



UNIVERSITAT DE BARCELONA

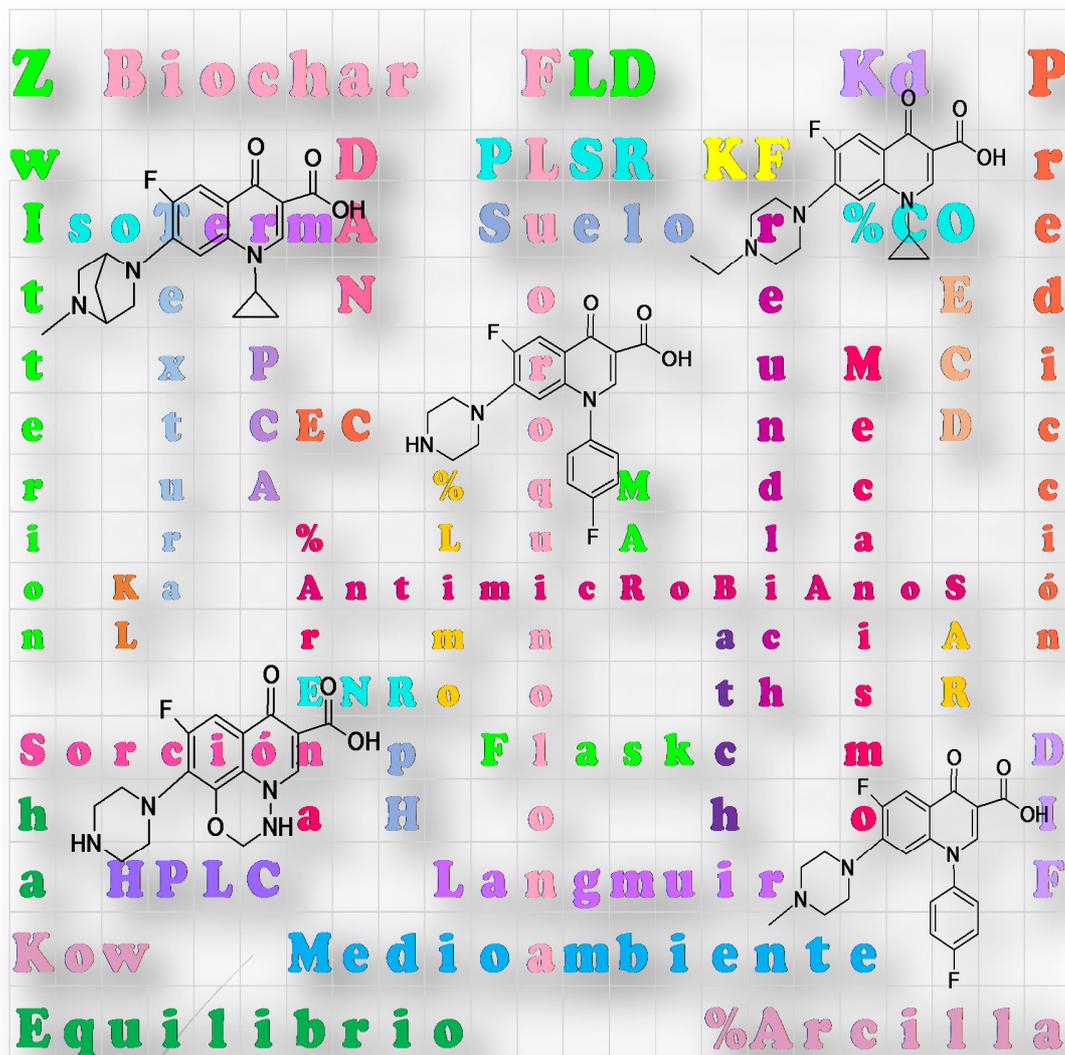
Sorción de quinolonas en suelos agrícolas

Gina Mabel Cárdenas Youngs

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

SORCIÓN DE QUINOLONAS EN SUELOS AGRÍCOLAS

Gina Mabel Cárdenas Youngs



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y QUÍMICA ANALÍTICA

Programa de doctorado:

Química Analítica i Medi Ambient

SORCIÓN DE QUINOLONAS EN SUELOS AGRÍCOLAS

Memoria presentada por Gina Mabel Cárdenas Youngs para
optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Gina Mabel Cárdenas Youngs

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. José Luis Beltrán Abadía, del
Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica de la facultad de
Química de la Universidad de Barcelona

El Dr. José Luis Beltrán Abadía, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Barcelona,

HACE CONSTAR,

Que el presente trabajo de investigación, titulado:

“SORCIÓN DE QUINOLONAS EN SUELOS AGRÍCOLAS”,

ha sido realizada bajo su dirección por la Sra. Gina Mabel Cárdenas Youngs en el citado Departamento para optar al título de Doctora por la Universidad de Barcelona.

Barcelona, septiembre de 2018

Dr. José Luis Beltrán Abadía

Beca doctoral otorgada por el Gobierno de la República de Panamá
SENACYT-2013- Convocatoria Excelencia Profesional para estudios de Doctorado



DEDICATORIA

Con mi más profundo amor y agradecimiento a ti Sofía, mi princesa, mi hermosa hija. Por tu paciencia y comprensión, a pesar de tu corta edad. Eres un pan de Dios... El mejor regalo que él pudo darme.

Fueron innumerables horas las que me alejé de ti, por dedicar tiempo a finalizar este trabajo. Has crecido escuchándome decir: no puedo, estoy ocupada con la tesis... Espero que el sacrificio de ambas haya valido la pena y que de ahora en adelante el futuro sea mejor, sobre todo para ti. Te amo. Te amo infinitamente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a muchas personas:

A mi papá, Agapito y a mi mamá, Nina, porque siempre están a mi lado. Tenazmente...Son padres número 1.

A mi esposo, Jorge, por su incansable soporte, en todos los sentidos...

A José Luis, mi tutor de tesis, por su paciencia y aportes significativos en la realización y culminación de este trabajo.

Y a todas las personas que de una u otra forma aportaron su granito de arena en el transcurso de esta historia.

Gracias.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE.....	IX
RESUMEN.....	i
ESTRUCTURA GENERAL.....	iii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Agentes antimicrobianos	3
1.1.1 Administración y uso de agentes antimicrobianos	6
1.1.2 Presencia de antimicrobianos en el medio ambiente	10
1.2 Fluoroquinolonas	12
1.2.1 Clasificación de las quinolonas	14
1.2.2 Aplicaciones de las fluoroquinolonas y aparición de resistencia	19
1.3 Fluoroquinolonas estudiadas.....	21
1.3.1 Presencia de fluoroquinolonas en el medio ambiente.....	25
1.4. Sorción en suelos	32
1.4.1 Suelo.....	32
1.4.2 Estructura y textura del suelo.....	40
1.5 Sorción	43
1.5.1 Factores que influyen en los procesos de sorción.....	45
1.5.2 Medida de la sorción.....	49
1.5.3 Isotermas y modelos de sorción	51
1.6 Biochar	57
1.6.2 Sorción en biochar.....	67
1.7 Constantes de disociación y coeficientes de distribución	69
1.7.1 Equilibrios ácido-base	70
1.7.2 Lipofilicidad y coeficiente de distribución.....	75
2. OBJETIVOS.....	83
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	87
3.1. Instrumentación	89

3.1.1 Cromatografía de líquidos.....	89
3.1.2 Otros instrumentos y equipos.....	90
3.2 Reactivos, disoluciones y materiales.....	91
3.2.1 Reactivos.....	91
3.2.2 Preparación de disoluciones estándar de fluoroquinolonas para la determinación de coeficientes de distribución octanol/agua.....	92
3.2.3 Suelos.....	92
3.2.4 Biochar.....	95
3.3 Metodología de trabajo.....	96
3.3.1 Determinación de fluoroquinolonas mediante HPLC-FL.....	96
3.3.2 Sorción de fluoroquinolonas en suelos.....	97
3.3.3 Sorción de fluoroquinolonas en biochar y mezclas suelo-biochar.....	98
3.3.4 Experimentos de estabilidad (“envejecimiento”).....	99
3.3.5 Estudio de coeficientes de distribución y constantes de disociación.....	100
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	101
4.1 Coeficientes de partición octanol/agua y constantes de disociación.....	103
4.2 Estudios de sorción en suelos.....	113
4.2.1 Establecimiento de los tiempos de equilibrios.....	113
4.2.2 Isotermas de sorción.....	116
4.2.3 Análisis multivariante de los datos de sorción.....	155
4.3 Estudios de sorción en biochar y mezclas suelo/biochar.....	174
4.3.1 Perfiles de sorción de la DAN y ENR en biochar en función del pH.....	176
4.3.2 Isotermas de DAN y ENR en suelos modificados con biochar.....	179
5. CONCLUSIONES.....	201
6. BIBLIOGRAFÍA.....	207

RESUMEN

Esta tesis trata sobre el estudio del comportamiento de sorción de un grupo de fluoroquinolonas (Danofloxacin DAN, Difloxacin DIF, Enrofloxacin ENR, Marbofloxacin MAR, Sarafloxacin SAR) en suelos agrícolas. Los suelos han sido elegidos de tal forma que poseen una amplia variedad de características físico-químicas, a fin de que el estudio sea representativo.

La parte experimental de la tesis ha consistido, por un lado, en la realización de estudios de sorción en suelos y en mezclas suelo/biochar, y, por otra parte, en la determinación de los coeficientes de partición octanol/agua y de las constantes de disociación a este grupo de fluoroquinolonas.

Para los estudios de sorción, primeramente, se han obtenido los perfiles cromatográficos de los suelos, a fin de asegurarnos de la ausencia de los analitos a investigar en cada una de las matrices. Seguidamente, se han determinado los tiempos necesarios para que la sorción en la fase suelo/agua llegue al equilibrio, luego de lo cual se procedió a obtener las isotermas de sorción para cada suelo, de un total de catorce, con cada fluoroquinolona, mediante el método de equilibrio en "batch" descrita en la prueba 106. Sorción-Desorción publicado por el OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). Una vez obtenidas las isotermas, se ajustaron las mismas a las ecuaciones de los modelos de Freundlich y Langmuir utilizando el análisis por mínimos cuadrados no lineales. Luego, con el fin de conseguir aquella isoterma que mejor describiera el comportamiento de sorción, se aplicó el software ISOT_CALC y la herramienta macro Solver de Microsoft Excell. En esta etapa, la mayoría de las isotermas fueron mejor definidas por el modelo de Freundlich, lo cual se ha determinado mediante el cálculo de la función Unitaria U de error cuadrático. Aquella isoterma que exhibía los menores valores en esta función, era la correspondiente al mejor ajuste.

De las isotermas, a partir de la relación entre las concentraciones en equilibrio del analito en la fase acuosa y en el suelo, fue posible calcular los coeficientes de sorción de

las fluoroquinolonas en cada suelo, a las concentraciones que nos interesaban. A partir de estos coeficientes y de las características fisicoquímicas de los suelos, nos fue posible correlacionar todas las variables, mediante la utilización del Análisis por Componentes Principales PCA y predecir el comportamiento de sorción de los analitos, a través del análisis de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales PLSR.

Del PCA es posible afirmar que el pH, la k_d , la capacidad de intercambio catiónico CEC y el contenido de materia orgánica OC, son las variables que más influyen en el comportamiento de sorción de las fluoroquinolonas en los suelos estudiados. Y los que menos influyen son los contenidos de arena, limo y arcilla.

En cuanto a los modelos de predicción PLSR, el que obtuvo el mejor coeficiente de correlación entre los valores experimentales y predichos ha sido el modelo de la ENR (0,989), seguido por el modelo de la MAR (0.9675), SAR (0.960), DIF (0.919) y, por último, DAN (0.905).

Los resultados obtenidos de los estudios de sorción en mezclas suelo/biochar nos permiten afirmar que la utilización de biochar como enmienda para suelos es viable para suelos tipo arenosos, con características similares a las del suelo estudiado, tanto con ENR, como con DAN. En cambio, un suelo franco-arcilloso-limoso no mejora su capacidad de sorción, si no, que se dio el caso en que la llega a desmejorar.

Tras aplicar un procedimiento similar al descrito para la obtención del mejor ajuste a las isothermas, se obtuvieron los coeficientes de partición octanol/agua y las constantes de disociación para las fluoroquinolonas estudiadas. Los resultados obtenidos nos indican que el orden de lipofilidad es $DIF > ENR > DAN > SAR > MAR > CIP$.

ESTRUCTURA GENERAL

Esta tesis consta de seis capítulos. El capítulo 1 que corresponde a la introducción, se divide a su vez en diferentes secciones, que contemplan temas como fluoroquinolonas, sorción en suelos, sorción en mezclas suelo biochar, coeficientes de distribución y constantes de disociación. Cada una de estas subsecciones intenta ayudar al lector a conocer los conceptos básicos claves en cada uno de esos temas, así como de ofrecerle información relevante que pueda ser de utilidad para profundizar en los mismos.

En el capítulo 2, se describen los objetivos que desarrollamos en esta tesis.

En la Parte Experimental, el capítulo 3, se describen paso a paso los experimentos realizados en el laboratorio, los reactivos y equipos utilizados, las condiciones de trabajo a través de los cuales obtuvimos los datos y los resultados, así como el tratamiento quimiométrico que ha sido aplicado a los datos obtenidos.

En el capítulo 4, Resultados y Discusión, se tratan de explicar los resultados obtenidos mediante aplicaciones quimiométricas, así como mediante su correspondencia con la literatura publicada relacionada a cada uno de los temas.

Seguidamente, encontraremos el capítulo 5, donde se plasman las conclusiones del trabajo realizado. Y, por último, el capítulo 6 contiene la infografía consultada.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACD LogD	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD
ACD LogP	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD
ADMET Predictor	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD/pKas
ADME-tox	Absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AEM	Agencia Europea de Medicamentos
ALOGPS	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD
ALOGPS 2.1	Programa comercial disponible para la estimación de valores de pKa
BC	Negro de carbón (black carbon)
Bio-Loom	Programas comerciales disponibles para la estimación de log P/logD
CIP	Ciprofloxacina
ChemDraw Prime	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD
Clog P	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD/pKas
CZE	Electroforesis de zona capilar
D	Coefficiente de partición aparente/Declaración/Coefficiente de distribución para sustancias ionizables
DAN	Danofloxacina
DDD	Dosis Diaria Definida (Defined Dosis Dairy)
DIF	Difloxacina
DOM	Materia Orgánica Disuelta
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dw	Peso seco (dry weight)
E	Envejecido
ENO	Enoxacina

ENR	Enrofloxacin
ECDC	Centro Europeo para la Prevenci3n y el Control de Enfermedades (European Centre for Disease Prevention and Control)
EDA	Donador Aceptor de Electrones (electron-donor acceptor)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
Epik	Programa comercial disponible para la estimaci3n de valores de pKa
ESP	Esparfloxacin
FL	Fluorescencia
FLE	Fleroxacin
GAT	Gatifloxacin
HSLogD	M3todo de alta velocidad para medir log D
IBI	International Biochar Initiative
Kd	Coefficiente de distribuci3n
K _F	Coefficiente de Freundlich, tambi3n llamado coeficiente de capacidad unitaria
K _L	Constante de Langmuir
Kow	Constante de distribuci3n entre octanol y agua Constante de disociaci3n entre agua/octanol de la especie neutra
KOWWIN-EPI Suite™	Programa comercial para la estimaci3n de log P/logD
LEV	Levofloxacin
LOD	L3mite de detecci3n (Limit of detection)
LOM	Lomefloxacin
LOQ	L3mite de cuantificaci3n (Limit of quantification)
LV's	Variables latentes
MAE	Error absoluto promedio
MAR	Marbofloxacin
Marvin	Programa comercial disponible para la estimaci3n de valores de pKa
Matlab 6.5	Software para el tratamiento de datos
MEEKC	Microemulsi3n electrocin3tica (microemulsion electro kinetic)

MS	Espectrometría de masas
Molinspiration Prop. Calculator	Programa comercial para la estimación de log P/logD
MOX	Moxifloxacina
N	Dimensión de la población de una medida
Nd	No detectado
NHA	Número de átomos no hidrógenos (Number of Nonhydrogen Atoms)
NHET	Número de heteroátomos (Number of Heteroatoms)
NLLS	Mínimos Cuadrados No Lineales (non-linear least squares)
NOM	Materia orgánica natural (natural organic matter)
NOR	Norfloxacina
NR	No Regulado
NROT	Número de enlaces rotatorios (Number of Rotatable Bonds)
No. CAS	Número de registro para la identificación numérica única de compuestos químicos
OECD	Organización para la cooperación y el Desarrollo Económico (Organisation for Economic Cooperation and Development)
OFL	Ofloxacina
OSIRIS Property	Programa comercial disponible para la estimación de
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PCA	Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)
PCM	Material carbonoso pirogénico (Pyrogenic Carbonaceous Material)
pKa DB	Programa comercial para la estimación de valores de pKa
pKalc	Programa comercial disponible para la estimación de valores de pKa (PALLAS System)

PLS	Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares)
PLSR	Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares Regression)
PLS Toolbox 3.5	Software para el tratamiento de los datos
PCU	Unidad de corrección de la población (population correction unit)
PrologP	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD
PrologD	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD
QikProp	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD/pKa
QSAR	Relaciones cuantitativas estructura-actividad (Quantitative Structure-Activity Relationship)
QSPR	Quantitative Structure-Property Relationship
RAM	Resistencias Antimicrobianas
RMS	Error cuadrático medio
RMSE	Raíz del Error Cuadrático Medio
RP	Fase reversa, Recién Preparado
SAR	Sarafloxacin
SLIPPER-2001	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD
SolvStat	Solver Estadístico. Herramienta Solver de Microsoft Excel
SPARC	Programa comercial disponible para la estimación de log P/logD/pKa
Sw	Solubilidad en agua
Pe	Permeabilidad efectiva
U	Función objetivo para el cálculo
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (United States Department of Agriculture)
VALLME	Microextracción líquido-líquido asistida por vortex
ZF	Sistema de zonas fluidicas

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Agentes antimicrobianos

Los antibióticos son sustancias químicas que matan organismos patógenos como bacterias, hongos y protozoos o inhiben su crecimiento y/o proliferación (1-2).

A pesar de que muchos autores utilizan el término antibiótico para referirse únicamente a sustancias químicas de origen natural, que actúan contra la proliferación de bacterias, en esta tesis utilizaremos indistintamente, los términos antibiótico, antimicrobiano o antibacteriano, como sinónimos, para referirnos tanto a fármacos naturales como sintéticos que se utilizan con este fin.

El descubrimiento de los antibióticos data del año 1928 cuando Alexander Fleming descubrió la penicilina (3). Sin embargo, el primer antibiótico utilizado para propósitos generales en la medicina moderna fue el prontosil o sulfonamida (figura 1.1), descubierto en el año 1932 por Gerhard Domagk, desarrollado por los laboratorios Bayer y finalmente lanzado al mercado en el año 1935, por la misma compañía (4).

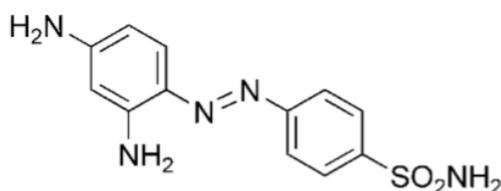


Figura 1.1 Estructura química del Prontosil

Actualmente, la variedad de antibióticos disponibles es muy amplia. Para clasificarlos pueden tomarse en cuenta diferentes factores como su mecanismo de acción, su estructura química, su espectro de actividad, y la relación entre actividad y concentración, por ejemplo. Enseguida daremos algunos ejemplos de clasificación.

Dependiendo de su modo de acción, los agentes antimicrobianos pueden ser clasificados en dos tipos: *bactericidas*, cuando matan a las bacterias sobre las que actúan, y *bacteriostáticos*, cuando detienen la multiplicación de las bacterias (2).

Atendiendo a su origen, los antibióticos pueden clasificarse como (5):

- *Naturales*: procedentes de microorganismos como hongos y bacterias.
- *Semisintéticos*: compuestos naturales químicamente modificados.
- *Sintéticos*: productos de origen antropogénico.

La tabla 1.1 muestra los antimicrobianos más ampliamente empleados según sean naturales o sintéticos.

Tabla 1.1. Antibióticos más utilizados

Naturales	Sintéticos
Aminoglicósidos	Nitroimidazoles
β -lactámicos	Nitrofuranos
Macrólidos	Quinolonas
Polienos	Sulfonamidas
Polipéptidos	
Tetraciclinas	

Y en la siguiente tabla se indican algunos antibióticos clasificados según su mecanismo de acción (6).

Tabla 1.2. Clasificación de los antimicrobianos según su mecanismo de acción.

Mecanismo de Acción	Grupo	Ejemplos
Inhibición de la síntesis de ADN	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina, Norfloxacina
	Rifamicina	Rifampicina
	Nitroimidazol	Metronidazol
Inhibición de la síntesis de proteínas	Aminoglicósidos	Estreptomicina, kanamicina
	Tetraciclinas	Oxitetraciclina, doxiciclina
	Macrólidos	Eritromicina, claritromicina
	Lincosamidas	Lincomicina, clindamicina
	Amfenicoles	Cloranfenicol
	Otros	Ácido fusídico
Inhibición de la síntesis de metabolitos intermediarios	Sulfonamidas	Sulfadiazina, sulfametazina
	Trimetoprim	Trimetoprim
Inhibición de la integridad de la membrana citoplasmática	Polipéptidos	Polimixina B, colistina, nisina
	Polienos antimicóticos	Nistatina, natamicina, anfotericina B
	Ionóforos	Calcimicina, monensina, salinomicina
Inhibición / disruptores de la síntesis de la pared celular	B-lactámicos	Penicilina, cefalosporinas, cefamicina, monobactámicos, inhibidor de la β -lactamasa, ampicilina
	Glicopéptidos	Vancomicina, teicoplanina, daptomicina
	Otros	Bacitracina, fosfomicina, cicloserina

En el siguiente apartado veremos cómo se usan y administran los antimicrobianos.

1.1.1 Administración y uso de agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos pueden emplearse en medicina humana, veterinaria, agricultura y en la industria.

En medicina veterinaria se administran a través de piensos medicados, inyecciones y aplicaciones externas, y pueden utilizarse con diversos propósitos, como los que se presentan a continuación (7-8):

- *Prevención de enfermedades de origen bacteriano* mediante tratamiento *metafiláctico*, que consiste en controlar ciertas variables clínicas en un determinado grupo de animales, hasta que una de ellas, por ejemplo, la temperatura, aumenta por encima de determinado valor límite (fijado de antemano). En este caso, todo el lote de animales es tratado para evitar un brote de la enfermedad.
- *Tratamiento de enfermedades de origen bacteriano* a través del tratamiento *terapéutico*, que se refiere al tratamiento de enfermedades infecciosas diagnosticadas. Las dosis terapéuticas administradas están estrictamente relacionadas con las especies y el estado de la enfermedad, y suelen ser altas durante períodos cortos de tiempo.
- *Control de enfermedades de origen bacteriano* empleando el tratamiento *profiláctico* que no es más que la utilización del medicamento para prevenir la enfermedad en determinadas situaciones, como, por ejemplo, antes de intervenciones quirúrgicas, transporte de ganado o mezcla de animales de diferentes rebaños (9-10).
- *Promoción del crecimiento*. En este caso, los antibióticos se añaden a los piensos para animales con el fin de mejorar la eficiencia de la digestión de los alimentos (11-12), por lo que son llamados *potenciadores digestivos*. La aplicación de antimicrobianos a niveles subterapéuticos (3-220 mg Kg⁻¹ alimento) durante largos períodos de tiempo ayuda a que el animal crezca más rápido y disminuye su susceptibilidad a las enfermedades relacionadas con el estrés (13). Esta práctica puede tener incidencia en el aumento de la resistencia bacteriana. Por esto, en la Unión Europea (UE) el uso de estos agentes para promover el

crecimiento está prohibido desde el año 2006 (14). Sin embargo, en otros países sigue siendo una práctica habitual (15).

Por otro lado, en medicina humana, los antimicrobianos se administran a través de inyecciones, soluciones y grageas orales, así como mediante aplicaciones externas y nebulizadores. Se utilizan para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas (16).

En medicina vegetal los antimicrobianos, principalmente estreptomina y oxitetraciclina, se emplean en el cuidado de árboles frutales, vegetales y plantas ornamentales (por ejemplo, orquídeas), para la prevención, tratamiento y control de bacterias en estos cultivos (13, 17). Su aplicación se realiza mediante nebulización del medicamento.

Finalmente, como ejemplos de la utilización de antimicrobianos en medios industriales, podemos indicar su aplicación en oleoductos (para evitar el crecimiento de algas u otros microorganismos), o en plantas de procesado de alimentos (18).

La figura 1.2 muestra el consumo de antibacterianos para uso sistémico en 30 países de la Unión Europea/Espacio Económico Europeo (UE/EEA), para el año 2016, expresada como Dosis Diaria Definida (DDD, Defined Dosis Dairy) por cada 1000 habitantes y día (19).

Podemos observar que los antimicrobianos más empleados son los β -lactamas y penicilinas (20.18 DDD/1000 hab/día), seguidas de los macrólidos, las licosamidas y las estreptograminas (8.25 DDD/1000hab/día). A continuación, las quinolonas (4.75 DDD/1000hab/día), seguidas por las tetraciclinas (2.52 DDD/1000hab/día) y por último las sulfonamidas y trimetoprimas (1.49 DDD/1000hab/día).

En cuanto al consumo de antibióticos en veterinaria, el principal indicador que se emplea para expresar las ventas es la cantidad de ingrediente activo (en mg) por unidad de corrección de población (PCU, en función del número de animales y su peso): mg/PCU. A pesar de la disponibilidad de medicamentos, según datos publicados por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), alrededor de 25,000 pacientes mueren cada año en la Unión Europea, debido a una infección causada por bacterias multirresistentes, con un impacto de sobre coste sanitario de 1,500 millones de euros (20).

1. Introducción.

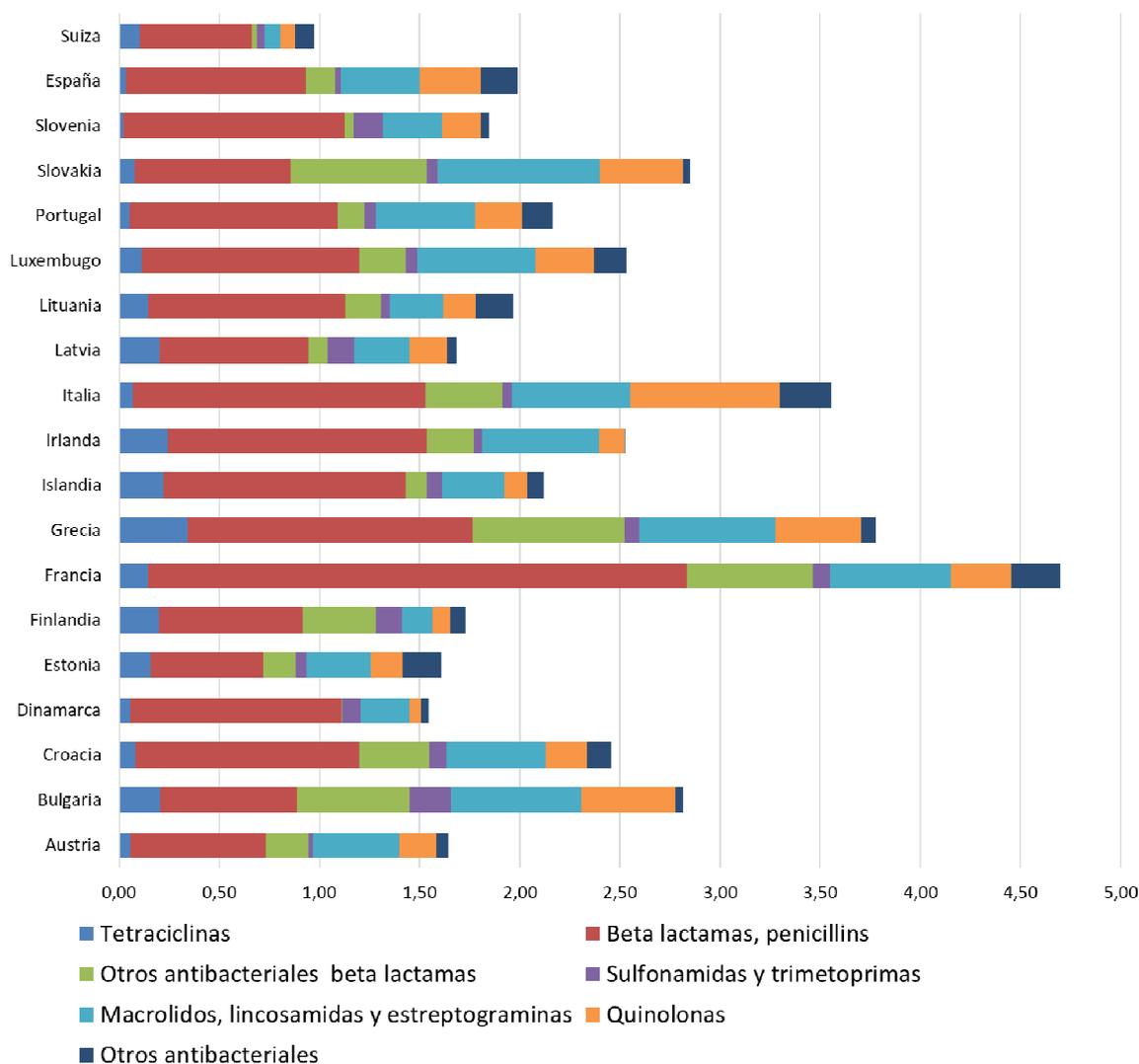


Figura 1.2. Consumo de antimicrobianos por país de la Unión Europea/Área Económica Europea EU/EEA para el año 2016. El consumo se expresa como DDD (dosis diaria definida por 1000 habitantes y día) (19)

En la Figura 1.3 se indican los datos correspondientes a un grupo de 26 países del espacio EU/EEA, los cuales cubren aproximadamente el 95% de la población animal destinada al consumo en la Unión Europea. De las ventas totales, las mayores proporciones, expresadas como mg/PCU, se registraron para las tetraciclinas (37%), penicilinas (22%) y sulfonamidas (10%) (21).

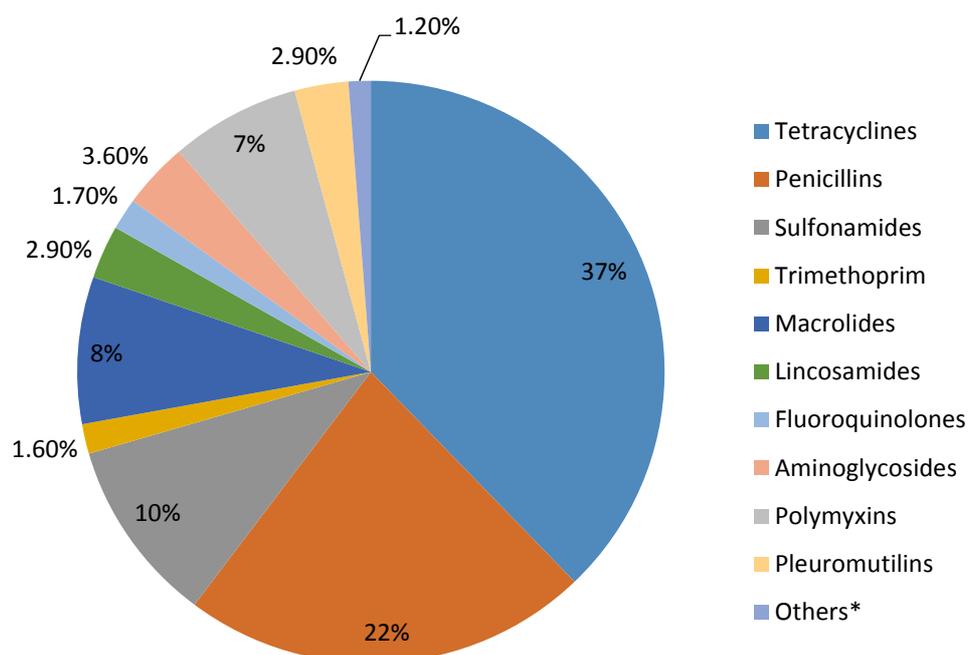


Figura 1.3. Ventas de las diferentes clases de antimicrobianos (porcentajes en base a mg/PCU) para 26 países del área UE/EEA (19)

A pesar de que el uso de antimicrobianos en medicina veterinaria, principalmente en la producción de ganado ovino y bovino, acuicultura y avicultura, ha permitido aumentar de forma importante la producción de alimentos de origen animal, también presenta inconvenientes como:

- La presencia de residuos de estos fármacos en los alimentos (22).
- Presencia de residuos de fármacos en aguas destinadas para consumo humano (23).
- Impactos ecológicos debido a prácticas inadecuadas de medicación (23).
- Aparición de resistencias a antibióticos por el mal uso de estos (19, 24-27).
- Difusión generalizada al medioambiente, provocando la afectación de sistemas acuáticos y terrestres (28).

Por tanto, el empleo de antimicrobianos en cualquiera ámbito tiene como consecuencia su posible dispersión en el medio ambiente.

1.1.2 Presencia de antimicrobianos en el medio ambiente

Debido a la gran cantidad y a la amplia variedad de antimicrobianos utilizados en diferentes aplicaciones, estos han alcanzado diferentes compartimientos ambientales. Por ejemplo, muchos estudios han confirmado la presencia de trazas de antimicrobianos (penicilinas, tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos y quinolonas) en suelos, sedimentos, aguas subterráneas, superficiales y biota (29-54).

Existen diversas vías de entrada de agentes antimicrobianos al medio ambiente, tal como se indica en la Figura 1.4.



Figura 1.4. Vías de entrada y posible distribución de los antimicrobianos en el medio ambiente. Adaptado de (51)

En la figura anterior pueden observarse diversos ejemplos sobre cómo los antibióticos pueden incorporarse a los diferentes compartimientos medioambientales una vez se utilicen en medicina humana, veterinaria y vegetal, desde sus lugares de fabricación (44-45, 48-49, 51-55) y a través de la inadecuada disposición de aquellos fármacos que no han sido utilizados (56).

A continuación, se indican las características de las principales vías de entrada:

- **Medicina veterinaria.** Al tratar animales con antibióticos, estos son excretados en forma de metabolitos secundarios o como el mismo compuesto original (13) en diferentes proporciones, convirtiéndose esta vía como una de las principales fuentes de contaminación (57). Cuando el estiércol de los animales medicados se utiliza para fertilizar un suelo agrícola, entran a éste los agentes antimicrobianos y sus metabolitos (58), que, como cualquier fármaco, pueden poseer actividad biológica (59), dando como resultado el desequilibrio natural mediante el desarrollo de resistencias bacterianas en el medio ambiente (54, 60).
- **Medicina humana.** Los antibióticos, como sus metabolitos, provenientes de hospitales y viviendas particulares, son trasladados a través de la red de alcantarillados de aguas residuales hasta la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) correspondiente, donde no son completamente eliminados (61-63). La presencia de antimicrobianos en los efluentes y en los lodos procedentes de las depuradoras nos confirma este escenario (56, 64-67). Incluso, existe la posibilidad de que estos compuestos puedan llegar a las aguas destinadas al consumo humano (68-69).
- **Medicina Vegetal.** Según datos del año 1995, en Estados Unidos de América, se aplicaron aproximadamente 11,3 Tn de estreptomina y 6,2 Tn de oxitetraciclina a árboles frutales en los principales Estados productores de este tipo de árboles. Los antibióticos se aplicaron a los cultivos de manzana (20%), pera (35 a 40%) y durazno (4%). Aunque la diversidad y cantidad de antibióticos usados para el control de enfermedades en plantas es poco significativo (menos del 0,1% del total en Estados Unidos), se han desarrollado agentes patógenos de plantas resistentes a los antibióticos (70).
- **Residuos de la industria farmacéutica.** Generalmente estas industrias tienen implementados procesos de producción limpia y gestión de residuos (71) con la finalidad de reducir el riesgo de pérdidas de materias primas y/o productos, por lo que la inserción de fármacos al medio ambiente desde estos focos suele estar disminuida.

La incorporación de antibióticos y/o de sus metabolitos secundarios o productos de degradación al medio ambiente a través de las diferentes vías de entrada puede inducir a diversas consecuencias. Por ejemplo, a raíz de sus diferentes utilidades, ya sea en el

tratamiento de animales para consumo humano, por ejemplo, o en la utilización del agua residual utilizada en las explotaciones agrícolas puede llevar a la presencia de residuos de fármacos antibacterianos en alimentos, como vegetales (49, 72), agua natural (29, 52), agua de consumo (52), jalea real (46) y huevos de gallina (73-74), entre otros.

Ha sido, también demostrado, que su presencia y/o permanencia en el medio ambiente provocan alteraciones en el funcionamiento de las comunidades de microorganismos residentes en los medios contaminados (57, 75-77) y favorece la aparición y proliferación de bacterias resistentes (78).

La OMS considera que las resistencias antimicrobianas (RAM) son un grave problema de salud que afecta a diferentes sectores y ha propuesto implantar una estrategia global con la finalidad de minimizarlo (79). España, a través de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), ha publicado un plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de RAM, y reducir sus consecuencias sobre la salud de los animales y el hombre (80).

A continuación, veremos el grupo de antimicrobianos correspondientes a los fármacos estudiados en este trabajo, las fluoroquinolonas.

1.2 Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son antibióticos de origen sintético (81). Debido a su amplio espectro de acción, en la actualidad se utilizan considerablemente en el tratamiento y prevención de enfermedades causadas por bacterias gram positivas, Gram negativas y anaerobias.

La primera quinolona utilizada para el tratamiento de enfermedades infecciosas fue el ácido nalidíxico, sintetizado en el año 1962 a partir de la cloroquina (82-84) y utilizada únicamente para infecciones de las vías urinarias. A finales de la década de los 1980, se introduce un átomo de flúor en la posición 6 de la estructura 4-quinolona de estos fármacos. (Figura 1.5). Esto revolucionó su utilización de forma amplia y eficaz, ya que las fluoroquinolonas resultantes (también llamadas quinolonas de segunda generación) presentaban mejores características que las anteriores (84).

En la década de 1990 fueron sintetizados varios componentes de esta familia, con mejoras importantes en su biodisponibilidad, vida media y espectro de actividad, específicamente sobre el *Streptococcus pneumoniae*. Éstas fueron clasificadas como quinolonas de tercera generación.

Hacia el año 2000 aparecen nuevas moléculas, también conocidas como quinolonas de cuarta generación, que incluyen en su espectro a los gérmenes anaerobios (85).

Las moléculas de estos fármacos contienen dos anillos de seis eslabones en su estructura. Si la estructura general contiene un carbono en la posición 8, con un N en la posición 1, tenemos una **quinolona** verdadera, y si por otro lado contiene un nitrógeno en la posición 1 y otro en la posición 8, tenemos un sistema cíclico denominado como **naftiridona** (Figura 1.5) (50, 84-85). Sin embargo, ambas estructuras (quinolona y naftiridona), son consideradas como descriptoras de la clase "agentes antibacterianos de quinolona" (82, 84-85).

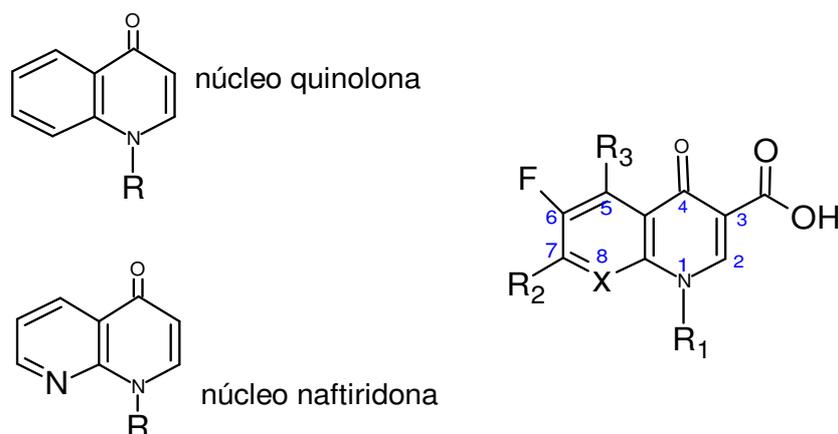


Figura 1.5. Núcleos quinolona y naftiridona y estructura básica de las quinolonas

Las fluoroquinolonas son moléculas pequeñas, con masas moleculares entre 300 y 500 Da. Son sensibles a la luz, por lo que deben ser protegidos de ésta durante el almacenamiento a largo plazo para evitar la pérdida de actividad (86).

En la figura 1.5, el anillo tipo 4-piridinona del lado derecho es necesario para la actividad antibacteriana. Sin embargo, no es el único sustituyente que le confiere estas

características a las quinolonas (87-88). Otros, ocupan las siguientes posiciones, según la numeración indicada en la figura 1.5:

- *Posición 1:* Para que la quinolona presente actividad antibacteriana, la posición N-1 requiere un sustituyente (87). Algunos ejemplos de este sustituyente son el etilo (norfloxacin, pefloxacin, lomefloxacin), el fluoroetilo (floxacin) o el ciclopropilo (ciprofloxacin).
- *Posición 2:* Las quinolonas contienen un H en el C-2. Se ha demostrado que la sustitución de este H disminuye las propiedades antibacterianas del fármaco.
- *Posición 3:* el grupo ácido carboxílico como cadena lateral en C-3 es esencial para la actividad antibacteriana de estos fármacos (50).
- *Posición 4:* Todas las quinolonas tienen un oxígeno cetona en esta posición (50), también esencial para su actividad antibacteriana (87).
- *Posición 6:* La naturaleza del sustituyente en el C-6 tiene un gran impacto sobre la actividad inhibitoria de la ADN-girasa y la penetración de la célula. Este sustituyente puede ser H, Cl, F, NO₂, NH₂, CN, CH₃SCH₃, COCH₃. El flúor en esta posición se encuentra en esencialmente todos los agentes modernos; es por este sustituyente que la clase se refiere a menudo como las *fluoroquinolonas*.
- *Posición 8:* Las variaciones más comunes en la posición C-8 son un átomo de hidrógeno o de nitrógeno (núcleo naftiridina). Aunque un grupo compacto, liofílico (F, F₃, Cl, OCH₃) aumenta la actividad antibacteriana.

En el siguiente apartado, veremos la clasificación de estos fármacos.

1.2.1 Clasificación de las quinolonas

Las quinolonas pueden clasificarse en función de su estructura como mono, bi, tri o tetracíclica, o bien según su espectro antibacteriano y propiedades farmacocinéticas (81, 88-91). Según este último caso podemos distinguir entre las quinolonas de:

- **Primera generación:** A excepción de la flumequina, no presentan el sustituyente Flúor en la posición 6. Por otra parte, su espectro de actividad es limitado, siendo sólo útiles en infecciones del tracto urinario.

- **Segunda generación:** se caracterizan por la presencia de un sustituyente Flúor en la posición 6, y de piperazina o metil piperazina en la posición 7. La actividad biológica es más amplia que las de primera generación. Son útiles en infecciones graves osteoarticulares, digestivas, de tejidos blandos, respiratorias y de transmisión sexual.
- **Tercera generación:** se caracterizan por la presencia de grupos cíclicos aminados en C7, junto con la presencia de sustituyentes en las posiciones C5 y C8. Algunas de ellas presentan leve actividad sobre bacterias anaerobias.
- **Cuarta generación:** presentan una actividad extendida contra bacterias G+, G- y anaerobias.

La siguiente tabla muestra las principales características distintivas de las diferentes generaciones de quinolonas.

A continuación, comentaremos dos de las propiedades fisicoquímicas más relevantes de las fluoroquinolonas, pues son las que las distinguen de sus demás congéneres. Se trata de la solubilidad y su capacidad de complejación.

Tabla 1.3. Características de las diferentes generaciones de quinolonas según su espectro antibacteriano y sus propiedades farmacocinéticas (91-94)

Generación de quinolona	Características principales
Primera	Actividad contra bacterias Gram negativas Vida media corta Baja concentración en suero y tejidos Infecciones del tracto urinario no complejas Administración oral
Segunda	Clase I (enoxacina, norfloxacin, lomefloxacin) Actividad mejorada contra bacterias Gram negativas Enlace proteína (50%) Vida media más larga que la primera generación Concentraciones moderadas en suero y tejidos Infecciones en el tracto urinario complicadas y no complicadas Administración oral
	Clase II (ofloxacin, ciprofloxacin) Actividad mejorada contra bacterias Gram negativas Patógenos atípicos, Pseudomonas aeruginosa (ciprofloxacin) Enlace proteína (20%-50%) Vida media moderada a larga Concentraciones más altas en suero y tejidos comparadas con la Clase I Infecciones urinarias complicadas, gastroenteritis, prostatitis, infecciones nosocomiales Administración oral e intravenosa
Tercera	Actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas Perfil farmacocinético similar a aquel de la segunda generación (Clase II) Indicaciones y modo de administración similar. Considerados para neumonía adquirida en pacientes hospitalizados.
Cuarta	Actividad extendida contra bacterias Gram negativas y Gram positivas Actividad contra anaerobios y contra bacterias atípicas Administración oral e intravenosa Considerados para el tratamiento de infecciones intraabdominales

Solubilidad

En general, la solubilidad de un fármaco es un parámetro de gran importancia para su administración intravenosa.

La mayoría de las fluoroquinolonas modernas son de carácter zwitteriónico, debido a la presencia de un grupo carboxílico en la posición 3 y una amina, generalmente un anillo piperazinil básico u otro N-heterocíclico en la posición 7. A pH bajo, tanto la amina como el ácido carboxílico están protonados, dando a la molécula una carga total positiva. Contrariamente, a pH alto, la amina está en la forma de base libre, mientras que el grupo carboxílico existe como un anión carboxilato, proveyendo una carga neta negativa. Debido a esto, las quinolonas tienden a ser más solubles en agua a pH ácido o básico, con solubilidad mínima a valores de pH intermedios entre el pK_{a1} y el pK_{a2} (92).

El empaquetamiento cristalino de las quinolonas, en el cual el grupo aromático está apilado, también contribuye a que la solubilidad en agua disminuya. Poseen puntos de ebullición muy altos, generalmente $>200^{\circ}\text{C}$, lo que indica que sus formas cristalinas son muy estables. Se han medido solubilidades extremadamente bajas para algunas quinolonas. La tosufloxacina, por ejemplo, presenta una solubilidad en agua de 0.008 mg mL^{-1} a pH fisiológico (92).

Formación de complejos con iones metálicos di- y trivalentes

Las quinolonas tienen potencial para formar complejos con iones de metales de transición, como el cobre, plomo, zinc y magnesio (86).

Como sucede con otros medicamentos, los antiácidos y ciertos suplementos minerales disminuyen su absorción y biodisponibilidad. Esto es debido a la formación de complejos con iones metales divalentes y trivalentes (95). La estabilidad de los complejos formados varía con el ión metálico, siguiendo el orden: $\text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Fe}^{3+} < \text{Al}^{3+}$ (92).

Las quinolonas se enlazan a estos iones formando complejos, en los cuales pueden actuar como monodentado, bidentado y ligando puente, debido a sus grupos funcionales (92):

- Una función ácido carboxílico en la posición 3 para un enlace bidentado.
- En la mayoría de los casos un anillo básico piperazinil u otro N heterocíclico en la posición 7 para un enlace monodentado.
- Un átomo de oxígeno del carbonilo en la posición 4 para un ligando puente.

1. Introducción.

En los complejos poliméricos en estado sólido, son posibles múltiples modos de coordinación. En la siguiente ilustración pueden observarse los diferentes modos de coordinación de las quinolonas.

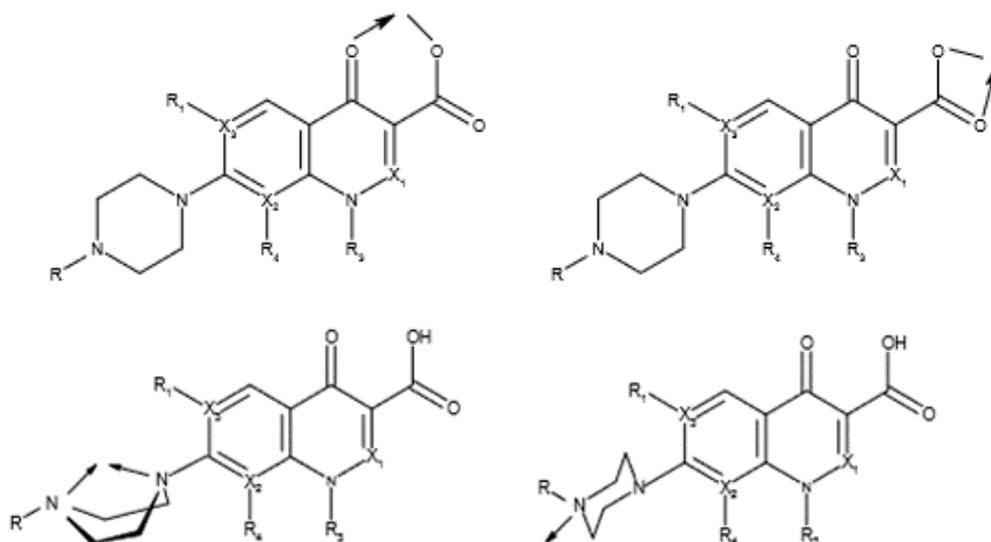


Figura 1.6. Principales modos de coordinación de las quinolonas (92)

En la siguiente figura se muestra la estructura general de un complejo metal: quinolona 1:2.

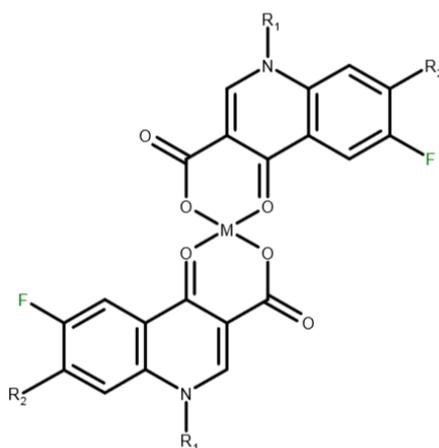


Figura 1.7. Estructura general de un complejo quinolona 1:2 (metal:ligando) con cationes divalentes (92)

Por lo anterior, podemos señalar que la interacción con iones metálicos tiene consecuencias importantes para la solubilidad, farmacocinética y biodisponibilidad de las

quinolonas, así también como en el mecanismo de acción de estos agentes bactericidas (92).

En cuanto a su mecanismo de actuación frente a los microorganismos, las quinolonas inhiben rápidamente la síntesis del ADN, promoviendo la escisión del ADN bacteriano en los complejos ADN-Enzima de la ADN Girasa y la Topoisomerasa Tipo IV (96-99). Penetran la pared celular a través de porinas (en el caso de bacterias Gram negativas) para inhibir la replicación bacteriana al interactuar con dos enzimas, el ADN girasa (Topoisomerasa tipo II) y la Topoisomerasa tipo IV. Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN, por lo que, al inhibirse su acción, se provoca la muerte de la célula (100-106).

Por regla general, la actividad bacteriana Gram negativa se correlaciona a la inhibición del ADN girasa, mientras que la actividad bacteriana Gram positiva corresponde a la inhibición del ADN topoisomerasa tipo IV (89).

A continuación, veremos qué enfermedades son susceptibles para el tratamiento con fluoroquinolonas.

1.2.2 Aplicaciones de las fluoroquinolonas y aparición de resistencia

Desde sus inicios como agentes selectivos Gramnegativos limitados al tratamiento de la infección del tracto urinario, su aplicación se ha ampliado a infecciones sistémicas causadas por patógenos G+ y G-, en zonas que van desde la piel o articulaciones hasta el tracto respiratorio o digestivo, entre otros. Algunos agentes antimicrobianos de más reciente aparición incorporan actividad contra patógenos anaeróbicos, haciéndolos útiles en las infecciones quirúrgicas y ginecológicas.

Así, hoy en día, las quinolonas tienen los siguientes usos (96):

- Infecciones del tracto urinario y prostatitis.
- Enfermedades de transmisión sexual.
- Tratamiento de infecciones respiratorias.
- Cirugía, obstetricia y ginecología.
- Tratamiento de meningitis bacteriana.

- Pacientes inmunocomprometidos.
- Infecciones óseas (osteomielitis).
- Infecciones de la piel y tejidos blandos.

Por otro lado, y como ha sucedido con otros fármacos, se han detectado resistencias a algunas quinolonas. Las tasas de resistencia frente a las quinolonas presentan amplias variaciones, que dependen de las especies bacterianas, los entornos clínicos, el origen de las cepas, las ubicaciones geográficas o el patrón de uso (88, 107-109).

En términos generales, la resistencia es más frecuente en los países desarrollados que en zonas en desarrollo, debido a su uso veterinario, en particular entre los animales destinados al consumo (109-110).

Las primeras cepas de resistencia a quinolonas se detectaron en microorganismos que son inherentemente menos susceptibles, tales como *Estafilococos* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, la reducción de la susceptibilidad o la resistencia se ha ampliado recientemente para *Escherichia Coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Streptococcus pneumoniae* (111).

Según la EFSA y ECDC Scientific Report 2015 (112), se ha observado en países de la Unión Europea resistencia a las fluoroquinolonas, en particular para la ciprofloxacina y el ácido nalidíxico. Para ambos antibióticos se observaron resistencias en aislamientos de *Campylobacter* de aves de corral, carne de pollo, cerdos y ganado. Por otro lado, también se presentó resistencia a la ciprofloxacina en serotipos de *Salmonella* (Kentucky e Infantis).

Los mecanismos principales de resistencia a quinolonas son la mutación cromosomal, la reducción de la concentración intracelular de quinolonas y los genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos. El mecanismo común a todas las fluoroquinolonas ocurre por mutación cromosomal en los genes que codifican para el ADN girasa (las subunidades GyrA y GyrB) y la topoisomerasa IV (las dos subunidades ParC y las dos ParE), disminuyendo la afinidad del fármaco por los sitios de enlace sobre las enzimas y haciendo al fármaco un inhibidor menos efectivo (110). Por esto se recomienda prescribirlas racionalmente y así evitar en lo posible la aparición de resistencias.

Para minimizar los riesgos de aparición de resistencia a las Fluoroquinolonas, se ha sugerido (113):

- Administrar una dosis adecuada.

- Evitar la administración concomitante de fármacos que contienen iones metálicos (p.e. antiácidos con aluminio o magnesio).
- Utilizar combinaciones de antibióticos, cuando fuera necesario.
- Los pacientes hospitalizados no deberían recibir terapias prolongadas (>2 a 4 semanas).
- No utilizar estos agentes para tratar infecciones triviales, o cuando el éxito terapéutico sea poco probable.

De la amplia variedad de fluoroquinolonas existentes, a continuación, veremos cuáles han sido objeto de este estudio.

1.3 Fluoroquinolonas estudiadas

En la Figura 1.8 se presentan las estructuras de las fluoroquinolonas estudiadas en este trabajo: danofloxacin (DAN), difloxacin (DIF), enrofloxacin (ENR), marbofloxacin (MAR) y sarafloxacin (SAR).

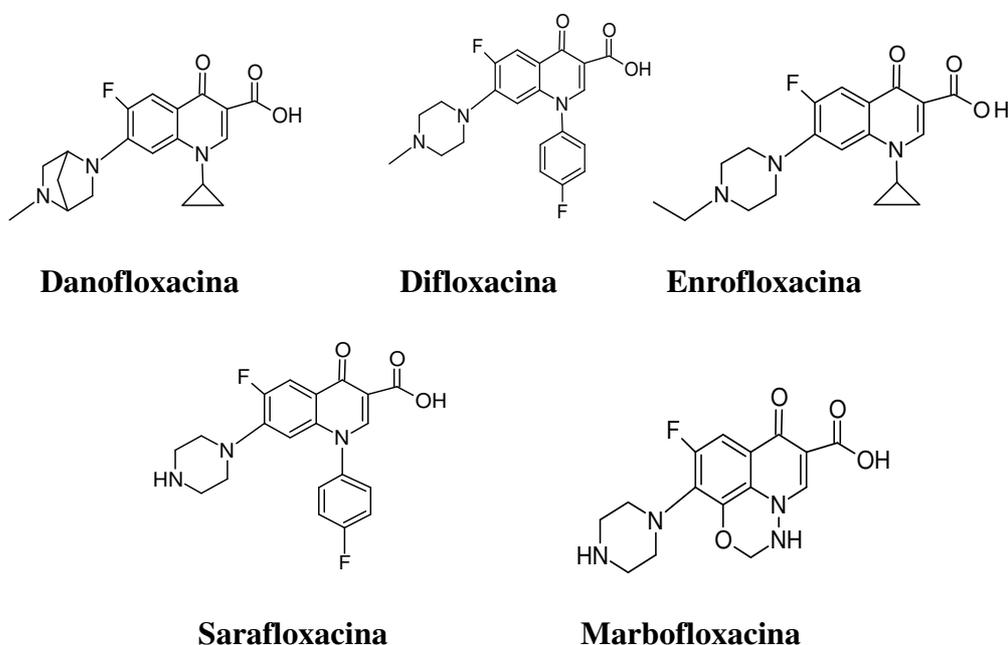


Figura 1.8. Estructura de las fluoroquinolonas estudiadas

La tabla 1.4 resume las propiedades fisicoquímicas de este grupo de sustancias.

Tabla. 1.4. Propiedades fisicoquímicas de las fluoroquinolonas estudiadas (114-115)

Fluoroquinolona	Danofloxacin	Difloxacin	Enrofloxacin	Marbofloxacin	Sarafloxacin
No. CAS	112398-08-0	91296-86-5	93106-60-6	115550-35-1	91296-87-6
Fórmula Empírica (Notación Hill)	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃
Peso Molecular (Da)	357,38	399,39	359,39	362,36	385,36
Nombre	1-Ciclopropil-6-fluoro-7-[(1S,4S)-5-metil-2,5-diazabicyclo [2.2.1]hepta-2-il]-4-oxo-1,4-dihidro-3-ácido quinolona carboxílico. Advocin ^a	6-Fluoro-1-(4-fluorofenil)-1,4-dihidro-7-(4-metilpiperazino)-4-oxo-3-ácido quinolona carboxílico hidrocloreuro	1-Ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidro-3-ácido quinolona carboxílico. Baytril ^a	9-Fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metilpiperazino)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3-ij][1,2,4]benzoxadiazina-6-ácido carboxílico. Zeniquin ^a	6-Fluoro-1-(4-fluorofenil)-4-oxo-7-(1-piperazinil)-1,4-dihidro-3-ácido quinolona carboxílico
Punto de Fusión	268-272 °C	>275 °C	219-223 °C	268-269°C	323,19 °C (Predicho)
Punto de Ebullición ^(b)	~569,3 °C a 760 mmHg	595,5 °C a 760 mmHg	560,46 °C a 760 mmHg		~621,4 °C a 760 mmHg
Solubilidad	soluble en agua 172-205 g/L	Clorhidrato soluble en agua (5 mg/ml), DMSO, y metanol	Ligeramente soluble en agua	DMSO 2 mg/mL; Agua <1 mg/mL	DMSO (<1 mg/ml a 25 °C), metanol, ácido clorhídrico 0,1N (25 mg/ml), y etanol (<1 mg/ml a 25 °C). Insoluble en agua
Estado físico	Sólido	Sólido	Sólido	Sólido	Sólido

^a: Nombre comercial^b: Valor de predicción mediante software (115)

En la siguiente tabla se indica el año de introducción de las fluoroquinolonas estudiadas, así como las empresas responsables de su desarrollo y comercialización.

Tabla 1.5. Introducción de las quinolonas DAN, DIF, ENR, SAR y MAR (110)

Fluoroquinolona	Año de comercialización	Desarrollada por
Danofloxacin	1991	Pfizer
Difloxacin	1996	Fort Dodge
Enrofloxacin	1989	Bayer Corporation
Sarafloxacin	1994	Abbott/Fort Dodge
Marbofloxacin	1995	Vetoquinol/Pfizer

En la tabla 1.6 se indican las principales aplicaciones de las fluoroquinolonas estudiadas.

1. Introducción.

Tabla 1.6. Principales usos de los antibióticos estudiados (114)

	DAN	DIF	ENR	MAR	SAR
Pavos	-	Infecciones del sistema respiratorio	-	-	Enfermedades del sistema urinario
Perros	-	Infecciones de la piel y tracto urinario	Infecciones bacterianas de los tractos digestivo, respiratorio y urogenital, infecciones de la piel y otitis externa	Infecciones de la piel, del sistema respiratorio, glándulas mamarias, tracto urinario	-
Ganado vacuno	Enfermedades respiratorias	Infecciones del sistema respiratorio	Infecciones del aparato respiratorio y digestivo	-	-
Gallinas	Enfermedades respiratorias	Infecciones del sistema respiratorio	-	-	Enfermedades del sistema urinario
Ganado porcino	Enfermedades respiratorias	Infecciones del sistema respiratorio	Infecciones del aparato respiratorio y digestivo	-	-
Gatos	-	-	infecciones bacterianas de los tractos digestivo, respiratorio y urogenital, infecciones de la piel y otitis externa	Infecciones de la piel, del sistema respiratorio, glándulas mamarias, tracto urinario	-
Peces	-	-	-	-	Bacterias género Vibrio, Bacteria Gram (-) rickettsia
Humanos	Infecciones del tracto urinario	Infecciones del tracto urinario	Infecciones del tracto urinario	Infecciones del tracto urinario	Infecciones del tracto urinario

Como hemos visto, hoy en día existe una amplia variedad de quinolonas, que se usan en el tratamiento de diversas enfermedades, debido a su amplio espectro de acción. Por ello, existe la probabilidad de que puedan ser encontrados en diferentes compartimientos ambientales. En la siguiente sección veremos las concentraciones en que se han encontrado.

1.3.1 Presencia de fluoroquinolonas en el medio ambiente

Diversos factores afectan la permanencia de los antimicrobianos en el medioambiente terrestre. Entre los más importantes se encuentran la temperatura, el tipo de suelo, el pH, la radiación UV, y en la presencia de estiércol animal, la cantidad de éste y la relación suelo/estiércol (116).

Asimismo, el efecto de los residuos de antimicrobianos en el medio ambiente está influenciado por factores tales como:

- **Complejación y adsorción.** La formación de complejos o quelación de antibióticos con varios compuestos (orgánicos, inorgánicos o iones) pueden hacer que los antibióticos queden inactivos en el suelo o el estiércol. Un estudio realizado en diferentes tipos de suelos concluyó que la Sarafloxacina se une fuertemente al suelo y presenta muy baja disponibilidad para los microorganismos presentes en el suelo (117).
- **Productos de degradación.** Los productos veterinarios se degradan biótica o abióticamente en los suelos y en el agua. Generalmente estos procesos disminuyen la actividad de los fármacos. Sin embargo, algunos productos de degradación tienen actividad similar a la de sus compuestos padres (56). Así, se ha demostrado que la actividad de oxitetraciclina, tilosina, sulfadiazina, estreptomina y ciprofloxacina disminuyen con el tiempo bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas en lodos activados y bacterias del suelo seleccionadas, lo que sugiere menor actividad de los productos de degradación; sin embargo, pueden llegar a tener vidas medias elevadas como en el caso de la oxitetraciclina que permaneció activa durante 100 días (118).

Los niveles en que los antimicrobianos se encuentren en el medioambiente dependerá de la vía de entrada, de las propiedades físicas y químicas del fármaco, el medio donde se encuentren, así como de las condiciones ambientales donde son liberados (52).

La Tabla 1.7 muestra ejemplos de concentraciones de diferentes fluoroquinolonas encontradas en biota. Las concentraciones detectadas en plantas y animales analizadas en estos estudios varían en concentraciones que van desde no detectados hasta los 6310.0 ng L⁻¹ para el caso de las plantas y en específico de la CIP. Del grupo de fluoroquinolonas evaluadas en las plantas fue la CIP la que se encontró en mayor concentración, seguida por la NOR, OFL, DIF, ENR, FLE y LOM. La SAR no fue detectada. Por otro lado, las concentraciones en peces van desde no detectadas hasta 1653.17 ng L⁻¹, siendo, en este caso, la ENR la que se detectó en mayor concentración.

De la literatura consultada también obtuvimos datos para fluoroquinolonas en diferentes tipos de aguas. Los datos recogidos se indican en la Tabla 1.8, donde se puede observar que las fluoroquinolonas que se encontraron en mayores concentraciones en aguas superficiales fueron la NOR (650.0 ng L⁻¹) y la OFL (529.9 ng L⁻¹), mientras que las que presentaron mayores concentraciones en efluentes de PTAR fueron la CIP (26000 ng L⁻¹ como efluente de una PTAR de un hospital) y la OFL (37000 ng L⁻¹). Finalmente, la ENR se detectó en mayor concentración (403 ng L⁻¹) que el resto de las fluoroquinolonas analizadas en estudios realizados a aguas subterráneas (pozos).

Tabla 1.7. Fluoroquinolonas en biota

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			FLUOROQUINOLONAS								Fuente
			CIP	DIF	ENR	FLE	LOM	SAR	OFL	NOR	
Lago Baiyangdian-China	Plantas	Rango	nd-6310,0	nd-47,3	nd-12,0	nd-36,5	nd-2,22	nd	4,3-47,1	nd-220,0	33
	Peces	Rango	nd-29,9	nd-6,00	nd-36,5	nd-18,6	nd-18,0	nd-48,5	nd-30,0	nd-98,4	
Río Liao-China	Peces y crustáceos	Rango	nd-12,54		280,95-1653,17				nd-5,62	nd-3,20	119
Río Haihe-China	Peces de estanques-Carpa común-2008	Rango	nd-0,5	Nd	nd	nd-1,1	nd-0,2	nd	nd	nd	120
	Peces de estanques-Carpa Plateada-2008	Rango	nd-3,7	Nd	nd	nd-0,2	nd	nd	nd	nd-0,3	
	Peces-Carpa cruciana-2010	Rango	2,5-11,6	8,1-12,5	nd	nd-2,7	nd	nd	nd-2,3	nd-3,5	
	Peces-Carpa Cruciana-2008	Rango	nd-51,6	nd-8,4	nd-8,2	nd-50,8	nd	nd-10,5	nd-0,3	nd-0,7	
	Carpa Común	Conc. Puntual	1,2	Nd	nd	nd	0,3	nd	nd	0,3	
	Carpa Plateada	Conc. Puntual	0,5	2,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	

dw: peso seco (dry weight) nd: no detectado N: tamaño de la población evaluada en el estudio CIP: Ciprofloxacina DIF: Difloxacina ENR: Enrofloxacin FLE: Fleroxacin LOM: Lomefloxacina SAR: Sarafloxacina OFL: Ofloxacina NOR: Norfloxacina

1. Introducción.

Tabla 1.8. Fluoroquinolonas en aguas

CONCENTRACIÓN (ng L ⁻¹)			FLUOROQUINOLONAS											Fuente	
			CIP	DIF	ENR	FLE	LO M	SAR	OFL	NOR	MAR	LEV	DAN		ENO
Aguas Superficiales-China	Río Haihe-Corriente principal	Rango	nd - 19,7	nd-3,4	nd-1,0	nd-7,3	nd-0,9	nd-11,9	9,1-95,2	nd-128,9	-	-	-	-	120
	Río Haihe-Tributarios	Rango	7,2-59,0	nd	nd-5,1	nd-9,8	nd	nd-142,0	8,2-112,2	nd-104,9	-	-	-	-	
	Río Dagu	Rango	19,7-69,3	nd-10,1	nd-1,2	nd-17,6	nd-5,8	nd-68,6	22,8-529,9	82,9-345,5	-	-	-	-	
	Río Chentaizi	Rango	15,6-32,5	nd-4,9	nd-11,2	nd-32,8	nd-39,4	nd-19,1	176,8-332,7	329,8-650,0	-	-	-	-	
	Río Duliujian	Rango	11,6-51,0	nd	2-6,2	nd-1,2	nd	nd	49,2-89,4	nd-255,7	-	-	-	-	
	Estanques de peces	Rango	nd-28,8	nd-10,3	nd	nd	nd-0,9	nd	34,9-48,4	32,1-236,8	-	-	-	-	
Aguas Superficiales, Residuales y Subterráneas-China	E. PTAR	Rango	nd-21	-	nd-4	1-6	1-4	-	45-1270	5-35	-	-	-	-	121
	Pozos	Rango	7-62	2-5	15-403	14-60	6-19	-	15-63	1-28	-	-	-	-	
	Ríos	Rango	35	-	6-201	6-8	3	-	5-28	8	-	-	-	-	
Aguas residuales Granja Porcina-China	E. PTAR Porcina	Puntual	-	-	-	-	-	-	14,2	nd	-	-	-	-	39
Aguas Residuales y Subterráneas Granja Porcina-China	Lagunas	Rango	-	-	9,45-56,5	nd-6,26	nd-<LOQ	-	50,4-155,0	nd-<LOQ	nd-4,36	-	-	-	36
	Agua subterránea	Puntual	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	-	-	
	E. PTAR	Puntual	74,8	-	nd	11,7	25,5	-	1010	974	-	-	-	-	
Aguas residuales-China	E. PTAR	Rango	nd-55	-	-	nd-38	nd-28	-	150-1200	36-200	-	-	-	-	35
Agua Residual-China	E. PTAR	Puntual	37 ± 16	-	2,1 ± 0,6	5,2 ± 0,3	71 ± 14	<LOD	528 ± 89	256 ± 64	-	40 ± 8	1,1 ± 0,2	40 ± 20	37

CONCENTRACIÓN (ng L ⁻¹)			FLUOROQUINOLONAS											Fuente	
			CIP	DIF	ENR	FLE	LOM	SAR	OFL	NOR	MAR	LEV	DAN	ENO	
Aguas Superficiales-China	Lago Baiyangdian	Rango	nd-60,3	nd	nd-4,42	nd-6,35	nd	nd-28,2	0,38-32,6	nd-156	-	-	-	-	33
Aguas residuales-Korea	E. PTAR Municipal	Promedios	728	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	122
	E. PTAR Ganaderías		142	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-		
	E. PTAR Hospital		3080	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-		
	E. PTAR Fábricas de fármacos		1860	-	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-		
Aguas residuales-Italia	E. PTAR Hospital A (verano)	Rango	10000–15000	-	<LOD	-	-	-	13000–22000	40–100	-	-	<LOD	330–480	123
	E. PTAR Hospital B (verano)	Rango	1400–1900	-	<LOD	-	-	-	3300–4100	203–440	-	-	<LOD	58–100	
	E. PTAR Hospital B (invierno)	Rango	15000–26000	-	<LOD	-	-	-	25000–37000	220–510	-	-	<LOD	180–450	
	E. PTAR (invierno)	Rango	290–1100	-	<LOD	-	-	-	220–520	140–170	-	-	<LOD	30–100	

CIP: Ciprofloxacina

DIF: Difloxacina

ENR: Enrofloxacin

FLE: Fleroxacin

LOM: Lomefloxacina

SAR: Sarafloxacina

OFL: Ofloxacina

NOR: Norfloxacina

MAR: Marbofloxacina LEV: Levofloxacina

DAN: Danofloxacina

ENO: Enoxacin

nd: no detectado

<LOQ: menor al límite de cuantificación del método <LOD: menor al límite de detección del método

E. PTAR: Efluente de Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

Respecto al compartimiento ambiental correspondiente a suelos y sedimentos, la tabla 1.9 muestra algunos datos publicados para estos casos.

En suelos, la CIP fue la detectada en mayor concentración ($651.6 \mu\text{g kg}^{-1}$), mientras que para el caso de sedimentos y lodos de PTAR, las mayores concentraciones fueron para la NOR ($19591.0 \mu\text{g kg}^{-1}$) y la OFL ($5.8 \times 10^6 \mu\text{g kg}^{-1}$), respectivamente.

En general, la persistencia de un fármaco en un sedimento o en el suelo depende de su fotoestabilidad, de su capacidad de enlace y adsorción, de su velocidad de degradación y de su lixiviación por el agua (112, 116). En el caso particular de las fluoroquinolonas, las principales causas para su persistencia en suelos y sedimentos son la baja degradación y su afinidad a éstos (60).

Algunas fluoroquinolonas presentan baja biodegradación en aguas residuales. Por ejemplo, no se observó degradación de la CIP después de 28 días de haber sido inoculada una alícuota del efluente de una PTAR, en una botella de agua que permaneció cerrada durante el tiempo del experimento (124). Por otro lado, en un estudio con microorganismos del suelo, el 80% de los mismos no fueron capaces de degradar a la DAN (118).

En otras investigaciones llevadas a cabo sobre la SAR, ésta pudo ser degradada por la acción de diversos hongos en el suelo, siempre que se encuentre biodisponible. La vida media para la biotransformación de la sarafloxacina en forma de clorhidrato fue de 5 días, mientras que el tiempo medio para su mineralización fue de 139 días (125).

Por lo anterior, las fluoroquinolonas son fármacos persistentes en los suelos, como consecuencia de su rápida y fuerte sorción a éste. Esta sorción es poco afectada por la humedad o la temperatura del suelo. Por otro lado, las plantas promueven la disipación de las fluoroquinolonas que se encuentran en la vecindad directa a las raíces, pero, dado a la pequeña fracción de la rizosfera del suelo (que se asume es $<15\%$ del volumen del suelo), su impacto sobre el destino final de las fluoroquinolonas es limitado (126).

Tabla 1.9. Fluoroquinolonas en suelos, sedimentos y lodos de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales. China

CONCENTRACIONES ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		FLUOROQUINOLONAS										Fuente	
		CIP	DIF	ENR	FLE	LOM	SAR	OFL	NOR	MAR	LEV		DAN
Estiércol		-	-	-	-	16,5	Nd	nd	-	8,15	nd	nd	
Sedimento		-	-	-	-	17,7	Nd	nd	-	20,1	nd	nd	
Suelos de cultivo de hortalizas	Conc. Puntuales	-	-	-	-	6,22	Nd	nd	-	1,85	nd	nd	37
Lodo PTAR		-	-	715	-	21,4	43,5	89,3	-	5800	5610	-	
Suelos irrigados con aguas	Rango	<LOD-84,85	-	-	-	-	-	-	<LOD -83,92	-	-	-	33
Suelos	Rango	2,4-651,6	-	0,1-167,0	-	-	-	-	0,4-288,3	-	-	-	76
Sedimentos de Ríos	Rango	nd-1930,0	nd-16,9	nd-156,8	nd-164,0	nd-1340,0	nd-35,9	2,8-5807,5	3,9-19591,0	-	-	-	122
Sedimentos de Lago	Rango	nd-46,0	nd	nd-13,0	nd-6,69	nd-29,0	Nd	nd-362	49,4-1140	-	-	-	34
Lodos PTAR	Conc. Puntuales	1040	-	70	80	1000	530	7790	7230	-	-	-	38
Lodos de PTAR	Rango	130,0-950,0	nd-11,0	nd-95,0	5,5-320,0	69,0-3000,0	nd-240,0	550,0-21000,0	430,0-4900,0	-	-	-	36
Lodos de PTAR	Conc. Puntuales	$7,15 \times 10^5$	-	$2,14 \times 10^4$	$4,35 \times 10^4$	$8,93 \times 10^4$	-	$5,8 \times 10^6$	$5,61 \times 10^6$	-	-	-	37

CIP: Ciprofloxacina DIF: Difloxacina ENR: Enrofloxacin FLE: Fleroxacin LOM: Lomefloxacina nd: no detectado
 SAR: Sarafloxacina OFL: Ofloxacina NOR: Norfloxacina MAR: Marbofloxacina LEV: Levofloxacina DAN: Danofloxacina
 PTAR: Planta de Tratamiento de Aguas Residuales <LOD: menor al límite de detección del método

1.4. Sorción en suelos

De los cuatro compartimientos medioambientales, atmósfera, biosfera, hidrosfera y litosfera, este último es el que nos ocupa en este trabajo de investigación.

Algunos autores se refieren a este compartimento como Tierra sólida. Está ubicada debajo de la atmósfera y de los océanos (127). Tiene la capacidad de interactuar con una gran variedad de compuestos químicos, reteniéndolos, por lo que actúa como un filtro que reduce o evita que los contaminantes alcancen las corrientes de aguas superficiales y subterráneas (128-129). Es químicamente estable, con una disponibilidad variable de H₂O. El suelo es fuente y sumidero de todos los elementos esenciales para los organismos vivos.

En esta tesis se evalúa la capacidad de sorción en el suelo de un grupo de antimicrobianos de origen sintético, particularmente fluoroquinolonas (130). Por ello, a continuación, veremos las características y propiedades más relevantes de los suelos.

1.4.1 Suelo

Si definimos la palabra suelo de una forma sencilla, podemos decir que es la corteza de la Tierra o el manto que la cubre. Sin embargo, para nuestros propósitos, ésta es una definición muy somera, por lo cual, extraeremos los conceptos más importantes de definiciones dadas por diferentes autores. Singer y Munns (131) aportan las siguientes ideas:

- El suelo es un material biogeoquímico complejo sobre el cual pueden crecer las plantas.
- Tiene propiedades estructurales y biológicas que lo distinguen de las rocas y sedimentos, a partir de los cuales normalmente se han originado.
- Consiste en sistemas ecológicos dinámicos que proveen agua, nutrientes, aire y soporte a las plantas.
- Soporta todos los ecosistemas sobre la Tierra, incluyendo una gran población de microorganismos que reciclan los materiales de la vida.

- Protege al agua subterránea al filtrar las sustancias químicas tóxicas y las enfermedades de organismos provenientes del agua residual.

De la definición dada por la Sociedad Americana de las Ciencias del Suelo (132) podemos añadir que el suelo:

- Es un material no consolidado, inorgánico u orgánico sobre la superficie inmediata de la Tierra.
- Ha sido sometido a fuertes cambios y muestra los efectos de los factores medioambientales del clima (incluyendo los efectos del agua y la temperatura), y de los macro- y microorganismos, condicionados al relieve, que han actuado sobre el material parental por un período de tiempo.
- Es, por lo tanto, un producto que difiere del material del que se deriva en muchas propiedades y características físicas, químicas, biológicas y morfológicas.

Por otro lado, de la definición dada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, United States Department of Agriculture) en su libro Soil Taxonomy (133), rescatamos los siguientes discernimientos sobre el suelo:

- Es un cuerpo natural compuesto de sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases que ocurren sobre la superficie de la tierra.
- Está caracterizado por uno o varios horizontes o capas, que son distinguibles del material inicial, como resultado de adiciones, pérdidas, transferencia y transformaciones de energía y materia.

Por último, anotamos la definición de Porta i Casanellas (134), quienes sostienen que:

- El suelo es un sistema abierto, heterogéneo, poroso y dinámico que recubre la corteza terrestre.
- Es el hábitat natural de plantas y organismos vivos, siendo su fuente de agua, oxígeno y nutrientes.
- Está habitado por microorganismos (protozoos, bacterias, etc.) y macroorganismos (topos, lombrices, etc.).

1. Introducción.

Así vemos que el suelo puede constar de múltiples componentes que lo convierten en un sistema muy complejo. Algunos de estos componentes se muestran en la siguiente figura.

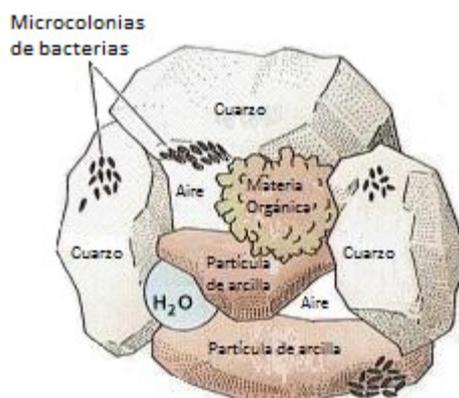


Figura 1.9. Complejidad del suelo. Adaptado de (135)

La composición elemental media del suelo (136) se muestra en la tabla 1.10. De acuerdo con lo mostrado podemos decir, de manera simplificada, que el suelo es una matriz cuyo contenido principal son los silicatos y los óxidos de Al y Fe, además, de que contiene cantidades relativamente pequeñas de los elementos esenciales.

Tabla 1.10. Composición elemental media del suelo (135)

Elemento	Contenido (% en peso)	Elemento	Contenido (% en peso)
O	49,0	Mn	0,080
Si	33,0	S	0,050
Al	7,0	F	0,020
Fe	4,0	Cl	0,010
C	1,0	Zn	0,0050
Ca	1,0	Cu	0,0020
K	1,0	B	0,0010
Na	0,70	Sn	0,0010
Mg	0,60	I	0,00050
Ti	0,50	Mo	0,00030
N	0,10	Co	0,00080
P	0,08	Se	0,0000010
Otros componentes, incluyendo al H			1,8

%; porcentaje

Por otra parte, también es posible considerar que un suelo está formado por tres fases: *sólida*, *líquida* y *gaseosa*, que presentan las siguientes características principales:

- **Fase sólida (entre 50-60%)**, constituida por componentes **orgánicos e inorgánicos**, también referidos como materia orgánica y materia mineral.
- **Fase líquida (entre 25-35%)**, también conocida como la **solución del suelo** cuando contiene sales disueltas. La proporción real de aire y agua varía según la cantidad de agua presente y el tamaño de poros (137). Por ejemplo, cuando llueve, los poros se llenan de agua, que se vacían de nuevo cuando el suelo se seca (138).
- **Fase gaseosa (entre 15-25%)**. La mayoría de los gases se encuentran en el interior de los poros del suelo, a no ser que estén disueltos. En comparación con el aire de la atmósfera, la **fase gaseosa** del suelo presenta cantidades superiores de dióxido de carbono y considerablemente inferiores de oxígeno. Además, también pueden estar presentes en cantidades superiores a las presentes en la atmósfera otros gases producidos por la actividad microbiana anaeróbica (NO, N₂O, NH₃, CH₄ y H₂S) (139). La aireación del suelo varía de acuerdo con las condiciones de éste; por ejemplo, un suelo encharcado o saturado de agua tiene poca aireación (138).

En la siguiente figura se muestran los porcentajes relativos que corresponden a cada fase. Debido a que la cantidad que esté presente de una fase varía mucho de un suelo a otro, se presentan en forma de intervalo.

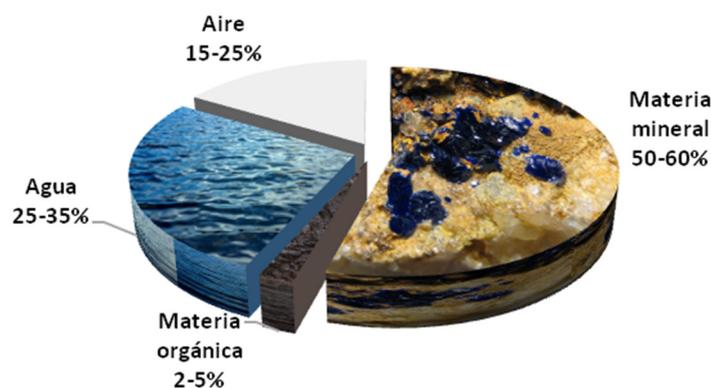


Figura 1.10. Composición relativa de las diferentes fases del suelo

1.4.1.1 Fase sólida del suelo

Los **componentes orgánicos** a menudo se encuentran en cantidades por debajo del 10%, recubriendo las partículas inorgánicas y/o como fase separada. Una excepción la constituyen las turbas o suelos de pantanos (histosuelos), que pueden estar constituidas hasta por un 100 % de materia orgánica (137).

Entre los componentes orgánicos se incluyen a las plantas y raíces de plantas, los restos de animales en diferentes estados de descomposición (>95%), células, tejidos de microorganismos del suelo y organismos vivos (<5%), sustancias sintetizadas por la población del suelo, así también como humus (136-137, 140-141).

La materia orgánica presente en los suelos puede clasificarse en (139) **materiales húmicos**, y **materiales no húmicos**.

Los compuestos húmicos provienen de la descomposición microbiana de las plantas, y presentan un alto contenido en lignina y/o celulosa. Frecuentemente, se encuentran en la zona superficial, (llamada Horizonte A) y contribuyen a la estabilización de los agregados del suelo (142). En general, sus masas moleculares son superiores a los 2000 Da.

Dentro de los materiales húmicos, se diferencian tres subgrupos (139):

- Los **ácidos húmicos**: presentan un color marrón oscuro, son solubles en medio alcalino e insolubles en medio ácido.
- Los **ácidos fúlvicos**: tienen un color amarillo - marrón claro y son solubles en medios alcalinos y ácidos.
- La **humina**: presenta un color negro y es insoluble tanto en medio ácido como en medio alcalino.

Los materiales no húmicos incluyen fragmentos de tejido vegetal sin descomponer o parcialmente descompuestos, y organismos del suelo. Estos últimos incluyen una amplia variedad de especies de bacterias, hongos, protozoos, actinomicetes, así como muchas especies de mesofauna, tales como las lombrices que toman rol en la descomposición de los residuos vegetales y su incorporación en el suelo. Poseen masas moleculares inferiores a los 2000 Da, e incluye ácidos orgánicos de bajo peso molecular, carbohidratos, polisacáridos, aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, etc. (139).

La materia orgánica del suelo presenta un espectro amplio de grupos funcionales, donde predomina el oxígeno (carboxilo, hidroxilo, carbonilo), además de los grupos amino y sulfhidrilo (142).

A pesar de que la materia orgánica representa en general un pequeño porcentaje de la masa del suelo (< 10%), tiene una influencia muy importante sobre las propiedades físicas y químicas del suelo, especialmente con referencia al comportamiento de los contaminantes. El humus tiene una alta capacidad de intercambio catiónico (CEC), aunque dependiente del pH, y una fuerte capacidad de sorción para diferentes tipos de contaminantes, incluyendo moléculas orgánicas no polares y metales pesados (139).

Por su parte, el **material inorgánico**, como define la International Society of Soil Science, además de contener óxidos de metal y sales, es una mezcla de partículas que se diferencian por su tamaño en:

- Arena (con diámetro entre 0.02-2 mm).
- Limo (con diámetro entre 0.02-0.002 mm).
- Arcilla (con diámetro menor de 0.002 mm).

La figura 1.11 muestra una comparación de los tamaños de las partículas primarias que componen el material inorgánico del suelo.

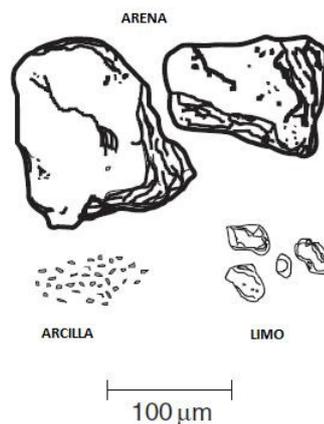


Figura 1.11. Representación del tamaño de las partículas de arena, limo y arcilla. Adaptado de (143)

Algunas de las características más relevantes de estas partículas primarias se describen a continuación.

La **arcilla** está formada por capas de silicatos, mayoritariamente de filosilicatos, como la caolinita, la illita, etc., hidróxidos de Al y Fe y de compuestos de carbonatos y de azufre (138). Los minerales de arcilla pueden ser cristalinos o amorfos (128). Debido a su estructura y a su gran superficie específica, las arcillas tienen una fuerte tendencia a interactuar con especies químicas disueltas en agua.

Por otro lado, la **fracción de arena** está formada por partículas groseras que presentan una superficie específica más baja que las demás fracciones, lo cual limita su capacidad de retención de agua, nutrientes y contaminantes. Contiene principalmente partículas de cuarzo (SiO_2), pero también puede contener fragmentos de feldespatos, mica, turmalina, y hornblenda, ésta última muy raramente (143).

Finalmente, la **fracción de limo** consiste en partículas de tamaño intermedio entre arena y arcilla. Desde el punto de vista mineralógico, las partículas de limo, generalmente, se asemejan a las partículas de arena, compuestas mayormente de cuarzo (SiO_2). Sin embargo, frecuentemente están recubiertas con arcilla fuertemente adherida, por lo que el limo puede exhibir, hasta un grado limitado, algunas de las características fisicoquímicas, atribuidas, generalmente, a la arcilla, como lo es una superficie específica mayor que el de la arena (143).

A partir de esas características, podemos afirmar que la fracción de arena es menos activa químicamente que la fracción de limo y mucho menos en comparación con la de arcilla.

Siguiendo con el estudio de las tres diferentes fases que constituyen el suelo, a continuación, se describe la fase líquida, conocida como *solución del suelo*.

1.4.1.2 Fase líquida del suelo

El término **solución de suelo** se refiere a la fase acuosa que permea los poros de un suelo. Esta solución del suelo incluye sales disueltas (aproximadamente en concentraciones de 0.02M) y materia orgánica disuelta.

Su comportamiento químico depende de la presencia de coloides, orgánicos e inorgánicos, capaces de dar lugar a reacciones que involucren adsorción y desorción, intercambio iónico, disolución de minerales, precipitación, etc. (136). Entre los coloides se incluyen a las arcillas, los óxidos metálicos y las partículas orgánicas.

Debido a los diferentes tamaños y localización de los poros del suelo, la solución del suelo es discontinua (137). De hecho, la composición de la solución del suelo para un suelo de un horizonte dado puede variar considerablemente a lo largo del tiempo debido a (144):

- Una composición variable del agua de infiltración.
- Variabilidad en las condiciones del clima.
- Variabilidad en la actividad biológica.

El pH de una solución de suelo característica puede variar, generalmente, entre 4 a 9, y gobierna la movilidad y disponibilidad de nutrientes y contaminantes para las plantas, así también como la actividad enzimática de los microorganismos del suelo (136).

1.4.1.3 Fase gaseosa del suelo

La fase gaseosa también se conoce como "atmósfera del suelo". Su presencia en el suelo es importante debido a que permite la respiración de los organismos del suelo y de las raíces de las plantas que cubren su superficie, además de ejercer un papel de primer orden en los procesos de oxidación-reducción que tienen lugar en el suelo.

La siguiente tabla muestra la composición media de la fase gaseosa del suelo, comparada con el aire de la atmósfera terrestre.

Tabla 1.11. Composición media de la atmósfera del suelo y terrestre (145).

Componente	Composición media	
	Atmósfera del suelo	Atmósfera terrestre
Oxígeno	10 – 20 %	21 %
Nitrógeno	78,5 – 80 %	78 %
Dióxido de carbono	0,2 – 3,5 %	0,03 %
Agua	Saturado	Variable
Otros	< 1 %	> 1 %

La diferencia en composición cuantitativa se debe, principalmente, a la respiración de las raíces de las plantas, de los microorganismos del suelo y el CO₂ desprendido tras la descomposición de la materia orgánica. Así, por ejemplo, un suelo cultivado posee mayor contenido de CO₂ que aquel no cultivado (145).

Por otro lado, también existen otras características físicas de los suelos que pueden ayudarnos a explicar la interacción entre una sustancia química y el suelo. Estas características son la estructura del suelo y su textura.

1.4.2 Estructura y textura del suelo

Las partículas del suelo forman agregados estables que se conocen como “peds” o agregados. El tipo de peds en conjunto definen la estructura del suelo. Ésta se clasifica de acuerdo con el tamaño, tipo y grado de agregado en (143):

- Granular.
- Laminar.
- Bloque angular.
- Bloque subangular.
- Prismático.
- Columnar.

Estas estructuras se muestran en la siguiente figura:

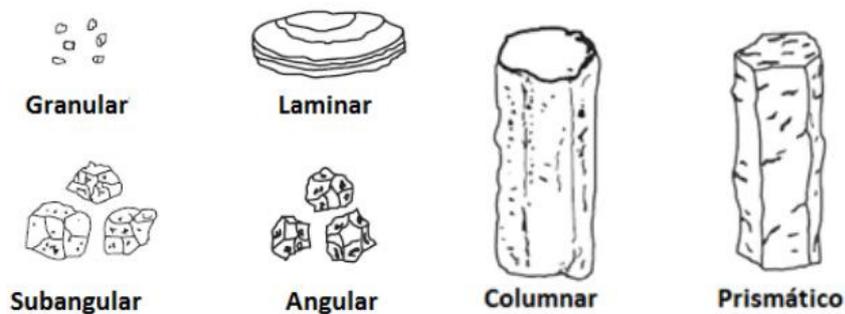


Figura 1.12. Formas de agregación del suelo. Adaptado de (143)

Por su parte, la textura de un suelo se clasifica en base a la distribución de sus fracciones (arena, limo, arcilla), teniendo en cuenta el porcentaje presente de cada uno de ellos. La USDA desarrolló una clasificación en la que se proponen los siguientes tipos de textura (Tabla 1.12).

Tabla 1.12. Tipos de textura de un suelo según la USDA (146)

Nombres comunes de los suelos (textura general)	Arenoso	Limoso	Arcilloso	Clase textural
Suelos arenosos (textura gruesa)	86-100	0-14	0-10	Arenoso
	70-86	0-30	0-15	Franco arenoso
Suelos francos (textura moderadamente gruesa)	50-70	0-50	0-20	Franco arenoso
	23-52	28-50	7-27	Franco
Suelos francos (textura mediana)	20-50	74-88	0-27	Franco limoso
	0-20	88-100	0-12	Limoso
	20-45	15-52	27-40	Franco arcilloso
Suelos francos (textura moderadamente fina)	45-80	0-28	20-35	Franco arenoso arcilloso
	0-20	40-73	27-40	Franco limoso arcilloso
	45-65	0-20	35-55	Arcilloso arenoso
Suelos arcillosos (textura fina)	0-20	40-60	40-60	Arcilloso limoso
	0-45	0-40	40-100	Arcilloso

La Figura 1.13, que se presenta a continuación, muestra el diagrama de textura que se utiliza para clasificar los suelos. El contenido relativo de cada fracción, en el diagrama, nos indica la textura de cada suelo.

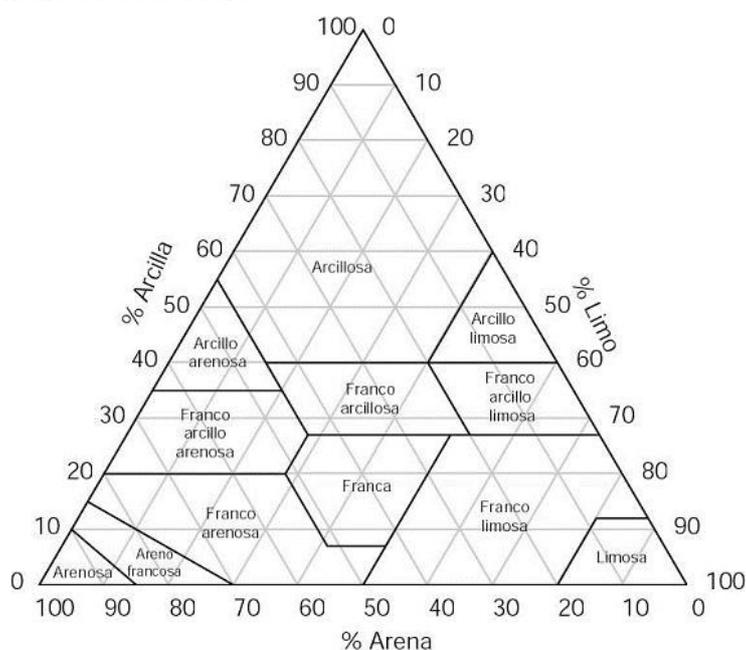


Figura 1.13. Clasificación de los suelos basada en las clases texturales según la USDA. Adaptado de (146)

El suelo se estructura en diferentes capas, conocidas como **horizontes del suelo**, y su disposición se conoce como el **perfil del suelo** (146). Para su descripción se utilizan diferentes nomenclaturas, en particular la propuesta por el USDA, que se representa en la Figura 1.14. En ella, las letras mayúsculas **O**, **A**, **B**, **C** y **E**, se utilizan para identificar a los horizontes maestros, mientras que para realizar distinciones dentro de estos horizontes se utilizan letras minúsculas (en la figura se muestran sólo los horizontes maestros).

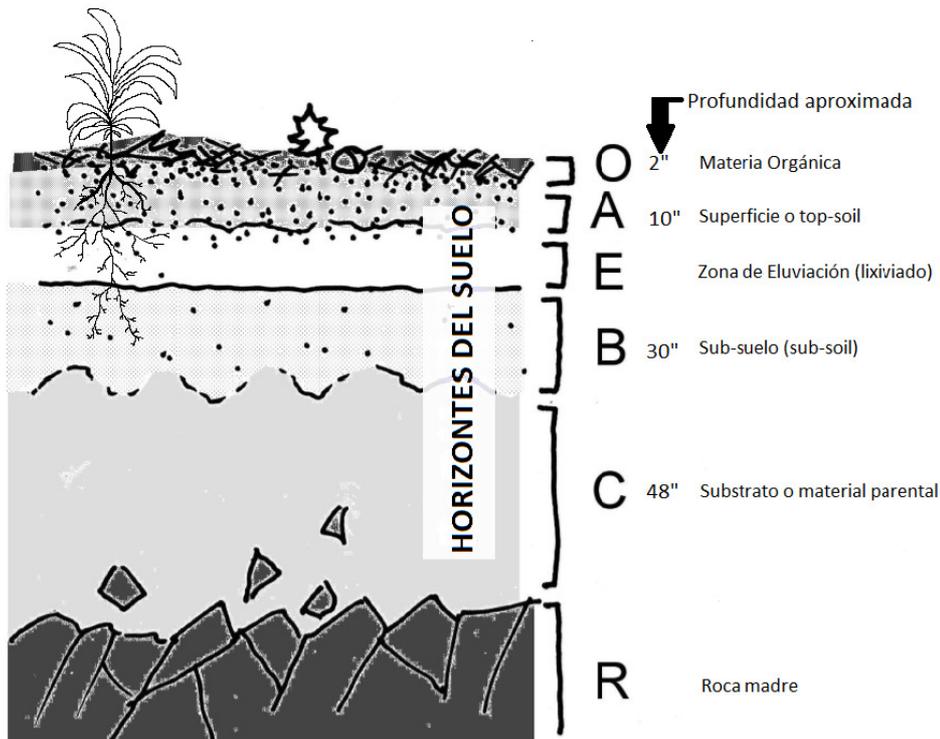


Figura 1.14. Horizontes del suelo. Adaptado de (141, 146)

La mayoría de los suelos están conformados por tres horizontes maestros:

- El horizonte **A** o superficial (top-soil), es la zona de mayor actividad biológica ya que, generalmente, está enriquecido con materia orgánica. En éste, las plantas, los animales y sus residuos interactúan con una enorme diversidad de microorganismos, tales como bacterias, protozoos y hongos. Además, existe una variedad de macroorganismos, que incluyen lombrices, artrópodos y roedores con madrigueras en el suelo. Esta zona es, generalmente, la más fértil del suelo,

pero también la más vulnerable a la erosión por el agua y el viento (especialmente si carece de vegetación o de residuos que la protegen) (143).

- El horizonte **B** o subsuelo, es la zona donde tienden a acumularse los materiales lixiviados desde el horizonte A por percolación del agua (p. ej. carbonatos y arcillas).
- El horizonte **C**, también llamado substrato o material parental, está constituido de material envejecido (creado y depositado por procesos geológicos, no por procesos de desgaste) y roca fragmentada.

Algunos suelos poseen un horizonte orgánico (**O**) sobre la superficie, pero éste también puede estar enterrado.

Además, se puede encontrar en el suelo el horizonte maestro **E**, que es subsuperficial y posee pérdida significativa de minerales. A éste también se le conoce como zona de eluviación, debido a que los componentes orgánicos e inorgánicos han sido percolados por el paso del agua (147).

Y para finalizar, a la roca madre, la cual no es un horizonte, se le identifica con la letra **R** (146).

Una vez el soluto (compuesto) alcanza el suelo (sorbente) puede tener lugar el proceso de sorción, usualmente utilizando como medio la solución del suelo (interfase sólido-líquido).

A continuación, explicaremos cómo se lleva a cabo el proceso de sorción.

1.5 Sorción

Sorción es el término general utilizado para describir al conjunto de diferentes procesos que dan como resultado la retención de una sustancia (sorbato) por la fase sólida inorgánica u orgánica del suelo (sorbente) (148). La sorción incluye los procesos de adsorción, absorción, partición o precipitación superficial. Sin embargo, se utiliza el término “sorción” cuando el mecanismo específico de interacción es desconocido o incierto.

Los sorbentes más fuertes son normalmente los componentes carbonáceos, que incluyen a la materia orgánica natural (NOM, del inglés natural organic matter) y al negro de carbón (BC, del inglés black carbon). La NOM consiste en biomasa remanente en estado de degradación avanzada, mientras que el BC es el subproducto de la pirólisis o combustión incompleta de biomasa o combustible fósil que se incorpora al suelo a partir de incendios de biomasa (como carbono o carbón vegetal) y la deposición de partículas de hollín atmosférico. A menos que se presente en muy bajos niveles o que el contenido de humedad del suelo sea muy bajo, los materiales carbonosos dominan la sorción de compuestos apolares y muchos compuestos polares. Incluso las especies iónicas presentan una sorción apreciable, si no predominante, a los componentes carbonáceos. Mientras que el BC es típicamente un sorbente más fuerte que la NOM, éste es usualmente menos abundante y su fuerza es atenuada por la meteorización (weathering) (149).

Resulta importante resaltar que la sorción gobierna el destino, la movilidad y los efectos que pueden tener los fármacos en el medioambiente. Los fármacos más fuertemente retenidos en el suelo son los que presentan menor biodisponibilidad para los organismos nativos, menor tendencia a ser transportados a las aguas subterráneas o superficiales, menor fotodegradación y menor participación en procesos de hidrólisis, redox, etc. (150).

La forma en la cual una sustancia queda retenida en el suelo varía con la naturaleza de esta, la composición del suelo (151) y las propiedades químicas de la solución del suelo. A continuación, veremos más detalles relacionados.

1.5.1 Factores que influyen en los procesos de sorción

Los principales factores y propiedades del suelo que influyen en los procesos de sorción incluyen (152-159):

- Profundidad del suelo.
- Contenido de materia orgánica.
- Contenido y tipo de materia mineral (arcilla, óxidos e hidróxidos de aluminio y hierro, carbonatos).
- pH.
- Temperatura.
- Potencial redox.
- Régimen de aire y agua.
- Textura y porosidad.
- Capacidad de intercambio catiónico.
- Actividad biológica y biomasa.

Aunque el suelo sea un sistema muy complejo, puede decirse que se caracteriza por ser un sorbente de función dual, en el que el mecanismo de retención de los solutos puede ser por adsorción (por parte de la materia mineral) o por partición (por la materia orgánica) (151). Sin embargo, la forma en que se lleva a cabo la sorción en un determinado tipo de suelo puede verse afectada por las actividades que se realizan en un suelo agrícola, como lo es, por ejemplo, la fertilización, la cual puede alterar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (136).

Por otra parte, las propiedades químicas de la solución del suelo que principalmente influyen en el proceso de sorción son el pH, fuerza iónica, iones competidores, capacidad de intercambio de iones y potencial redox. Además, las condiciones climáticas que afectan la temperatura y humedad del suelo también influyen en los procesos de sorción (136).

En cuanto a los solutos, las propiedades más importantes que determinan su modo de interacción con la fase sólida del suelo son (155):

- Su forma y configuración.
- Su constante de acidez.
- Su solubilidad en agua.
- Su polaridad.
- Su tamaño molecular.

Se ha demostrado que cuando aumentan el número de átomos de carbono, el peso y el volumen molecular, y disminuye la polaridad, aumenta la sorción de los compuestos hidrofóbicos (156).

Los antimicrobianos son moléculas orgánicas relativamente grandes que presentan diversos grupos funcionales en su estructura que influyen decisivamente en la sorción. Algunos de estos grupos son ionizables en el intervalo de pH de los suelos naturales (4-8) y, por tanto, en función del pH de la solución se pueden encontrar en forma catiónica, aniónica, neutra o zwitteriónica, ofreciendo la posibilidad de establecer diferentes interacciones. Éste es el caso de las fluoroquinolonas.

Por lo anterior, a continuación, se describirán los principales grupos funcionales que tienen más influencia en los procesos de sorción que se llevan a cabo entre un soluto y un sorbente (155):

- **Grupo hidroxilo:** es el grupo funcional reactivo dominante sobre las superficies de muchas partículas de la fase sólida, tales como minerales de silicato amorfos, óxidos o hidróxidos. También se encuentra como alcoholes y fenoles en muestras complejas. En particular, el grupo -OH de los alcoholes puede desplazar a las moléculas de agua en la capa de hidratación primaria de cationes adsorbidos sobre las partículas de arcilla de los sólidos del suelo y sólidos del sedimento. Otros mecanismos de sorción de los grupos hidroxilo son a través de enlaces de hidrógeno e interacciones catión-dipolo.
- **Grupo carbonilo:** este grupo incluye a los aldehídos y cetonas. La sorción de cetonas tiene lugar mediante un enlace de hidrógeno entre un grupo OH⁻ del sorbente y el grupo carbonilo de la cetona.
- **Grupo carboxilo:** principalmente de ácidos orgánicos, puede interactuar directamente con un catión intercapa o formar un enlace de hidrógeno con las moléculas de agua coordinada a un catión intercambiable sobre la superficie del

sólido. La sorción de los ácidos orgánicos depende del poder de polarización del catión. Estos ácidos también pueden adsorberse físicamente sobre las partículas de arcilla de cualquier fase sólida, siendo el enlace de hidrógeno un mecanismo importante en los procesos de sorción.

- **Grupos amino:** pueden dar lugar a enlaces por intercambio de cationes.

Desde el punto de vista del sorbente, cabe tener en cuenta que los suelos naturales suelen presentar cierta carga negativa dentro del intervalo de pH ambiental. Los principales responsables son los grupos funcionales de la materia orgánica, principalmente carboxilos y fenoles, así como los grupos hidroxilos situados en la periferia de la fracción mineral. En consecuencia, los cationes de la solución son atraídos electrostáticamente por dichos grupos. Por otra parte, la materia orgánica hidratada se puede comportar como una fase sólida, no demasiado compacta, capaz de permitir la disolución o “partición” de sorbatos (157-158).

Después de revisar las características más relevantes del soluto, el sorbente y la solución del suelo que deben tenerse en cuenta en los estudios de sorción, veamos a continuación la forma en que se lleva a cabo este proceso.

La sorción tiene lugar cuando la variación de energía libre (ΔG) de la interacción entre el compuesto y el suelo es negativa. Esa interacción puede ser conducida tanto por entalpía (ΔH) como por entropía (ΔS):

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Ec. 1.1})$$

Los cambios de entalpía son el resultado de las diferencias en enlace entre la superficie adsorbente y el sorbato (soluto) y el enlace entre el solvente (agua) y el soluto (159).

Los mecanismos que tienen especial inferencia y que frecuentemente operan simultáneamente en las interacciones de sorción entre las interfaces acuosa-fase sólida son (150, 159):

- Enlace iónico.
- Puente de hidrógeno.
- Atracciones de van der Waals.

- Intercambio de ligandos.
- Transferencia de carga (proceso donador-aceptor de electrones).
- Enlaces hidrofóbicos o partición de compuestos hidrofóbicos no polares de la fase acuosa en la materia orgánica del suelo.
- Ion dipolo directo e inducido e interacciones dipolo-dipolo.
- Quimisorción.

La quimisorción involucra la formación de un enlace; es, por tanto, un ejemplo de proceso que se lleva a cabo por variaciones de entalpía, mientras que el enlace hidrofóbico lo es para cambios de entropía. Por otro lado, la fisisorción comprende todas las interacciones débiles tales como las de Van der Waals (159).

La Figura 1.15 muestra algunas de las interacciones de sorción que pueden tener lugar entre el soluto y el sorbente.

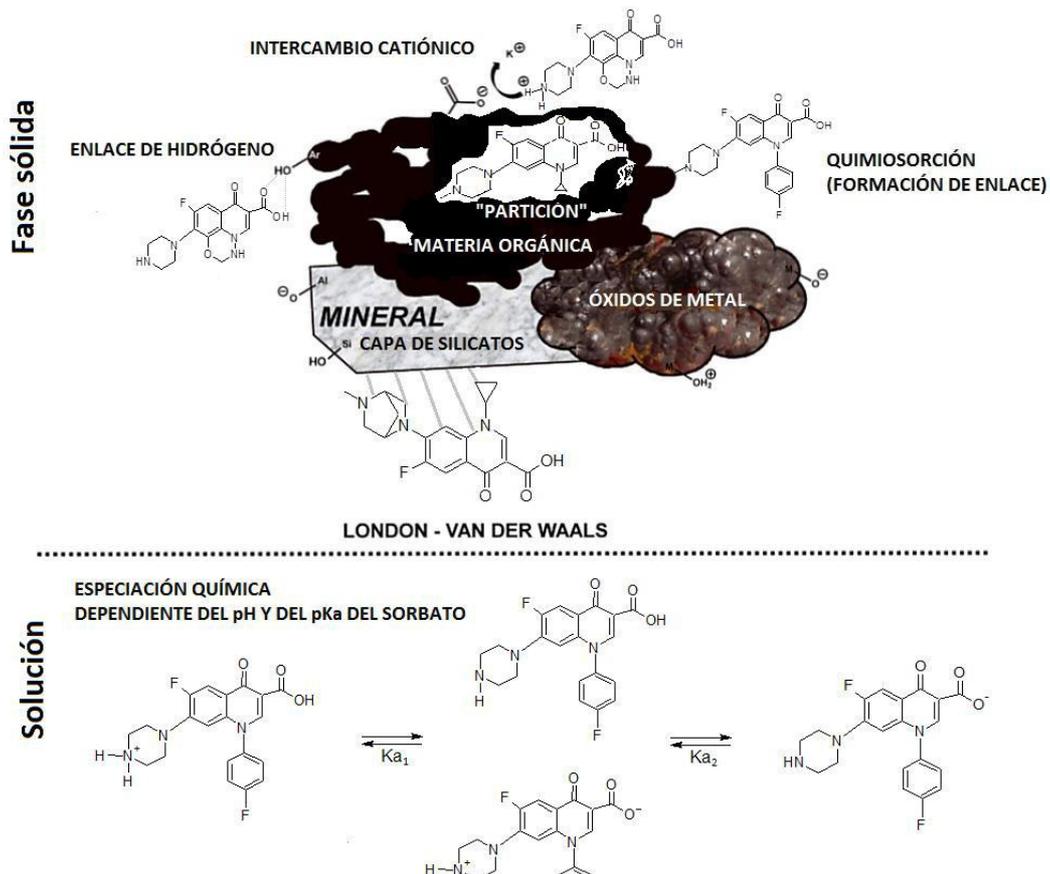


Figura 1.15. Diferentes interacciones posibles entre una molécula orgánica ionizable y los diferentes componentes que integran el suelo

Seguidamente, pasaremos a exponer las posibilidades de cuantificar la sorción, así como los diferentes modelos que se utilizan con la finalidad de describir y entender las interacciones suelo-soluto.

1.5.2 Medida de la sorción

La magnitud de sorción o capacidad de retención de un suelo puede cuantificarse mediante la relación entre la concentración de soluto retenido por el sorbente (C_s , mg Kg⁻¹) y la concentración del mismo soluto en la solución en equilibrio (C_w , mg L⁻¹). Esta relación es el coeficiente de distribución (K_d), que se expresa en unidades de volumen por masa de sorbente (L Kg⁻¹) (160):

$$K_d = \frac{C_s}{C_w} \quad (\text{Ec. 1.2})$$

El valor de K_d es una medida directa de la partición de un soluto entre la fase sólida y la fase acuosa. En el marco de esta tesis, la fase sólida es el suelo, mientras que la fase líquida es la disolución acuosa en equilibrio con éste.

No obstante, K_d no es una constante termodinámica, y por tanto depende de otras variables, como el pH y la fuerza iónica de la solución, las propiedades fisicoquímicas del suelo, la concentración del soluto, etc.

En general, la determinación de K_d se lleva a cabo mediante diferentes métodos (161-163):

- **Método en columna o desplazamiento en columna (column displacement o flow-through).** En éste, una solución que contiene una cantidad conocida de un soluto se introduce en una columna rellena con suelo cuya densidad aparente (masa de suelo por unidad de volumen de la columna) y porosidad (volumen de espacio de poro por unidad de volumen de la columna) son conocidos. Se mide la concentración del soluto en el eluato en función del volumen de éste. También se determina el volumen muerto, utilizando un marcador no retenido. A partir de estos datos se determina el factor de retención, parámetro relacionado con el coeficiente de distribución.
- **Método por equilibrio en lotes (batch).** Es el método más comúnmente utilizado y es el que describimos en este estudio.
- **Método de equilibrio de lotes en sitio (batch in situ).** Este método es similar al anterior. En éste, se extrae directamente de un acuífero una muestra que contiene un par fase sólida-fase acuosa. La fase acuosa se separa por centrifugación o filtración de la fase sólida y luego se determina la concentración del soluto. También se determina la concentración de éste en la fase sólida.
- **Método de modelado de campo.** Se utiliza para obtener datos exactos sobre el tiempo de transporte de un contaminante, ya que se mide la concentración de un contaminante disuelto directamente de muestras que se toman en pozos de monitorización. También se conoce como método de calibración en campo. Es un procedimiento para estimar valores de K_d , que utiliza un modelo de transporte y datos de monitoreo de aguas subterráneas existentes. Se trata de un proceso iterativo que frecuentemente requiere el ajuste de valores para otros diferentes

parámetros de entrada como la porosidad efectiva, velocidad de flujo, entre otros.

- **Método K_{OC} .** Es un método para estimar la partición de compuestos orgánicos. Como en general las sustancias orgánicas hidrofóbicas se distribuyen en la materia orgánica natural presente en sedimentos o suelos, este enfoque asume que el contaminante interactúa únicamente con la materia orgánica del suelo. Por tanto, se utiliza un coeficiente de partición entre el carbono orgánico (K_{OC}) o la materia orgánica (K_{OM}) y el agua.

Por otra parte, y como ya se ha comentado, K_d no es una constante termodinámica, sino que depende de una serie de factores. Uno de ellos es la concentración de soluto, por lo que, para describir el comportamiento de un soluto entre un fluido y una fase sólida, los estudios relacionados se llevan a cabo a diferentes concentraciones de soluto en equilibrio entre las dos fases. Este procedimiento lleva a la determinación de las **isotermas de sorción**, que se describen en el siguiente apartado.

1.5.3 Isotermas y modelos de sorción

Una isoterma de sorción consiste en la representación gráfica de C_s en función de C_w a temperatura constante, y en unas condiciones experimentales determinadas (como pH, fuerza iónica, etc.). Su determinación experimental se lleva a cabo a partir de la medida de las concentraciones en equilibrio entre C_s y C_w en un intervalo de valores de C_w . Por su propia definición, la pendiente de la isoterma en cada punto C_s/C_w corresponde al valor de K_d . Por tanto, las isotermas de sorción describen la relación entre la cantidad de soluto retenida por el sólido y su concentración en solución en el equilibrio (156).

Existen cuatro tipos básicos de isotermas de sorción, en función de la forma que pueden presentar, siendo los tipos o clases, L, H, C y S (138, 140, 164-167), (Figura 1.16):

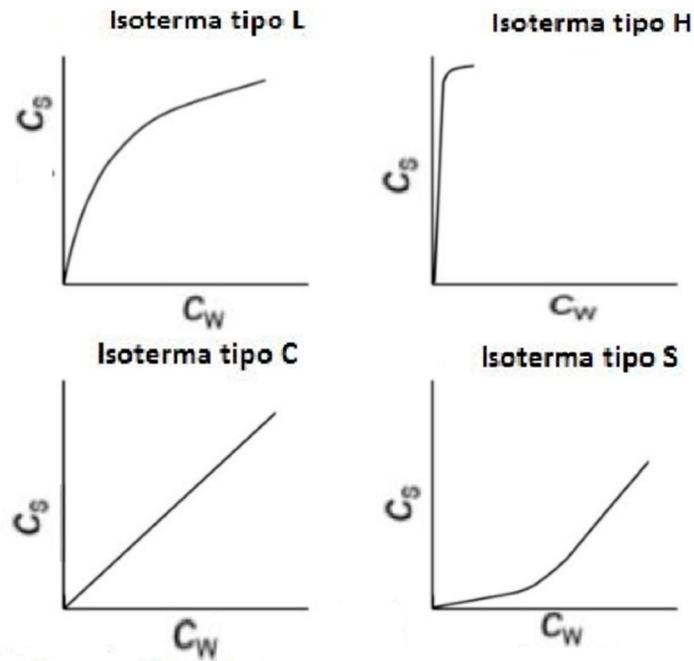


Figura 1.16. Tipos básicos de isothermas. Adaptado de: (138, 141, 167)

- La *isoterma tipo L* es la más común de las isothermas de sorción en suelos. Este tipo indica una gran afinidad entre el sorbato y el sorbente a bajas C_w , la cual va disminuyendo a medida que aumenta el contenido de soluto en la superficie del sorbente. Un caso extremo de esta isoterma es el tipo **H**, denominada de alta afinidad, que presenta una pendiente inicial muy elevada. Usualmente indica quimisorción (por ejemplo, interacciones fosfato-óxido de hierro) (136, 141).
- La *isoterma de tipo C* se caracteriza por una pendiente constante, dando lugar a un valor de K_d constante. Este hecho se puede interpretar por la existencia de un exceso de sitios en la superficie del sorbente en una situación lejos de la saturación, o bien que la sorción del sorbato supone la creación de nuevos sitios capaces de sorber la misma cantidad de sorbato. A menudo, a este tipo de isothermas se les denomina isothermas de partición constante (141). Una K_d constante sugiere que la retención del sorbato es independiente de la cobertura de la superficie (128). Los procesos de sorción tipo C frecuentemente se relacionan con la partición de sustancias químicas orgánicas en la materia orgánica del suelo.
- La *isoterma de tipo S* se distingue por presentar un punto de inflexión que supone un aumento repentino de la pendiente. Este comportamiento se atribuye

generalmente a una cooperación entre las moléculas retenidas (165) y sugiere que hay una barrera para la sorción del sorbato a concentraciones bajas. Este hecho puede ser debido a otras sustancias que compiten por los sitios de sorción, pero una vez que se vence esta limitación, la interacción sorbato-sorbente es similar a la sorción indicada por la curva L (128).

Las isotermas de sorción nos permiten conocer de una manera macroscópica la distribución de soluto entre dos fases. En general, proporcionan información sobre el mecanismo de sorción, y en casos concretos, permiten la asignación de un determinado mecanismo de manera conclusiva. En general, la caracterización de un mecanismo de sorción requiere un estudio más exhaustivo, como, por ejemplo, la medida de C_s mientras se varía alguna propiedad de la solución (como el pH) (140), o mediante la realización de estudios de competición con otros sorbatos. Estos últimos, a menudo sirven para averiguar qué parte de la molécula se encuentra involucrada en la interacción con el sorbente.

El objetivo cuando se obtiene una isoterma de sorción, es la obtención de un modelo que describa, de la forma más adecuada posible, el comportamiento del sistema. Con la finalidad de llevar a término esta aproximación, se utilizan diferentes modelos de sorción, a los que se ajustan los datos experimentales. Las ecuaciones más empleadas para describir los datos obtenidos son las ecuaciones de Langmuir y Freundlich. No obstante, a veces se utilizan combinaciones de estas o ecuaciones más complejas cuando las anteriores no se ajustan adecuadamente a los valores experimentales (128). Ejemplos de estos modelos serán expuestos más adelante. Por último, cabe indicar que, cuantos más parámetros se necesiten para ajustar un modelo, más difícil será la adjudicación de un significado físico a cada parámetro obtenido. A continuación, se describen más detalladamente los modelos de Langmuir y Freundlich.

Modelo de Langmuir

El enfoque del equilibrio de Langmuir fue desarrollado en 1918 para describir la adsorción de gases sobre superficies homogéneas. Este modelo incluye una serie de

requisitos con el objeto de explicar la adsorción de especies químicas en suspensiones suelo-solución de suelo, que se indican a continuación (142):

- Existe un número limitado de sitios de sorción, que tienen la misma energía.
- La sorción es de tipo monocapa simple.
- El comportamiento de adsorción es independiente de la cobertura de la superficie (no existe interacción entre las especies sorbidas en la superficie).
- Se puede asumir el máximo recubrimiento del sorbente.
- Todos los sitios de adsorción están representados por el mismo tipo de grupos funcionales.

A pesar de que la sorción en los sistemas suelo/agua dista mucho de cumplir todos los requisitos, la ecuación de Langmuir es muy empleada, sobre todo cuando existe un mecanismo de sorción predominante y la isoterma presenta un perfil de tipo L. La relación entre C_s y C_w , según el modelo de Langmuir se obtiene, mediante la ecuación (162):

$$C_s = \frac{b \cdot K_L \cdot C_w}{1 + K_L \cdot C_w} \quad (\text{Ec.1.5})$$

Donde b (mg kg^{-1}) es la capacidad de máxima sorción del suelo, que relaciona la afinidad de la superficie por el soluto (167), y K_L (L mg^{-1}) es la constante de Langmuir, que está relacionada con la intensidad de sorción o la energía de enlace del soluto por el sorbente.

Modelo de Freundlich

Este modelo considera la existencia de diferentes tipos de sitios, con sus correspondientes energías de sorción, y su expresión matemática se obtiene como resultado de combinar las ecuaciones de Langmuir de cada tipo de sitio, dando lugar a la ecuación (144):

$$C_s = K_F \cdot (C_w)^N \quad (\text{Ec.1.6})$$

Donde K_F ($\text{mg}^{1-N} \text{L}^N \text{kg}^{-1}$) es el coeficiente de Freundlich, también llamado coeficiente de capacidad unitaria. Está relacionado con la magnitud de la sorción y N (adimensional) es el parámetro de linealidad. Cuando $N=1$ indica una isoterma de tipo C (lineal) (167); en este caso particular, K_F equivale a K_d . Además, proporciona una medida sobre la

heterogeneidad de los sitios de sorción en la superficie del sorbente. Una desviación importante de la linealidad implica una gran diversidad de sitios de sorción; así, valores de $N < 1$ indican una disminución de K_d al aumentar C_w , mientras que si $N > 1$ indica una sorción favorecida a medida que aumenta la cantidad de soluto en la fase sólida.

En general, el modelo de Freundlich se ajusta mejor a los datos de equilibrio que el modelo de Langmuir, ya que no está limitado a sitios de energías homogéneas o niveles limitados de sorción (167).

Otros modelos de sorción

Además de los modelos de Langmuir y Freundlich, existe una gran variedad de modelos que pueden emplearse para describir el proceso de sorción. Algunos de ellos son los siguientes (168-171):

- Modelo Dual de Langmuir. Este modelo asume la existencia de dos tipos diferentes de sitios de sorción. Uno de alta energía y el otro de baja energía. Su ecuación se define como:

$$C_s = \frac{Q_{\max,1}^{DL} b_1 C_w}{1 + b_1 C_w} + \frac{Q_{\max,2}^{DL} b_2 C_w}{1 + b_2 C_w} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

Donde $Q_{\max,n}$ y b_n son las capacidades de máxima sorción y la afinidad de sorción por los sitios de sorción tipo n , respectivamente.

- Modelo de Langmuir-Freundlich. La ecuación que describe este modelo es la siguiente:

$$C_s = \frac{(K C_w)^\beta M}{1 + K C_w^\beta} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

Donde M es el máximo de sorción y β es un parámetro empírico que varía con el grado de heterogeneidad. K es el parámetro de afinidad.

- Modelo de sorción Polanyi-Dubinin-Manes. Está basado en la asunción de fenómenos de sorción heterogéneo y la existencia de un cierto potencial de sorción por moléculas en la proximidad de las superficies sorbentes. Este potencial depende de la distancia de la molécula a la superficie y de la naturaleza del sorbente. Su ecuación es:

$$C_s = Q_{\max}^{\text{PDM}} \exp \left[- \left(\frac{RT \ln \left(\frac{S}{C_w} \right)}{Z} \right)^d \right] \quad (\text{Ec. 1.9})$$

Donde S es la solubilidad en agua del soluto en su estado normal (líquido o sólido) ($\mu\text{mol L}^{-1}$) a la temperatura experimental. Z (J mol^{-1}) y d (-) son parámetros fijados, y R ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) y T (K) son la constante del gas ideal y la temperatura experimental, respectivamente. El parámetro Z es un factor de normalización, que representa las fuerzas de interacción responsables de la sorción de las diferentes moléculas, mientras que el exponente d depende de la distribución de las energías de sorción.

- Modelo de Elovich. Este modelo está basado en el principio cinético que asume que los sitios de sorción aumentan exponencialmente con la sorción, lo cual implica una sorción multicapa.

$$\frac{C_s}{q_m} = K_E C_w \exp \left(- \frac{C_s}{q_m} \right) \quad (\text{Ec. 1.10})$$

Donde K_E es la constante de equilibrio de Elovich (L mg^{-1}) y q_m es la capacidad de sorción máxima de Elovich (mg g^{-1}).

- Modelo de Temkin. Asume que la sorción de todas las moléculas en la capa disminuye linealmente con la cobertura debido a las interacciones sorbente-sorbato y que la sorción está caracterizada por una distribución uniforme de las energías de enlace, hasta alcanzar una energía de enlace máxima.

$$\theta = \frac{RT}{\Delta Q} \ln K_0 C_w \quad (\text{Ec. 1.11})$$

Donde θ es la cobertura fraccional, R es la constante universal de los gases, T la temperatura (K), $\Delta Q = (-\Delta H)$ la variación de la energía de sorción (KJ mol^{-1}) y K_0 es la constante de equilibrio de Temkin (L mg^{-1}).

En esta tesis también estudiamos los procesos de sorción en mezclas suelo/biochar, por lo que en el siguiente apartado se describe el ‘Biochar’, así como sus usos y su relación con este trabajo.

1.6 Biochar

El “Biochar” es un material carbonoso pirogénico *PCM* (*Pyrogenic Carbonaceous Material*), como también lo son el carbón vegetal (charcoal), el carbón de leña (char), el negro de carbón (black carbon) y el carbón activado (activated carbon) (172). Se trata de un material con alto contenido de carbono, rico en compuestos aromáticos condensados de seis átomos de carbono unidos entre sí (173-174).

Los PCM son producidos mediante combustión o pirólisis de biomasa. La biomasa es una mezcla de constituyentes estructurales (hemicelulosas, celulosa y lignina) y cantidades menores de extractivos (material inorgánico, azúcares no estructurales, material nitrogenado, clorofila, ceras, entre otros componentes menores) (175-176), que durante el proceso de pirólisis en ausencia de oxígeno, se degrada a diferentes velocidades y por diferentes mecanismos y vías, dando como resultado la producción de sólidos (material carbonoso del tipo del biochar, por ejemplo), productos líquidos y gaseosos (175).

En el proceso de pirólisis, los componentes estructurales de la biomasa se descomponen gradualmente. La hemicelulosa es el primer componente de la biomasa en descomponerse, a temperaturas de 470 a 530 K. A continuación, la celulosa se degrada en el rango de temperatura de 510 a 620 K, y el último componente en pirolizarse, a temperaturas de 550 a 770 K, es la lignina (175).

La materia prima de partida y su aplicación son las principales características que por convención se tienen en cuenta para la clasificación y denominación de los materiales carbonosos pirogénicos. Por ejemplo, para que un material carbonoso sea denominado como **Biochar** debe haber sido obtenido únicamente mediante pirólisis de material de origen biológico (173) y en ausencia o con cantidades limitadas de oxígeno. Además, debe haber sido producido para su aplicación al suelo (con el fin de mejorar su productividad), como depósito de carbono (C), como promotor en la remediación de suelos, o para filtrar el agua percolada por el suelo. Otra característica importante que se toma en cuenta para distinguirlo de los demás materiales carbonosos es su alto contenido de carbono, con estructuras aromáticas condensadas de seis átomos de carbono unidos entre sí (173-174).

Durante la obtención de Biochar (considerado como un sólido de alto contenido energético) también se obtienen otros productos de energía renovable, tales como el **Bio-oil** (líquido de alto contenido energético) y el **Syngas** (gas de relativamente bajo contenido energético) (177).

Los sistemas de pirólisis empleados en el procesado de la biomasa se pueden dividir en tres tipos (177), diferenciados en la temperatura y velocidad de calentamiento, y que dan lugar a diferentes proporciones en los productos obtenidos (175):

- Pirólisis “lenta” (slow pyrolysis), también conocida como pirólisis convencional.
- Pirólisis “rápida” (fast pyrolysis).
- Pirólisis “relámpago” (flash pyrolysis).

El rendimiento de productos líquido, sólido y gas dependerá de las condiciones de pirólisis empleadas y de la materia prima. La tabla 1.13 muestra los diferentes rendimientos obtenidos para los biocombustibles de acuerdo con el tipo de pirólisis y las condiciones empleadas en cada caso

La tabla muestra que temperaturas moderadas y tiempos de residencias mayores favorecen la producción de biochar y syngas, mientras que la producción de bio-oil es altamente favorecida por tiempos de residencia extremadamente cortos y temperaturas muy altas en la pirólisis relámpago, siendo este tipo de proceso el preferido para obtenerlo.

Tabla 1.13. Proporción de biocombustibles obtenido según tipo de pirólisis (177-178)

Proceso	Condiciones			Rendimiento de producto (%)		
	Temperatura (K)	Tiempo de residencia (s)	Velocidad de calentamiento (K/s)	Bio-oil	Biochar	Syngas
Pirólisis lenta	550 - 950	450 – 550	0,1 – 1,0	30	35	35
Pirólisis rápida	850 - 1250	0,5 - 10	10 – 200	50	20	30
Pirólisis relámpago	1050 - 1300	< 0,5	> 1000	75	12	13

Por otra parte, algunas organizaciones no gubernamentales como la “International Biochar Initiative” (IBI) sostienen que el Biochar debe cumplir, además de las condiciones citadas previamente, con estas características (172):

- Una proporción $H/C_{org} \leq 0,7$ expresado como relación molar. Este parámetro indica el grado de carbonización del biochar, ya que la presencia de hidrógeno revela la presencia de residuos de materia orgánica original poco carbonizada (179);
- Unos valores límites del contenido en metales pesados (mostrados en la Tabla 1.14), puesto que el mismo está relacionado con su toxicidad y la posibilidad de que éstos pasen a través de la cadena trófica al ser humano.

En la siguiente tabla se exponen algunos de los requerimientos para los certificados de biochar que exigen la Unión Europea y la IBI para los parámetros indicados.

Tabla 1.14. Requerimientos normativos en los certificados de Biochar (172)

PARÁMETRO	Certificado Europeo de Biochar V4.8	Estándar de biochar IBI V2.0
Contenido de C	$C_{TOTAL} \geq 50\%$	C_{ORG} Clase 1 $\geq 60\%$ $60\% >$ Clase 2 $\geq 30\%$
Relación Molar H/ C_{ORG}	0.7 máx.	0.7 máx.
Elemento	Contenido ($mg\ kg^{-1}$)	
	Grado premium	Todos los biochar ($mg\ kg^{-1}$)
As	NR	12 – 100
Cd	< 1	12 – 100
Cr	< 80	64 – 1200
Co	NR	40 – 150
Cu	< 100	63 – 1500
Hg	< 1	1 – 17
Mo	NR	5 – 20
Ni	< 30	47 – 600
Se	NR	2 - 36
Zn	< 400	200 – 7000
B, Cl, Na	NR	D
Pb	< 120	NR

NR: No Regulado Declaración C_{TOTAL} : Carbono total máx: máximo C_{ORG} : Carbono orgánico D:

En cuanto a su composición, el biochar, además de carbono, puede contener oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo y azufre en menor proporción (180-181). El contenido de cada uno de estos elementos, así como sus propiedades fisicoquímicas, dependerá de la biomasa de partida (182-184) y de las condiciones de pirolisis (174, 183-189). La siguiente tabla muestra el contenido de C, O e H de acuerdo con el grado de carbonización del biochar (188, 190).

Tabla 1.15. Composición del biochar de acuerdo con la temperatura de pirólisis

Grado de carbonización	C	O	H	Referencia
Alto (500-700 °C)	$\geq 90 \%$	$\leq 20\%$	$\leq 2\%$	(188)
Bajo (300-400 °C)	40-50%	$>20\%$	2-10%	(190)

Estudios con diferentes materias primas han demostrado que al aumentar la temperatura de pirólisis la capacidad de intercambio catiónico CEC aumenta hasta alcanzar un máximo y luego disminuye. Por otro lado, el área superficial, el contenido de cenizas, la capacidad de retención de agua y el pH aumentan al aumentar la temperatura de pirólisis, mientras que el carbono orgánico extraíble en agua presente en el biochar disminuye conforme aumenta la temperatura de pirólisis (191-192).

Por otra parte, se ha comprobado que al aumentar la temperatura de pirólisis la relación H/C, el % de N e H disminuyen, mientras que el % de C aumenta. El % de S varía, ligeramente bajo estas condiciones (189).

Durante la pirolisis del biochar, como en la formación de cualquier carbón, la materia orgánica experimenta una descomposición térmica y una posterior reducción de volumen. Aparte de la pérdida de agua y de otras moléculas volátiles, la estructura biopolimérica original de la biomasa utilizada –por lo general lignina, celulosa y hemicelulosa vegetal (187) - cambia a una estructura amorfa donde coexisten una mezcla de estructuras poliaromáticas y restos de biopolímeros alterados (193).

La estructura del biochar es altamente aromática, donde una serie de anillos aromáticos de seis eslabones condensados adoptan estructuras planas (placas) del tipo grafito (Figura 1-17a) (194). Estas estructuras aromáticas repetitivas, que recuerdan a la estructura del grafeno, se agrupan formando pilas de un número reducido de placas, que forman pequeños reductos de estructuras cristalinas dentro del carbón (Figura 1-17b) (195). Se ha confirmado mediante difracción de rayos X que los biochars pueden llegar a contener hasta el 71% de grafito microcristalino formado por agregados de tres placas. Éstas se encuentran en disposición turbostrática (placas no alineadas) y se disponen en el espacio de forma aleatoria (Figura 1-17c) (194, 196).

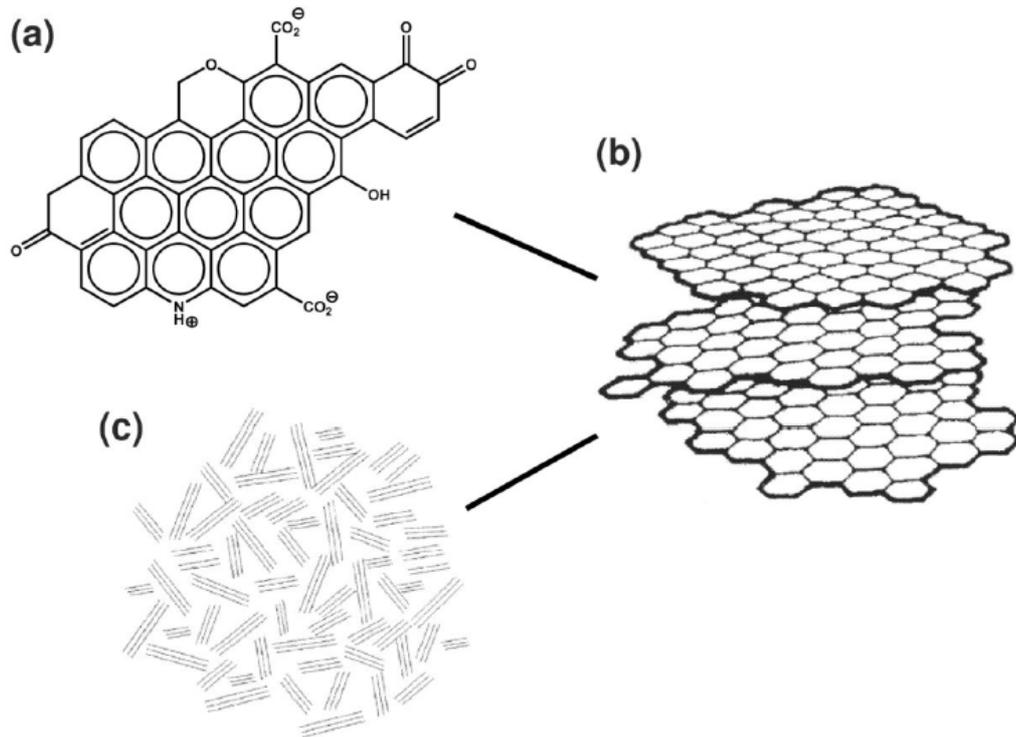


Figura .1.17. Estructura del biochar. (a) Representación de una capa (tipo grafeno) donde se observa el sistema central π conjugado y los grupos funcionales en los bordes. (b) Unidades estructurales básicas apiladas. (c) Distribución aleatoria de los agregados microcristalinos (194, 196)

Las temperaturas extremadamente altas (2500 °C) pueden favorecer la formación de biochar con estructuras poliaromáticas condensadas, que dan como resultado biochar con estructuras ideales como las que se muestran en la figura 1.18.

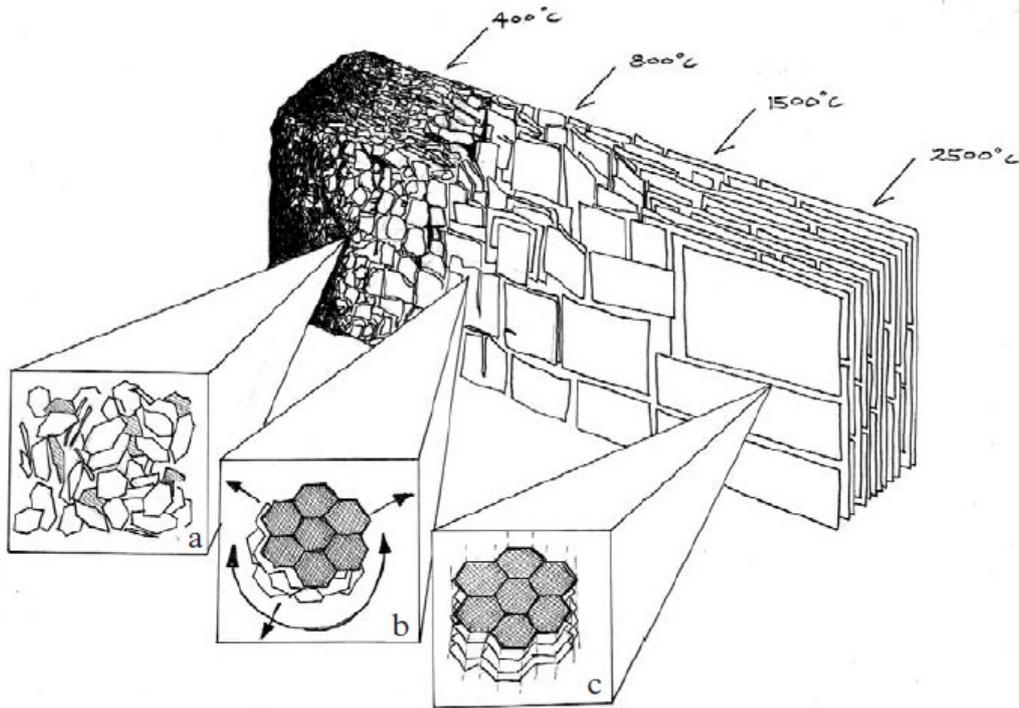


Figura 1.18. Estructura ideal del biochar desarrollada con temperaturas de tratamiento extremadamente altas. (a) Proporción aumentada de C aromático, altamente desordenada en la masa amorfa, (b) crecimiento de láminas de C aromático conjugado, en forma de turbo estrato (c), estructura que tiende a la del grafito (173)

Las superficies de los PCM contienen una variedad de grupos funcionales localizados sobre o dentro de los bordes de las capas, exhibiendo diferentes grados de aromaticidad (197). Dentro de las placas de biochar también pueden encontrarse oxígeno, nitrógeno y azufre como heteroátomos en los anillos aromáticos (piranos, cromenos, dioxanos o lactonas), y formando parte de los diferentes grupos funcionales situados en los bordes. De éstos, los principales son fenol, carboxilo, éster, amino, etc. (Figura 1.19) (198). En los bordes de las placas también hay electrones σ desapareados que son el resultado de roturas homolíticas de enlaces ocurridas durante la pirólisis (198-200).

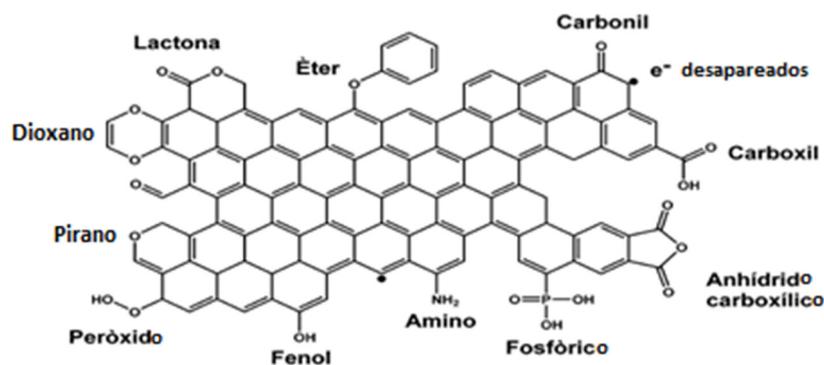


Figura 1.19. Diferentes grupos funcionales y heteroátomos más comunes en biochar (198)

Actualmente las aplicaciones de biochar son muy variadas. A continuación, explicaremos las más importantes.

1.6.1 Usos del Biochar

El biochar puede utilizarse para una variedad de aplicaciones como (201):

- Mitigación del cambio climático, mediante la reducción de las emisiones del gas de efecto invernadero (202), que en conjunto con la producción de bioenergía provee de un beneficio neto medioambiental (203). Esta reducción se basa en el secuestro de C atmosférico (CO₂) por el biochar al ser éste una forma altamente estable de C, por lo que retiene al CO₂ de forma más firme (173, 204-206).
- Enmienda para el suelo, mejorando sus características mediante la reducción de pérdidas por lixiviación de nutrientes del suelo (207-208) y aumento de la productividad de los cultivos en suelos altamente erosionados o degradados mediante la mejora del contenido de carbono orgánico (209).
- Agente para mejorar la calidad del agua que percola (210).
- Remediación y/o protección contra contaminantes medioambientales, como es el caso de la contaminación por NO₃⁻ (211), disminución de la captación de pesticidas por las plantas (212) y la biodisponibilidad de metales pesados (213-214), ya que los contaminantes son retenidos en el biochar.
- Fuente de energía verde (215-216).

Algunas de estas aplicaciones se muestran en la Figura 1.20.

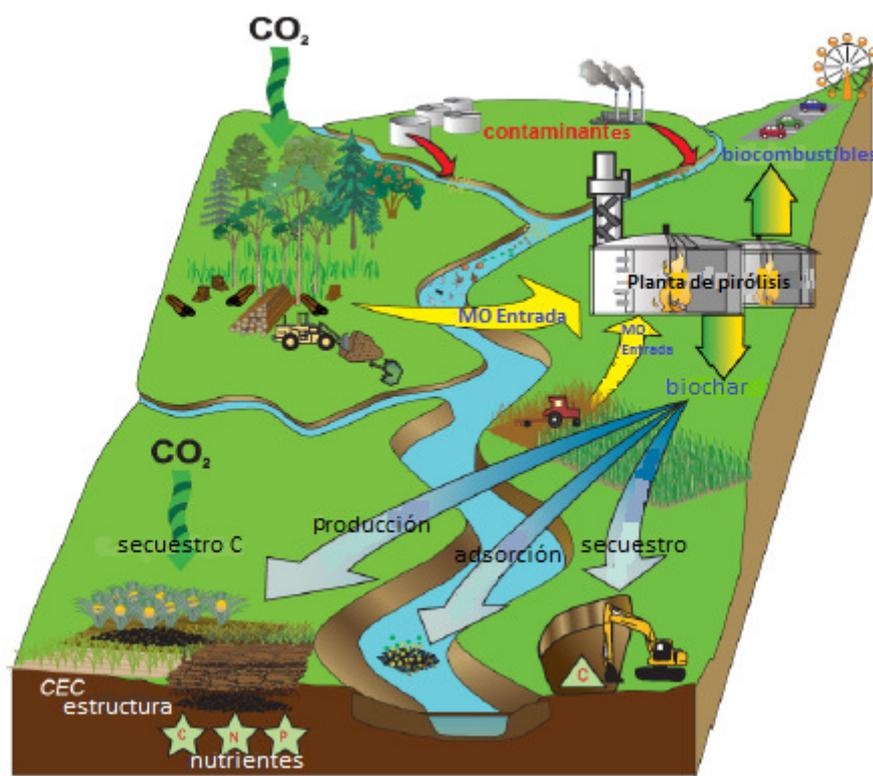


Figura 1.20. Representación de los principales beneficios que puede aportar el uso de biochar al medioambiente (Adaptado de 174)

No obstante, a pesar de los posibles efectos beneficiosos del biochar en diferentes ámbitos, también se deben considerar los posibles impactos que pueda tener sobre el medio (217).

Algunos estudios han indicado efectos adversos tras la aplicación de biochar como agente de rectificación a los suelos. Según Drake et al. (218), su utilización como enmienda aumenta el contenido total de carbono hasta un 15.6% en un suelo de bajo contenido de carbono, mejorando la biodiversidad y beneficiando las actividades de reforestación, pero altera las características fisicoquímicas del suelo, tales como la conductividad eléctrica y el ciclo del nitrógeno. Esta evidencia también ha sido descrita en un estudio posterior (219), por lo que algunos autores recomiendan la realización de más estudios sobre las respuestas planta-suelo-biochar para sitios específicos. En esta misma línea de estudio, Rees et al. 2014 (220), demostraron que el biochar disminuye la movilidad de los metales en el suelo. En sus resultados sostienen que, a corto plazo, los efectos del biochar sobre

los suelos contaminados pueden ser controlados por el tamaño de las partículas del biochar y por los procesos de alcalinización del suelo, teniendo el pH del suelo un rol importante en este contexto.

Otros efectos desfavorables descritos en la literatura son la liberación de la DOM del suelo (221) y los efectos negativos que tiene sobre la actividad de la fauna del suelo (222).

Por otro lado, las investigaciones realizadas por García et al. (223), sobre sorción de pesticidas a biochars de diferentes orígenes y fabricados en condiciones distintas, demostraron que los pesticidas estudiados fueron más afines al biochar con mayor proporción de aromaticidad y con mayor área superficial específica.

Por tanto, el impacto del biochar sobre el suelo dependerá de un conjunto de factores como (174):

- La materia prima y método de producción del biochar.
- El tipo de suelo sobre el cual se aplica.
- El clima.
- El tipo de cultivo.

La aplicación de biochar al suelo como enmienda es un proceso irreversible, por lo que deben examinarse a fondo los riesgos potenciales antes de adoptarse el uso generalizado de biochar. Algunos de estos riesgos son (203):

- **Las dosis de aplicación.** Debe evitarse la extrapolación de resultados a tipos de suelos no estudiados ya que no todos los suelos responden de igual manera a la aplicación de biochar. A pesar de que la mayoría de los estudios indican mejoras, en ocasiones se han observado efectos adversos sobre el crecimiento de las plantas. Este hecho ha sido atribuido a la retención de nutrientes por parte del biochar.
- **Efectos sobre agroquímicos.**
 - El biochar puede retener sustancias orgánicas, entre ellas herbicidas, reduciendo su efectividad.
 - El biochar puede inhibir la degradación microbiana de compuestos orgánicos.

- **Albedo del suelo.** El albedo del suelo es una medida de la reflectividad de una superficie y juega un papel importante en el cambio climático. El carbón en general oscurece al suelo, principalmente aquellos bajos en materia orgánica, por lo que la aplicación de biochar al suelo aumenta la absorción de la energía solar y disminuye el albedo del suelo. Este fenómeno da lugar a un aumento en la temperatura de la superficie del suelo, dando lugar a efectos más drásticos en el cambio climático en caso de un uso generalizado del Biochar.
- **Tiempo de residencia en el suelo.** Se estima que la vida media del biochar en el suelo (el tiempo en que tarda en descomponerse la mitad de la masa de biochar aplicado), es demasiado largo, pudiendo ser de varios miles de años para las regiones templadas (más de 3000 años) y de alrededor de 600 años en las zonas tropicales. Además, el porcentaje de mineralización (conversión a CO₂) en un período de 2 años, es muy bajo (aproximadamente del 3%).

El análisis de numerosos estudios lleva a la conclusión de que el biochar es persistente y que la mayor pérdida de éste del suelo tiene lugar mediante erosión, ya que se ha encontrado biochar en aguas superficiales (224), por lo que, como mencionaba Sohi et al., 2009 (174), la utilización de biochar puede llevar a la contaminación de las fuentes de aguas dulces, siendo pertinente la realización de estudios sobre las pérdidas de biochar a través del flujo lateral y vertical durante su movimiento a través de los perfiles del suelo, tras su aplicación a éste.

Con el fin de conocer más acerca del proceso de sorción en suelos adobados con biochar, a continuación, profundizaremos un poco en este tema.

1.6.2 Sorción en biochar

En general, las variaciones en la capacidad de sorción del biochar se ven afectadas por su temperatura de obtención, estructura molecular, porosidad y contenido en minerales (192).

Como hemos visto en la figura 1.19, el biochar puede poseer diferentes grupos funcionales. Su presencia le confiere la posibilidad de interactuar con distintos sorbatos, además de otorgarle un carácter ácido-base a su superficie. Por tanto, en función del pH de la solución que esté en contacto con la superficie del biochar, ésta exhibirá una carga superficial diferente, lo cual podría dar como resultado cambios de polaridad e hidrofobicidad. La Figura 1.21 muestra una compilación de los principales grupos funcionales y su comportamiento ácido-base.

La carga positiva en la superficie del biochar suele derivarse de la presencia de grupos funcionales con carácter básico que contienen oxígeno (por ejemplo, piranos y cromenos), nitrógeno (aminas) y electrones π deslocalizados en los planos basales de las placas que presentan un sistema que pueden interactuar con el ion hidronio mediante mecanismos tipo EDA (electron-donor acceptor) (225).

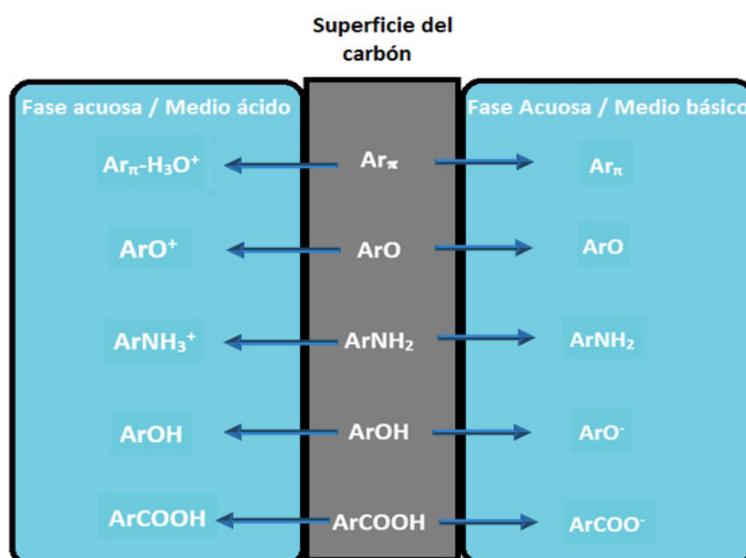


Figura 1.21. Principales grupos funcionales que pueden estar presentes en la superficie del biochar (AR indica un anillo aromático). Adaptado de 225

Por otro lado, las cargas negativas son consecuencia de los grupos funcionales ácidos, como los carboxilos y en menor extensión fenoles y carbonilos. Es frecuente la presencia de una gran cantidad de grupos funcionales diferentes, por lo que es posible que pocos μm de distancia coexistan grupos funcionales con carácter ácido-base diferente. Esto hace difícil la caracterización de las interacciones que pueden tener lugar en la superficie del biochar.

Adicionalmente, una característica muy importante del biochar es que su superficie puede considerarse anfótera con respecto a las interacciones π . Las placas de biochar presentan un carácter marcadamente donador de electrones debido a la región central poliaromática y polarizable. Sin embargo, no se puede descartar que en los límites de las placas puedan existir regiones con carácter donador o aceptor de electrones σ y π . Por ejemplo, los grupos carboxilo, carbonilo y nitro son aceptores de densidad electrónica, a causa de la presencia de orbitales vacíos en sus configuraciones electrónicas (224, 226, 227).

Por otro lado, el conocimiento de las propiedades físicas y químicas, tanto del suelo, como de los contaminantes, tiene amplia aplicación, sobre todo, con propósitos de elucidar el destino de los compuestos químicos una vez alcancen el medioambiente. En el siguiente apartado conoceremos más acerca de los coeficientes de partición octanol/agua y de las constantes de acidez.

1.7 Constantes de disociación y coeficientes de distribución

En la actualidad, los fármacos se diseñan con el objeto de enlazarse a una proteína, a un receptor o a una enzima (228), para que puedan ser asimilados por el organismo tratado, y de esta forma combatir o prevenir una determinada enfermedad, actuando únicamente sobre la parte infectada.

Sin embargo, las dosis aplicadas son, generalmente, mayores a las requeridas por el organismo tratado, por lo cual no son absorbidos en su totalidad por el cuerpo receptor, pudiendo ser excretados o liberados al medio ambiente hasta en un 90 por ciento de la cantidad total administrada (14), representando así un riesgo para la salud. Como consecuencia de su uso, los ingredientes activos de los fármacos (APIs) que se administran, así como sus metabolitos de degradación, están ampliamente difundidos en todos los compartimientos ambientales. Por tanto, conocer las propiedades físicas y químicas, tales como el coeficiente de partición octanol/agua, las constantes de disociación y su solubilidad, principalmente, es de gran relevancia para determinar si una sustancia tiene tendencia a concentrarse en el medio ambiente acuático, terrestre, atmosférico o en la biota (229).

En este apartado se describen algunos procedimientos para la determinación de la lipofilicidad y constantes de acidez de sustancias químicas, en este caso fluoroquinolonas, así como la importancia de estas mediciones. También se indican, algunos de los principales métodos de predicción de estos parámetros.

1.7.1 Equilibrios ácido-base

Las constantes de disociación constituyen parámetros importantes, tanto para estudios ambientales como en medicina, al afectar las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, tales como lipofilicidad, solubilidad (230), absorción, distribución, metabolismo y eliminación (229).

Los fármacos que tienen propiedades ácidas o básicas débiles son más activos que aquellos con características fuertemente ácidas o básicas e incluso neutras (231). De hecho, la mayoría de los fármacos son compuestos ionizables, siendo aproximadamente un 75% de ellos de carácter básico; un 20% presentan características ácidas y un 5% son no ionizables (232).

En el caso particular de las quinolonas su actividad antibacteriana depende del pH, y de su concentración (233).

Otros ejemplos pueden ilustrar la importancia de los equilibrios ácido-base en medicina: por una parte, en caso de sobredosis de fármacos, es frecuente su eliminación por la orina. El pH de ésta normalmente es de 5,7 a 5,8, pero puede modificarse administrando dosis orales de NH_4Cl o NaHCO_3 , o bien dosis intravenosas de NaHCO_3 (234). Este aspecto, que puede salvar vidas en casos de sobredosis de barbitúricos, anfetaminas y narcóticos, está relacionado con la mayor capacidad de excreción de ácidos débiles en orina alcalina o de bases débiles en orina ácida.

También, conocer la constante de acidez de un fármaco es de utilidad para maximizar los rendimientos de reacciones químicas o síntesis, durante su fabricación. Por ejemplo, la extracción con disolventes puede ser aplicada con mayor eficiencia en una región de pH donde la molécula sintetizada sea neutra.

Por otro lado, los valores de pKa de zwitteriones/anfolitos, junto con los coeficientes de permeabilidad efectiva P_e (al pH del punto isoelectrico) PAMPA (Parallel Artificial

Membrane Permeability Assay), han sido utilizados para determinar la permeabilidad pasiva (relativa a la absorción intestinal) de diferentes compuestos anfóteros, entre ellos las fluoroquinolonas (235).

En cuanto a su dispersión en el medioambiente, los fármacos, al igual que cualquier otra sustancia, pueden moverse entre los diferentes compartimentos ambientales en función de las propiedades fisicoquímicas y características estructurales que posean. Las más importantes (236) son:

- Constante de disociación.
- Lipofilicidad.
- Presión de vapor.
- Solubilidad en agua.
- Reactividad.

De lo anterior es notable la importancia que tiene el conocimiento de las constantes de disociación, por lo que comentaremos algunos de los métodos que se emplean para su determinación.

En la actualidad, existen diferentes procedimientos experimentales y de predicción para determinar valores de pKa.

Aunque tradicionalmente se han utilizado para su determinación la valoración potenciométrica, la espectrofotometría de absorción UV-Vis (237), la solubilidad y la partición líquido-líquido (230), existe además una serie de técnicas experimentales, además de las citadas, como son la conductimetría, voltimetría, calorimetría, electroforesis, resonancia magnética nuclear, cromatografía líquida y fluorimetría (238).

A continuación, comentaremos brevemente los métodos experimentales más utilizados:

- **Espectrofotometría de absorción UV-Vis:** este método se basa en el cambio del espectro UV-VIS de la sustancia en estudio a diferentes valores de pH. Los resultados se obtienen a partir de la representación de la absorbancia en función del pH, a longitudes de onda donde hay una diferencia apreciable entre la absorptividad de las diferentes especies. Se puede trabajar a concentraciones del orden de 10^{-5} M, siendo la cantidad mínima de sustancia requerida para utilizar este método de un (1) mg (239). Sin embargo, tiene el inconveniente de que la muestra debe estar libre de impurezas, o que éstas no absorban en la misma longitud de onda del analito. Algunos ejemplos de su utilización incluyen:

fluoroquinolonas (240), colorantes de interés en diferentes campos (comercial, investigaciones médicas, análisis químico, industria) (241), antiinflamatorios (242), diferentes compuestos orgánicos (243), fármacos ionizables estructuralmente diversos (244).

- **Potenciometría:** en esta técnica se determinan los valores de pKa mediante una valoración potenciométrica del analito con ácido o con base fuerte (238, 245). Ha sido utilizado para la determinación de pKa's de una gran variedad de fármacos como quinolonas (246), fluoroquinolonas (247-248) y otros (249-256).
- **Electroforesis de zona capilar (CZE).** En la electroforesis capilar se aplica un campo eléctrico para lograr la separación de los componentes de una mezcla. Cuando se aplica el campo eléctrico, las especies cargadas empiezan a moverse. La separación obedece, en distinta medida, a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa (239). Este procedimiento no requiere de medidas de concentraciones de solutos o valorantes como en las técnicas potenciométricas, sino que sólo es necesario la medición de tiempos de migración (233). Este método ha sido utilizado para la obtención de valores de pKa de diferentes fármacos, como quinolonas (257), bases orgánicas en soluciones acuosas de acetonitrilo (258), compuestos heterocíclicos con una variedad de propiedades farmacológicas (259), diferentes ingredientes activos profármacos (260). La electroforesis capilar asistida por presión mediante detección por serie de fotodiodos se ha utilizado para determinar los pKa de diferentes fármacos (230).
- **Cromatografía líquida.** Este método se basa en el diferente comportamiento de retención de las formas neutra y cargadas de un analito. Se determina el tiempo de retención en función del pH de la fase móvil por HPLC de fase inversa. El valor del pKa se corresponde con el punto de inflexión en la curva sigmoide resultante (261). Sin embargo, esta técnica presenta el inconveniente de que requiere la adición de un modificador orgánico a la solución que contiene el analito para mejorar la retención de este (262). Los valores de pKa de ácidos polifenólicos se han determinado por esta técnica (253).
- **Método de solubilidad:** se utiliza cuando el compuesto tiene solubilidad extremadamente pequeña. Consiste en valorar una solución acuosa de la sustancia en dirección a la formación de su especie neutra hasta que precipite la base o el ácido libre. El pKa se obtiene entonces a partir del cálculo del producto de solubilidad (239).

Algunos de estos métodos han sido automatizados, siendo así muchas las determinaciones de valores de pKa's realizadas, utilizando los métodos de espectroscopia UV y potenciometría mediante instrumentos basados en estas técnicas (263-267).

Por otro lado, también existen diferentes los métodos de predicción disponibles, que suelen dividirse en dos categorías (268):

- **Métodos ab initio**, del término latín que quiere decir “desde el comienzo”. Estos métodos se basan en *cálculos directos*, es decir, cálculos derivados directamente de principios teóricos de mecánica cuántica (269-271). Entre éstos se encuentran los cálculos de valores de pKa basados en ciclos termodinámicos relacionados con el cambio de energía libre de Gibbs para la reacción de disociación (271).
- **Métodos estadísticos**, también llamados **QSPR** o **QSAR** (“Quantitative Structure-Property Relationship” o “Quantitative Structure-Activity Relationship”) cuando se aplican a la actividad biológica (269). Con el fin de estimar los valores de pKas de compuestos específicos, estos métodos combinan descriptores moleculares seleccionados, frecuentemente obtenidos mediante cálculos de química cuántica, y valores de pKa obtenidos experimentalmente (270).

La tabla 1.16 recoge algunos de los métodos computarizados QSPR más empleados para la estimación de valores de pKa, la compañía a quien pertenece y el enlace de internet correspondiente.

Tabla 1.16. Programas comerciales disponibles para la estimación de valores de pKa. Adaptado de (232).

PROGRAMA	COMPAÑÍA	URL
Marvin	Chemaxon (272)	https://www.chemaxon.com/
pKalc	CompuDrug (273)	http://www.compudrug.com/pallas_system
pKa DB	Advanced Chemistry Development (274)	www.acdlabs.com/products/
Epik	Schrodinger (275)	http://www.schrodinger.com/Epik/
QikProp	Schrodinger (276)	https://www.schrodinger.com/qikprop
ADMET Predictor	Simulations Plus (277)	www.simulations-plus.com
ChemDraw Prime	CambridgeSoft (278)	www.cambridgesoft.com
Sparc	Automated Reasoning in Chemistry (279)	http://archemcalc.com/sparc.html
ALOGPS 2.1	VCCLABS (280-281)	http://www.vcclab.org

Estas herramientas dan lugar, en general, a una capacidad de predicción razonable. Por ejemplo, en la aplicación de ACD/Labs a un conjunto de 22 compuestos se obtuvo un error estándar de 0.39 unidades de pKa, mientras que aplicado a otro conjunto de 26 fármacos se alcanzó un error de 0.36 unidades de pKa (281).

También, utilizando pKalc, en 645 compuestos se obtuvo una exactitud dentro de 0.25 unidades de pKa. QikProp posee un error absoluto promedio (MAE) de 0.19 unidades de pKa, y SPARC presentó un error RMS de 0.37 unidades de pKa en la evaluación de 3685 compuestos. ADMET Predictor tiene un MAE de 0.56 unidades de pKa para un conjunto de 2143 sustancias químicas diversas. Por otra parte, VCCLabs y SPARC son herramientas disponibles on-line gratis, aunque hay que resaltar el hecho de que VCCLabs falló en la predicción de 43 de los 645 compuestos químicos empleados como conjunto muestra (281).

1.7.2 Lipofilicidad y coeficiente de distribución

La **lipofilicidad** es la tendencia de un compuesto a transferirse desde una matriz acuosa hacia una matriz lipídica no polar (232). Su evaluación consiste en medir la distribución del compuesto entre dos fases líquidas inmiscibles, una no polar y otra polar. Para ello, generalmente se utiliza octanol como fase no polar y una solución acuosa cuyo pH es ajustado con un tampón, como fase polar.

La lipofilicidad de una determinada sustancia se puede expresar cuantitativamente mediante la **constante de distribución** entre agua y octanol (**Kow**) (282), que indica la relación de concentraciones en equilibrio de esta sustancia en octanol ($[A]_o$) y agua ($[A]_w$) (283):

$$Kow = \frac{[A]_o}{[A]_w} \quad (\text{Ec. 1.13})$$

Generalmente, el Kow, se expresa en forma de logaritmo y se utiliza “**log P**” cuando se trata de compuestos no ionizables.

En el caso de sustancias ionizables, podemos definir un **coeficiente de distribución (D)** como la relación entre la concentración total de un soluto entre octanol ($C_{B,OCT}$) y la fase acuosa ($C_{B,w}$):

$$D = \frac{C_{B,OCT}}{C_{B,w}} \quad (\text{Ec. 1.14})$$

Normalmente, el coeficiente de distribución (D) también se expresa en forma logarítmica ($\log D$). Para una sustancia ionizable, este valor depende del pH del medio, así como de sus constantes de disociación y de su “**lipofilicidad intrínseca**”, indicada como $\log P$, que corresponde al valor de $\log D$ cuando la sustancia se encuentra en forma neutra (284). Por su parte, el valor de $\log D$ a un pH determinado se le llama “**lipofilicidad efectiva**” (284-285).

En el caso de ácidos, su $\log D$ disminuye cuando aumenta el pH, ya que la relación de moléculas neutra/anión en solución disminuye, mientras que en bases tenemos el efecto contrario ($\log D$ aumenta con el pH) (232).

En el caso particular de las fluoroquinolonas, que son sustancias que presentan dos equilibrios de disociación ácido-base, pueden existir en forma catiónica (H_2A^+), neutra

(HA) o aniónica (A^-), además de la especie zwitteriónica (HA^\pm) en función del pH del medio. Por tanto, su lipofilicidad efectiva ($\log D$) dependerá de los valores de sus constantes de acidez (pK_{a1} y pK_{a2}), el valor de $\log P$ y el pH del medio. Así, el valor máximo de $\log D$ se obtendrá a pH entre pK_{a1} y pK_{a2} , mientras que $\log D$ disminuirá cuando: $pH < pK_{a1}$ y $pH > pK_{a2}$.

La lipofilicidad tiene relevancia en diversos campos de la medicina y en medioambiente.

En medicina tiene una importancia especial en los estudios de descubrimiento y desarrollo de fármacos, ya que están relacionados con propiedades tales como solubilidad, permeabilidad y estabilidad química (232, 286). El valor de $\log P$ también se utiliza en el establecimiento de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR), el cribado fisicoquímico en predicciones ADME-TOX (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) (287); así pues, se aplica extensamente tanto en estudios de actividad farmacocinética de medicamentos (232, 285), como en estudios de farmacodinámica, puesto que la lipofilicidad de un fármaco es esencial para su penetración a través de las membranas biológicas.

En general se observa que los valores altos de $\log P$ y $\log D$ son características no deseadas en este tipo de moléculas, ya que éstas se enlazarían a las proteínas del plasma de forma muy intensa, hecho que podría dar lugar a la acumulación del fármaco en los tejidos (285).

Por otro lado, en estudios ambientales, el K_{ow} es un valor de gran importancia para comprender y predecir el comportamiento, movilidad y destino medioambiental de los contaminantes (288). También se emplea como parámetro de entrada en programas de modelado del transporte y difusión en suelos y sedimentos, y en aguas superficiales y subsuperficiales (289), así como en programas de exposición, peligro y evaluación de riesgos (290), y en la estimación del coeficiente de partición correspondiente al carbono orgánico de suelos y sedimentos (291).

Además, la lipofilicidad también se utiliza en estudios de correlaciones con otras propiedades, tales como solubilidad (292), permeabilidad, metabolismo, toxicidad, enlace a proteínas y distribución (232).

En cuanto a los métodos de determinación de la lipofilicidad, desde los años 70 se han desarrollado diferentes métodos para predecir y determinar la lipofilicidad (293) y su

clasificación varía según los autores de los estudios. Por ejemplo, algunos los clasifican como métodos directos e indirectos (282, 294), otros, como métodos “in silico” (se utilizan programas especialmente desarrollados con propósitos de predicción), métodos de alto rendimiento y métodos exhaustivos (232). En nuestro caso, los clasificaremos como métodos experimentales y modelos de predicción.

A continuación, veamos, de manera más amplia, en qué consisten algunos de los métodos más utilizados para la determinación de la lipofilidad.

En primer lugar, veamos ejemplos de los métodos experimentales:

- **Método de agitación en frascos (“shake flask”).** Éste consiste esencialmente en una extracción líquido-líquido, en la que una disolución de la sustancia (normalmente en medio acuoso) se equilibra mediante agitación con otro disolvente inmiscible. El periodo de agitación puede variar entre 24 y 72 horas, aunque diversos autores indican que una agitación de 3 horas es suficiente para alcanzar el equilibrio de partición cuando la sustancia ya está disuelta en una de las dos fases. Una vez alcanzado el equilibrio, se toman alícuotas de cada fase y se determina su concentración (por ejemplo, mediante HPLC). En fluoroquinolonas, este método ha sido aplicado a la determinación del coeficiente de partición aparente $\log P_{app}$ para la sarafloxacin (294), ciprofloxacina y homólogos (295), y de la moxifloxacina (296).
- El método **reducido de agitación en frascos** (“scaled-down shake flask”) es una modificación del método anterior. El instrumento en el que se lleva a cabo el experimento consta de 96 pocillos, con un volumen de 1 mL (0.5 mL de fase acuosa y 0.5 mL de octanol). El compuesto a ensayar se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO). Se adicionan las fases al vial, se sella y se agita para mezclar. Posteriormente, se obtiene una alícuota de cada una de las fases y se analiza, generalmente por HPLC, para determinar la concentración del compuesto en cada fase.

Este método tiene el inconveniente de que el DMSO puede alterar el equilibrio de distribución, por lo que el volumen debe mantenerse lo más bajo posible (<1% del volumen acuoso).

Una variante de este método utiliza un manipulador de líquidos robótico con detección por espectrometría de masas. Ha sido utilizado para determinar el $\log D$ de una variedad de compuestos (297).

○ Otras variedades del método de agitación en frascos son la microextracción líquido-líquido asistida por vortex **VALLME** y acoplada a HPLC y el sistema de zonas fluidicas **ZF**. En VALLME se requieren únicamente 2 minutos de agitación con vortex para que la solución compuesta por la fase acuosa, que consiste en agua y que contiene el analito disuelto y, por la fase orgánica, el octanol, alcancen el equilibrio. La concentración del analito se determina en la fase orgánica por HPLC (298). Por otro lado, en el sistema ZF se utilizan volúmenes del orden de microlitros de octanol, de la fase acuosa -un amortiguador de fosfato salino-, y de la solución del fármaco. La distribución del analito en las fases se da por el movimiento oscilante de una bomba pistón de jeringas. Las fases se separan debido a la diferencia en densidades. Luego la zona de fluidos se coloca en la celda de detección de flujo de un espectrofotómetro y se mide la absorbancia de una de las fases, que junto con los volúmenes del solvente y de la muestra pura utilizados para el experimento, se emplea para determinar el coeficiente de partición octanol/agua (299).

○ **Método potenciométrico.** En este procedimiento se valora en primer lugar el compuesto para obtener una curva pH/volumen de valorante. A continuación, se realiza otra valoración en las mismas condiciones, pero en presencia de octanol. El cambio en la curva es debido a la partición del compuesto en octanol. La lipofilidad se calcula a partir del cambio de la curva. Este método ha sido utilizado para la determinación de coeficientes de partición membrana liposomal-agua y perfiles de lipofilidad de fármacos ionizables (300), ácidos débiles (antimicrobianos, herbicidas, preservantes de madera), bases débiles (tranquilizantes, anestésicos, β - bloqueadores) y compuestos dipróticos (fármaco antimalaria) (284, 301-302).

La aplicabilidad de este método depende de la solubilidad del compuesto en agua.

○ **Membranas artificiales.** Estas simulan la partición liposoma/agua y la permeación de la membrana celular (284). Han sido utilizadas para medir la lipofilidad de diferentes quinolonas (303).

En una variante de este método la partición del analito se lleva a cabo mediante la utilización de aceites de semillas formando una delgada película lipídica como modelo de una biomembrana que simula su estructura y función (304).

- **Cromatografía líquida de fase inversa (HPLC-RP)**. En este método, una columna C18 simula la fase orgánica no polar y, la fase móvil, la fase acuosa. Se utiliza una serie de patrones, a partir de los cuales se representa su tiempo de retención (t_R) respecto su log D, previamente determinado, para obtener una recta de calibrado. El t_R del compuesto a ensayar se compara con esta recta para determinar su log D. Este método ha sido utilizado para determinar el coeficiente de partición n-Octanol/agua para DDTs y compuestos relacionados (305) y utilizando gradientes de elución (306).
- **Electroforesis capilar (CE)**. En este caso se utiliza la microemulsión electrocinética (MEEKC) para medir la lipofilidad. El compuesto a ensayar se distribuye entre la fase orgánica no polar -la microemulsión- y la fase acuosa. Cuando el compuesto se encuentra en la microemulsión, éste se mueve más lentamente a través de la columna. Por tanto, al aumentar la afinidad del compuesto por la fase lipofílica de la microemulsión, aumentará su tiempo de retención. Como en el caso anterior, se necesita de un calibrado con sustancias de log D previamente determinado. Este método se ha empleado para determinar los coeficientes de partición de una gran variedad de compuestos (307-308).

Para finalizar, mencionaremos algunos de los métodos que utilizan modelos de predicción.

En el caso de sustancias para las que no se dispone de valores experimentales de lipofilidad intrínseca ni de sus constantes de disociación, se han desarrollado una serie de programas que permiten la predicción de lipofilidades. Estos métodos pueden dividirse en dos categorías: los **basados en subestructura** y los **basados en propiedades** (308).

A continuación, veamos, las características de cada método y sus subdivisiones, de una forma general, ya que no es el propósito de este trabajo de tesis profundizar en este tema.

Los métodos **basados en subestructura** también reciben el nombre de métodos aditivos. Generalmente se calibran a partir de un gran conjunto de datos (309). Dentro de éstos se incluyen:

- Los **métodos fragmentales**: fragmentan la molécula en grupos de átomos. Toman en cuenta sus contribuciones y aplican factores de corrección para

compensar las interacciones intramoleculares electrónicas y estéricas. Se han utilizado para predecir la lipofilidad de moléculas orgánicas pequeñas (310).

- Los **métodos basados en átomos**: en éstos los diferentes tipos de átomos (H, C, O, S, N, halógenos) que contiene una molécula se dividen en diferentes categorías, dependiendo del medio ambiente del átomo dentro de la molécula, con el fin de obtener correlaciones razonables.

Ambos tipos de métodos asumen que las contribuciones de las subestructuras intervienen en el valor final de log P.

Los métodos **basados en propiedades** utilizan descriptores de la molécula para calcular log P como una función de las propiedades fisicoquímicas moleculares. Entre los descriptores que se toman en cuenta se encuentran la superficie molecular, el volumen de la molécula, la existencia o no de dipolos, y la presencia o no de cargas parciales (310-311). Algunos de estos métodos son (308):

- Los que utilizan representación de la **estructura en 3-D**.
- Los basados en **descriptores topológicos**. Se fundamentan en la teoría del gráfico molecular, y se conocen como descriptores 2-D. Representan la conectividad de los átomos en una molécula con independencia de parámetros métricos tales como equilibrio de distancias interatómicas entre los núcleos, ángulos de enlace y ángulos de torsión (309).

La tabla 1.17 detalla algunos de los programas de cálculo empleados más habitualmente en la predicción de log P y log D:

Tabla 1.17. Programas comerciales disponibles para la estimación de log P/logD

NOMBRE	TIPO DE MÉTODO	COMPAÑÍA/URL
Clog P	Subestructura-Fragmental (310-311, 312)	Daylight Chemical Information www.daylight.com
Bio-Loom	Subestructura-Fragmental (313-314)	BioByte http://www.biobyte.com/bb/ prod/bioloom.html
ACD LogD ACD LogP	Subestructura- fragmental (310, 274)	Advanced Chemistry Development www.acdlabs.com/products/
Molinspiration Prop. Calculator	Subestructura-fragmental (315)	Molinspiration www.molinspiration.com
KOWWIN-EPI Suite	Subestructura: átomo/fragmento (316-318)	EPA & Syracuse Research Corporation https://www.epa.gov/tsca-screening- tools/epi-suitetm-estimation-program- interface http://www.srcinc.com
ChemDraw Prime	Subestructura-fragmental (278)	CambridgeSoft www.cambridgesoft.com
OSIRIS Property Explorer	Subestructura-Átomo (319)	Organic Chemistry Portal
PrologP, PrologD	Subestructura-Átomos (273, 320)	CompuDrug www.compuDrug.com
QikProp	Propiedades- estructura molecular 3D (275-276)	Schrodinger https://www.schrodinger.com/qikprop
ADMET Predictor	Propiedades-Descriptores moleculares-2D, (277)	Simulations Plus www.simulations-plus.com
SLIPPER-2001	Propiedades-Estructura molecular (321)	ChemDB http://www.chemdbsoft.com/slipper- logp-logc-logd-logsw-fa.html
Sparc	Propiedades-Estructura molecular (279)	Automated Reasoning in Chemistry archemcalc.com/sparc.html
ALOGPS	Aditivo-Subestructura (310) Descriptores fragmetales (280, 322-323)	Virtual Computational Chemistry Lab www.vcclab.org

La exactitud de predicción de los diferentes métodos depende en gran medida de la complejidad molecular (el tamaño), y ha sido evaluada tomando en cuenta el número de átomos no hidrógenos (NHA, Number of Nonhydrogen Atoms), así como el número de heteroátomos (NHET, Number of Heteroatoms) y el número de enlaces rotatorios (NROT, Number of Rotatable Bonds) presentes en la molécula. A partir de estos análisis se ha demostrado que los métodos de predicción producen valores elevados de RMSE (Raíz del Error Cuadrático Medio) para moléculas con alto NHA. Igualmente, el error es mayor al aumentar los otros dos descriptores (NHET y NROT). No obstante, el efecto de estos dos últimos parámetros sobre la exactitud es menor que el observado para NHA. En general, se ha obtenido una baja exactitud de predicción de log P y log D para la mayoría de los métodos de cálculo que existen (308).

En el caso de log D, al comparar los valores experimentales de un conjunto de 70 fármacos con los predichos al utilizar la herramienta ClogD, se obtuvo un R^2 de 0.72, y la diferencia entre los valores predichos y los experimentales fue de alrededor de 1.05 unidades logarítmicas. En cambio, para moléculas pequeñas se han obtenido errores más pequeños (232).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el estudio de las interacciones entre una serie de antibióticos, de uso veterinario en general, y el suelo, con la intención de establecer su movilidad entre diferentes compartimientos medioambientales, así como la fijación de estos fármacos a la fase sólida para evitar su dispersión. Los fármacos objeto de este estudio han sido las siguientes fluoroquinolonas: danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin y sarafloxacin.

Para llevar a cabo este objetivo global se han planteado un conjunto de objetivos secundarios, que son:

- Estudio del comportamiento ácido-base y de distribución entre agua/octanol, que nos servirá para establecer la especiación de estos fármacos en función del pH, así como su lipofiliidad, relacionada con la interacción entre los fármacos y la materia orgánica del suelo.
- Estudio de las interacciones fármaco-suelo mediante la determinación de las isothermas de sorción de estas fluoroquinolonas en 14 suelos agrícolas de diferente procedencia y características físico-químicas (pH, capacidad de intercambio iónico, contenido en materia orgánica y textura).
- Para establecer las características del suelo que tienen más influencia sobre la sorción de estos fármacos se ha llevado a cabo un estudio mediante análisis de componentes principales (PCA) que compara las características del suelo y los coeficientes de distribución (K_d) de los fármacos en los diferentes suelos.
- Establecer modelos de predicción de la sorción de las quinolonas estudiadas a partir de las características físico-químicas de los suelos. Para ello se utilizará la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR).

2. Objetivos

- Con objeto de desarrollar posibles metodologías o técnicas que contribuyan a la remediación de suelos afectados por contaminación de fluoroquinolonas, además de evitar o disminuir su difusión hacia otros compartimentos ambientales (agua, biota), se evaluará la aplicación de “biochar” como enmienda de suelos. Para ello se estudiará la sorción de algunas quinolonas en biochar y mezclas suelo/biochar, en contenido de entre el 2-4% de este último. De esta manera se podrá comprobar su posible utilización como agente secuestrante de fármacos en la remediación de suelos agrícolas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

En este apartado se describen las metodologías utilizadas en los diferentes procesos experimentales llevados a cabo en este trabajo, así como la instrumentación, reactivos y disoluciones empleados.

3.1. Instrumentación

3.1.1 Cromatografía de líquidos

Para la determinación de las fluoroquinolonas estudiadas se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent Serie 1100 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EUA). Este equipo consta de los siguientes módulos

- Cabina de desgasificación de disolventes por sistema de vacío G1322A
- Bomba cuaternaria G1311A QuatPump
- Inyector automático G1329A ALS
- Detector de fluorescencia G1321A FLD que consta de (324):
 - Lámpara de descarga de xenón de 150 W, con Intervalo de trabajo entre 200-900 nm.
 - Monocromadores de excitación y emisión, con redes holográficas cóncavas de 1200 líneas por mm, y ancho de banda de 20 nm.
 - Detector de referencia que corrige las fluctuaciones de intensidad de la lámpara midiendo la luz de excitación transmitida por la celda de flujo.
- Columna cromatográfica Phenomenex Kinetex C18 (150 × 4,60 mm / 2,6 μm/100 Å), con precolumna Kinetex (SecurityGuard UHPLC C18).

El sistema cromatográfico se controla mediante un PC con el sistema operativo MS Windows XP, a través del software Agilent ChemStation para sistemas de LC (rev. B-04-02 SP1), que permite además el procesamiento de los datos obtenidos (325).

3.1.2 Otros instrumentos y equipos

- Balanza Mettler Toledo PB1502-L ($\pm 0,0001$ g).
- Divisor Micro-riffle de Jones® (Sepor Inc., CA, USA). Utilizado para fraccionar pequeñas cantidades de suelo (25 g – 1 kg). Presenta 14 canales alternados de 3,2 mm de amplitud que distribuyen la muestra de forma homogénea en dos recipientes.
- pH-metro Crison GLP21 (Crison Instruments, Alella, Barcelona), equipado con un electrodo combinado de vidrio Crison 52-02, con electrodo de referencia de Ag/AgCl. Tiene una precisión de $\pm 0,01$ unidades de pH.
- Centrífuga Heareus Christ Labofuge 400 (Heareus Christ, Osterode am Harz, Alemania) que permite trabajar hasta 3500 rpm.
- Estufa Conterm (JP Selecta, Abrera, Barcelona) que permite trabajar entre 40 – 250 °C.
- Estufa refrigerada Medilow (JP Selecta, Abrera, Barcelona) que permite trabajar entre 0 – 50 °C.
- Mezclador vortex Stuart® SA8 (Barloworld Scientific Ltd., Staffordshire, UK) con control de velocidad variable entre 200 y 2500 rpm. Permite la agitación en modo continuo o intermitente.
- Agitadores mecánicos rotatorios Breda 34526 y SBS MRH-4 (Breda Scientific, Breda, Países Bajos) que proporcionan velocidades comprendidas entre 0,5 y 100 rpm.
- Agitador de rodillos Ovan RollerMix, D RM120-D E (Ovan, Barcelona) que consta de 5 rodillos que permiten la agitación horizontal rotatoria a velocidades comprendidas entre 20 y 150 rpm.
- Baño de ultrasonidos Branson 5510 (Branson Ultrasonidos, Hospitalet de Llobregat, Barcelona). Trabaja a una frecuencia de 40 kHz y tiene un tanque de 10 L de capacidad.

3.2 Reactivos, disoluciones y materiales

3.2.1 Reactivos

Las Fluoroquinolonas utilizadas en este estudio han sido suministradas por Fluka-Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), de calidad VETRANAL

- Danofloxacin (C₁₉H₂₀FN₃O₃) ≥ 99,8%. CAS: 112398-08-0.
- Clorhidrato de Difloxacin (C₂₁H₁₉F₂N₃O₃·HCl) ≥ 99,5%. CAS: 91296-86-5.
- Enrofloxacin (C₁₉H₂₂FN₃O₃) ≥ 98,0%. CAS: 93106-60-6.
- Marbofloxacin (C₁₇H₁₉FN₄O₄) ≥ 98,9%. CAS: 115550-35-1.
- Clorhidrato de Sarafloxacin (C₂₀H₁₇F₂N₃O₃·HCl·3H₂O) ≥ 97,3%. CAS: 91296-87-6.

Otras sustancias empleadas han sido:

Reactivos Merck (Darmstadt, Alemania):

- Hidrógeno fosfato de sodio ≥ 99%. CAS: 7558-79-4.
- Cloruro de sodio ≥ 99,5%. CAS: 7647-14-5.
- Ácido clorhídrico 36,5-38%. CAS: 7647-01-0.
- Acetonitrilo ≥ 99,8% grado HPLC. CAS: 75-05-8.

Reactivos Fluka-Sigma Aldrich (Buchs, Suiza):

- Tetraborato de sodio decahidratado ≥ 99%. CAS: 1330-43-4.
- Ácido oxálico ≥ 99,5%. CAS: 6153-56-6.

Reactivos de diferentes casas comerciales:

- n-octanol ≥ 99% Panreac (Barcelona, España). CAS: 111-87-5.
- Agua doblemente desionizada, de resistividad >18,2 MΩ cm⁻¹ Milli-Q Plus system, Millipore, Molheim, (France).
- Tampones de pH=4.01 y pH=7.00 para el calibrado del pH-metro, Crison (Crison Instruments, Alella, Barcelona).

Todas las sustancias químicas utilizadas han sido de grado analítico, excepto cuando se indica específicamente.

3.2.2 Preparación de disoluciones estándar de fluoroquinolonas para la determinación de coeficientes de distribución octanol/agua

Para la determinación del coeficiente de distribución entre agua/octanol, así como de las constantes de disociación, se prepararon disoluciones estándar de las diferentes fluoroquinolonas en agua Milli-Q, a una concentración de 100 mg L^{-1} , conteniendo además NaCl en concentración $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Las soluciones fueron almacenadas a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en botellas de vidrio ámbar y utilizadas dentro del período de una semana. Las soluciones de trabajo fueron preparadas diariamente por dilución de la solución estándar.

Sorción en suelos y en biochar

Para los estudios de sorción de fluoroquinolonas a suelos agrícolas y biochar, se prepararon disoluciones estándar de las fluoroquinolonas (100 mg L^{-1}) en agua Milli-Q. Las soluciones fueron almacenadas a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en botellas de vidrio ámbar y utilizadas dentro del período de una semana. Las disoluciones de trabajo fueron preparadas diariamente por dilución de la disolución estándar en CaCl_2 10 mM y NaN_3 $1,5 \text{ mM}$.

3.2.3 Suelos

Se ha trabajado con un total de 14 muestras de suelos naturales, de las que 13 proceden de diferentes localizaciones de España, mientras que una proviene de la República de Panamá. Se ha comprobado que los diferentes suelos estudiados no contenían residuos de fluoroquinolonas.

Los suelos procedentes de España han sido suministrados por el laboratorio Agroambiental Applus⁺ (Sidamon, Lleida) y por el grupo de investigación QUESTRAM-R1, del Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica de la Universidad de Barcelona.

El tratamiento previo a los análisis de los suelos ha consistido en un secado al aire durante 48 horas, y un posterior tamizado, de forma que el diámetro de partícula es inferior a 2 mm. Los suelos se homogenizan por agitación mecánica durante 2 horas. Posteriormente, las muestras se dividen en varias fracciones haciendo uso de un divisor *micro-riffle* que asegura una reducción representativa de la muestra. Las fracciones de las muestras se depositan en recipientes de polietileno de alta densidad.

Para minimizar la actividad antimicrobiana, las muestras se han esterilizado mediante irradiación con rayos gamma procedentes de una fuente de Co-60, que suministra una dosis de entre 25 – 35 kGy. Este tratamiento se ha realizado en la empresa Aragogamma S.A. (Les Franqueses del Vallès, Barcelona). Finalmente, las fracciones de suelo esterilizados se guardan en un lugar seco y protegidos de la luz. Previamente a su utilización, los suelos se homogenizan otra vez en el agitador de rodillos durante 1 hora. En el laboratorio Agroambiental Applus⁺ (Sidamon, Lleida) se han determinado la textura (método de sedimentación discontinua), el contenido de materia orgánica (método Walkley-Black) y la Capacidad de Intercambio de Cationes CEC (método de extracciones con acetato de amonio). La tabla 3.1 muestra las propiedades físicas y químicas más relevantes de los suelos estudiados.

3. Parte experimental

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los suelos estudiados

ID	pH en agua 1:2,5	pH en CaCl₂ 0,01 M	CEC^a (meq/100g)	CO^b (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase Textural USDA
S01	4,9	4,32	24,5	7,99	59,9	31,0	9,1	Franco-arenoso
S02	5,4	5,12	30,6	0,8	36,7	42,8	20,5	Franco-limoso
S03	7,7	5,3	20,3	1,21	56,8	28,4	11,8	Franco-arenoso
S04	5,3	5,9	44,6	7,4	49,3	20,1	30,6	Franco-arcilloso
S05	7,6	6,54	36,0	1,53	37,0	33,0	30,0	Franco-arcilloso
S06	6,6	6,6	5,0	0,63	55,3	37,0	7,7	Franco-arenoso
S07	8,2	7,46	16,2	1,13	13,6	55,5	30,9	Franco-arcilloso-limoso
S08	8,2	7,5	12,7	1,55	21,2	53,0	25,8	Franco-limoso
S09	8,0	7,54	11,6	1,26	21,3	50,7	28,0	Franco-arcilloso
S10	7,8	7,8	5,2	0,29	89,6	8,4	2,0	Arenoso
S11	8,2	7,84	6,1	0,57	84,0	11,1	4,0	Franco-arenoso
S12	8,4	7,9	3,7	0,00	94,2	5,0	0,8	Arenoso
S13	8,2	8,23	10,2	1,38	34,1	43,2	22,7	Franco
S14	8,6	8,6	7,0	0,63	42,6	38,5	18,9	Franco

^a: Capacidad de Intercambio Catiónico

^b: Contenido en carbono orgánico

3.2.4 Biochar

El biochar utilizado en este trabajo ha sido suministrado por la empresa Piroeco Bioenergy (Málaga, España), obtenido mediante pirólisis de biomasa procedente de producciones y residuos agroforestales. Las principales características de éste se indican en la siguiente tabla:

Tabla 3.2. Características del Biochar utilizado en este trabajo.

Carbono fijo (%)	85,56
Volátiles (%)	12,24
Densidad (g/L)	370
N total (%)	0,5
P total (g/Kg)	2,4
K total (g/Kg)	11,7
Mg total (g/Kg)	5,6
Ceniza a pH 8 (%)	2,2
Cd total (mg/Kg)	0,07
Pb total (mg/Kg)	1,4
Cr total (mg/Kg)	0,7
Ni total (mg/Kg)	11
Cu total (mg/Kg)	13
Zn total (mg/Kg)	22
Mn total (mg/Kg)	781

El biochar ha sido previamente triturado y tamizado (<2 mm), y posteriormente se ha almacenado en un recipiente de polietileno de alta densidad en un lugar seco y protegido de la luz.

3.3 Metodología de trabajo

3.3.1 Determinación de fluoroquinolonas mediante HPLC-FL

El análisis de las fluoroquinolonas estudiadas en este trabajo (DAN, DIF, ENR, MAR, SAR) se realizó mediante la utilización del sistema cromatográfico descrito en el apartado 3.1.1 (HPLC-FL), llevándose a cabo en modo isocrático a temperatura ambiente.

En los estudios de sorción, la fase móvil está compuesta de ácido fórmico 0,01 mol L⁻¹ a pH = 2,5 y ACN, en una proporción desde 67:33 hasta 86:14 (V/V) dependiendo del contenido de materia orgánica del suelo en estudio. La solución amortiguadora se filtra a través de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, antes de su utilización. El caudal de la fase móvil ha sido de 1,0 mL min⁻¹, y el volumen de inyección de 30 µL. Las longitudes de onda de excitación y emisión del detector por fluorescencia se han fijado a $\lambda_{exc}=297$ nm y $\lambda_{em}=507$ nm para la MAR, mientras que para el resto de las fluoroquinolonas (DAN, DIF, ENR y SAR) las longitudes de onda de excitación/emisión, fueron de 280/450 nm, respectivamente.

La cuantificación se ha realizado mediante la utilización de una recta de calibrado externa, midiendo las áreas de patrones preparados el mismo día de la medida.

Los límites de detección y cuantificación del método empleado en la obtención de las de isotermas en suelo se indican en la tabla 3.3. El intervalo de linealidad para todas las fluoroquinolonas se extiende desde el límite de detección hasta aproximadamente 5 mg L⁻¹.

En el caso de los equilibrios de distribución, la fase móvil consiste en una disolución de ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹ de pH ajustado a 2,5 y ACN, en una proporción de 77:23. El resto de las condiciones experimentales (volumen de inyección, flujo de fase móvil y longitudes de onda de excitación y emisión) han sido los mismos que en el caso de los estudios de sorción.

Tabla 3.3. Límites de detección y cuantificación para las fluoroquinolonas estudiadas mediante HPLC-FLD

	ENR	DAN	DIF	MAR	SAR
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1	1	1	2	5
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5	5	2	6	2

3.3.2 Sorción de fluoroquinolonas en suelos

El estudio de sorción de las fluoroquinolonas en suelos naturales se ha realizado siguiendo las pautas indicadas en la directiva 106 de la OECD (162). En la misma se detalla el procedimiento a seguir para la realización de ensayos de sorción mediante experimentos tipo lote (*batch*).

La fase líquida consiste en una disolución de CaCl_2 10 mM, que incluye una concentración 1,5mM de NaN_3 ; esta disolución se emplea para mantener la fuerza iónica constante durante el proceso de sorción y minimizar la suspensión de partículas. A esta fase líquida se le denomina frecuentemente “agua artificial” porque pretende mimetizar las condiciones del agua de lluvia natural. Este medio se ha empleado en los estudios de sorción en suelos, así como en los posteriores estudios de sorción en biochar y de mezclas suelo/biochar. La azida de sodio se utiliza como bactericida, para evitar el crecimiento de microorganismos en la solución que podrían alterar la concentración del analito, ya sea degradándolo o suprimiéndolo. En particular, su uso es conveniente en los estudios de sorción que incluyen Biochar, ya que su presencia en estos sistemas puede estimular el crecimiento de microorganismos (326).

Una vez determinada la relación suelo:agua adecuada (1:10, g mL^{-1}) y el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (24-120 h, dependiendo del tipo de suelo) mediante estudios preliminares, se han realizado los experimentos de sorción con el fin de caracterizar las isothermas correspondientes.

El procedimiento experimental se describe a continuación:

En tubos de centrifuga de polipropileno de capacidad adecuada de acuerdo a la relación suelo:agua previamente determinada, se adiciona 1,000 g de suelo y 8,00 mL de la solución de $\text{CaCl}_2/\text{NaN}_3$. Los tubos se colocan en el agitador rotatorio durante 24 h con el fin de que la mezcla suelo:agua alcance el equilibrio. Simultáneamente se preparan

disoluciones del blanco y controles con el mismo volumen de la solución de $\text{CaCl}_2/\text{NaN}_3$, sin la adición de suelo.

Una vez equilibrada la mezcla suelo:agua, se añade al tubo la cantidad necesaria de disolución patrón de fluoroquinolona y de la disolución de $\text{CaCl}_2/\text{NaN}_3$ para obtener un volumen total de 10,00 mL. De esta manera, se preparan mezclas suelo/agua, en las que el volumen total de fase líquida es el mismo (10 mL), variando la concentración inicial de fluoroquinolona en la fase líquida (C_0). Se sigue el mismo procedimiento para la preparación de los blancos y los controles.

Una vez preparadas las mezclas, los tubos se agitan a 30 rpm protegidos de la luz en el agitador rotatorio durante el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de las fases, el cual ha sido previamente determinado y que depende del tipo de suelo y las interacciones que tenga con el analito en particular.

Los controles (en ausencia de suelo) se han empleado para comprobar la concentración inicial (C_0). El análisis de los controles ha permitido descartar cualquier degradación o sorción de las fluoroquinolonas a las paredes del recipiente.

Una vez finalizada la etapa de agitación, las muestras se centrifugan a 3500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se extrae una alícuota de 2,00 mL de la fase acuosa sobrenadante, y se filtra a través de una membrana de nylon de 0,22 μm . A continuación, se inyecta la muestra así obtenida al sistema de HPLC-FL para determinar la concentración del analito en equilibrio en la fase acuosa (C_w). Finalmente, se mide el pH de todas las muestras, controles y blancos.

Los estudios de sorción en suelo se realizaron para las siguientes fluoroquinolonas: DAN, DIF, ENR, MAR y SAR.

3.3.3 Sorción de fluoroquinolonas en biochar y mezclas suelo-biochar

Los estudios de sorción para mezclas suelo-biochar se realizaron únicamente para la DAN y la ENR con los suelos S07 y S12.

Todos los experimentos se han realizado en viales de vidrio color ámbar.

Para decidir el intervalo de concentraciones C_w en el que se trabajarían las isotermas de sorción para la DAN y ENR en el sistema suelo-biochar al 2% y al 4% en peso y a los pH de interés, primero se determinó el perfil de sorción de la fluoroquinolona en función del

pH, y posteriormente se construyó una isoterma a pH constante, obteniendo de estas un intervalo de trabajo para la DAN de Cw entre 10^{-3} y $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ para el suelo S07, mientras que en el suelo S12 se trabajó en el intervalo comprendido entre 10^{-3} y $21,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Debido al hecho de que el biochar contiene grupos funcionales que les confiere carácter ácido-base, se realizaron experimentos previos para determinar la cantidad de HCl o NaOH necesaria que debía ser adicionado con el fin de obtener el pH deseado en los estudios de distribución de quinolona entre biochar-agua.

Los sistemas biochar-agua y las mezclas suelo-biochar se han preequilibrado en un tubo de centrífuga durante 24 horas a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, con 8 mL de la solución de CaCl_2 10 mM y NaN_3 1,5 mM, protegido de la luz y bajo agitación suave. La masa de sólido ha sido de 1,0000 g en las mezclas de suelo/biochar, y entre 0,0200-0,0600 g en los estudios de distribución en el sistema biochar-agua. Después del proceso de preequilibrado, se adiciona a todos los sistemas la cantidad correspondiente de solución de CaCl_2 10 mM y NaN_3 1,5 mM y de fluoroquinolona para alcanzar la concentración inicial del analito deseada y un volumen total final de 10,00 mL.

Las muestras así preparadas se agitan suavemente, protegidas de la luz, durante 48 horas para alcanzar el equilibrio. A continuación, se centrifugan a 1900 rpm durante 15 minutos; se extrae una alícuota del líquido sobrenadante y se filtra a través de un filtro de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. La determinación de fluoroquinolona en esta disolución se lleva a cabo mediante HPLC-FL. El pH del sistema en equilibrio se mide en el resto de la muestra que queda en el tubo de centrífuga.

Con este procedimiento se han realizado los estudios de sorción de DAN y ENR en biochar, así como en las mezclas suelo/biochar al 2% y al 4% en biochar.

3.3.4 Experimentos de estabilidad (“envejecimiento”)

Para comprobar los cambios que pueden experimentar las características de sorción de un suelo al que se ha añadido biochar, se ha procedido a un estudio de “envejecimiento” (*weathering* o *aging*) que simule este proceso en un período de tiempo reducido.

Se prepararon muestras de suelo con un contenido en biochar del 2% y del 4 % en peso, que se han acondicionado durante 30 días, a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ y dos agitaciones manuales diarias, previas a una etapa de pre-equilibrado de 48 h, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y agitación a 30 rpm.

Posteriormente, se adiciona la fluoroquinolona y se equilibra durante 48 h más, a 20 °C y agitación a 30 rpm. Una vez completada la etapa de sorción, se cuantifica la fluoroquinolona restante en la fase acuosa mediante HPLC-FL.

3.3.5 Estudio de coeficientes de distribución y constantes de disociación

El coeficiente de distribución aparente de las quinolonas estudiadas se ha determinado mediante el método de “shake flask”, en un sistema n-octanol/fase acuosa a 25 °C y una fuerza iónica de 0,15 mol L⁻¹ en NaCl. Por otra parte, el estudio tomó en consideración la variación del coeficiente de distribución en función del pH ya que el mismo permite, la determinación de las constantes de disociación ácido-base de las especies involucradas.

Para ello se preparó una disolución amortiguadora, compuesta por una mezcla de Na₂HPO₄ y Na₂B₄O₇ (0,01 mol L⁻¹ de cada uno) (327), ajustando la fuerza iónica a 0,15 mol L⁻¹ añadiendo la cantidad necesaria de NaCl. Posteriormente, esta solución fue saturada en n-octanol; paralelamente se preparó n-octanol saturado en agua Milli-Q.

Para cada fluoroquinolona, se prepararon 16 muestras en frascos de vidrio color ámbar, que contenían 5 mL de la disolución indicada en el párrafo anterior y una concentración constante de fluoroquinolona (aproximadamente 3 mg L⁻¹). El pH se varió aproximadamente entre 3 y 9 mediante la adición de la cantidad adecuada HCl 0,15 mol L⁻¹ y NaCl 0,15 mol L⁻¹. El volumen total de fase acuosa y de n-octanol en todos los casos fue, respectivamente, de 6 y de 50 mL. Además, se prepararon 3 muestras de control, saturadas en n-octanol, a valores de pH ácido, neutro y básico, que contenían la misma concentración de quinolona que el resto de las muestras.

Todas las muestras se agitaron durante tres horas para alcanzar el equilibrio de distribución. Posteriormente se centrifugaron a 1900 rpm durante 10 minutos, con el fin de separar las fases acuosa y orgánica. A continuación, se filtró una alícuota de la fase acuosa a través de un filtro de 0,22 µm en la que determinó la concentración de la fluoroquinolona en esta fase mediante HPLC-FL; en otra alícuota se midió el pH de la solución en equilibrio. La concentración del analito en la fase orgánica se obtuvo por balance de masas a partir de la concentración inicial obtenida de los controles

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describen los resultados obtenidos en los diferentes estudios llevados a cabo sobre las fluoroquinolonas objeto de esta tesis.

4.1 Coeficientes de partición octanol/agua y constantes de disociación

Con objeto de poder relacionar el comportamiento de sorción de las fluoroquinolonas en los diferentes suelos, que implican tanto variaciones de pH como del contenido en materia orgánica, se ha procedido en primer lugar a la determinación de sus características de lipofilidad y de sus equilibrios de disociación ácido-base.

Aunque en principio esta información está presente en la bibliografía disponible, hay notables discrepancias entre los valores indicados por los distintos autores, tal y como se comentará posteriormente, y por lo tanto se ha decidido llevar a cabo esta determinación en las mismas condiciones para las fluoroquinolonas estudiadas.

La determinación de la lipofilidad y de las características ácido-base de las fluoroquinolonas se ha llevado a cabo mediante extracción líquido-líquido, entre la fase acuosa (tampón, conteniendo Na_2HPO_4 0,01 M y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,01 M con fuerza iónica ajustada a 0,15 M con NaCl) y la fase orgánica (n-octanol).

En primer lugar, se determinó la relación de volúmenes entre fase acuosa/fase orgánica apropiada para obtener una variación lo suficientemente importante de concentración de fluoroquinolona en fase acuosa al variar el pH del medio. En nuestro caso, el volumen de fase acuosa y orgánica ha sido de 6,0 mL y 50,0 mL, respectivamente; los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 25 ± 1 °C.

En general, se prepararon 15-16 muestras para cada fluoroquinolona, conteniendo todas ellas la misma concentración inicial en fase acuosa (aproximadamente 3 mg L^{-1}). A continuación, a cada muestra se le añadió el volumen de HCl 0,15 M necesario para obtener el pH deseado de cada muestra, en un intervalo de pH entre 3 a 9. Todas las

muestras fueron preparadas con el mismo volumen de fase acuosa y de fase orgánica en frascos de vidrio ámbar.

Una vez establecido el equilibrio y separadas las fases (según el apartado 3.3.5), se determinó la concentración de la fluoroquinolona en la fase acuosa en equilibrio (C_w) por HPLC-FL, en las condiciones descritas en el apartado 3.3.1. La concentración de fluoroquinolona en la fase orgánica se obtuvo mediante balance de masas, a partir de la concentración inicial de ésta en la fase acuosa ($C_{0,w}$), su concentración en el equilibrio (C_w) y los volúmenes de octanol y fase acuosa (V_{OCT} y V_w , respectivamente).

$$C_{OCT} = \frac{C_{0,w} - C_w}{V_{OCT}} V_w \quad (\text{Ec. 4.1})$$

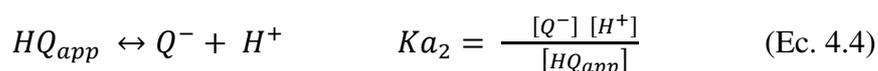
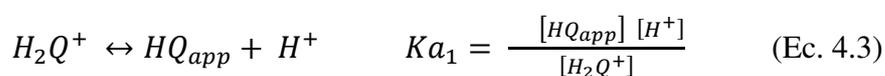
De la relación entre la concentración de fluoroquinolona en la fase orgánica y acuosa se obtiene el coeficiente de partición (D) a cada pH, definido por la ecuación:

$$D = \frac{C_{OCT}}{C_w} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

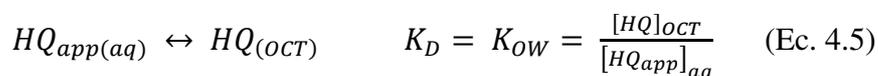
Los valores C_{OCT} y C_w indican las concentraciones totales de las diferentes especies de la fluoroquinolona (protonada H_2Q^+ , aniónica Q^- , neutra HQ , zwitteriónica $HQ^{+/-}$) que pueden existir en la fase orgánica y en la fase acuosa, dependiendo del pH de la solución. A efectos prácticos, consideraremos a la suma de concentraciones de las especies neutra y zwitteriónica como la “especie neutra aparente” HQ_{app} .

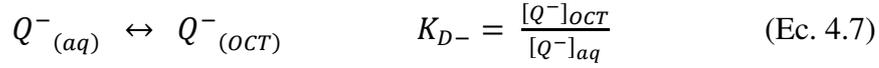
Debido a la diversidad de especies presentes en el sistema, pueden darse diferentes equilibrios. Éstos se describen a continuación, junto con las expresiones de sus constantes.

- Disociación en fase acuosa de la fluoroquinolona:



- Distribución en la fase acuosa y la orgánica de las diferentes especies de la fluoroquinolona:





Teniendo en cuenta que las especies cargadas pueden distribuirse entre la fase acuosa y la fase orgánica (por ejemplo, como pares iónicos con Cl^- o Na^+), el coeficiente de partición D, puede escribirse como:

$$D = \frac{[H_2Q^+]_{OCT} + [HQ_{app}]_{OCT} + [Q^-]_{OCT}}{[H_2Q^+]_{aq} + [HQ_{app}]_{aq} + [Q^-]_{aq}} \quad (\text{Ec. 4.8})$$

Y sustituyendo las concentraciones de cada especie en la ecuación 4.2 por la concentración de fluoroquinolona neutra en fase acuosa, y en función de las distintas constantes de equilibrio y de la concentración de iones hidrógeno en la fase acuosa, obtenemos la siguiente ecuación:

$$D = \frac{\frac{K_{D+}[H^+]}{K_{a1}} + K_{OW} + \frac{K_{D-}K_{a2}}{[H^+]}}{\frac{[H^+]}{K_{a1}} + 1 + \frac{K_{a2}}{[H^+]}} \quad (\text{Ec. 4.9})$$

Esta ecuación describe la relación entre el coeficiente de partición, el pH de la solución y las diferentes constantes de equilibrio. Los valores de $[H^+]$ se calculan a partir del pH y del coeficiente de actividad.

Como no existe una ecuación directa para determinar las diferentes constantes de equilibrio, utilizamos un procedimiento por Mínimos Cuadrados No Lineales (NLLS, Non-Negative Least Squares) para refinar el conjunto de constantes. Para ello, definimos una función objetivo (U) basada en las diferencias al cuadrado de los valores experimentales y calculados de log D:

$$U = \sum_{i=1}^n (\log(D_{EXP,i}) - \log(D_{CALC,i}))^2 = f(pH, D_{EXP}, K_{a1}, K_{a2}, K_{D+}, K_{OW}, K_{D-}) \quad (\text{Ec. 4.10})$$

Donde “n” es el número de pares de datos D/pH, y $\log(D_{EXP,i})$ y $\log(D_{CALC,i})$ los valores experimental (ecuación 4.2) y calculado (ecuación 4.9) para el punto de datos “i”.

Como los valores de $\log(D_{CALC,i})$ se calculan a partir del pH medido de la disolución y del conjunto de constantes en equilibrio estimadas, la función U depende de los pares de datos experimentales pH/D y del conjunto de constantes de equilibrio. Éstas se refinan

iterativamente, mediante la utilización de la función Solver de la hoja de cálculo de MS ExcelTM, hasta obtener un mínimo en la función U. Los errores estimados de las constantes de equilibrio se calculan con el macro SolvStat (328).

Siendo la función Solver un método iterativo que necesita de valores de partida de los diferentes parámetros a optimizar, éstos se han obtenido a partir de las curvas experimentales logD/pH. Para log(K_{OW}) se utiliza el valor máximo de log(D) de cada fluoroquinolona, mientras que para los valores estimados de pK_{a1} y pK_{a2} se han tomado los datos de pH en los puntos de inflexión de la curva (entre 5-6 y 9, respectivamente). En primer lugar se optimizan simultáneamente los valores de log(K_{OW}), pK_{a1} y pK_{a2}. Posteriormente se han ajustado los valores de log(K_D⁺) y log(K_D⁻); finalmente todas las constantes simultáneamente.

Las figuras 4.1 y 4.2 muestran las representaciones gráficas de los datos obtenidos y los calculados para los pares pH/D.

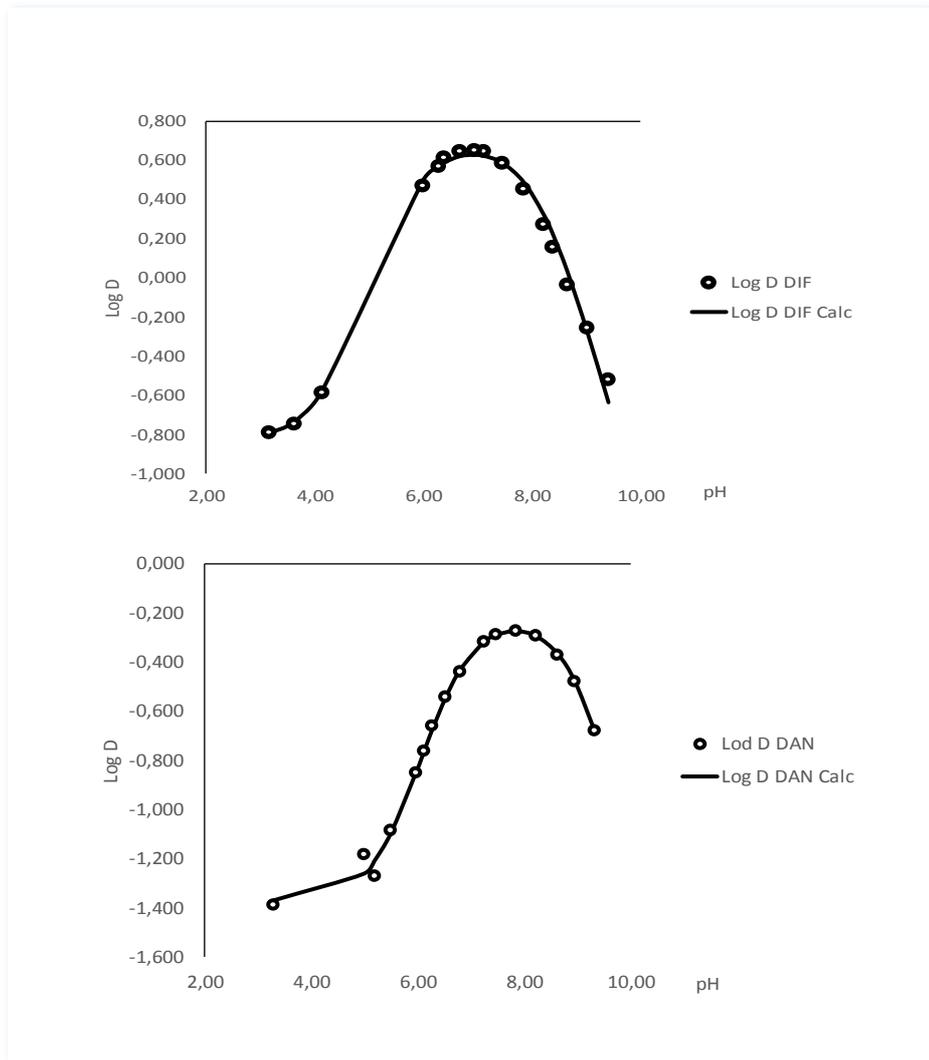


Figura 4.1. Representación de las curvas logD/pH para DAN y DIF. Los símbolos representan los datos experimentales, mientras que la línea continua indica la curva teórica a partir del conjunto de constantes determinado

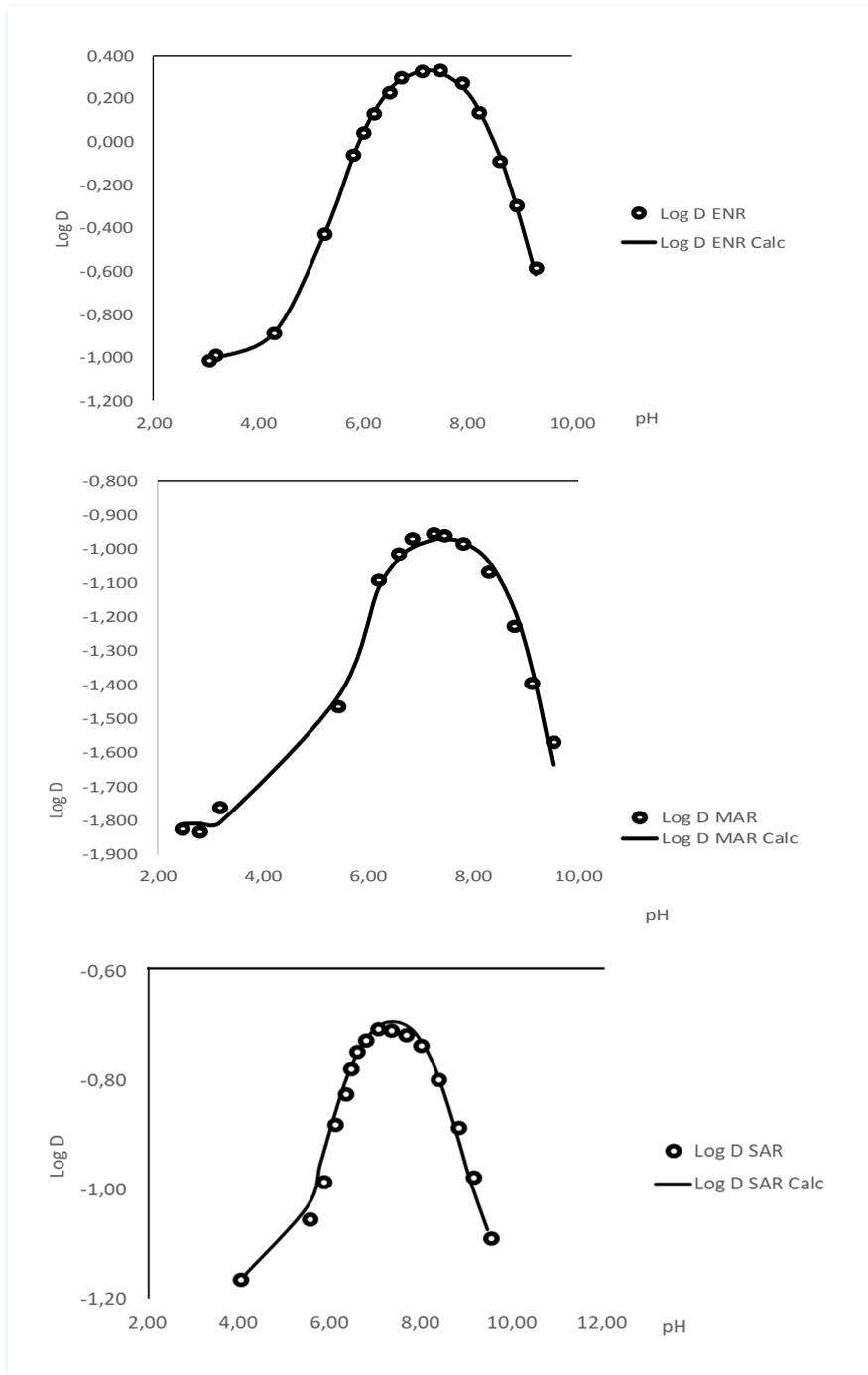


Figura 4.2. Representación de las curvas logD/pH para ENR, MAR y SAR. Los símbolos representan los datos experimentales, mientras que la línea continua indica la curva teórica a partir del conjunto de constantes determinado

Se realizaron diferentes ensayos con los datos $\log D/pH$ de las fluoroquinolonas, donde se incluían en el cálculo los valores obtenidos para las especies de ésta (catión, anión, especie neutra y zwitteriónica). Se llegó a la conclusión de que, para la DAN, DIF, ENR y MAR, con incluir la especie neutra y protonada en los cálculos, era suficiente para explicar la variación de los coeficientes de distribución como función del pH. En el caso de la SAR se observó un ligero aumento en $\log(D)$ que se podía explicar añadiendo al modelo el equilibrio de distribución de la especie aniónica. Sin embargo, sólo tenía una ligera importancia para valores de pH entre 9-9,2, siendo su concentración calculada no significativa para valores de $pH < 9$, por lo que finalmente se decidió no incluir esta especie en el modelo.

La Tabla 4.1 muestra los resultados obtenidos para $\log Kow$, pKa_1 y pKa_2 , con sus respectivas desviaciones estándares, así como $\log KD^+$ para la especie catiónica obtenidas en este estudio.

De los resultados indicados en la Tabla 4.1 es posible concluir que las fluoroquinolonas más lipofílicas son la DIF y la ENR, cuyos valores de $\log Kow$ fueron 0,68 y 0,39, respectivamente; coincidiendo, además, con el hecho de que son las fluoroquinolonas más ácidas del grupo estudiado, siendo el pKa_2 de 7,99 para la DIF y 8,25 para la ENR. Por otro lado, las fluoroquinolonas más hidrofílicas son MAR ($\log Kow -0,94$) y SAR ($\log Kow -0,69$).

A partir de los datos obtenidos, se puede calcular el valor de $\log D$ para los valores de pH dentro del intervalo en que se ha llevado a cabo el estudio. La Tabla 4.2 indica los valores de $\log D$ en el intervalo de pH estudiado (3-9), además del calculado a $pH=7,4$. A partir de estos valores podemos considerar estas fluoroquinolonas como sustancias en general de baja lipofilidad, presentando valores máximos de $\log(D)$ a valores de pH entre 6 y 8, siendo DIF y ENR las que presentan la mayor capacidad de transferencia a una fase orgánica. Por otra parte, es de destacar la posibilidad de distribución de la forma ácida de las fluoroquinolonas debido a la distribución de la especie H_2Q^+ .

Tabla 4.1. Coeficientes de partición octanol/agua y constantes de equilibrio para las diferentes fluoroquinolonas estudiadas (a 25 °C, I=0.15 M NaCl). Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar estimada en logaritmos de la cantidad

Fluoroquinolona	pK _{a1}	pK _{a2}	logK _{ow}	logK _{D+}
DAN	6.50 (0.04)	8.94 (0.06)	-0.23 (0.02)	-1.37 (0.02)
DIF	5.60 (0.14)	7.99 (0.05)	0.68 (0.03)	-0.83 (0.05)
ENR	6.02 (0.02)	8.25 (0.02)	0.39 (0.01)	-1.02 (0.01)
MAR	5.86 (0.09)	8.80 (0.05)	-0.94 (0.02)	-1.81 (0.02)
SAR	5.92 (0.11)	9.09 (0.06)	-0.69 (0.02)	-1.18 (0.04)

Tabla 4.2. Valores de log(D) calculados para la partición octanol-agua de las fluoroquinolonas estudiadas a diferentes valores de pH

Fluoroquinolona	pH							
	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	7.40	8.00	9.00
DAN	-1.37	-1.36	-1.26	-0.83	-0.37	-0.3	-0.28	-0.5
DIF	-0.8	-0.63	-0.05	0.5	0.63	0.6	0.43	-0.26
ENR	-1.01	-0.95	-0.59	0.04	0.32	0.33	0.23	-0.33
MAR	-1.81	-1.78	-1.6	-1.18	-0.98	-0.97	-0.99	-1.28
SAR	-1.18	-1.18	-1.11	-0.88	-0.73	-0.71	-0.72	-0.9

Para efectos de comparación de nuestros resultados con valores previamente publicados, en la Tabla 4.3 se muestran valores de coeficientes de partición y constantes de disociación encontrados en la literatura.

Tabla 4.3. Valores de la literatura para coeficientes de partición octanol/agua y constantes de equilibrio para las diferentes fluoroquinolonas estudiadas

Fluoroquinolona	pKa ₁	pKa ₂	logK _{ow}	logD (pH)	Referencia
DAN	6,07	8,56	-	-	262
	6,32	8,73	-	-	262
	-	-	0,44	-	331
DIF	-	-	-	0,76 (7,0)	329
	5,66	7,24	-	-	262
	5,8	8,26	1,28	-	331
ENR	6,19	7,59	-	-	248
	6,27	ca. 8,3	1,1	-	58
	5,88	7,74	-	-	262
	6,09	7,91	-	-	262
	-	-	0,24	-	332
	-	-	0,7	-	331
MAR	5,69	8,02	-	-	262
	5,51	8,38	-	-	262
	-	-	-1,11	-	331
SAR	5,62	8,18	-	-	262
	5,87	8,88	-	-	262
	5,89	8,59	-	-	330
	4,12	6,78	-	-0,89 (7,0)	294
	-	-	-1,36	-	332
	-	-	1,07	-	331

Tal como se comentaba al principio de este apartado, existen discrepancias entre los resultados que llegan a ser importantes en algún caso en particular; por ejemplo, para SAR existen diferencias entre los valores de pKa que pueden llegar a ser de casi 2 unidades de pKa para las dos constantes de disociación. Aunque éste es el caso más extremo, también hay diferencias importantes en el pKa₂ de DIF (1 unidad) y ENR (0,8 unidades). Por otra parte, también pueden aparecer discrepancias entre las constantes o coeficientes de distribución, como es el caso de la SAR, con valores de logK_{OW} que varían entre -1,36 y 1,07.

Si comparamos los valores obtenidos en este trabajo con los encontrados en la literatura, encontramos que en general ambas constantes de disociación (pKa₁ y pKa₂) están dentro del intervalo indicado en la Tabla 4.3, con diferencias entre 0,1 a 0,2 unidades de pH, a excepción del pKa₂ para MAR. Por lo tanto, podemos considerar que el procedimiento seguido para obtener estos valores es válido.

No obstante, los valores de coeficientes de partición obtenidos son discordantes con los encontrados en la literatura. Esto se debe, probablemente, a que en la mayoría de los casos se han medido para un solo valor de pH, generalmente 7 o 7,4 y en otros casos, como por ejemplo para la DAN y la MAR, los valores publicados son obtenidos por métodos de predicción a partir de la estructura molecular.

4.2 Estudios de sorción en suelos

4.2.1 Establecimiento de los tiempos de equilibrios

Previamente a la determinación experimental de las isothermas de sorción de las diferentes fluoroquinolonas es necesario establecer el tiempo de equilibrio, es decir el tiempo necesario para que la concentración del analito en la solución acuosa en contacto con el suelo se estabilice.

Su determinación experimental se realiza preparando diferentes disoluciones de analito en equilibrio con el suelo, a la misma concentración inicial, de las que se determina la concentración del analito a diferentes intervalos de tiempo. En nuestro caso, después de equilibrar durante 48h la solución de CaCl_2 0,01 M con una cantidad determinada de suelo (1 g de suelo, 10mL de solución), se añade la cantidad suficiente de analito para tener una concentración inicial de 5 mg L^{-1} . Cada muestra se mantiene en agitación durante un tiempo determinado, pasado el cual se separan las fases y se determina la concentración de fluoroquinolona en fase acuosa (C_w).

De esta manera podemos obtener un conjunto de datos que nos relacionan la cantidad de fármaco en disolución después de un tiempo de contacto con el suelo, para una determinada concentración inicial, es decir, la cinética del equilibrio de sorción.

En las figuras 4.3 a 4.6 se representan algunos de los datos obtenidos de concentración de la fluoroquinolona (DAN, DIF, MAR y SAR) en solución (C_w) en función del tiempo transcurrido después de la adición de analito a la solución. En ellas se han escogido suelos con características fisicoquímicas variadas, con el fin de observar mejor la diferencia de sorción entre uno y otro. Este comportamiento es el esperado debido a que la sorción depende, en gran medida, de las características que posea cada suelo, entre otros factores.

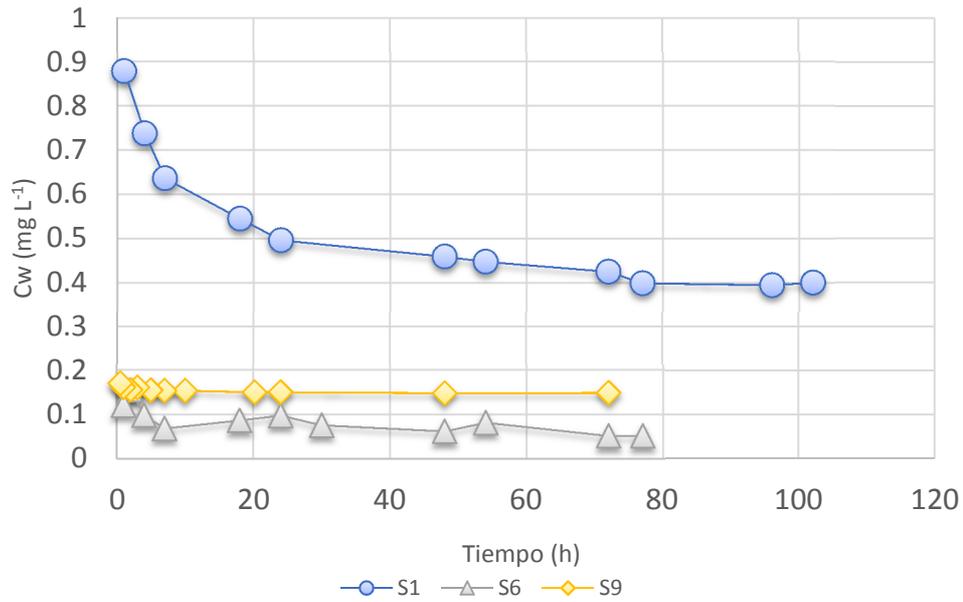


Figura 4.3. Cinética de sorción de la danofloxacina en diferentes tipos de suelos (S01, S06, S09)

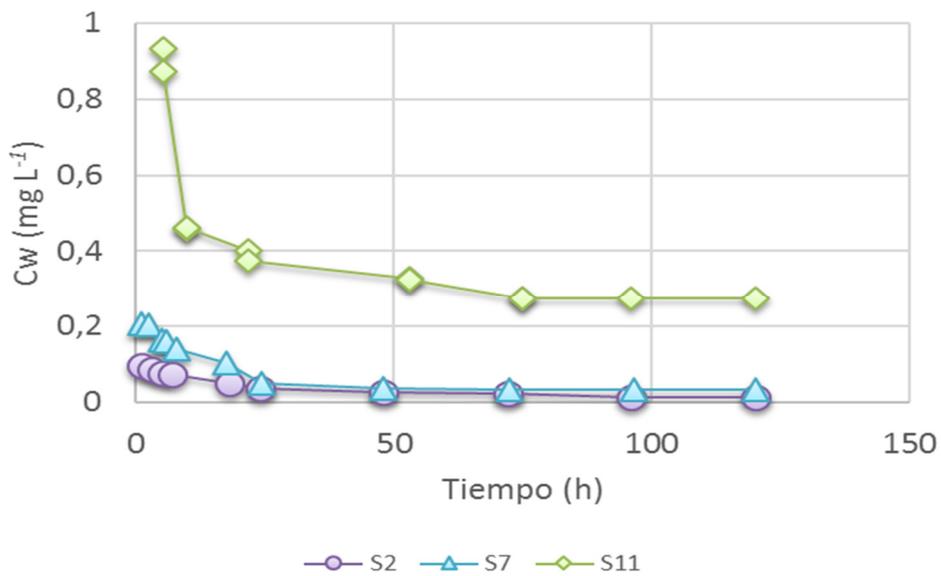


Figura 4.4. Cinética de sorción de la difloxacina en diferentes tipos de suelos (S02, S07, S11)

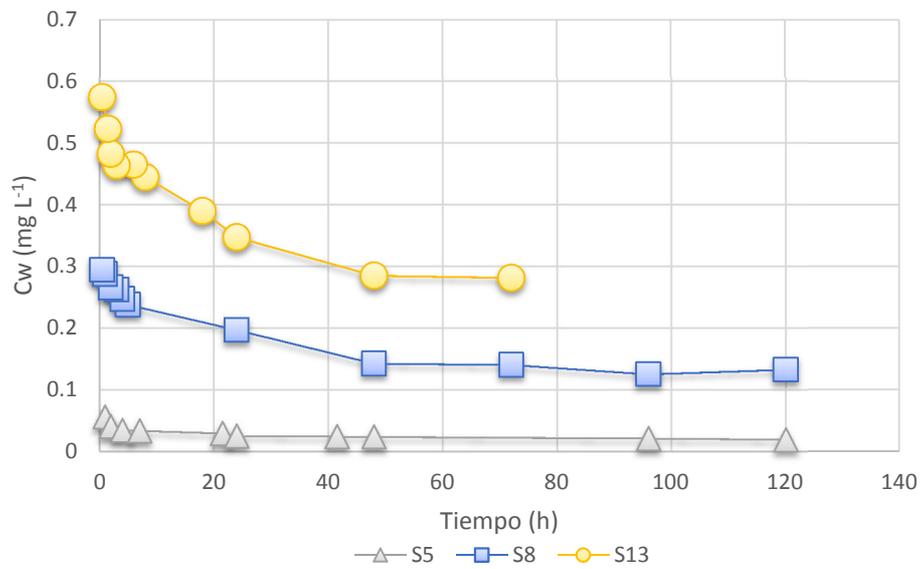


Figura 4.5. Cinética de sorción de la marbofloxacina en diferentes tipos de suelos (S05, S08, S13)

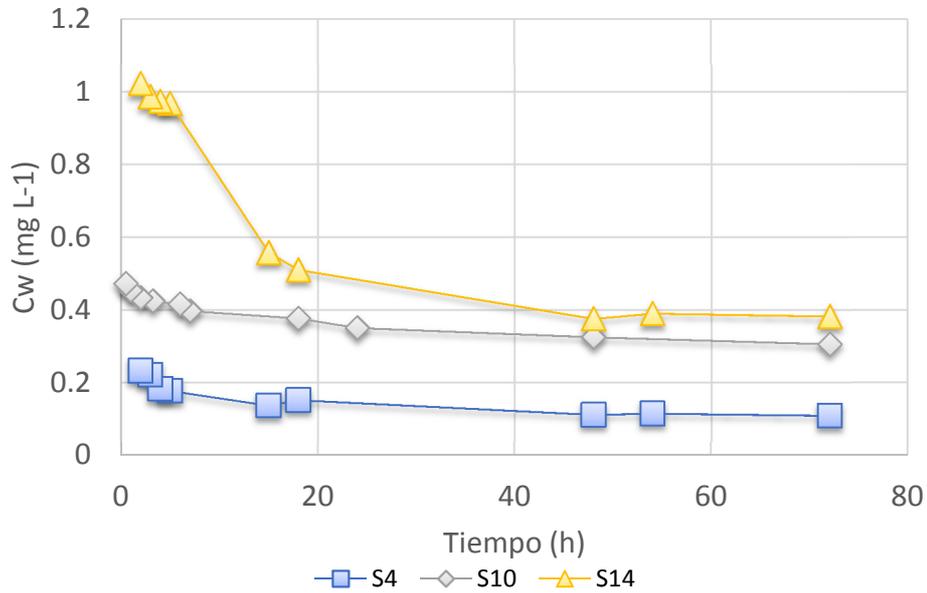


Figura 4.6. Cinética de sorción de la sarafloxacina en diferentes tipos de suelos (S04, S10, S14)

Aunque no se presentan todos los datos obtenidos, ya que por claridad sólo se indican una parte de ellos, si que podemos observar diferencias en cuanto a la variación de concentración en disolución y tiempo de equilibrio. En particular se observa que para los suelos más ácidos la disminución de concentración al inicio es mayor que en los de pH más elevado, como ocurre en la DIF (S02), MAR (S05) o SAR (S04), mientras que los más básicos presentan mayor tiempo de equilibrio (S13 en DIF y MAR, S14 en SAR). Un comportamiento diferente lo presenta el suelo S01 en la DAN, ya que es el suelo más ácido de los estudiados, y presenta una menor disminución en C_w comparado con los otros dos en la DAN, además de necesitar más tiempo para llegar al equilibrio.

Como se ha podido observar, los tiempos de equilibrio necesario dependen de cada suelo y, en general van desde las 24 hasta las 120 horas.

4.2.2 Isotermas de sorción

En este apartado se han determinado las isotermas de sorción de cada fluoroquinolona estudiada en los 14 suelos, con la excepción de la ENR, para la que no se han podido determinar las isotermas de los suelos S03, S05 y S06. Las propiedades fisicoquímicas del conjunto de suelos estudiados cubren un amplio intervalo, como se observa en la Tabla 3.1 de la sección experimental. Entre estas propiedades se incluyen un contenido de arcilla entre 0,8-30,9 %, de limo entre 5,0-55,5%, de arena entre 13,6-94,2 %. La Capacidad de Intercambio Catiónico tiene valores entre 3,7-44,6 meq 100 g⁻¹, el pH entre 4,32-8,60 y contenido de carbono orgánico entre 0-7,99%.

Para la obtención de cada isoterma, se preparan en general 15 muestras, según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2. La concentración inicial (C_0) de fluoroquinolona añadida a la disolución en equilibrio con el suelo varía entre 5 - 120 mg L⁻¹ aproximadamente. Después de alcanzar el equilibrio de sorción, se separan las fases y se determina la concentración de fluoroquinolona que queda en equilibrio en la fase acuosa (C_w) mediante HPLC-FL. La concentración final en equilibrio ha variado aproximadamente entre 0,01 y 15 mg L⁻¹, dependiendo de la fluoroquinolona y suelo.

A partir del volumen de disolución (V_W), masa de suelo (m) y los valores de C_0 y C_W se determina la concentración de fluoroquinolona en la fase sólida (C_S) mediante balance de masa:

$$C_S = \frac{C_0 - C_W}{m} V_W \quad (\text{Ec. 4.11})$$

A partir de los pares de datos experimentales C_S/C_W podemos construir las isothermas de sorción de las fluoroquinolonas en suelos, como se describe en el apartado 1.5.3 de la introducción. En las figuras 4.7 a 4.11 se muestran las isothermas de sorción obtenidas de esta manera.

Para tener una primera aproximación del modelo de isoterma más apropiado, en primer lugar se han representado los valores de $\log(C_S)$ respecto a $\log(C_W)$. El motivo es que la expresión logarítmica del modelo de Freundlich (uno de los más habituales en la sorción en suelos de sustancias orgánicas) da lugar a una ecuación lineal; así, pasando la ecuación 1.6 a forma logarítmica se obtiene la expresión:

$$\log C_S = N \cdot \log C_W + \log K_F \quad (\text{Ec. 4.12})$$

Donde se obtiene una pendiente igual al parámetro de linealidad y una ordenada en el origen igual a $\log(K_F)$. En cambio, la expresión logarítmica del modelo de Langmuir da lugar a una curva.

La representación logarítmica ha dado lugar en todos los casos a líneas rectas, indicando que el modelo de Freundlich es el más adecuado para describir la sorción de fluoroquinolonas en los diferentes tipos de suelos estudiados. De todas maneras, también se ha comprobado el ajuste de las isothermas experimentales al modelo de Langmuir; los resultados han indicado que en todos los casos el modelo de Freundlich ha dado lugar a un mejor ajuste, con una excepción donde el ajuste ha sido similar, por lo que se ha asumido en todos los casos la sorción mediante el modelo de Freundlich.

Para la determinación de los parámetros del modelo de sorción (tanto Freundlich como Langmuir) se ha seguido un procedimiento similar a la determinación de las constantes de disociación y K_{OW} de las fluoroquinolonas (apartado 4.1), utilizando en este caso un método iterativo de regresión por NLLS ponderados. En este caso, se define una función objetivo (U) igual a la suma de cuadrados de las diferencias ponderadas entre los valores calculados y experimentales de C_S para un conjunto de m puntos experimentales:

$$U = \sum_{i=1}^m w_i \cdot (C_{S,exp,i} - C_{S,calc,i})^2 \quad (\text{Ec. 4.13})$$

Donde el término w_i indica el peso estadístico (o factor de ponderación) correspondiente al punto i , que en este caso se define como igual a la inversa del cuadrado del valor de C_S :

$$w_i = \frac{1}{C_S^2} \quad (\text{Ec. 4.14})$$

De esta manera, la ecuación 4.13 queda como:

$$U = \sum_{i=1}^m \frac{1}{C_{S,exp,i}^2} \cdot (C_{S,exp,i} - C_{S,calc,i})^2 = \sum_{i=1}^m \left(\frac{C_{S,exp,i} - C_{S,calc,i}}{C_{S,exp,i}} \right)^2 \quad (\text{Ec. 4.15})$$

Esta última ecuación nos indica que al aplicar este peso estadístico lo que se hace es dar lugar a una función objetivo, definida como la suma de los cuadrados de las diferencias relativas entre los valores experimentales y calculados de C_S . De esta forma, el peso de cada punto experimental en el cálculo es equivalente, independientemente del valor de C_S . En caso contrario (sin ponderación), el peso de los puntos con valores de C_S elevados es mucho mayor que para valores bajos.

El valor de $C_{S,calc,i}$ se calcula a partir de los valores experimentales de C_W , y de los parámetros del modelo de sorción. Así, para el modelo de Freundlich, el valor de $C_{S,calc,i}$ se obtiene como:

$$C_{S,calc,i} = K_F \cdot C_{W,exp,i}^N \quad (\text{Ec. 4.16})$$

Donde K_F y N corresponden a los parámetros a optimizar del modelo de Freundlich.

Para optimizar los parámetros del modelo de sorción se ha utilizado una rutina desarrollada como Macro para la hoja de cálculo MS EXCEL™, descrita en el software ISOT_Calc (333) y que está basada en el algoritmo iterativo de Gauss-Newton modificado por Levenberg-Marquardt. Este macro optimiza los parámetros, hasta que se llega a un mínimo de la función U de la ecuación 4.15.

Los resultados obtenidos para los modelos de Freundlich de las diferentes fluoroquinolonas en los suelos estudiados se indican en la Tabla 4.4, en la que se recogen los valores optimizados para K_F y N junto con los valores correspondientes de su desviación estándar. El buen ajuste conseguido en los diferentes sistemas en estudio se comprueba en las Figuras 4.7 a 4.11, donde además de representar los datos

experimentales como símbolos se indican también las isothermas calculadas según los modelos de sorción establecidos.

Por otra parte, el coeficiente de partición K_d se puede calcular a partir de la ecuación de Freundlich como:

$$K_d = \frac{C_S}{C_W} = \frac{K_F \cdot C_W^N}{C_W} = K_F \cdot C_W^{N-1} \quad (\text{Ec. 4.17})$$

Siendo su forma logarítmica:

$$\log(K_d) = \log(K_F) + (N - 1) \cdot \log(C_W) \quad (\text{Ec. 4.18})$$

Indicando que, análogamente a $\log(C_S)$, el $\log(K_d)$ también varía linealmente con $\log(C_W)$.

Como se observa, la magnitud de sorción en las isothermas de Freundlich depende de sus parámetros y de la concentración de soluto en la disolución en equilibrio con la fase sólida. Este hecho dificulta una comparación directa entre las diferentes fluoroquinolonas y suelos, ya que si bien el valor de K_F ya nos da una primera aproximación de qué sistema presentará mayor sorción, también depende del parámetro de linealidad N : si éstos son similares, no hay problema, pero en las isothermas estudiadas su valor varía entre 0,4 y 1,6 aproximadamente, por lo que la dependencia adicional con C_W será muy significativa. Por ello, y para poder comparar la intensidad de sorción entre los diferentes sistemas, se han calculado los valores de $\log(K_d)$ para una misma concentración de soluto en equilibrio, igual a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($K_{d0,1}$). Los valores así calculados se presentan en la Tabla 4.5, y permiten una comparación directa entre la sorción de las distintas fluoroquinolonas.

4. Resultados y discusión

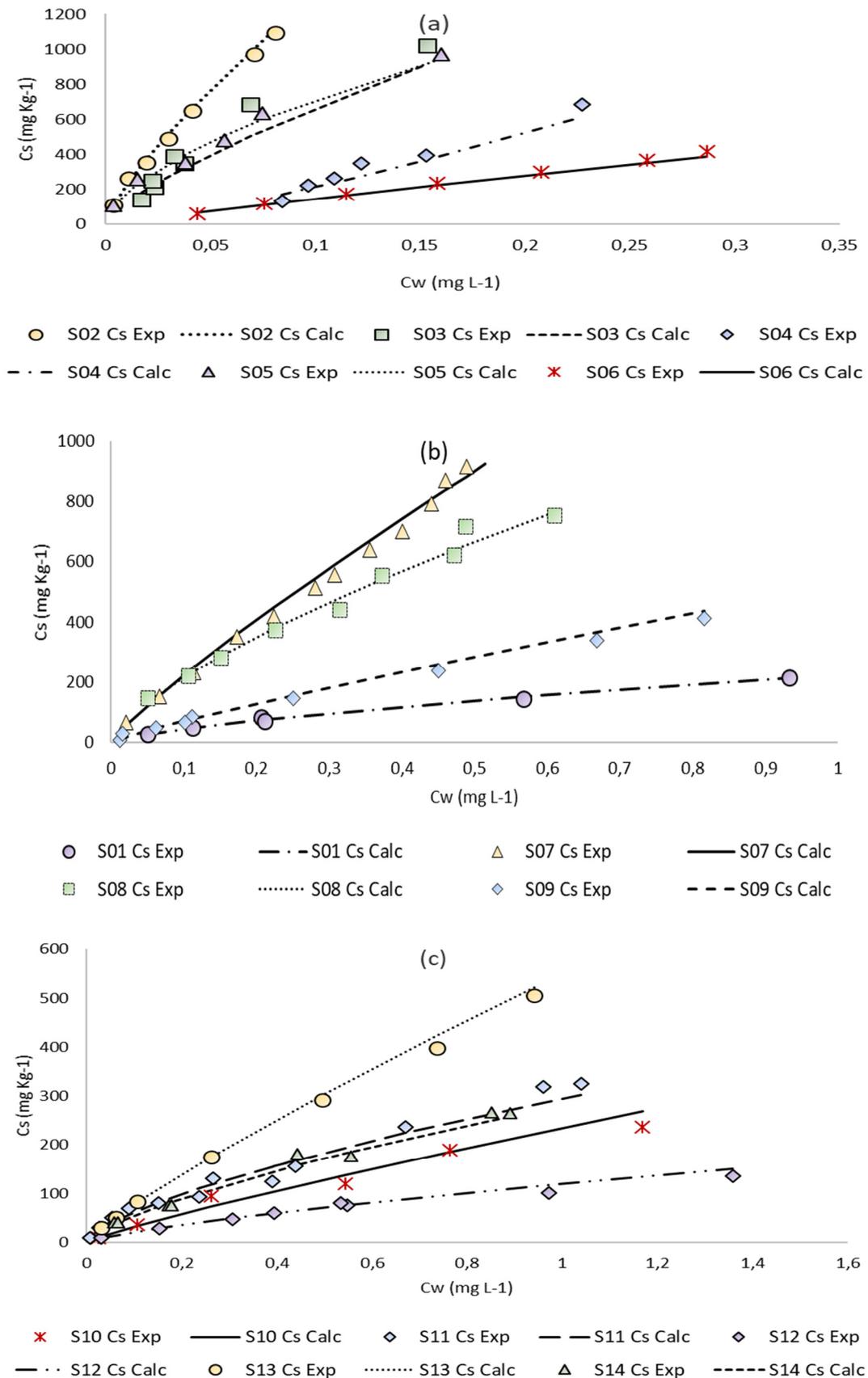


Figura 4.7. Isothermas de sorción de la Danofloxacin en los diferentes suelos estudiados

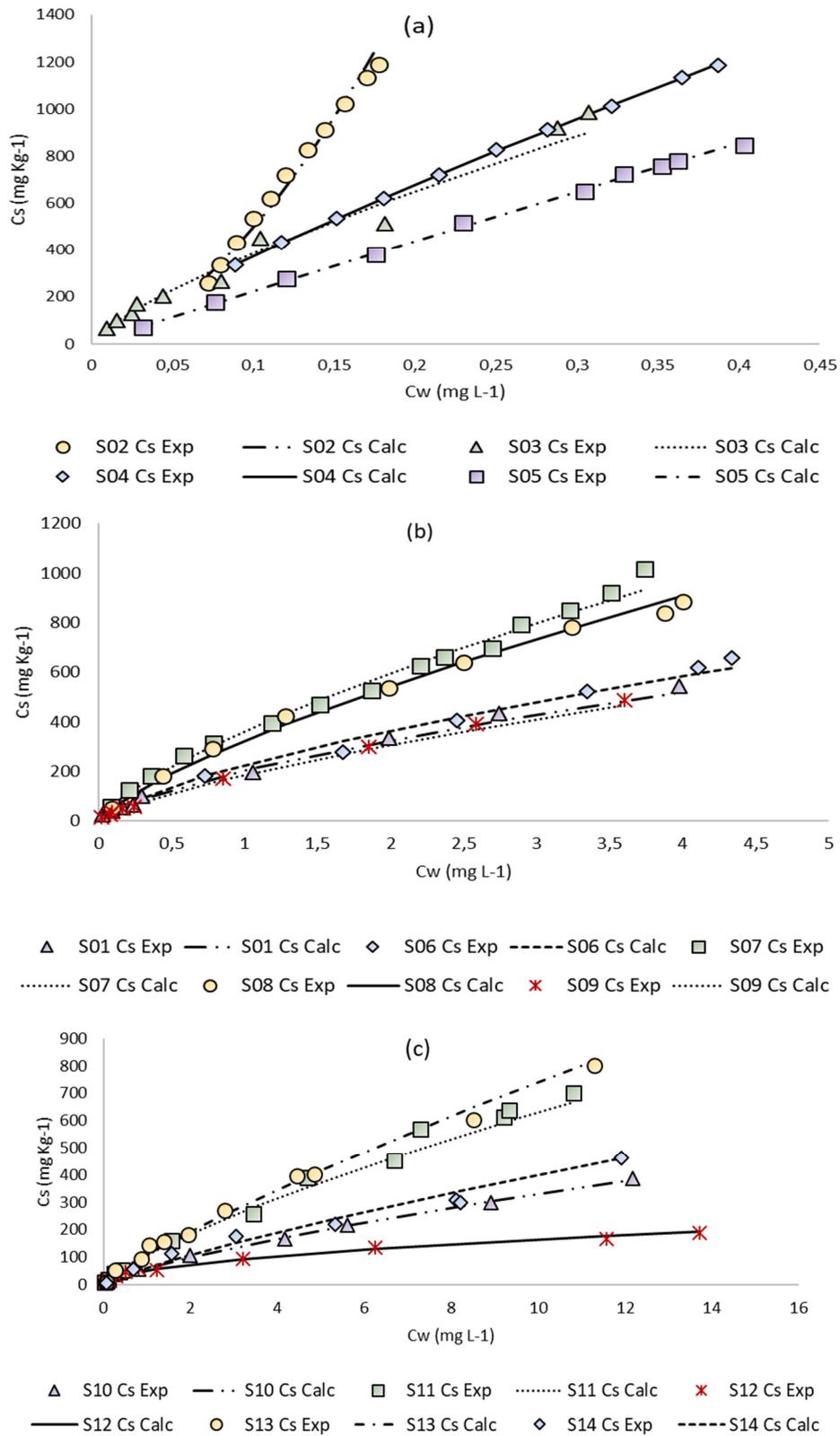


Figura 4.8. Isothermas de sorción de la Difloxacin en los diferentes suelos estudiados

4. Resultados y discusión

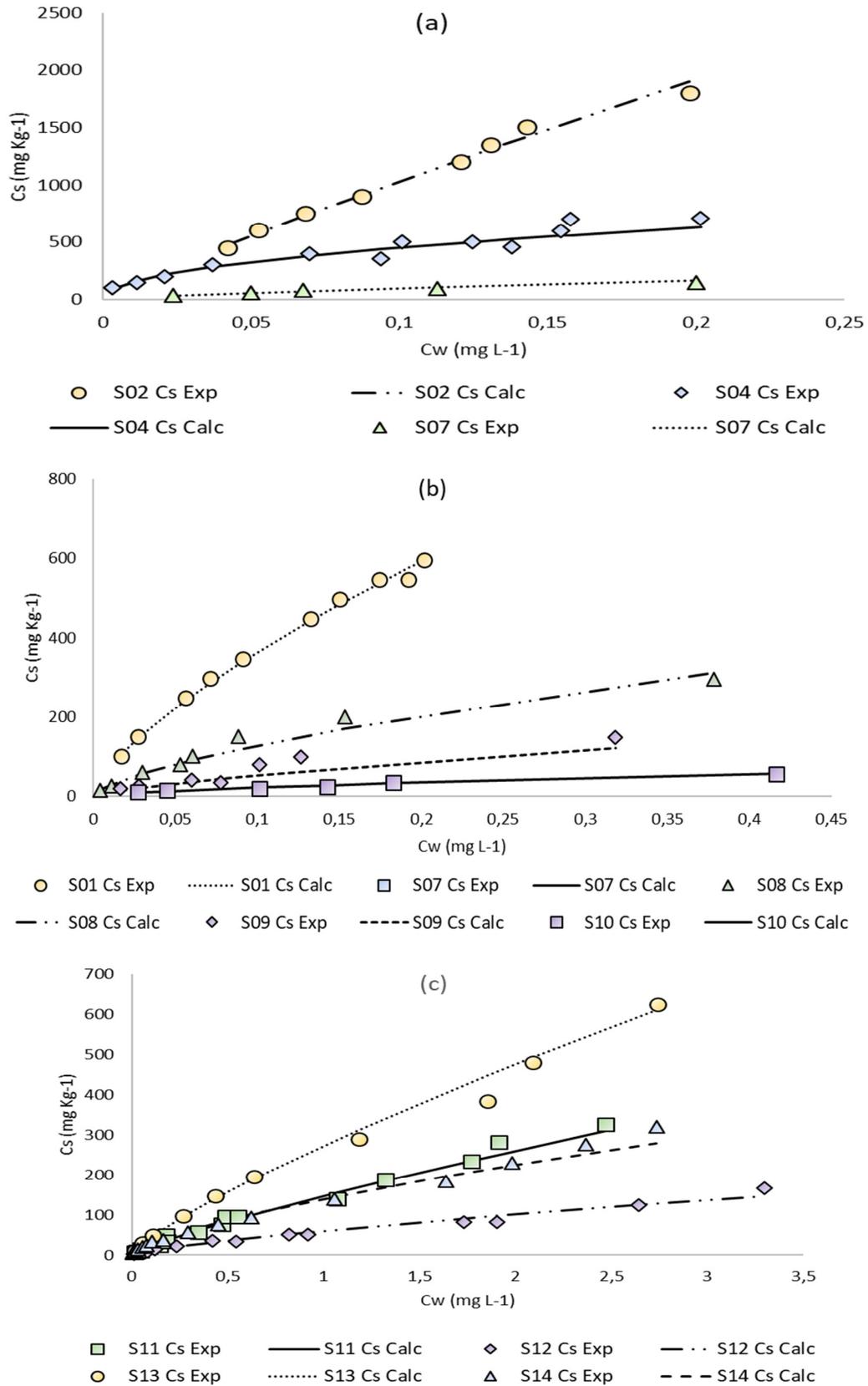


Figura 4.9. Isothermas de sorción de la Enrofloxacin en los suelos estudiados

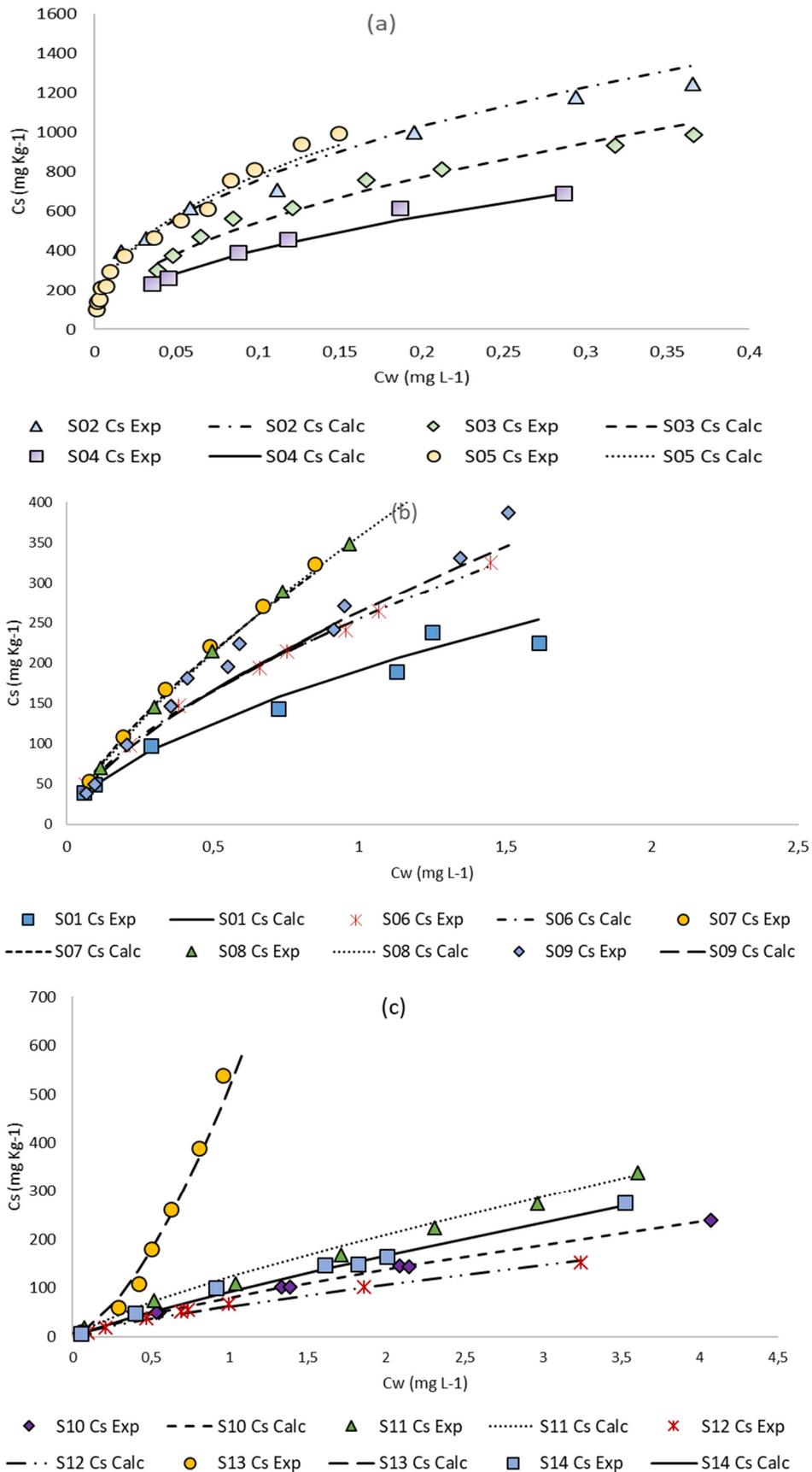


Figura 4.10. Isothermas de sorción de la Marbofloxacina en los suelos estudiados

4. Resultados y discusión

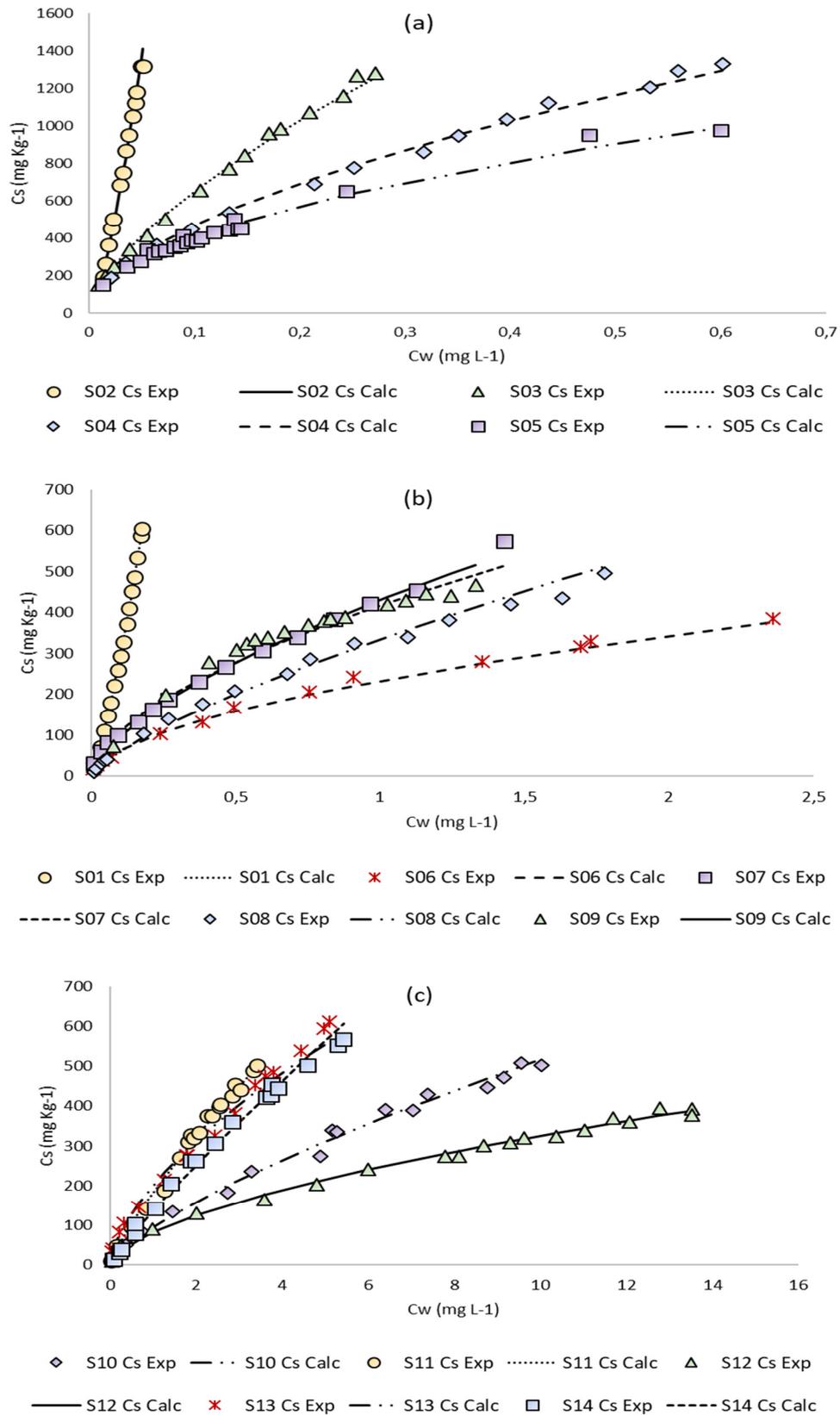


Figura 4.11. Isothermas de sorción de la Sarafloxacin en los suelos estudiados

Tabla 4.4: Parámetros de las ecuaciones de Freundlich para las diferentes fluoroquinolonas y suelos estudiados

	DAN	DIF	ENR	MAR	SAR
	K _F (s.d.)				
	N (s.d.)				
S01	219,1(3,4)	159,3(4,7)	1866,1(52,1)	190,5(4,1)	5203,8(152,2)
	0,710(0,008)	0,767(0,016)	0,710(0,011)	0,600(0,014)	1,252(0,012)
S02	7857,0(236,8)	21787,8(3224,0)	8137,4(374,6)	2073,5(72,5)	89935,4(13626,2)
	0,777(0,010)	1,643(0,070)	0,896(0,022)	0,433(0,018)	1,396(0,044)
S03	4953,0(487,6)	3150,0(312,8)	--	5121,6(503,8)	2963,4(81,7)
	0,751(0,037)	0,849(0,038)		0,486(0,019)	0,659(0,011)
S04	3768,5(191,1)	2680,4(17,5)	1347,3(146,3)	1290,6(22,4)	1726,0(27,1)
	1,185(0,033)	0,854(0,004)	0,474(0,036)	0,501(0,010)	0,568(0,007)
S05	2965,0(145,4)	2082,1(23,4)	--	2536,9(132,6)	1283,5(27,6)
	0,612(0,021)	0,968(0,007)	--	0,450(0,012)	0,503(0,010)
S06	1170,0(27,1)	227,2(5,4)	--	254,9(3,5)	232,5(4,4)
	0,869(0,017)	0,690(0,014)	--	0,613(0,008)	0,560(0,009)
S07	1571,0(63,5)	360,8(5,1)	541,3(12,1)	351,0(3,12)	462,9(20,1)
	0,848(0,024)	0,721(0,013)	0,741(0,014)	0,713(0,008)	0,799(0,028)

Tabla 4.4 (continuación)

	DAN	DIF	ENR	MAR	SAR
	K _F (s.d.)				
	N (s.d.)				
S08	999,7(36,6)	323,1(5,3)	601,3(28,9)	356,6(5,5)	334,1(7,7)
	0,553(0,016)	0,740(0,012)	0,677(0,017)	0,752(0,011)	0,743(0,011)
S09	522,2(10,7)	182,0(4,4)	278,4(20,1)	263,5(5,7)	417,6(5,0)
	0,884(0,014)	0,718(0,012)	0,735(0,034)	0,664(0,015)	0,482(0,022)
S10	239,6(10,3)	56,7(1,3)	104,5(3,9)	83,8(2,2)	85,3(1,9)
	0,895(0,031)	0,753(0,009)	0,701(0,022)	0,853(0,014)	0,802(0,013)
S11	298,9(23,9)	109,3(2,7)	146,7(7,6)	127,3(3,5)	182,7(3,4)
	0,687(0,035)	0,761(0,011)	0,824(0,027)	0,778(0,017)	0,815(0,015)
S12	128,7(4,9)	51,0(1,3)	61,3(1,9)	65,0(1,2)	82,8(2,3)
	0,844(0,027)	0,512(0,008)	0,758(0,016)	0,777(0,009)	0,594(0,012)
S13	540,2(18,5)	113,6(2,1)	273,4(7,4)	518,9(9,5)	201,8(3,3)
	0,811(0,018)	0,8524(0,009)	0,799(0,015)	1,663(0,031)	0,629(0,011)
S14	359,9(14,9)	62,1(2,3)	145,1(5,1)	99,6(2,2)	136,5(2,4)
	0,977(0,023)	0,806(0,014)	0,697(0,014)	0,736(0,013)	0,881(0,013)

Tabla 4.5: Valores de $\log(K_{d0,1})$ para las diferentes fluoroquinolonas y suelos, calculados a partir de los parámetros de la Tabla 4.4. Unidades de K_d en $L\ Kg^{-1}$

	DAN	DIF	ENR	MAR	SAR
S01	2,63	2,45	3,56	2,68	2,46
S02	4,12	3,70	4,01	3,88	3,56
S03	3,94	3,65	-	4,22	2,81
S04	3,39	3,57	3,65	3,61	2,67
S05	3,86	3,35	-	3,95	2,61
S06	3,20	2,67	-	2,79	1,81
S07	3,35	2,84	2,99	2,83	1,87
S08	3,45	2,77	3,10	2,80	1,78
S09	2,83	2,54	2,71	2,76	2,14
S10	2,48	2,00	2,32	1,84	1,13
S11	2,79	2,28	2,34	2,33	1,45
S12	2,27	2,20	2,03	2,04	1,32
S13	2,92	2,20	2,64	2,05	1,68
S14	2,58	1,99	2,46	2,26	1,25

A partir de las figuras de las isothermas, podemos observar que para la DAN los suelos S07, S08 y S09 (Figura 4.7a) presentan curvas del tipo H, es decir, que el analito presenta alta afinidad por el sorbente. En cambio, el suelo S1 presenta una curva tipo L, que indica también una gran afinidad entre el sorbato y el sorbente, pero que disminuye conforme aumenta el contenido de soluto en la superficie del sorbente. En cambio, el suelo S09 presenta una afinidad intermedia entre los otros.

En la figura 4.7b, observamos que el S04 presenta una curva tipo S, donde existe una barrera para la sorción del sorbato a bajas concentraciones, pero una vez se vence esta limitación, la interacción sorbato/sorbente es similar a la que describe una curva tipo L. Los suelos S02, S03, S05 presentan curvas tipo L, y el S06 una curva tipo C, que indica una partición constante.

Las curvas de la figura 4.7c, nos indican partición prácticamente constante para el suelo S14 (con $N = 0,977$), describiendo una curva tipo C, mientras que el suelo S13 exhibe más afinidad por el sorbente que el resto de suelos en la figura.

En cuanto a la DIF, tal como se observa en la figura 4.8a, presenta una curva tipo S (alta afinidad) para el suelo S02. Los suelos S03 y S04 exhiben una curva tipo L y el suelo S05 sigue una curva tipo C de partición constante al intervalo de concentraciones estudiado.

Todas las curvas representadas en la figura 4.8b, muestran que los suelos S01, S06, S07, S08 y S09 con DIF, tienen un comportamiento tipo L, indicando una gran afinidad entre el soluto y el sorbente a valores bajos de C_w , que va disminuyendo a medida que aumenta la concentración del soluto sobre el sorbente.

Según la figura 4.8c, los suelos S10, S11, S12, S13 y S14, muestran un comportamiento descrito por una curva tipo L, donde la difloxacina y el suelo son afines a concentraciones pequeñas, pero esta afinidad disminuye a medida que aumenta la concentración de la difloxacina sobre el suelo. Es de destacar la baja sorción que se obtiene en el suelo S12.

Por su parte, la ENR describe una curva que se asemeja al tipo L con los diferentes suelos estudiados, como se observa en las figuras 4.9 (a, b y c), presentando isothermas muy similares los suelos S01 y S04.

La MAR, por otro lado, exhibe curvas tipo H para los suelos S03 y S05, según la figura 4.10a. En cambio, la misma figura muestra que los suelos S02 y S04 describen curvas tipo L. Este tipo de curva también se observa con los suelos S01, S06, S07, S08 y S09 (Figura 4.10b). También se observa este comportamiento en los suelos S10, S11, S12 y S14, mientras que se observa una curva tipo H con el suelo S13 (Figura 4.10c).

En cuanto a la SAR, en la gráfica 4.11a, se observan curvas tipo L para los suelos S03, S04 y S05, y una curva tipo H para el S02. Para el suelo S01 se obtiene una curva tipo S.

La figura 4.11b muestra curvas tipo L para la sorción de esta fluoroquinolona en los suelos S06, S07, S08 y S09. Finalmente, en la 4.11c se observan curvas tipo L para los suelos representados S10, S11, S12, S13 y S14.

En las siguientes figuras se representan los valores optimizados para las constantes de la ecuación de Freundlich (K_F y N). K_F se representa en forma de logaritmo con la finalidad de que puedan observarse más claramente las diferencias en las intensidades de la sorción entre los diferentes suelos con respecto a la fluoroquinolona en estudio. Igualmente, en estas gráficas es posible hacernos una idea de la homogeneidad y heterogeneidad de los “setis” o sitios de sorción, tomando en cuenta el valor de N , ya que un valor igual o aproximadamente igual a 1 nos indica homogeneidad de los setis, un valor de N menor de 1 revela heterogeneidad de los setis, mientras que un valor de N mayor que la unidad señala que la presencia de soluto en la fase sólida favorece la sorción.

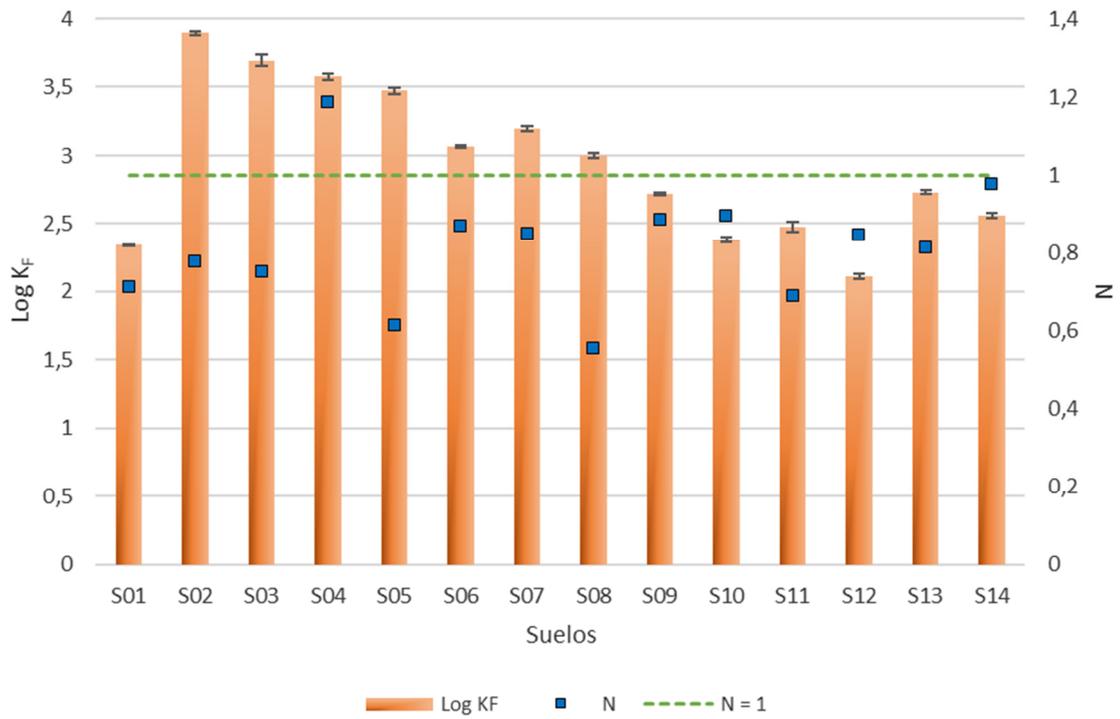


Figura 4.12. Valores de Log K_F y N para la DAN

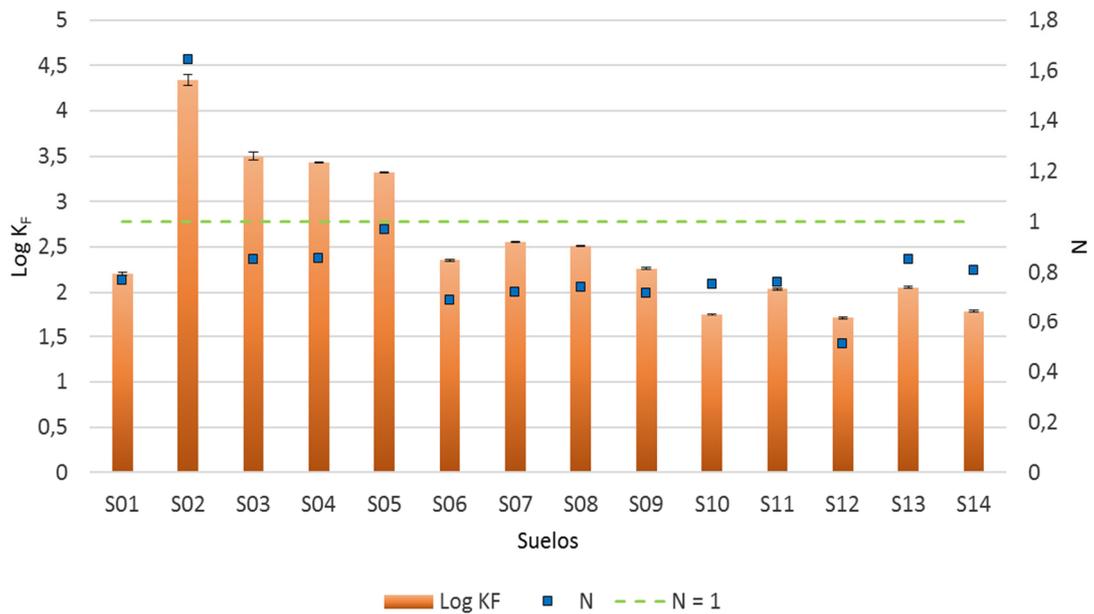


Figura 4.13. Valores de Log K_F y N para la DIF

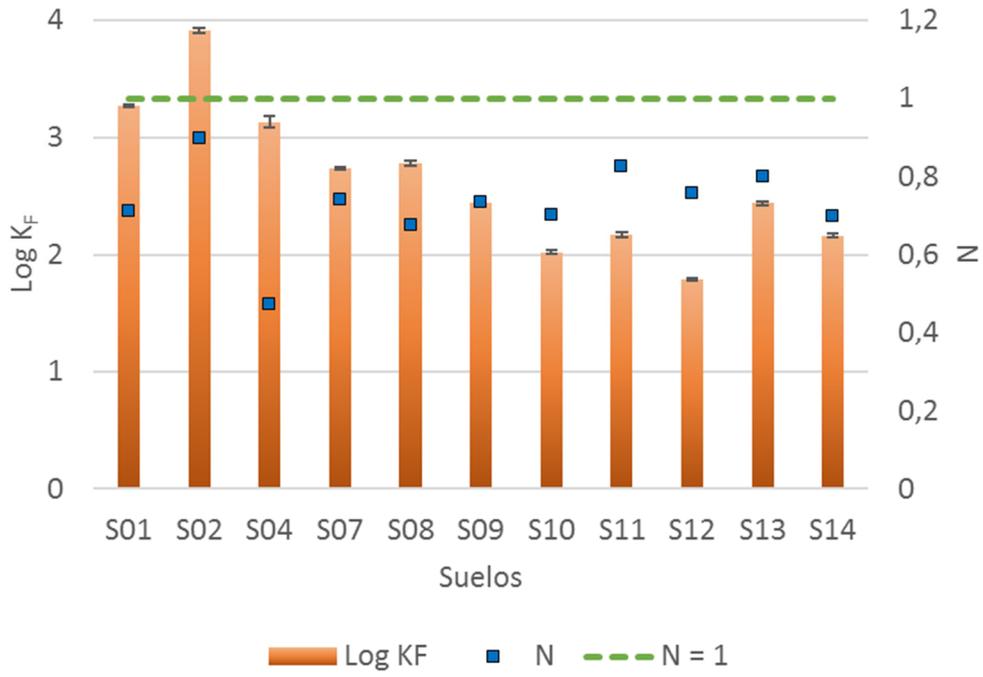


Figura 4.14. Valores de Log K_F y N para la ENR

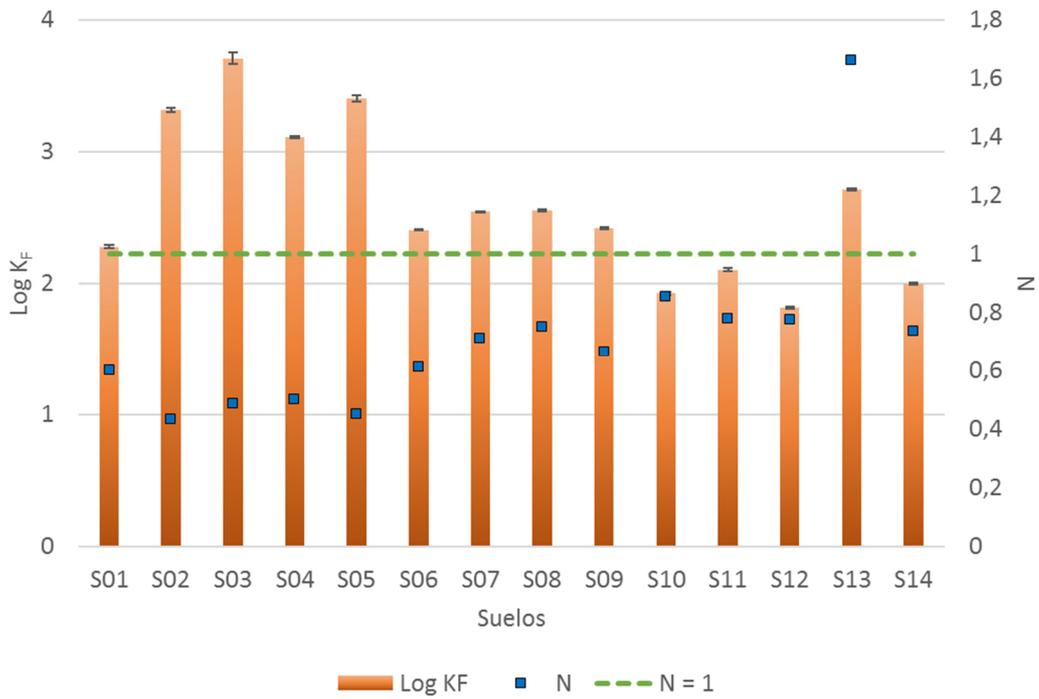


Figura 4.15. Valores de Log K_F y N para la MAR

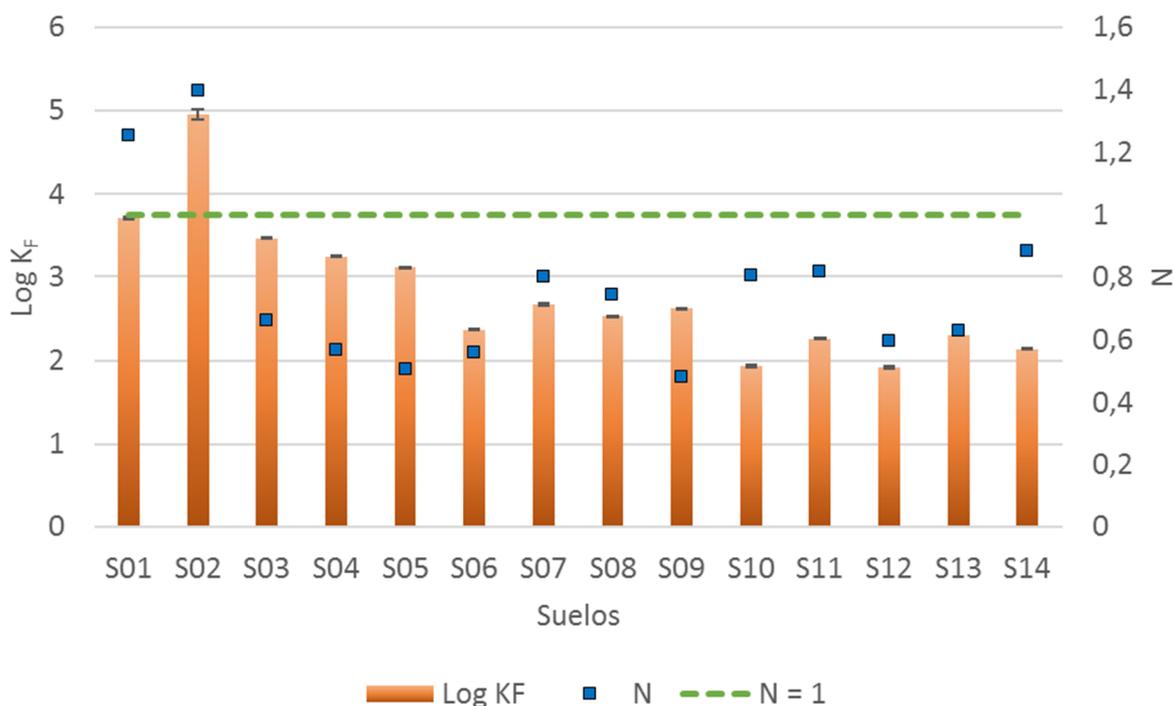


Figura 4.16. Valores de Log K_F y N para la SAR

A continuación, discutiremos los principales mecanismos de sorción que toman parte en la sorción de las fluoroquinolonas estudiadas (DAN, DIF, ENR, MAR, SAR) en los 14 diferentes suelos.

4.2.2.1 Mecanismos de sorción

La forma en que una sustancia química interactúa con un sorbente difiere de una sustancia a otra, del material con el que interactúa y múltiples factores como la temperatura, el pH, la concentración de la sustancia, la influencia de agentes complejantes y elementos competidores, así como de la cinética (334).

Así mismo, la especie química de la fluoroquinolona presente en la solución de suelo, influye en el mecanismo de sorción que prevalece. Según indica la bibliografía, éstos son el intercambio catiónico, la complejación superficial y el enlace catiónico (334-337), aunque también tienen lugar las interacciones electrostáticas como los puentes de

hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y la transferencia de cargas (donador aceptor de electrones, π - π EDA) (334).

El enlace catiónico, denominado (*cation bridging* o *ion binding*) se refiere a la interacción entre un catión divalente y un sorbente con carga neta negativa. Este tipo de enlace tiene una fuerza de atracción muy fuerte (338). En él los cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} se atraen a los grupos funcionales cargados negativamente presentes en el sorbente. Cuando predomina la presencia de cationes divalentes, predomina la interacción por enlace catiónico, mientras que cuando la presencia de iones monovalentes como Na^+ , K^+ y NH_4^+ es predominante, el mecanismo de sorción mediante intercambio de cationes prevalece sobre el enlace catiónico (339).

En las figuras que siguen, veremos el comportamiento de sorción de los suelos estudiados con respecto a cada fluoroquinolona, en base a los valores de $K_{d0,1}$ recogidos en la Tabla 4.5. En primer lugar, comentaremos las variaciones de la magnitud de la sorción en suelos correspondientes a la fluoroquinolona DAN.

De manera generalizada, para esta fluoroquinolona la sorción disminuye a medida que aumenta el pH del suelo. Se exceptúa el suelo S01, cuya sorción es menor a la del resto de los suelos de este grupo, a pesar de que es el suelo más ácido de todos ($\text{pH} = 4,32$).

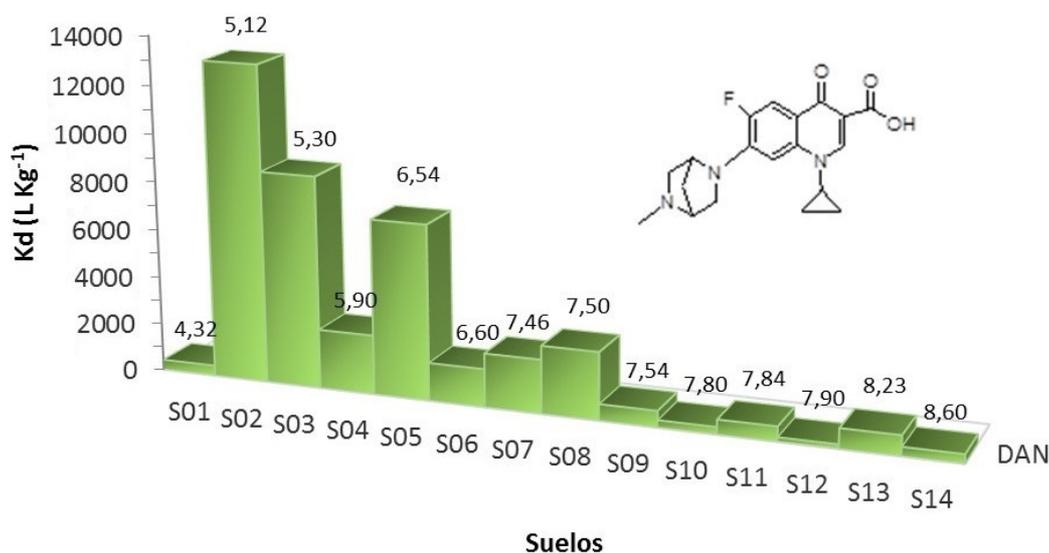


Figura 4.17. Valores de K_d de DAN para $C_w = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ en diferentes suelos. En la parte superior de cada barra del gráfico se indica el valor de pH del suelo

Los valores medidos de K_d para la DAN, en este grupo de 14 suelos, han estado entre 184,1 - 13135,8 L Kg⁻¹. De entre todos los suelos, los que presentan mayor sorción para esta fluoroquinolona son S02, S03 y S05. Todos son suelos ácidos con valores de pH entre 5,12 y 6,54. Esto nos indica que la especie predominante de la DAN en estos casos S02 y S03 es la catiónica (pK_{a1} 6,50). Por tanto, el mecanismo de sorción predominante en la sorción de DAN sería el intercambio de cationes. Para ello, a pH ácido, la molécula de DAN está protonada en el grupo amino del núcleo naftiridona. Este grupo protonado puede desplazar un catión del suelo, dando lugar al intercambio catiónico.

La diferencia en la magnitud de la sorción de los suelos S01 y S04, que rompen la tendencia dentro del grupo de los suelos ácidos, podría atribuirse al contenido en carbono orgánico, que es mucho mayor a la del resto de los suelos: el contenido en carbono orgánico (OC) para los suelos S01 y S04 es de 7,99% y de 7,40%, respectivamente. El contenido en OC del resto de suelos ácidos varía entre 0,63 y 1,53. Por tanto, a pesar de que la especie que predomina en ambos suelos es la catiónica, podría prevalecer la complejación superficial en vez del intercambio de cationes.

De los suelos básicos, los que presentaron mayores valores de K_d , han sido S07, S08 y S13, siendo la forma neutra/zwitteriónica la especie predominante de DAN al pH de estos suelos (7,46, 7,50, 8,23, respectivamente). Los mecanismos de sorción que más probablemente pueden tener lugar en estos casos son las fuerzas de Van der Waals.

Cabe señalar que, dentro del grupo de los suelos básicos, las magnitudes de sorción entre ellos son bastante similares. Esto puede deberse a que sus propiedades físicas y químicas son también similares entre sí, excepto los suelos S10 y S12, que presentan un alto contenido de arena, de 89,6 % y 94,2 %, respectivamente, motivo al cual se puede atribuir la disminución en sus valores de K_d con respecto a los otros suelos del grupo básico.

En el caso de la DIF, los suelos que han exhibido mayor capacidad de sorción son el S02, S03, S04 y S05, mientras que los que han presentado menor magnitud de sorción son S07, S08 y S09. Los tres primeros son suelos ácidos y los tres últimos son suelos ligeramente básicos.

La especie predominante en la solución de los suelos S02 y S03 es la catiónica (pK_{a1} 5,60), mientras que la especie predominante en los suelos S04 y S05 es la neutra/zwitteriónica (pK_{a2} 7,99). La diferencia de magnitud en los valores de K_d entre

los suelos S02 a S05 puede ser atribuida a la cada vez menor presencia de la especie catiónica en disolución.

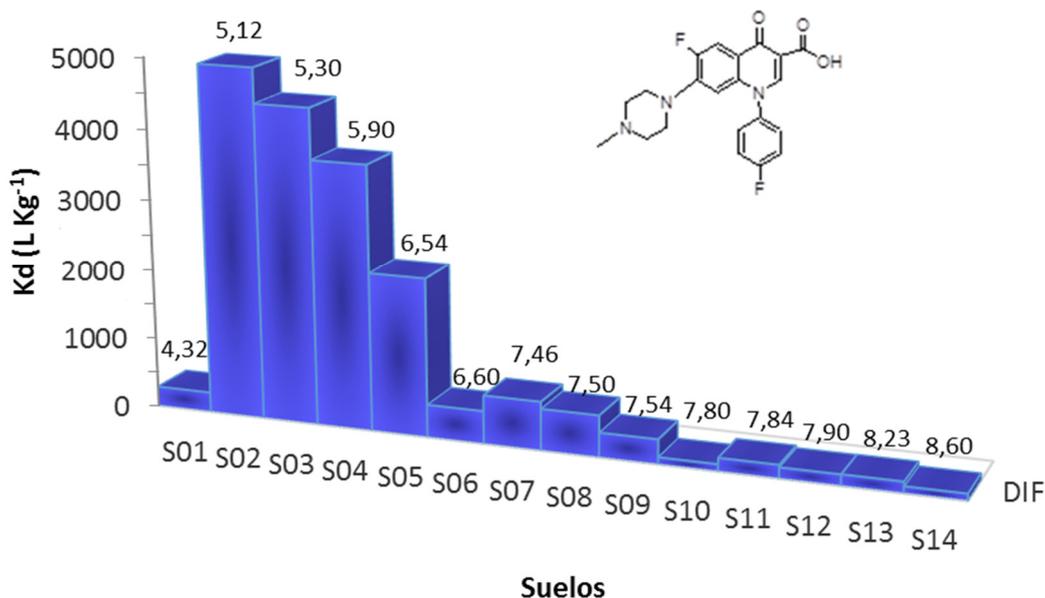


Figura 4.18. Kd para DIF a $C_w = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ en los suelos estudiados. En la parte superior de cada barra del gráfico se indica el valor de pH del suelo

Estos hechos sugieren que el mecanismo de interacción entre los componentes del suelo y la DIF, en los suelos S02 a S05, es el intercambio catiónico.

Dentro del conjunto de suelos con características ácidas, el S01 es el único que exhibe un comportamiento anómalo con respecto a los demás, ya que, siendo el suelo más ácido, es el que presenta menor capacidad de sorción. Al igual que para la DAN, este hecho puede ser debido a su alto contenido de carbono orgánico (7,99 %), el cual es más elevado que el presente en los demás suelos ácidos, y similar el S04 (7,40 % de OC), suelo que además sigue la tendencia del grupo de los suelos ácidos. Podríamos explicar esta diferencia, tomando en cuenta que el CEC ($44,6 \text{ meq } 100\text{g}^{-1}$) es más elevado para S04 que para S01 (CEC 24,5). Lo mismo para el contenido de arcilla, siendo de 30,6 % para S04 y 9,1 %

para S01. Una CEC y un contenido de arcilla más elevados, podrían favorecer la capacidad de sorción.

En el caso del grupo de los suelos básicos, de S07 a S12 la especie que predomina es la neutra/zwitteriónica, mientras que en los suelos S13 y S14 predomina la especie aniónica (pK_{a2} 7,99). La presencia de aniones puede favorecer que la complejación superficial – en la que interactúa un ion metálico con los agentes complejantes del suelo, tales como ligandos inorgánicos (aniones) y orgánicos (carboxilos y grupos fenólicos de la materia orgánica sólida)- y el “cation binding” sean los mecanismos de sorción predominantes.

En el grupo de los suelos básicos, el S10 y el S12 presentan un valor de K_d ligeramente menor a la de los suelos más básicos que ellos, variando así un poco la tendencia hacia la disminución de la capacidad de sorción. Probablemente, el contenido de arena (89,6 % y 94,2 %) para S10 y S12, respectivamente, sea la responsable de esta variación.

La figura 4.19 muestra las variaciones de $K_{d 0,1}$ de la ENR en función de los diferentes suelos. En ella podemos observar que se mantiene la tendencia de mayor sorción en los suelos ácidos (en este caso S01 S02 y S04) con respecto a los suelos básicos. Los suelos ácidos presentan unos valores de K_d entre $3637,8 \text{ L Kg}^{-1}$ y $10344,0 \text{ L Kg}^{-1}$. Según el pH de las soluciones acuosas, la especie de la ENR que predomina en ellas es la catiónica (pK_{a1} 6,02), por lo que el mecanismo que podría dominar la sorción de la ENR es el intercambio de cationes.

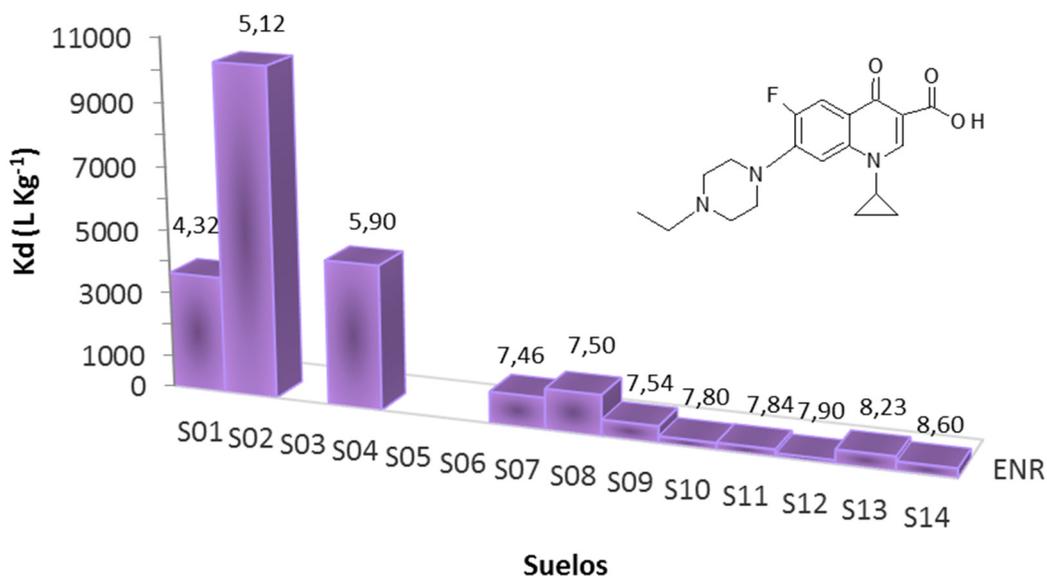


Figura 4.19. K_d para la ENR a C_w = 0,1 mg L⁻¹ para los diferentes suelos. En la parte superior de cada barra del gráfico se indica el valor de pH del suelo

Como en los casos anteriores, de las magnitudes numéricas de K_d podemos observar que S01, a pesar de tener el pH más ácido, es, entre los suelos ácidos, el que posee el valor de K_d más bajo. No obstante, en este caso la diferencia no es tan acusada como en el resto de suelos; de hecho, el valor de K_{d 0,1} de la ENR es el mayor entre las cinco fluoroquinolonas estudiadas, siendo aproximadamente de un orden de magnitud mayor que el resto. Esta particularidad no se puede explicar únicamente a partir del mayor contenido en carbono del suelo S01 y la lipofilicidad de la ENR (logK_{OW}=0,39), ya que este valor es incluso mayor en el caso de la DIF (logK_{OW}=0,68). Por tanto, la anomalía del suelo S01 puede ser debida a una combinación de diferentes factores, tanto de las propiedades de las fluoroquinolonas como de las características fisicoquímicas de los suelos.

Con respecto a los suelos básicos, y de acuerdo con su pK_{a2} (8,25), la ENR se encuentra en las formas zwitteriónica y neutra, a los pH de las soluciones del suelo de S07 a S13. El tipo de interacción que podría haber entre la ENR y estos suelos son las fuerzas de Van der Waals. En general, éstas son fuerzas débiles que darían como resultado valores de K_d pequeños, como en efecto puede apreciarse en la figura para la ENR.

De los suelos básicos, S07, S08 y S09 son los que presentan mayor capacidad de sorción. Los factores que pueden influir en estos casos pueden ser la capacidad de intercambio catiónico (estos tres son los que presentan los valores mayores dentro de los suelos básicos), y el contenido en carbono orgánico; en particular, el suelo S08 es el que presenta el valor más elevado de $K_{d0,1}$ dentro de los suelos básicos, siendo el que tiene el mayor valor de OC y el segundo mayor de CEC.

Por su parte, en el S14 (pH 8,6), la especie de la ENR que predomina es la aniónica. La presencia de la ENR como un anión puede dar lugar a interacciones con el suelo más fuertes que las propiciadas por un zwitterion, como pueden ser la complejación superficial y el “cation binding” o enlace de catión. La complejación superficial daría lugar a valores de K_d más elevados debido a que el enlace sería más fuerte que aquel proporcionado por un enlace de catión. Por esto, es probable que el mecanismo que se da en este suelo sea la complejación superficial, que aumenta ligeramente la magnitud de la sorción de la ENR con respecto a los demás suelos más básicos ($\text{pH} \geq 7,8$) a excepción del S13. Adicionalmente, también hay que tener en cuenta que, de estos suelos, el S14 tiene el segundo valor de CEC después del S13.

A continuación, explicaremos los mecanismos de sorción que pueden tener lugar entre la MAR y el conjunto de 14 suelos estudiados.

Para apoyarnos gráficamente, la figura 4.20 muestra los valores de K_d obtenidos para la MAR con cada suelo estudiado.

Entre los suelos ácidos, aquellos que presentaron valores de K_d , para la MAR, más elevados fueron S02, S03 y S05 ($9003,3 \text{ L Kg}^{-1}$). Según los pH de las soluciones, en los suelos S02 y S03 la MAR predomina como catión, mientras que en el suelo S05 lo hace en la forma neutra/zwitteriónica ($\text{pK}_{a1} 5,86$).

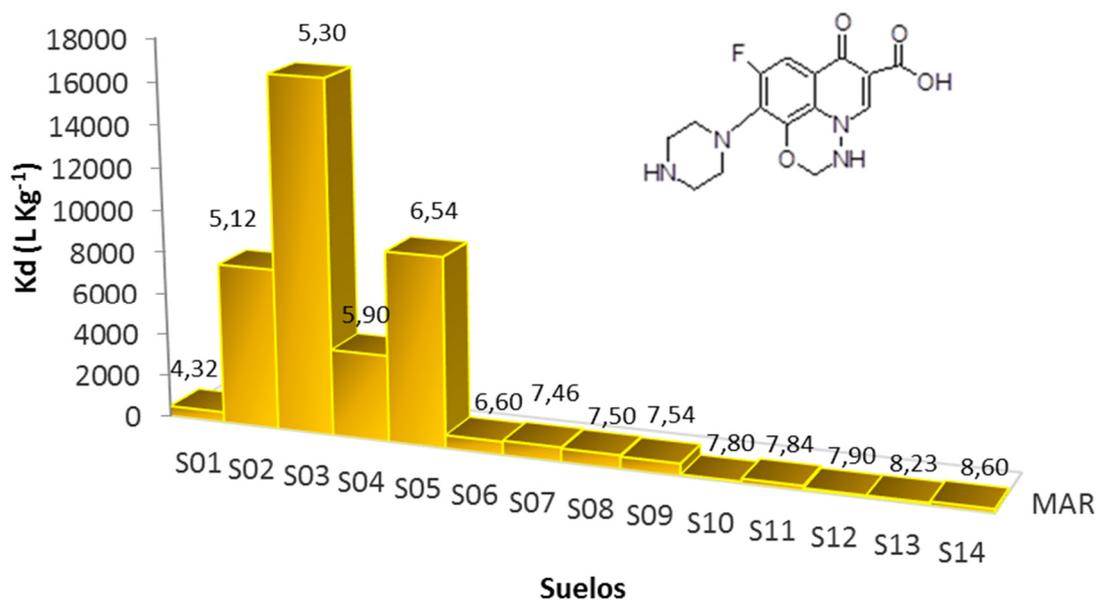


Figura 4.20. Kd a $C_w = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ en MAR para los diferentes suelos. En la parte superior de cada barra del gráfico se indica el valor de pH del suelo

En S02 y S03, podríamos decir que predomina el intercambio catiónico, dando como resultado valores de Kd más elevados. Sin embargo, en S05, en donde la MAR se encuentra en forma neutra/zwitteriónica, tendría que predominar las interacciones electrostáticas, lo que daría como resultado una Kd menor a la obtenida. Pero como para el suelo S05, CEC es $36,0 \text{ meq } 100\text{g}^{-1}$ y % OC es 1,53; probablemente esté predominando el intercambio catiónico en vez de interacciones electrostáticas, interacciones π - π o interacciones donador-aceptor de H. Estas dos últimas muy comunes cuando la materia orgánica está presente en cantidades elevadas, lo cual no es el caso, ya que el suelo S05 presenta un valor moderado de OC (1,53 %).

Con la MAR, S01 y S04 se comportan de manera anómala con respecto a los demás suelos ácidos. Por un lado, S01, y como ocurre con el resto de las fluoroquinolonas, presenta una Kd con un valor muy inferior al resto de los suelos de este grupo a pesar de ser el suelo más ácido. S04 también presenta una Kd inferior a los demás suelos ácidos, aunque con menor diferencia que S01. En S01 la MAR se encuentra, predominantemente, en forma catiónica, mientras que en S04 se encuentra, mayoritariamente, en forma neutra/zwitteriónica. Por la especie dominante en solución, los mecanismos de sorción que más probablemente tendrían lugar son el intercambio de cationes para el suelo S01 y las interacciones electrostáticas para el suelo S04. Al correlacionar el contenido de

materia orgánica de ambos suelos con sus respectivos valores de K_d y sabiendo que el suelo S01 posee 7,99 % y el suelo S04 un 7,40 %, de materia orgánica, podríamos asumir que esta es la razón por la cual las K_d sean más pequeñas de lo esperado. La materia orgánica presente puede interactuar con la MAR a través de interacciones electrostáticas (π - π , donador-aceptor de H) cuyas magnitudes son más débiles que la del intercambio catiónico, por lo cual, es posible que la sorción se vea disminuida, reflejándose con un valor de K_d menor a lo esperado.

Por otro lado, los suelos básicos que han presentado mayores valores de K_d han sido S07, S08 y S09. En estos suelos, cuyos valores de pH son 7,46; 7,50 y 7,54, respectivamente, la especie predominante de la MAR es la neutra/zwitteriónica (pK_{a2} 8,80). Por lo tanto, los mecanismos de sorción que prevalecen son las interacciones electrostáticas y los puentes de H. este tipo de interacción, como hemos mencionado, son débiles, por lo que los valores de K_d serán pequeños, como los que se han obtenido.

El resto de los suelos básicos (S10 a S14) presenta valores bajos de K_d , como cabría esperar, entre 70 y 200 L Kg⁻¹ aproximadamente.

Para terminar con las evaluaciones de las capacidades de sorción de los suelos para las fluoroquinolonas estudiadas, veremos a continuación los resultados obtenidos para la SAR, que se representan en la figura 4.21.

Como ocurre en las fluoroquinolonas comentadas previamente, los suelos que presentan mayor sorción para la SAR son los ácidos. El suelo S02 es el que presenta una mayor intensidad de sorción, aunque en este caso las diferencias con el resto son mayores. De acuerdo con los pH de las soluciones de suelo, (entre 5,12 y 5,90) de los suelos S02 a S04, la especie de la SAR que predomina en solución es la catiónica (pK_{a1} 5,92). Por lo tanto, podemos asumir que el mecanismo de sorción que prevalece es el intercambio catiónico.

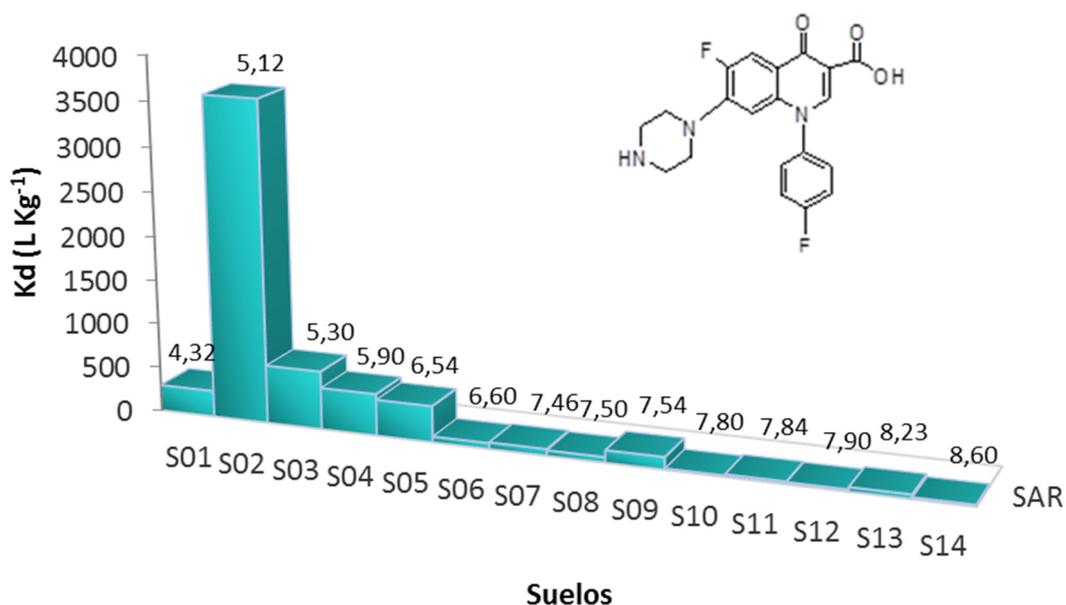


Figura 4.21. Kd a $C_w = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para SAR en los diferentes tipos de suelo. En la parte superior de cada barra del gráfico se indica el valor de pH del suelo

Al igual que como ocurre con las demás fluoroquinolonas, el suelo S01 exhibe un valor de Kd menor a lo esperado, a pesar de ser el suelo más ácido de todos. Este hecho nos lleva a tratar de correlacionar las propiedades fisicoquímicas del suelo con el valor presentado para Kd y al final llegamos también a concluir que, para este caso en particular, es el contenido de materia orgánica del suelo (7,99%) el que hace que los mecanismos de sorción que han dominado hayan sido las interacciones electrostáticas, las interacciones π - π o las interacciones donador-aceptor de H.

Por otro lado, del conjunto de suelos básicos, los que han exhibido mayor capacidad de sorción, han sido S07, S08 y S09, con valores de Kd de 73,4, 60,3 y 137,6 L Kg⁻¹, respectivamente. En ellos, y de acuerdo con su pH, la especie de la SAR que predomina es la neutra/zwitteriónica (pKa₂ 9,09). Así, los mecanismos de sorción que podrían prevalecer son las interacciones electrostáticas como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Esto hace que sus valores de Kd sean inferiores con respecto a los obtenidos para los suelos ácidos, donde la especie predominante es la catiónica y, por ende, donde el mecanismo de sorción que prevalece es el intercambio catiónico, que se traduce en valores de Kd más elevados.

En este grupo de suelos básicos, sin embargo, podemos observar que dos suelos, el S08 y el S13, presentan valores de K_d mayores de lo que cabría esperar, si se sigue la tendencia en la disminución de la sorción. Además, ambos suelos poseen propiedades fisicoquímicas muy similares, dentro de las cuales no se ha podido establecer alguna diferencia que pueda explicar el comportamiento, un tanto diferente, a los demás suelos del grupo.

La siguiente tabla muestra valores de K_d publicados para diferentes fluoroquinolonas.

Tabla 4.6. Coeficientes de sorción para diferentes fluoroquinolonas

Textura	pH CaCl ₂	Propiedades del Suelo					Log Kd (L kg ⁻¹)				Ref.
		%OC	CEC (mmol.dm ⁻³)	Arena %	Arcilla %	Limo %	DAN	ENR	NOR	CIP	
Franco Arenoso	3,7	1,24	35,7	77,9	18,1	4	3,45	3,33	3,77	3,46	
Franco Arcilloso Arenoso	3,7	2,92	56,9	65,6	24,3	10,1	4,03	4,10	4,42	4,08	
Franco Arenoso	3,8	0,96	27,6	88	8	4	3,10	2,89	3,18	3,04	
Arcilloso	3,9	21,34	109,9	14,4	47,6	38	4,50	4,39	4,69	4,66	
Franco Arenoso	4,5	0,98	39,2	72	4	24	3,69	3,62	3,96	3,55	
Franco	4,8	2,62	153,2	51,2	14,2	34,6	4,48	4,57	4,54	4,61	
Franco	4,8	2,16	100	44,9	20,4	34,7	4,37	4,16	4,32	4,20	340
Franco Arenoso	5,1	0,67	32	84	6	10	2,93	2,74	3,00	2,86	
Franco Arcilloso Arenoso	5,1	5,43	125,2	47,3	34,5	18,2	4,00	4,09	4,02	3,98	
Arcilloso	5,2	6,56	107,2	7,5	65,8	26,7	5,11	5,10	5,20	5,42	
Arcilloso	5,4	5,78	207,8	20,6	54,3	25,1	5,41	5,40	5,53	6,11	
Franco Arcilloso Limoso	5,7	4,1	217,5	18,6	36,6	44,8	4,71	4,73	4,56	4,61	
Arcilloso	6,9	9,56	52,2	10,9	68,4	20,7	4,24	4,00	5,23	4,06	
Franco	3,2	8,93	8,62	47,6	15,6	36,8	3,34		3,88		337

Textura	Propiedades del Suelo						Log Kd (L kg ⁻¹)				Ref.
	pH CaCl ₂	%OC	CEC (mmol.dm ⁻³)	Arena %	Arcilla %	Limo %	DAN	ENR	NOR	CIP	
Franco	3,6	2,58	4,6	51,3	10,6	38,1	3,00			3,08	
Franco Arenoso	3,6	0,78	3,3	57,6	1,2	41,2	2,30			2,32	
Arenoso	3,8	1,68	0,82	94,9	1,4	3,8	2,18			2,41	
Arenoso	4,1	1,78	1,82	94	1,8	4,2	2,66			2,48	
Franco Limoso	4,2	0,84	2,38	19,5	26,9	53,5	2,81			2,91	
Franco Arcilloso Arenoso	4,4	0,3	1,78	73,1	20,1	6,8	2,63			2,69	
Franco Arenoso	4,5	0,14	4,5	52,3	15,9	31,9	2,93			2,98	
Franco	4,5	1,95	4,19	33,8	16,5	49,7	3,04			3,08	
Franco Arenoso	4,5	2,46	1,05	73,9	3,9	22,2	2,46			2,95	
Franco Arcilloso Arenoso	4,6	0,79	2,16	50,7	24,7	24,6	2,89			3,08	
Franco	4,7	0,16	2,88	39,4	17,2	43,4	2,87			3,00	
Franco Arenoso	4,8	0,05	0,98	63,4	14,8	21,8	2,48			2,41	
Franco Limoso	5	1,87	5,28	25,6	8,7	65,7	3,04			3,00	
Franco Arenoso	5,1	0,2	1,48	70,2	11	18,8	2,52			2,66	
Arcilloso	5,2	0,46	21,36	21,6	54,2	24,2	4,65			3,90	

4. Resultados y discusión

Textura	pH CaCl ₂	Propiedades del Suelo					Log Kd (L kg ⁻¹)				Ref.
		%OC	CEC (mmol.dm ⁻³)	Arena %	Arcilla %	Limo %	DAN	ENR	NOR	CIP	
Franco Arenoso	5,2	2,48	3,45	52	16,6	31,4		2,68		3,00	
Franco Arenoso	5,3	0,35	2,64	65,9	14,8	19,3		2,86		3,00	
Franco Arenoso	5,4	0,18	6,08	62,7	8,9	28,5		3,15		2,86	
Franco Arenoso	5,5	4,13	7,88	71,9	3,5	24,6		2,91		2,95	
Franco Limoso	5,6	3,08	10,42	16,9	12,4	70,7		3,23		3,23	
Franco	5,6	2,75	6,37	46,4	19	34,6		2,88		3,11	
Franco Arenoso	5,6	4,56	7,87	55	9,2	35,8		3,04		3,15	
Franco Arcilloso Arenoso	6	0,23	3,89	58,4	23,9	17,8		3,20		2,88	
Arcilloso	7,2	3,94	43,95	14,4	49,7	35,9		4,43		3,34	
Arcilloso Limoso	6,6	1,21	28,37	10,7	47,6	41,7		4,56		3,91	
Arcilloso	6,6	0,74	32,06	10,7	53,6	35,7		4,56		3,99	
Arcilloso	6,8	4,16	53,34	12,2	65,1	22,7		4,54		3,81	
Arcilloso	7,2	1,31	41,67	14,6	51,8	33,6		4,41		3,36	
Arcilloso Limoso	7,5	0,47	21,62	9	42,4	48,5		4,41		3,52	
Arenoso	6	0,59	4	93	2,5	4,5	2,43			2,61	
Franco Arenoso	6,1	2,27	9	86,2	6,6	7,2	2,99			3,11	341

Textura	Propiedades del Suelo						Log Kd (L kg ⁻¹)			Ref.	
	pH CaCl ₂	%OC	CEC (mmol.dm ⁻³)	Arena %	Arcilla %	Limo %	DAN	ENR	NOR		CIP
Franco Arenoso	6,6	1,24	9	78,2	9,5	12,4	2,66			2,72	
Arcilloso	4,9	1,63	13,6	27,2	41,7	28,8	3,48				
Franco	5,3	0,73	16,9	39,4	17,2	42,9	3,75				
Franco Arenoso	5,3	0,7	12	80,1	2,5	16,7	2,70			2,63	336
Franco Arenoso	6	1,23	7,4	84	7,2	8,4	3,09				
Franco	7,5	1,58	19,1	39,1	23,4	36,6	2,41				
Arcilloso	5,9	1,62	127,8	12,2	75	11,6	4,61	4,61		4,61	335

En la tabla anterior podemos comparar solamente los valores indicados para la DAN y la ENR. Aun así, la tarea de comparar los resultados obtenidos en este trabajo, (tabla 4.5) con los obtenidos por otros autores (tabla 4.6), se hace un poco difícil, en el sentido de que la bibliografía encontrada no incluye las concentraciones a la que se han sido determinados los coeficientes de partición; como ya hemos comentado con anterioridad, es necesario que los valores de K_d se acompañen de este parámetro, puesto que los coeficientes de partición no son constantes termodinámicas y por tanto, dependen de la concentración.

Por otro lado, en los casos en que sí han publicado la concentración de trabajo, no nos es posible realizar el cálculo para K_d a nuestros datos a esa concentración, debido a que son concentraciones más pequeñas que las utilizadas como concentraciones de trabajo en este estudio. Aun así, podemos observar en estas tablas que para suelos Franco Arenosos, la DAN presenta valores de $\log K_d$ entre 2,63 y 3,94, con magnitudes logarítmicas muy similares a las encontradas en otras publicaciones (2,93 a 3,45). Lo mismo ocurre con la ENR, donde los $\log K_d$ varían entre 2,74 y 3,62 para los datos referenciados y los nuestros están entre 2,34 y 3,56.

También, para suelos arenosos, en el caso de la ENR, otros autores obtuvieron un $\log K_d$ de 2,43, mientras que nosotros obtuvimos resultados entre 2,03 y 2,32, que se encuentran en el mismo orden de magnitud.

En cambio, al observar los resultados obtenidos por otros autores para suelos franco-arcillosos-limosos, los resultados obtenidos han sido de 4,71 para la DAN y 4,73 para la ENR, que en nuestro caso han sido de 3,35 y 2,99, para DAN y ENR, respectivamente; podemos ver que difieren en una unidad logarítmica para el caso de la DAN y casi en dos unidades logarítmicas para el caso de la ENR.

Esta misma tendencia se observa al comparar nuestros resultados de $\log K_d$ para suelos francos, los cuales se ubican en el intervalo de 2,58 a 2,92 para la DAN y entre 2,46 a 2,64 para la ENR, mientras que otros autores han obtenido valores de $\log K_d$ para la DAN entre 4,37 a 4,48 y de entre 2,41 a 4,57 para el la ENR, es decir, con diferencias de hasta 2 unidades logarítmicas.

Estas diferencias pueden deberse a que las concentraciones de trabajo no son las mismas, por lo que no sería correcto tratar de sacar conclusiones concretas al respecto. Lo que sí podría decirse, de manera general, es que los suelos arenosos presentan magnitudes de

sorción más pequeñas que todos los demás tipos de suelos, y siguiendo un orden creciente de sorción de acuerdo a: franco arenosos, franco limosos, franco arcillosos, franco-arcilloso-arenoso, franco-arcilloso-limosos y arcillosos.

Por otro lado, y con el propósito de establecer una primera relación entre la sorción y las propiedades de los suelos, se han tratado los datos de manera univariante mediante correlación lineal.

En las siguientes gráficas se representan los valores de $\log(K_d)$ calculados para $C_w = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabla 4.5) respecto a las diferentes propiedades fisicoquímicas del suelo (pH, CEC, así como el contenido de OC, arena, arcilla y limo).

La tabla 4.7 muestra las correlaciones entre los valores de K_d y las características fisicoquímicas de las fluoroquinolonas.

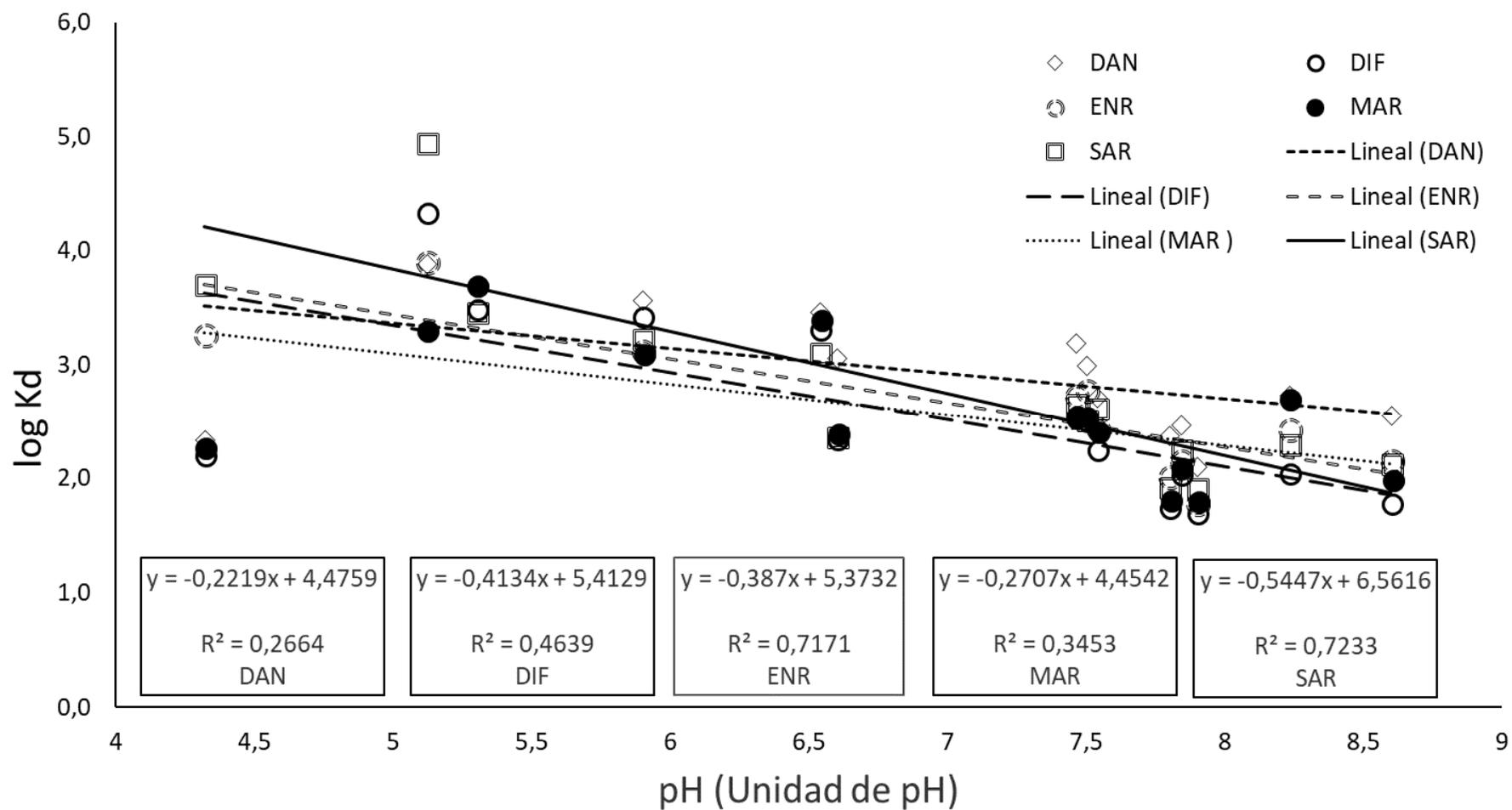


Figura 4.22. $\log(K_{d0,1})$ vs pH

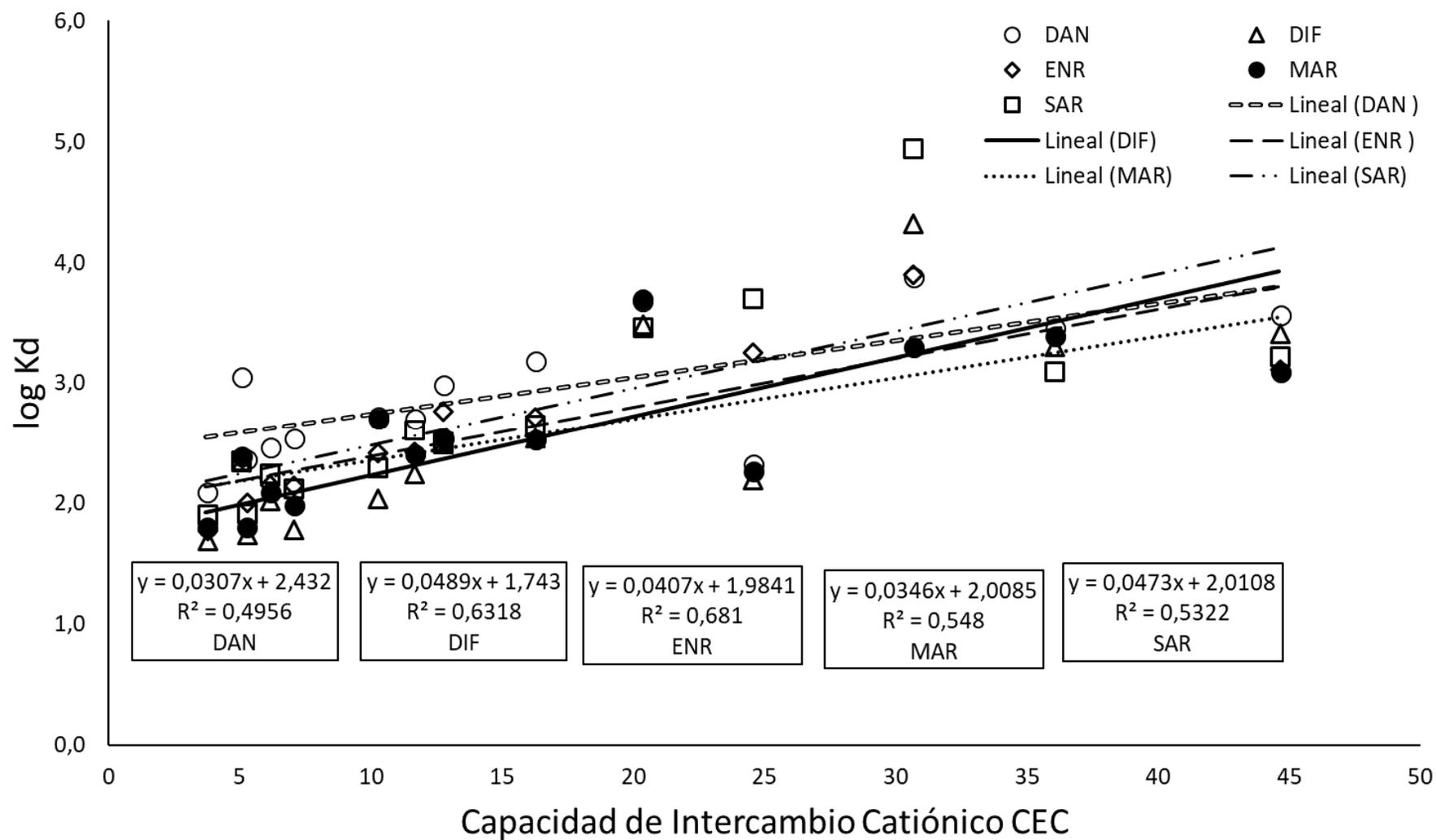


Figura 4.23. $\log(K_{d0,1})$ vs CEC

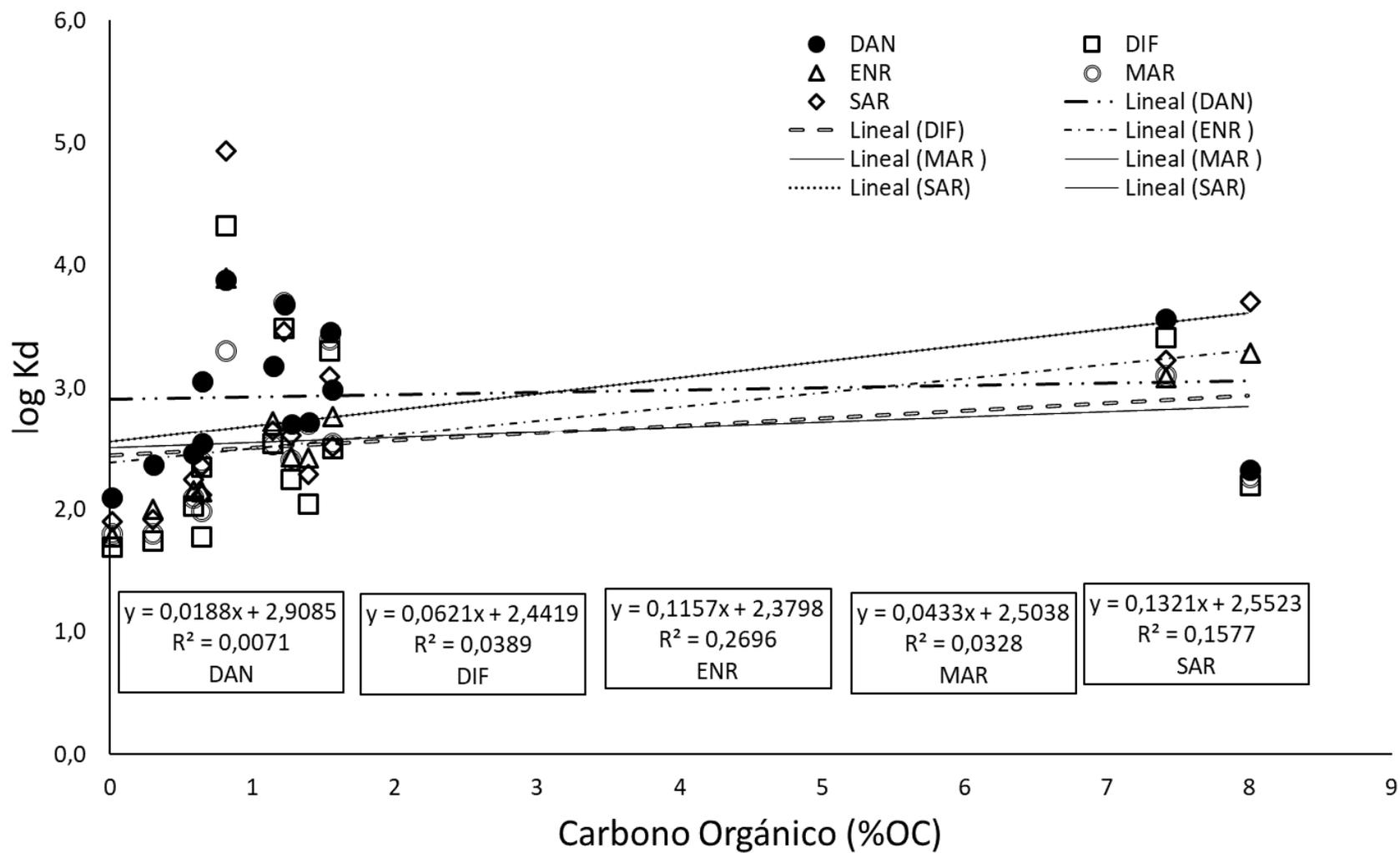


Figura 4.24. $\log(K_{d0,1})$ vs %OC

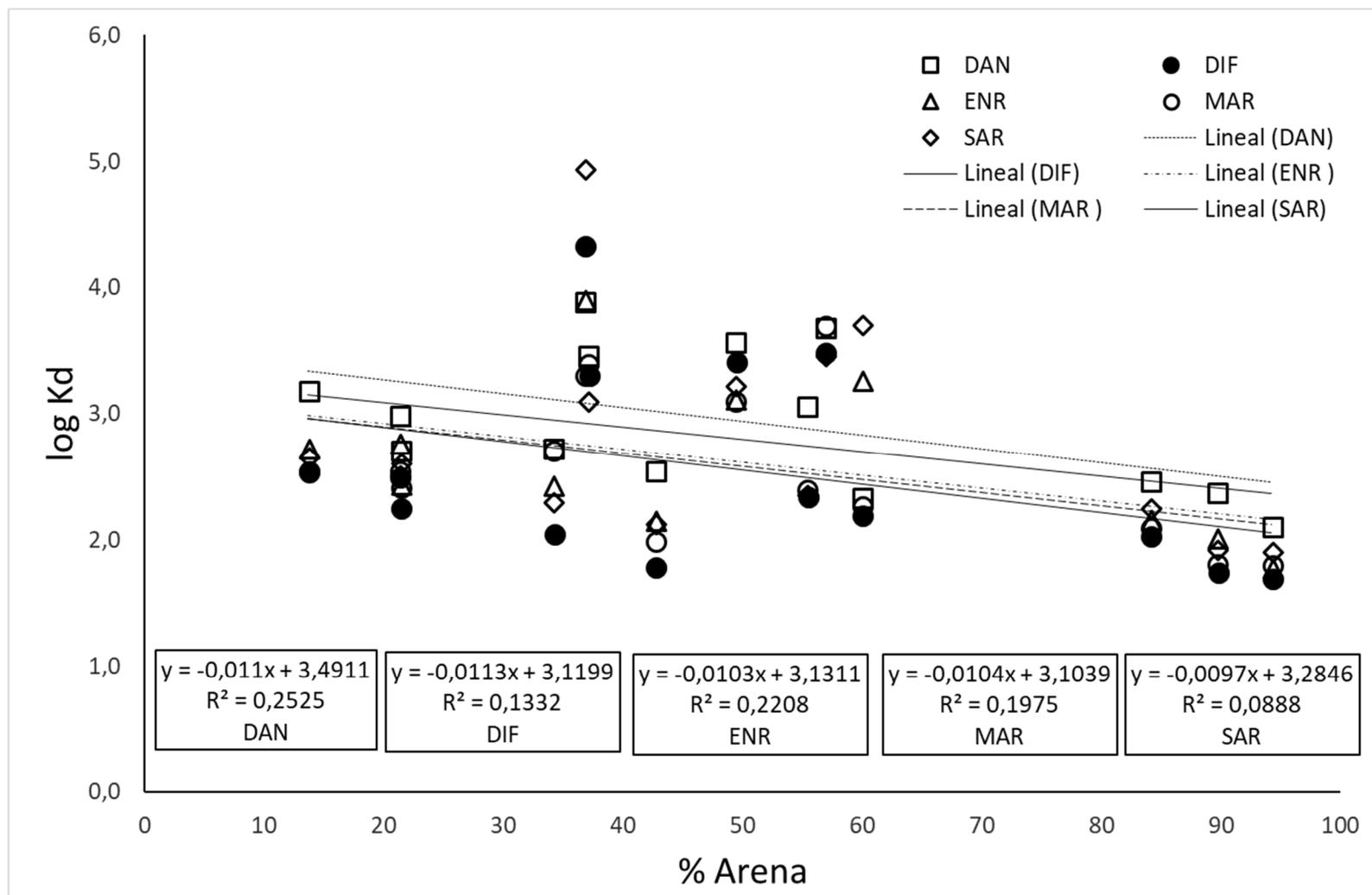


Figura 4.25. $\log(K_{d0,1})$ vs % Arena

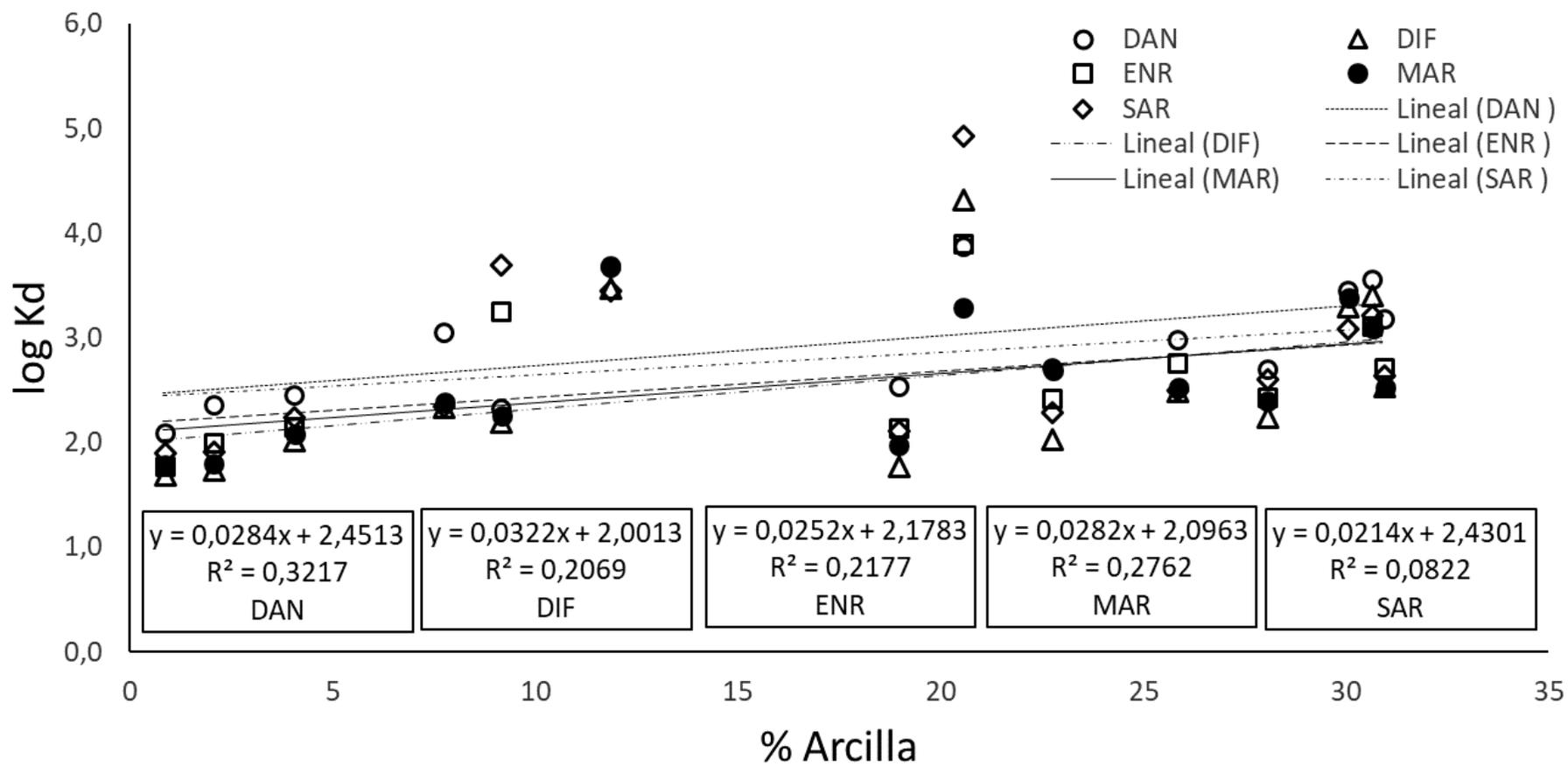


Figura 4.26. $\log(K_{d0,1})$ vs % Arcilla

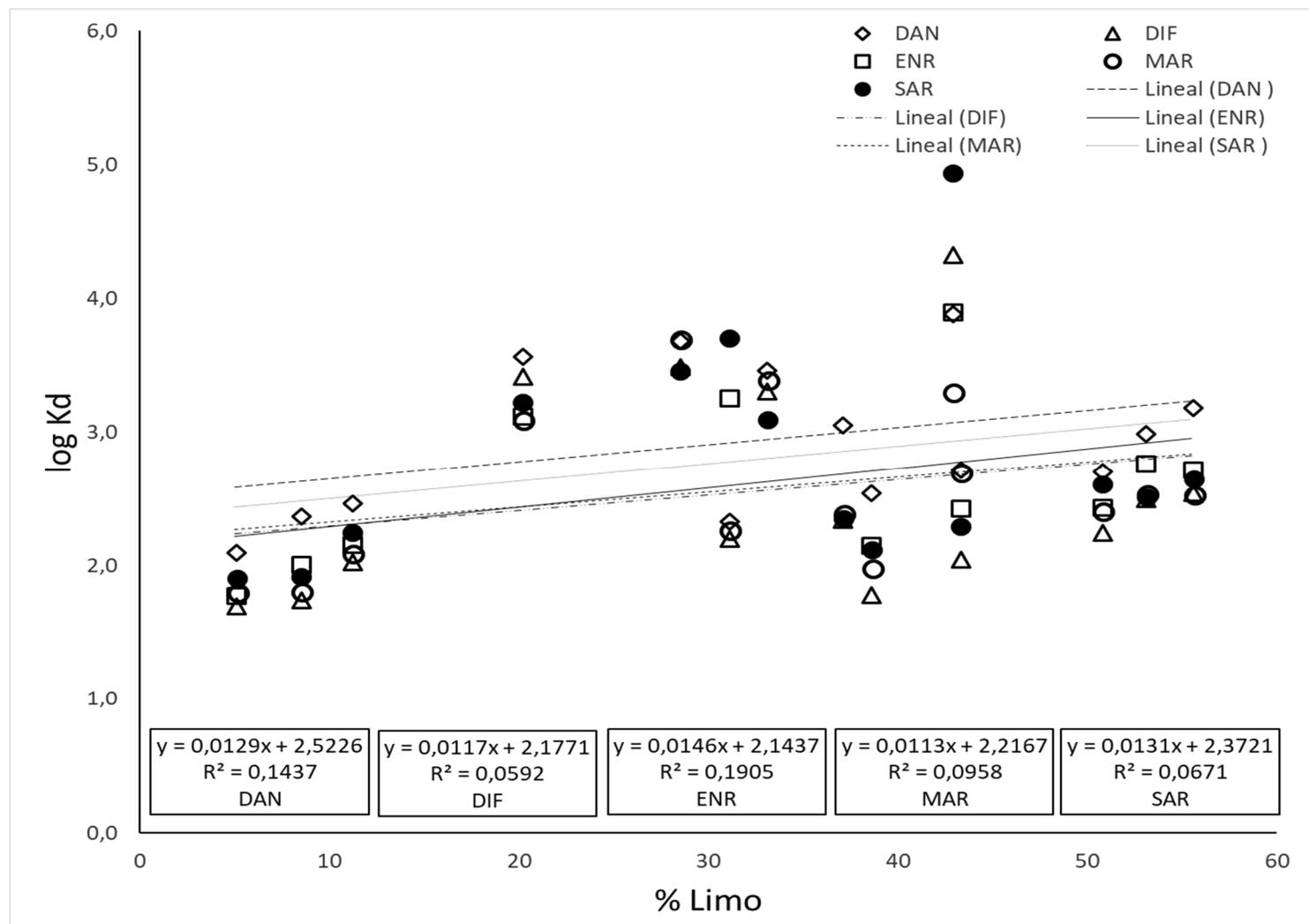
Figura 4.27. $\log(K_{d0,1})$ vs % Limo

Tabla 4.7. Coeficientes de correlación entre los valores de $\log(K_{d 0,1})$ de las fluoroquinolonas estudiadas y sus características fisicoquímicas.

	pH	CEC	% OC	% Arena	% Arcilla	% Limo
Fluoroquinolona	R ²					
DAN	0,2664	0,5121	0,3161	0,2525	0,3217	0,1437
DIF	0,4639	0,6318	0,1819	0,1332	0,2069	0,0592
ENR	0,7171	0,8322	0,2696	0,2208	0,2177	0,1905
MAR	0,3453	0,5480	0,4415	0,1975	0,2762	0,0958
SAR	0,7233	0,5322	0,1022	0,0888	0,0822	0,0671

De estos resultados solamente se aprecia una clara correlación entre $\log K_d$ y la CEC. El pH también presenta una correlación significativa, aunque aparentemente menor que el CEC. El resto de las propiedades no da lugar a una correlación significativa en general, dando lugar a una gran dispersión en las representaciones de las figuras. No obstante, se aprecia una cierta tendencia positiva entre $\log(K_d)$ y arcilla y limo, y negativa con el contenido en arena.

Así, una primera aproximación indica la mayor importancia de la CEC en cuanto la sorción de las fluoroquinolonas en los suelos, siendo también altamente significativa la influencia del pH del medio (a menor pH mayor sorción), y una influencia menor de otros parámetros como la textura del suelo o el contenido en carbono orgánico.

No obstante, se observa que el tratamiento de datos de sorción de forma univariante (es decir, comparando cada vez con una sola propiedad) es insuficiente para obtener una visión de conjunto de la influencia de las propiedades fisicoquímicas de los suelos y de las características de las sustancias en la sorción de éstas. Por tanto, es necesaria la aplicación de procedimientos matemáticos más elaborados para estudiar la influencia de los diferentes factores, y en su caso, llegar a poder predecir la sorción de las fluoroquinolonas en estudio a un suelo de características conocidas.

Para ello, a continuación, se estudia la aplicación de técnicas quimiométricas de tratamiento de datos a los resultados obtenidos en los experimentos de sorción.

4.2.3 Análisis multivariante de los datos de sorción

En este apartado se ha procedido al tratamiento multivariante de los datos obtenidos, con objeto de intentar establecer una aproximación más apropiada de la influencia de los diferentes factores en relación con la sorción de estas fluoroquinolonas en los diferentes suelos estudiados. En particular, se han aplicado el Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*) para estudiar la influencia de los distintos factores, y la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLSR, *Partial Least Squares Regression*).

El tratamiento de los datos se ha llevado a cabo empleando el software PLS_Toolbox 3.5 (Eigenvector Research, Mason, WA, USA), trabajando en el entorno MATLAB™ 6.5 (The Mathworks, Natick, MA, USA) bajo MS Windows XP.

4.2.3.1 Análisis de la sorción mediante componentes principales (PCA)

El análisis por componentes principales es un método multivariante de análisis de datos que permite encontrar relaciones entre las diferentes variables que describen un sistema, con la finalidad de simplificar y reducir el número de variables mediante la formación de combinaciones lineales. De estas combinaciones resultan nuevas variables ortogonales, no correlacionadas entre ellas, que se denominan componentes principales (PCs).

De esta manera, se crea una nueva matriz, que se descompone en “scores”, valores (coordenadas) de las muestras en este nuevo espacio de PCs, y “loadings”, que indican la importancia que tiene cada una de las variables en cada componente (342-343).

La matriz de los datos experimentales incluye las propiedades fisicoquímicas de los suelos, junto con los valores de K_d (para una $C_w = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) para las cinco fluoroquinolonas, en forma de logaritmo decimal, según los datos indicados en la Tabla

4.5, obtenidos a partir de los parámetros de las ecuaciones de Freundlich correspondientes al ajuste de cada isoterma experimental.

Así, se ha construido una matriz de datos de 14 filas (los 14 suelos) y 11 columnas, que corresponden a las características de cada suelo más los valores de $\log(K_{d0,1})$ de las cinco fluoroquinolonas:

- pH
- CEC
- Contenido de carbono
- Contenido de arcilla
- Contenido de limo
- Contenido de arena
- Kd's de DAN, DIF, ENR, MAR y SAR

Hay que recordar que, en realidad, esta matriz no contiene 154 elementos (14x11), ya que no se dispone de los datos de Kd correspondientes a los suelos S03, S05 y S06 de la ENR. No obstante, el software utilizado permite el tratamiento de un conjunto de datos matriciales a los que le falta algún elemento (*missing values*).

El pretratamiento de los datos ha consistido en un autoescalado, ya que las variables no presentaban las mismas unidades ni la misma magnitud. En un autoescalado, se calcula el valor promedio para cada propiedad (X_M) y su desviación estándar (s_X). A partir de estos valores, un valor determinado de esa propiedad (X_i) se transforma a un nuevo valor autoescalado ($X_{AE,i}$) como:

$$X_{AE,i} = \frac{X_i - X_M}{s_X} \quad (\text{Ec. 4.19})$$

De esta manera, se obtiene una variación homogénea a lo largo de los 14 suelos para cada una de las propiedades.

El algoritmo PCA calcula, a partir de una matriz de datos, el número de componentes principales linealmente independientes que se necesita para explicar la variancia dentro de la matriz. En realidad, el sistema realiza una descomposición de la matriz según sus valores propios y vectores propios, de forma que el primer componente encontrado es el que da lugar a la mayor variabilidad en el conjunto de datos; el segundo componente se determina a partir de la matriz obtenida mediante la diferencia entre la inicial y la recalculada a primer componente. Este procedimiento se realiza de forma sucesiva, hasta

que la diferencia entre la matriz inicial y la reconstruida a partir de los componentes principales llega a un valor lo suficientemente pequeño.

Los resultados obtenidos se dan en forma de tabla, en las que se indica la varianza capturada por cada componente y la acumulada, o en forma de gráfico. En nuestro caso, estos resultados se indican en la Tabla 4.7. Se puede observar que 5 PC (componentes principales) capturan la mayor parte de la varianza total (99,01 %). Por otra parte, el 97,71% de la varianza se puede explicar con cuatro componentes principales.

La Figura 4.28 muestra la representación de varianza capturada acumulada para el modelo respecto al número de componentes principales.

La representación de los “scores” y “loadings” del modelo de 5 PCs necesitaría de un espacio de cinco dimensiones. No obstante, para poder obtener una representación en dos dimensiones, en la gráfica se indican los “scores” del PC2 respecto a los del PC1 para los diferentes suelos, ya que los dos primeros PCs representan más del 80 % de la varianza acumulada.

A continuación, la representación de los “scores” obtenidos en el tratamiento de los datos por PCA (Figura 4.29) nos indican las semejanzas (de características y comportamiento) entre los diferentes suelos, lo que permite agruparlos según sus características.

Tabla 4.8. Varianza capturada en el Análisis de Componentes Principales.

PC No.	Varianza Capturada	Varianza Total
1	61,12	61,12
2	21,41	82,52
3	10,39	92,91
4	4,79	97,71
5	1,3	99,01
6	0,57	99,57
7	0,26	99,83
8	0,12	99,95
9	0,04	99,99
10	0,01	100

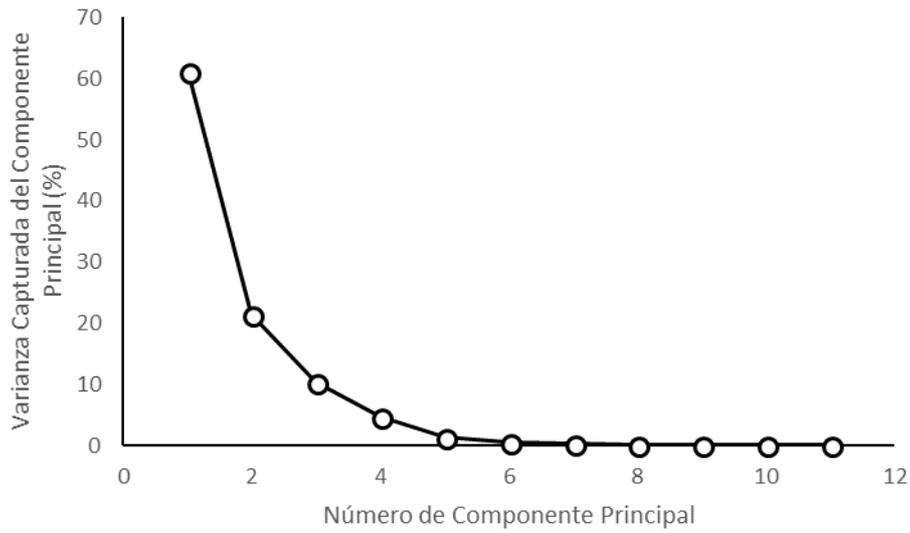


Figura 4.28. Varianza capturada por PCA en función del número de componentes principales

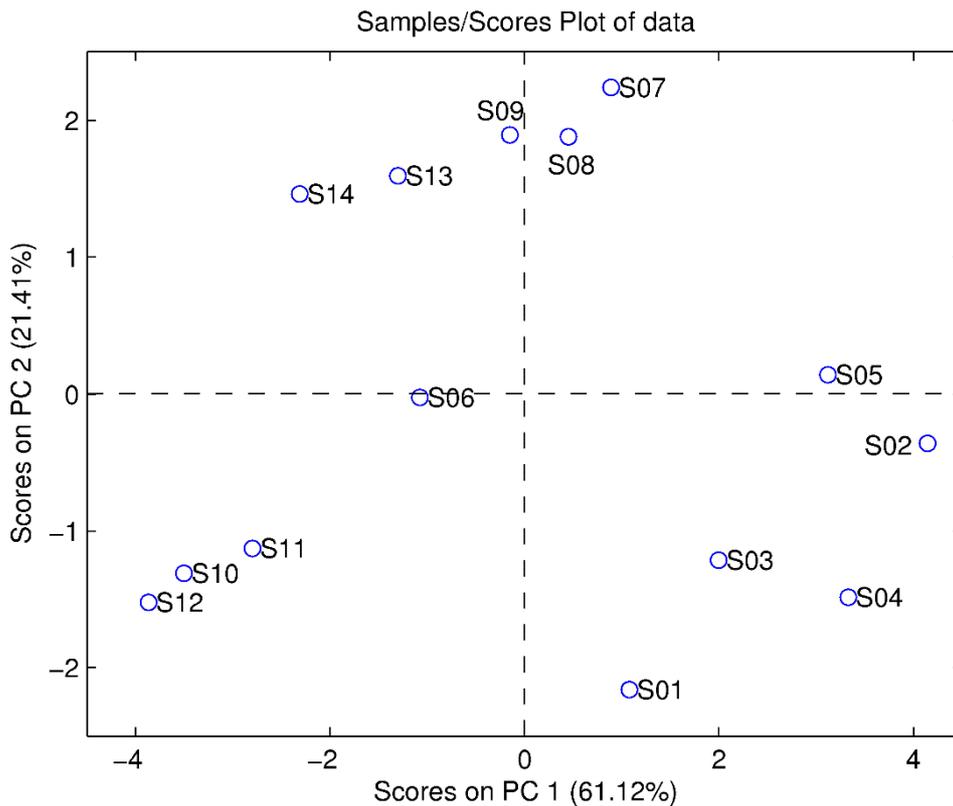


Figura 4.29. Agrupación de los suelos según sus características de acuerdo con sus “scores” sobre PC1 y PC2

Esta representación (Figura 4.29) nos muestra que podemos agrupar los suelos estudiados en los siguientes cuadrantes o grupos:

Cuadrante I (inferior derecha): En éste tenemos agrupados los suelos S01, S02, S03 y S04. Son suelos ácidos, con $\text{pH} < 6$.

Cuadrante II (superior derecha): Aquí se incluyen los suelos S05, S07, S08. Se asemejan en el contenido de arcilla (25 - 30%), carbono orgánico (S05: 1,53%, S07: 1,13% y S08: 1,55%) y en el pH (6,54 - 7,50), aunque presentan diferencias importantes a nivel de CEC.

Cuadrante III (superior izquierda): Este cuadrante contiene los suelos S09, S13, S14. Comparten un contenido moderado de carbono orgánico (0,63 – 1,38%) y CEC (5,0 - 11,6 meq 100g^{-1}). El contenido de arcilla es del mismo orden entre ellos (entre 19 – 28%), correspondiente a suelos Franco (S13, S14) y franco-arcilloso (S09). El pH varía entre 7,7 y 8,6.

Cuadrante IV (inferior izquierda): En esta zona están perfectamente definidos los suelos S10, S11 y S12. El suelo S06, aunque también está en este cuadrante, tiene características fisicoquímicas que le hace estar separado de los otros tres, y muy cercano al Cuadrante III. Los suelos S10 a S12 comparten un alto contenido de arena (84 – 94%) y bajo en arcilla (0,8 – 4%), pH básico (7,8 – 7,9), así como valores bajos de CEC y carbono orgánico, entre 3,7 – 5,2 meq 100g^{-1} y 0,0 – 0,57%, respectivamente.

El suelo S06, como se ha comentado, tiene características similares a los del tercer cuadrante, pero su alto contenido en arena (55,3%) y bajo en arcilla (7,7%) hace que se integre en el cuadrante IV, a pesar de su pH ligeramente ácido ($\text{pH}=6,6$).

Por otra parte, para relacionar las propiedades de los suelos con los coeficientes de distribución calculados para $C_w = 0,1 \text{ mgL}^{-1}$, se representan los “loadings” del PC2 respecto a los correspondientes del PC1.

Esta gráfica nos indica la dependencia (positiva o negativa) entre las diferentes variables: por ejemplo, si están en el mismo cuadrante indicará una correlación positiva, mientras que si están en cuadrantes enfrentados es debido a una correlación negativa. Por otra parte, cuanto más cerca estén entre si las diferentes variables, indicará una mayor dependencia o correlación.

La figura 4.30 nos indica la correlación que existe entre los diferentes parámetros o propiedades del suelo y los K_d . Así, la cercanía de la CEC con los K_d de las fluoroquinolonas, nos indica una fuerte correlación entre ellos, que en particular será

mayor para MAR y menor en DAN. Análogamente, el contenido de arcilla tendrá más influencia en DAN que en el resto. Del contenido en carbono orgánico podemos decir que éste tendrá una mayor incidencia en el Kd de SAR, MAR y DIF, pero menor en la DAN.

Es de destacar también la fuerte correlación negativa entre el pH y las Kd para todas las fluoroquinolonas, ya que al aumentar el pH disminuye la fracción de especie catiónica de estos fármacos.

También se observa una correlación negativa con el contenido de arena del suelo, ya que corresponde a un mayor diámetro de partícula de suelo, y por tanto a una menor área específica.

Por tanto, de la observación de los “loadings” obtenidos mediante el modelo de PCA para cinco componentes ya podemos tener una buena aproximación al comportamiento de sorción de estas fluoroquinolonas: la sorción aumentará con el CEC, el contenido de arcilla y limo, así como el de carbono orgánico. Un aumento en la fracción arenosa del suelo implica una disminución de la sorción, al igual que un aumento del pH.

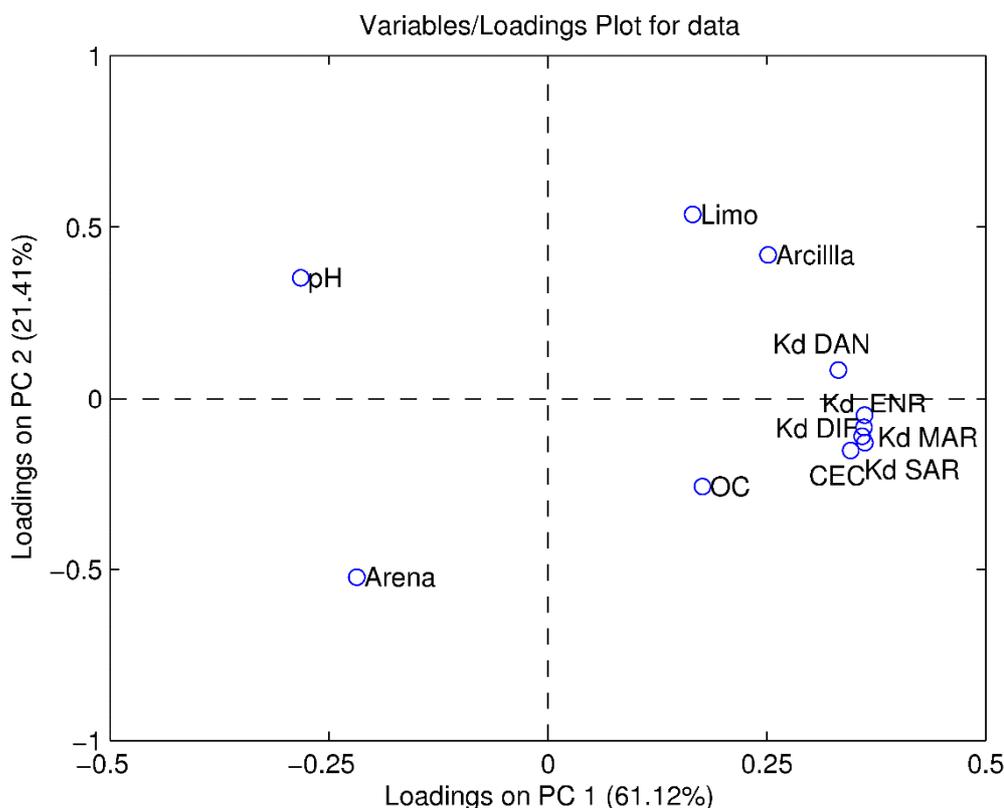


Figura 4.30. Relaciones entre los Kd de las fluoroquinolonas estudiadas y sus propiedades fisicoquímicas

Adicionalmente, el algoritmo PCA también permite obtener las correlaciones entre las diferentes variables estudiadas. La Tabla 4.9 recoge los valores de dichas correlaciones, que se comentan a continuación.

Las correlaciones entre propiedades y $\log(K_{d 0,1})$ listadas en la Tabla 4.9 complementan de forma numérica las observaciones comentadas respecto a la Figura 4.30. En primer lugar, cabe destacar la alta correlación entre los valores de K_d para las cinco fluoroquinolonas, como era de esperar. De todas maneras, y como se observa en la Figura 4.30, donde la K_d de DAN está ligeramente separada de las demás, esta fluoroquinolona presenta una menor correlación con las K_d del resto (entre 0,79 – 0,87), mientras que las otras presentan correlaciones apreciablemente más altas entre ellas (coeficiente de correlación entre 0,89 – 0,98). Esto nos indica también un comportamiento diferente al resto.

Además, si comparamos las correlaciones que existen entre las K_d de las fluoroquinolonas y las propiedades de los suelos, podemos identificar algunas tendencias:

- En primer lugar, la correlación negativa entre el pH y las K_d en todos los casos. Ello nos indica que probablemente la especie catiónica (H_2Q^+) será de gran importancia para la sorción de las fluoroquinolonas, ya que al disminuir el pH aumenta su proporción. Este hecho también está de acuerdo con los resultados de los estudios de distribución entre octanol/ agua, que indicaban la posible extracción de la especie catiónica a la fase orgánica (presumiblemente como par iónico).

Además, la correlación del pH con la K_{dDAN} es menor (en valor absoluto) que para el resto de las fluoroquinolonas. Ello puede ser debido a que el pK_{a1} de la DAN (6,50) es significativamente mayor que en las otras (5,6-6).

Tabla 4.9. Correlaciones entre la propiedades de suelos y $\log(K_{d0,1})$ de las fluoroquinolonas, calculadas por PCA

	pH	CEC	OC	Arcilla	Limo	Arena	K_{dDAN}	K_{dDIF}	K_{dENR}	K_{dMAR}	K_{dSAR}
pH	1.000	-0.775	-0.732	-0.074	-0.041	0.055	-0.438	-0.707	-0.852	-0.712	-0.839
CEC	-0.775	1.000	0.744	0.503	0.141	-0.293	0.643	0.897	0.891	0.887	0.848
OC	-0.732	0.744	1.000	0.208	-0.037	-0.058	0.072	0.441	0.616	0.422	0.463
Arcilla	-0.074	0.503	0.208	1.000	0.803	-0.922	0.630	0.548	0.515	0.566	0.434
Limo	-0.041	0.141	-0.037	0.803	1.000	-0.971	0.547	0.284	0.410	0.330	0.330
Arena	0.055	-0.293	-0.058	-0.922	-0.971	1.000	-0.609	-0.404	-0.472	-0.441	-0.387
K_{dDAN}	-0.438	0.643	0.072	0.630	0.547	-0.609	1.000	0.857	0.793	0.869	0.805
K_{dDIF}	-0.707	0.897	0.441	0.548	0.284	-0.404	0.857	1.000	0.894	0.985	0.921
K_{dENR}	-0.852	0.891	0.616	0.515	0.410	-0.472	0.793	0.894	1.000	0.910	0.941
K_{dMAR}	-0.712	0.887	0.422	0.566	0.330	-0.441	0.869	0.985	0.910	1.000	0.939
K_{dSAR}	-0.839	0.848	0.463	0.434	0.330	-0.387	0.805	0.921	0.941	0.939	1.000

- El comportamiento de la DAN también difiere del resto de quinolonas en cuanto a su relación entre K_d y OC: el coeficiente de correlación entre estos parámetros es de 0,072 para la DAN, mientras que, para DIF, ENR, MAR y SAR es de 0,441, 0,616, 0,422 y 0,463, respectivamente. En DIF y ENR, esto es esperable, ya que sus valores de $\log(K_{ow})$ –medida de la lipofilidad– son, respectivamente, de 0,68 y 0,39. Estos valores indican una mayor tendencia a interaccionar con la fracción orgánica del suelo que el resto de fluoroquinolonas. No obstante, para MAR y SAR el valor de K_{ow} es incluso menor que en la DAN. El aspecto que más podría influir en cuanto a la correlación con OC, además del K_{ow} , puede ser el intervalo de pH en el que predomina la especie neutra/zwitteriónica, determinado a partir de la diferencia entre pK_{a1} y pK_{a2} ; si tenemos en cuenta este intervalo, podemos ver que para MAR y SAR es, respectivamente, de 3,02 y 3,17 unidades de pH, mientras que para DAN, DIF y ENR oscila entre 2,2 y 2,4 unidades.
- En cuanto a la relación con la CEC, nuevamente DAN presenta un comportamiento ligeramente distinto de las otras fluoroquinolonas, siendo el coeficiente de correlación entre $\log(K_d)$ y CEC de 0,643 para DAN, y entre 0,848 – 0,897. La explicación de este comportamiento puede ser la misma que en relación con su comportamiento respecto al pH, que influye en la posibilidad de formación de la especie catiónica.
- Con respecto a la relación con la textura del suelo, el comportamiento en general es el esperado, con correlación positiva para el contenido de arcilla y limo, y negativa con el contenido de arena. Nuevamente la DAN tiene un comportamiento ligeramente distinto del resto, con mayor correlación positiva al contenido de arcilla y limo, y más negativa con el de arena.

En resumen, del análisis por PCA de los datos obtenidos nos es posible señalar que las propiedades de los suelos que más influyen en el proceso de sorción son: CEC, OC y pH. La textura del suelo influye en menor medida, aunque podemos decir que el contenido en arcilla (partículas de grano fino) mejoran la sorción, mientras que un aumento en el contenido de arena (fracción de suelo de grano grueso) dificulta la sorción.

En el siguiente apartado se comprueba la posibilidad de predicción de los valores de K_d de las fluoroquinolonas a partir de las características fisicoquímicas de los suelos.

4.2.3.2 Predicción de la sorción mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR)

Con el objeto de poder realizar una predicción de los valores de K_d de las fluoroquinolonas en función de las características del suelo, se han construido modelos de predicción de la sorción de cada fluoroquinolona basado en Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales, a partir de los descriptores de los suelos pH, CEC, OC, arcilla, limo y arena.

Análogamente al PCA, el algoritmo PLS consiste en establecer un nuevo sistema de componentes principales (o variables latentes, LV) que describa un conjunto de datos experimentales. A diferencia del análisis PCA, PLS realiza simultáneamente la descomposición del conjunto de datos separados en dos bloques: uno que podemos definir como de variables conocidas (bloque “X”), y otro de las propiedades sobre las cuales se pretende realizar la predicción (bloque “Y”). En nuestro caso, el bloque de variables conocidas será el de características o descriptores de suelo, mientras que el bloque de predicción consiste en los valores de K_d correspondientes.

En este caso se construirá un modelo diferente para cada fluoroquinolona, que nos proporcionará una estimación de su $\log(K_d)$ a partir de los descriptores de suelo. Como en toda regresión, utilizaremos un conjunto de datos como patrones para calibrar el sistema (propiedades de suelo y K_d conocidas), y definiremos un conjunto de muestras sobre las que validar el modelo.

Así, se han escogido como patrones de calibrado los datos correspondientes a los suelos S01, S02, S04, S05, S06, S09, S11, S12 y S13 (9 suelos para calibrado), que contienen una variación suficiente en sus propiedades. Como muestras para validar los modelos se utilizan los suelos S03, S07, S08, S10 y S14 (5 muestras de validación). Esta selección se ha seguido para todas las fluoroquinolonas en estudio, excepto para la ENR, para la que no se dispone de las K_d para los suelos S03, S05 y S06. Así, para la ENR tendremos 7 suelos para el calibrado, y 4 para la validación.

El pretratamiento de datos, como en el análisis por PCA, ha consistido en un centrado y escalado del conjunto de datos.

Para el establecimiento de los modelos de predicción se ha aplicado el algoritmo PLS a los conjuntos de datos correspondientes a cada fluoroquinolona, utilizando una validación interna mediante el método de “leave one out” (344). Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 4.10 a 4.14, que contienen el número de variables latentes, junto con la varianza capturada y acumulada en función del número de LV tanto para el bloque X (propiedades) como el de predicción (Kd). En las tablas siguientes podemos apreciar que en general se necesitan entre 4 y 5 LVs para describir el sistema. El número de LVs necesario para construir el modelo de calibrado se ha escogido teniendo en cuenta la varianza global acumulada en el bloque Y, además de la varianza capturada en particular por el último LV. Así, para DAN y SAR se utilizan 4 LVs, mientras que, para DIF, ENR y MAR se han necesitado 5; el valor apropiado de LVs se indica en negrita en las tablas correspondientes.

Hay que insistir en el hecho de que la varianza capturada en el bloque X por este número de LVs asciende al 99,8-100 % del total, mientras que en el bloque Y es, en algunos casos, significativamente menor, siendo del 91,8, 94,4, 99,7, 96,7 y del 95,7 %, respectivamente, para DAN, DIF, ENR, MAR y SAR.

Los resultados de la validación de los modelos PLS para las fluoroquinolonas estudiadas se muestran en las tablas 4.14 a 4.18, así como en las figuras 4.31 a 4.35. En las tablas se indican los valores experimentales, los calculados, y el error de predicción, tanto para los patrones como para el conjunto de muestras de validación. También se incluye el error medio en cada caso y la desviación estándar de los errores de predicción. En el caso de los patrones para construir el modelo, el error medio es prácticamente nulo, mientras que para el conjunto de muestras de validación oscila entre -0,12 y 0,09; los valores de desviación estándar varían entre 0,1 y 0,23, tanto para los patrones como para las muestras.

Tabla 4.10. Porcentaje de varianza capturada para el modelo de regresión de la Danofloxacina

Componente	X-Block (Propiedades)		Y-Block ($\log(K_{a0,1})$)	
	Individual	Total	Individual	Total
1	48,95	48,95	54	54
2	21,97	70,92	24,98	78,97
3	15,67	86,58	12,78	91,75
4	13,21	99,79	0,08	91,83
5	0	99,79	0	91,83

Tabla 4.11. Porcentaje de varianza capturada para el modelo de regresión de la Difloxacina

Componente	X-Block (Propiedades)		Y-Block ($\log(K_{a0,1})$)	
	Individual	Total	Individual	Total
1	51,84	51,84	69,54	69,54
2	9,31	61,14	22,59	92,12
3	23,37	84,51	1,67	93,8
4	15,39	99,9	0,26	94,05
5	0,1	100	0,36	94,42

Tabla 4.12. Porcentaje de varianza capturada para el modelo de regresión de la Enrofloxacin

Componente	X-Block (Propiedades)		Y-Block ($\log(K_{d 0,1})$)	
	Individual	Total	Individual	Total
1	54,79	54,79	87,51	87,51
2	8,84	63,62	9,84	97,35
3	19,76	83,38	0,8	98,14
4	16,5	99,88	0,35	98,49
5	0,12	100	1,25	99,74

Tabla 4.13. Porcentaje de varianza capturada para el modelo de regresión de la Marbofloxacin.

Componente	X-Block (Propiedades)		Y-Block ($\log(K_{d 0,1})$)	
	Individual	Total	Individual	Total
1	51,49	51,49	70,32	70,32
2	14,94	66,43	20,37	90,69
3	20,22	86,65	5,35	96,04
4	13,26	99,9	0,26	96,3
5	0,1	100	0,61	96,91

Tabla 4.14. Porcentaje de varianza capturada para el modelo de regresión de la Sarafloxacina

Componente	X-Block (Propiedades)		Y-Block (log(K _{d 0,1}))	
	Individual	Total	Individual	Total
1	51,86	51,86	75,48	75,48
2	11,55	63,41	17,38	92,86
3	22,31	85,72	2,48	95,34
4	14,19	99,91	0,37	95,71
5	0,09	100	0,06	95,77

En las figuras se representan los valores de predicción de log(K_d) calculados por el modelo PLSR respecto a los valores reales. Los símbolos abiertos indican los datos correspondientes a los patrones, mientras que las muestras se indican por los símbolos en negro. Las línea diagonal indica cuando $\log(K_{d,exp}) = \log(K_{d,calc})$, y las líneas de puntos indican una diferencia de $\pm 0,2$ unidades entre en valor experimental y el calculado. De las figuras se observa que, en general, el error obtenido es inferior a estos límites.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos considerar que se ha logrado un buen ajuste en la predicción de los valores de log(K_{d 0,1}) para las diferentes fluoroquinolonas objeto de este estudio. Hay que recordar que, una vez establecido el modelo de PLSR para cada una de ellas, solamente es necesario conocer las propiedades básicas de los suelos para obtener una estimación de la magnitud de la sorción de estas fluoroquinolonas.

Tabla 4.15. Predicción de los valores de $\log(K_{d0,1})$ para la Danofloxacina a partir del modelo de regresión PLS

Suelo	$\log(K_{d,exp})$	$\log(K_{d,calc})$	error	error medio (des. est.)
Patrones:				
S01	2,659	2,765	-0,106	
S02	4,119	4,132	-0,014	
S04	3,330	3,221	0,109	
S05	3,853	3,879	-0,026	
S06	3,164	2,959	0,205	0,000
S09	2,813	3,028	-0,215	(0,166)
S11	2,789	2,605	0,184	
S12	2,327	2,575	-0,248	
S13	2,855	2,743	0,112	
Muestras:				
S03	3,823	3,606	0,217	
S07	3,347	3,241	0,106	
S08	3,332	3,009	0,323	0,092
S10	2,497	2,612	-0,115	(0,186)
S14	2,579	2,650	-0,071	

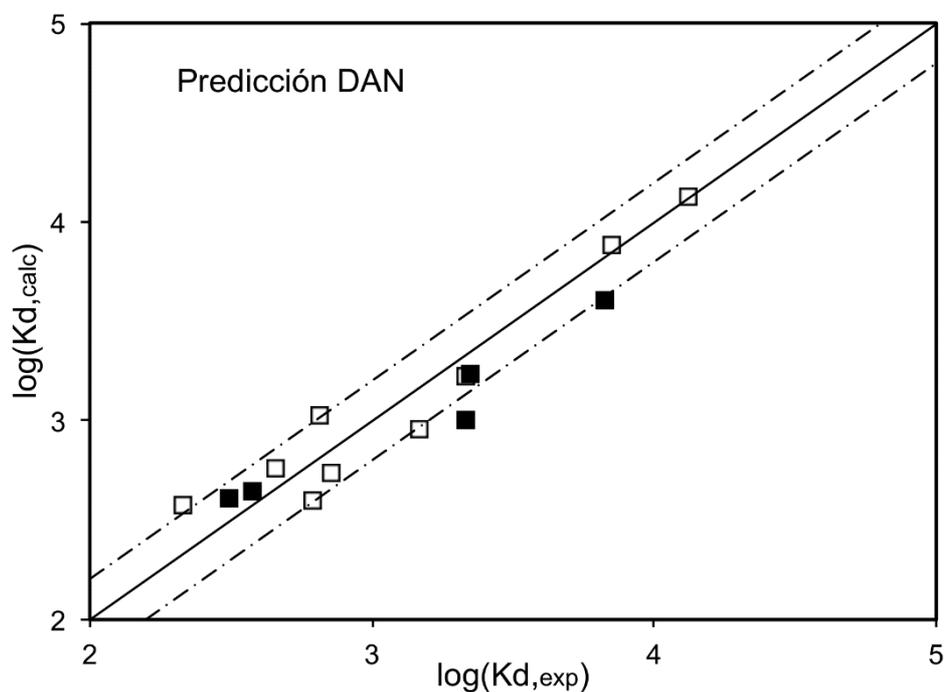


Figura 4.31. Comparación entre los valores experimentales de $\log(K_{d0,1})$ y de predicción según el modelo PLS para la Danofloxacina (símbolos abiertos indican patrones, y los símbolos en negro las muestras de validación)

Tabla 4.16. Predicción de los valores de $\log(K_{d0,1})$ para la Difloxacina a partir del modelo de regresión PLS

Suelo	$\log(K_{d,exp})$	$\log(K_{d,calc})$	error	error medio (desv. est.)	
Patrones:					
S01	2,626	2,783	-0,157	0,000 (0,140)	
S02	3,695	3,635	0,060		
S04	3,574	3,380	0,193		
S05	3,350	3,539	-0,189		
S06	2,673	2,457	0,216		
S09	2,539	2,594	-0,055		
S11	2,278	2,265	0,013		
S12	2,197	2,271	-0,074		
S13	2,207	2,215	-0,008		
Muestras:					
S03	3,586	3,335	0,251		0,069 (0,233)
S07	2,837	2,711	0,126		
S08	2,765	2,463	0,302		
S10	2,025	2,277	-0,252		
S14	1,985	2,067	-0,082		

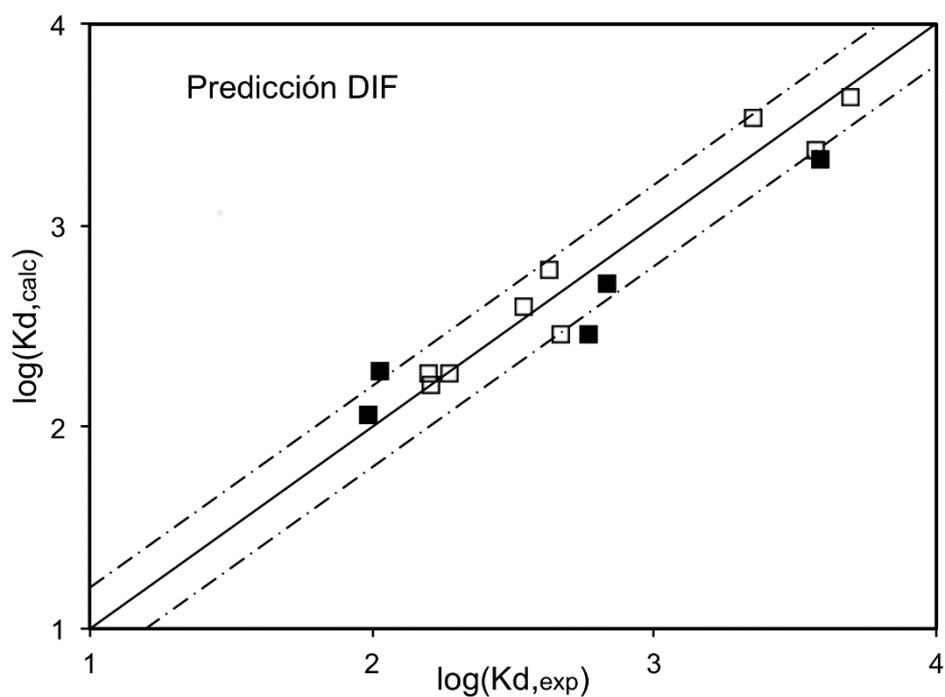
Figura 4.32. Comparación entre los valores experimentales de $\log(K_{d0,1})$ y de predicción según el modelo PLS para la Difloxacina (símbolos como en la figura 4.31)

Tabla 4.17. Predicción de los valores de $\log(K_{d,0,1})$ para la Enrofloxacina a partir del modelo de regresión PLS

Suelo	$\log(K_{d,exp})$	$\log(K_{d,calc})$	error	error medio (desv. est.)
Patrones:				
S01	3,559	3,562	-0,003	
S02	4,015	4,017	-0,002	
S04	3,655	3,655	0,000	
S09	2,710	2,699	0,011	0,000
S11	2,342	2,272	0,070	(0,038)
S12	2,030	2,086	-0,056	
S13	2,638	2,659	-0,021	
Muestras:				
S07	2,992	3,027	-0,035	
S08	3,102	2,947	0,155	0,040
S10	2,318	2,227	0,091	(0,100)
S14	2,461	2,512	-0,051	

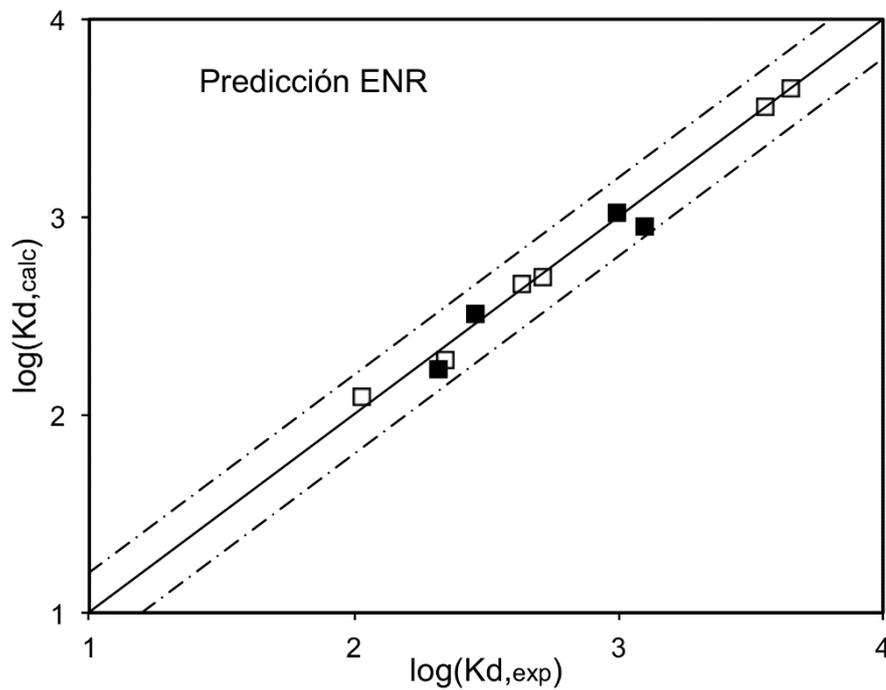


Figura 4.33. Comparación entre los valores experimentales de $\log(K_{d,0,1})$ y de predicción según el modelo PLS para la Enrofloxacina (símbolos como en la figura 4.31)

Tabla 4.18. Predicción de los valores de $\log(K_{d0,1})$ para la Marbofloxacina a partir del modelo de regresión PLS

Suelo	$\log(K_{d,exp})$	$\log(K_{d,calc})$	error	error medio (desv. est.)
Patrones:				
S01	2,692	2,765	-0,073	
S02	3,883	3,978	-0,095	
S04	3,610	3,536	0,074	
S05	3,896	3,855	0,041	
S06	2,756	2,521	0,235	0,000
S09	2,757	2,802	-0,045	(0,127)
S11	2,314	2,199	0,115	
S12	2,027	2,202	-0,175	
S13	2,180	2,257	-0,077	
Muestras:				
S03	3,738	3,588	0,150	
S07	2,832	2,945	-0,113	
S08	2,759	2,601	0,158	0,035
S10	2,124	2,208	-0,084	(0,127)
S14	2,117	2,056	0,061	

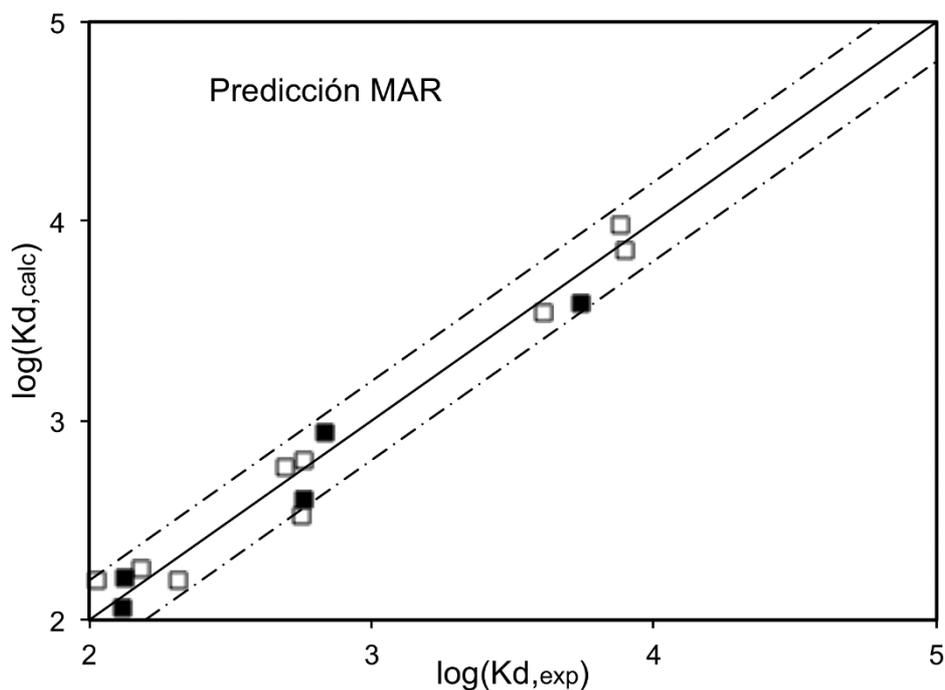


Figura 4.34. Comparación entre los valores experimentales de $\log(K_{d0,1})$ y de predicción según el modelo PLS para la Marbofloxacina (símbolos como en la figura 4.31)

Tabla 4.19. Predicción de los valores de $\log(K_{d,0,1})$ para la Sarafloxacina a partir del modelo de regresión PLS

Suelo	$\log(K_{d,exp})$	$\log(K_{d,calc})$	error	error medio (desv. est.)
Patrones:				
S01	3,465	3,507	-0,042	
S02	4,558	4,330	0,227	
S04	3,669	3,602	0,067	
S05	3,605	3,870	-0,265	
S06	2,807	2,993	-0,187	0,000
S09	2,997	2,971	0,026	(0,148)
S11	2,447	2,385	0,062	
S12	2,324	2,301	0,023	
S13	2,676	2,588	0,088	
Muestras:				
S03	3,813	3,789	0,025	
S07	3,035	3,190	-0,155	
S08	2,781	2,987	-0,206	-0,121
S10	2,249	2,376	-0,127	(0,087)
S14	2,254	2,396	-0,142	

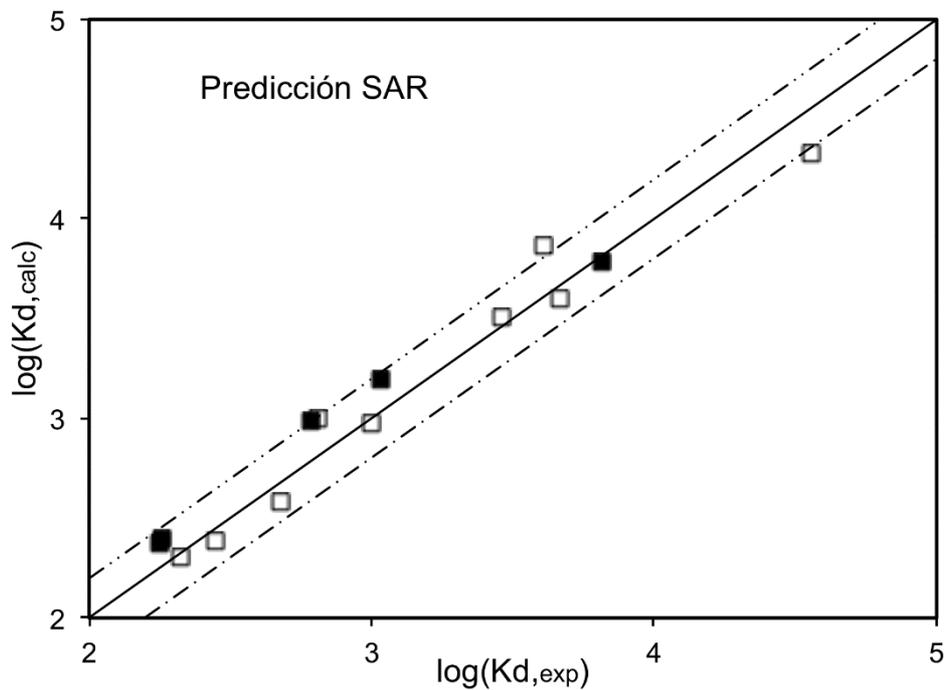


Figura 4.35. Comparación entre los valores experimentales de $\log(K_{d,0,1})$ y de predicción según el modelo PLS para la Sarafloxacina (símbolos como en la figura 4.31)

4.3 Estudios de sorción en biochar y mezclas suelo/biochar

La retención y sorción de fármacos por parte del suelo es un primer mecanismo para evitar su dispersión en el medio ambiente. Por ejemplo, en el caso de granjas, la excreción de antibióticos a través de la orina y heces de animales medicados es una vía de entrada de fármacos en el medio. Como se ha visto en la introducción, una vez ahí se pueden dispersar a través de los diferentes compartimientos ambientales y llegar hasta aguas de consumo, pudiendo afectar a la microfauna, e incluso dar lugar a la aparición de especies resistentes a determinados fármacos.

No obstante, la dispersión en el medio ambiente se puede reducir en el caso de que los fármacos queden retenidos al suelo. Para ello se debe cumplir que su K_d sea lo suficientemente elevada, dando lugar a una baja concentración de fármaco en la fase acuosa en equilibrio. Por ejemplo, en el caso de las fluoroquinolonas, los suelos con pH ácido, de naturaleza arcillosa y con una capacidad de intercambio iónico moderada-alta dan lugar a valores de $K_{d\ 0,1}$ del orden de 1000-10000, que se pueden considerar lo suficientemente elevados como para reducir el riesgo de dispersión. En el otro extremo, suelos de carácter básico, de textura arenosa y con baja capacidad de intercambio catiónico, dan lugar a valores de $K_{d\ 0,1}$ que pueden ser de dos órdenes de magnitud inferiores que los más arriba comentados, con $K_{d\ 0,1}$ entre 50 – 200. Este tipo de suelos presenta una baja capacidad de sorción y por tanto no serán capaces de retener estos fármacos, con el consiguiente riesgo de dispersión hacia otros compartimientos medioambientales.

Por ello, en este apartado se ha investigado la posibilidad de utilizar el Biochar como enmienda a suelos contaminados o susceptibles de sufrir el tipo de contaminación comentado. El Biochar, como hemos visto en la introducción, es un material que presenta ciertas ventajas desde el punto de vista de estabilización del Carbono, reducción de gases de efecto invernadero, además de ser un material de un coste asequible. Ya que además presenta buenas características como sorbente, se ha considerado su aplicación a suelos con objeto de aumentar su capacidad de retención de fármacos, en particular de fluoroquinolonas en este trabajo.

Para realizar este estudio se han considerado diferentes aspectos, como son el tipo de suelo a ensayar, qué fluoroquinolonas, además de la cantidad de biochar aplicado y si existen diferencias entre recién aplicado o si pueden dar lugar a cambios con el tiempo.

En cuanto a las fluoroquinolonas, se han escogido la ENR y la DAN. La primera de ellas tiene un comportamiento similar a las otras no incluidas (DIF, MAR y SAR), con valores de $K_{d0,1}$ situados en la zona media-alta. Por su parte, la DAN se ha escogido por presentar un comportamiento significativamente diferente de las otras estudiadas, en particular respecto a su relación de sorción con el pH, OC o CEC.

Se han seleccionado dos suelos para realizar estos ensayos, debido a sus características. Ésos han sido el S07 y S12; el primero tiene un pH ligeramente básico (7,46), y valores moderados en cuanto al resto de sus características, siendo su textura de tipo franco-arcilloso-limoso. Los valores de $K_{d0,1}$ de las diferentes fluoroquinolonas para este suelo oscilan entre 190 – 1200, aproximadamente, que podemos considerar intermedios. Por otro lado, el suelo S12 es un suelo arenoso (94,2% de arena), de pH=7,9, con baja CEC y prácticamente nulo contenido en OC. No es de extrañar, por tanto, que este suelo presente en general los valores más bajos de $K_{d0,1}$.

La aplicación del Biochar como enmienda a estos suelos se ha realizado a dos niveles: al 2% y al 4% en peso; no se ha ensayado un mayor contenido, ya que según se ha comentado en la introducción, una adición del 5% o más al suelo puede presentar efectos perjudiciales, como la retención de nutrientes. Adicionalmente, se ha comparado la eficacia de esta enmienda recién preparada con la de mezclas suelo/biochar en las que se ha simulado su envejecimiento, para tratar de evaluar su comportamiento en condiciones “de campo”.

La determinación de DAN y ENR en equilibrio en las soluciones del suelo se ha llevado a cabo en las mismas condiciones cromatográficas utilizadas en los estudios de sorción en suelos. El método fue evaluado, previamente, con el fin de comprobar que no se presentaban interferencias, en la determinación de las fluoroquinolonas, en forma de solapamientos de picos entre la matriz y la fluoroquinolona.

Los estudios de sorción se realizaron siguiendo el siguiente esquema:

- Determinación del perfil de sorción en biochar en función del pH para la ENR y la DAN.
- Isotermas de sorción en los diferentes suelos estudiados, en ausencia de biochar (ya determinadas en el apartado anterior).
- Isotermas de sorción en mezclas suelo/biochar al 2% y al 4%, recién preparados, para la ENR y la DAN.
- Isotermas de sorción en mezclas suelo/biochar al 2% y al 4% envejecidas para la ENR y la DAN.

A continuación, revisaremos los resultados de los estudios realizados.

4.3.1 Perfiles de sorción de la DAN y ENR en biochar en función del pH

Se ha determinado el comportamiento de sorción de la DAN y la ENR en biochar en función del pH. Para ello se ensayaron diferentes relaciones entre la masa de biochar y volumen de disolución, llegando a la conclusión que la utilización de 20 mg de biochar en equilibrio con un volumen de fase acuosa de 10 mL para cada experimento eran unas cantidades idóneas para llevar a cabo este experimento, ya que daban lugar a una concentración de fluoroquinolona en equilibrio apropiada para su medida, a la vez que representaba un cambio importante al variar el pH del medio.

Previamente a este estudio se construyeron curvas de valoración del biochar con el fin de determinar la cantidad de ácido fuerte (HCl) o base fuerte (NaOH) que es necesario añadir para obtener un pH determinado en el equilibrio.

Para determinar el perfil de sorción en biochar en función del pH, las muestras de biochar (aproximadamente 20 muestras para cada fluoroquinolona) se preequilibraban mediante agitación durante 24 h con la cantidad de HCl/NaOH necesario para obtener una variación de pH en el equilibrio entre 2 y 12, en un medio conteniendo CaCl_2 10 mM y

NaN_3 1,5 mM. Pasado ese tiempo, se añade a cada muestra una cantidad de fluoroquinolona inicial de 8 mg/L, y se mantiene en agitación durante 48 h.

Finalmente, se procede a la separación de fases para determinar la cantidad de fluoroquinolona que queda en disolución (C_w) y se mide el pH a ésta, según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.3. A partir de los datos de concentraciones inicial y final de fluoroquinolona, juntamente con la masa de biochar y el volumen de disolución se pueden obtener los valores de C_s (cantidad retenida por el biochar) como se indica en la ecuación 4.11.

La relación C_s/C_w corresponde a los valores del coeficiente de distribución (D) de la fluoroquinolona en biochar. Si representamos los valores de D (como $\log D$, por claridad y menor cambio en el orden de magnitud) obtendremos el perfil de sorción respecto al pH.

Las figuras 4.36 y 4.37 muestran los resultados obtenidos para la DAN y la ENR, respectivamente.

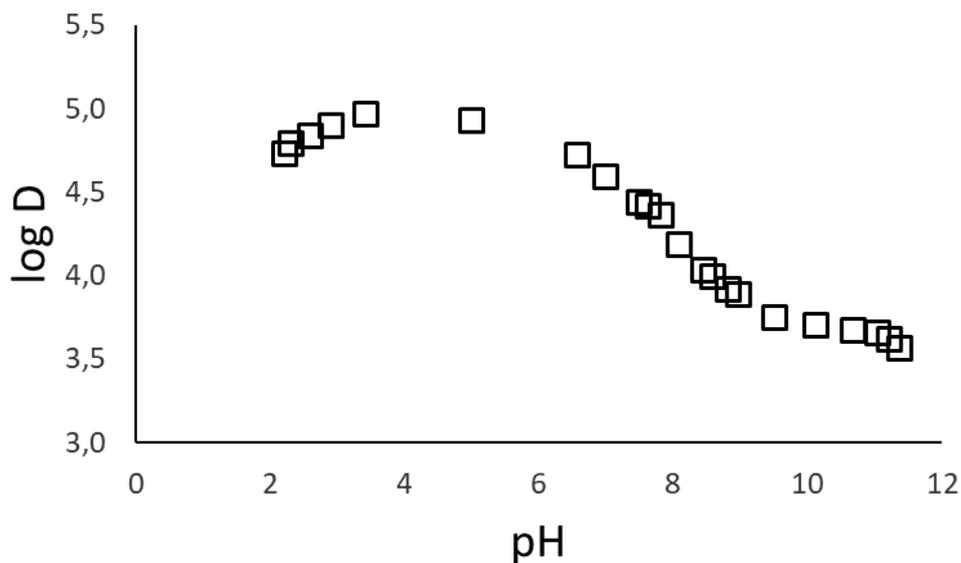


Figura 4.36: Perfil de sorción de la DAN en función del pH

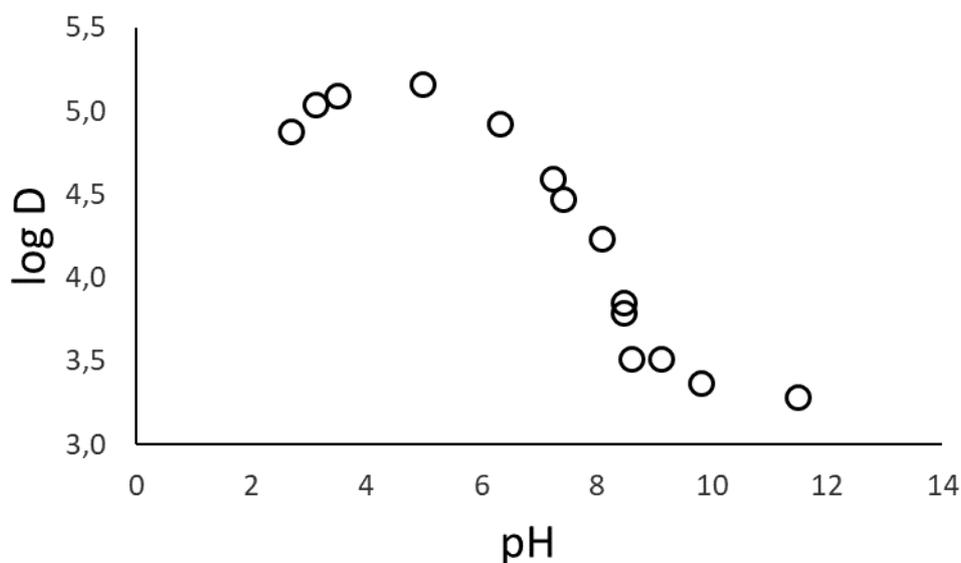


Figura 4.37: Perfil de sorción de la ENR en función del pH

En ellas podemos ver que a valores de pH inferiores a 8, el valor de K_d es superior a 10^4 para el caso de la DAN y $10^{3,5}$ para la ENR, siendo la ENR la que presenta un valor máximo D : $10^{5,2}$ a pH 5, aproximadamente, mientras que para DAN se obtiene un valor máximo de $D=10^5$, a pH=3-5-4 aproximadamente. Estas diferencias están de acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de distribución entre agua/octanol, donde la ENR siempre presenta una mayor razón de distribución que la DAN (Tabla 4.2).

En las dos fluoroquinolonas observamos que la retención máxima tiene lugar a pHs ácidos, menores que los correspondientes a sus valores de pK_{a1} . Ello indica que la especie catiónica (H_2Q^+) queda más fuertemente retenida que la neutra/zwitteriónica. En principio no es de extrañar que esta especie quede retenida, ya que en los estudios de extracción entre octanol/agua ya se daba esta circunstancia. No obstante, la particularidad en el biochar consiste en que sea más fuerte la retención de la especie catiónica que la neutra. Este aspecto sugiere la posibilidad de la existencia de una carga neta negativa en la superficie del biochar hasta un pH de 4, aproximadamente, cuando la sorción empieza a disminuir; de hecho, este comportamiento sería compatible con la existencia de grupos carboxilo en la superficie del biochar (ver figura 1.21). Así pues, en esta mayor sorción la especie catiónica sería compatible con una interacción de tipo electrostático entre “sites” del biochar cargados negativamente y la especie catiónica de las fluoroquinolonas.

Adicionalmente, el hecho de que al disminuir el pH por debajo de 4 también disminuya la sorción indica la neutralización de las cargas negativas superficiales del biochar.

Si además nos fijamos en los perfiles de sorción al aumentar el pH, observamos que al aumentar éste disminuye la sorción, hasta llegar a un pH entre 8 y 9, a partir del cual el valor de $\log D$ se estabiliza. Ello indica que la especie aniónica (Q^-) también presenta una sorción significativa en biochar, aunque de menor magnitud que la especie ácida. Este hecho también está de acuerdo con la extracción de fluoroquinolonas entre octanol/agua, donde se apreciaba una ligera extracción de la especie aniónica, aunque en baja proporción ya que el intervalo de pH de trabajo no dio lugar a resultados concluyentes. En cambio, con biochar se ha trabajado en un intervalo más amplio de pH, que ha podido poner de manifiesto esta distribución. Ya que no es asumible la presencia de una carga superficial positiva a estos valores de pH, el mecanismo de sorción podría ser mediante la extracción de un par iónico o complejo neutro (con iones Ca^{2+} , por ejemplo).

A continuación, comentaremos los resultados correspondientes a las mezclas suelo/biochar.

4.3.2 Isotermas de DAN y ENR en suelos modificados con biochar

Tal como se ha comentado anteriormente sobre la elección de los dos suelos (S07 y S12), el objetivo es comprobar si realmente un suelo con poca capacidad de sorción para las fluoroquinolonas (S12) es capaz de mejorar esta característica mediante la adición de biochar, a la vez que se pretende comprobar qué efecto puede tener la adición de biochar en un suelo de capacidad de sorción intermedia (S07).

En primer lugar, recordemos las características fisicoquímicas de estos dos suelos, que se indican en la tabla siguiente:

Tabla 4.20. Características fisicoquímicas de los suelos S07 y S12

ID	pH en CaCl ₂ 0,01 M	CEC (meq/100g)	OC (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Textura USDA
S07	7,46	16,2	1,13	13,6	55,5	30,9	Franco-arcilloso-limoso
S12	7,9	3,7	0,00	94,2	5,0	0,8	Arenoso

En la siguiente figura pueden verse las isotermas de sorción de las dos fluoroquinolonas para ambos suelos.

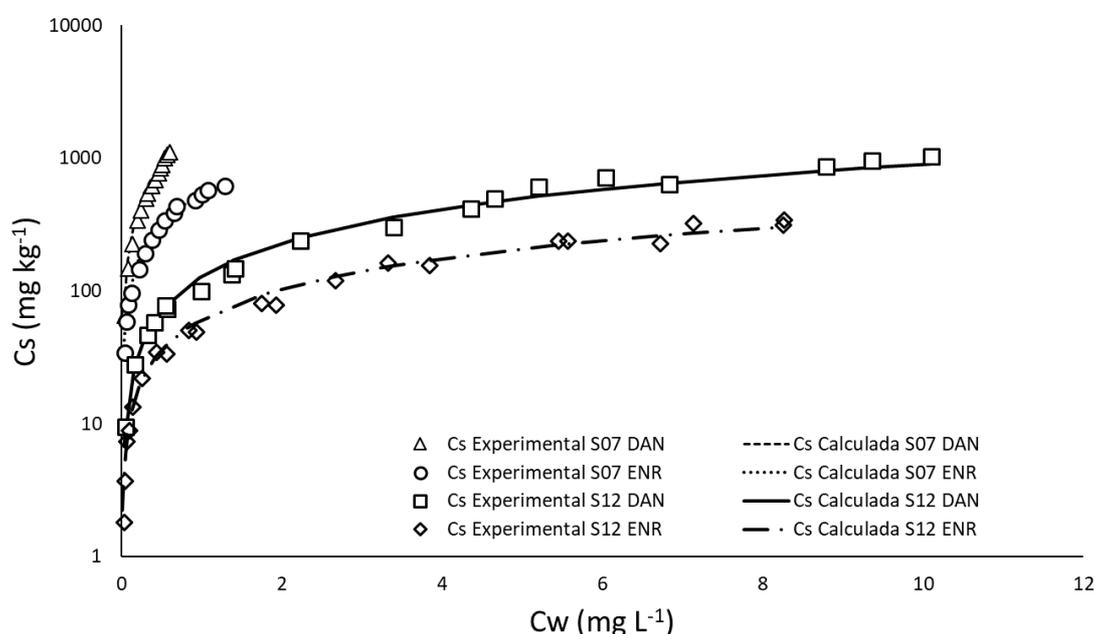


Figura 4.38. Isotermas de sorción experimentales y calculadas, para DAN y ENR en los suelos S07 y S12

En la figura 4.38 podemos comprobar que el suelo S07 posee una mayor capacidad de sorción que el suelo S12 para las dos fluoroquinolonas estudiadas, así como la mayor sorción de DAN comparada con ENR. También se puede comprobar al observar los datos presentados en la siguiente tabla, en la que se presentan los valores de K_d calculados a distintas concentraciones, con el fin de poder comparar y observar mejor las diferencias en las capacidades de sorción entre los suelos. Como era de esperar, para el suelo arenoso S12, los valores de K_d son siempre inferiores que para el suelo S07.

Tabla 4.21. Parámetros de sorción del modelo de Freundlich para la DAN y la ENR en los suelos S07 y S12 y valores de Kd calculados a diferentes niveles de concentración (C_w)

	Suelo	K_F	N	Kd (0,1 mg L ⁻¹)	Kd (0,5 mg L ⁻¹)	Kd (1,0 mg L ⁻¹)
DAN	S07	1571,0	0,848	2229,3	1745,6	1571,0
	S12	128,7	0,844	184,3	143,4	128,7
ENR	S07	541,3	0,741	982,7	647,7	541,3
	S12	61,3	0,758	107,0	72,5	61,3

De los resultados en la tabla podemos comprobar que la capacidad de sorción disminuye al aumentar la concentración de DAN y/o de ENR en la solución, ya que el valor de N para ambas es inferior a la unidad (entre 0,74 y 0,85).

A continuación, se describen los resultados obtenidos para la sorción de fluoroquinolonas en mezclas suelo-biochar.

4.3.2.1 Isotermas de DAN y ENR en suelos modificados con biochar recién preparados

En este apartado se han construido las isotermas de sorción para mezclas de suelo-biochar al 2% y al 4% en peso de biochar. Para realizar este ensayo, se han preparado dichas mezclas para los dos suelos, conteniendo aproximadamente 1 g de mezcla (unas 16 muestras para cada sistema) previamente homogeneizadas, y se han equilibrado con una disolución de CaCl₂ 10 mM y NaN₃ 1,5 mM, mediante agitación durante 24 h. A continuación, se añade a cada muestra la cantidad apropiada de fluoroquinolona, y se deja equilibrar durante 48 h en agitación. Pasado ese tiempo, y como en las anteriores isotermas, se separan las fases y se determina la concentración de fluoroquinolona en equilibrio en fase acuosa y el pH de ésta.

Con ello, y siguiendo el procedimiento habitual, se construyen las isotermas de sorción, realizando este experimento para las dos fluoroquinolonas, en los suelos S07 y S12 a los dos niveles de adición de biochar.

Los resultados obtenidos se describen a continuación:

En la Figura 4.39 se representan las isothermas de sorción obtenidas para DAN en el suelo S07, a los dos niveles de adición de biochar, comparadas con la isoterma de sorción sin la adición de biochar. En ella podemos observar que las isothermas obtenidas al 2% y 4% de biochar son equivalentes, y además están claramente por debajo de la que no contiene biochar. Este aspecto indica que para este tipo de suelos la adición de biochar es contraproducente, en el sentido que la capacidad de retención de estos por los fármacos se ve disminuida apreciablemente.

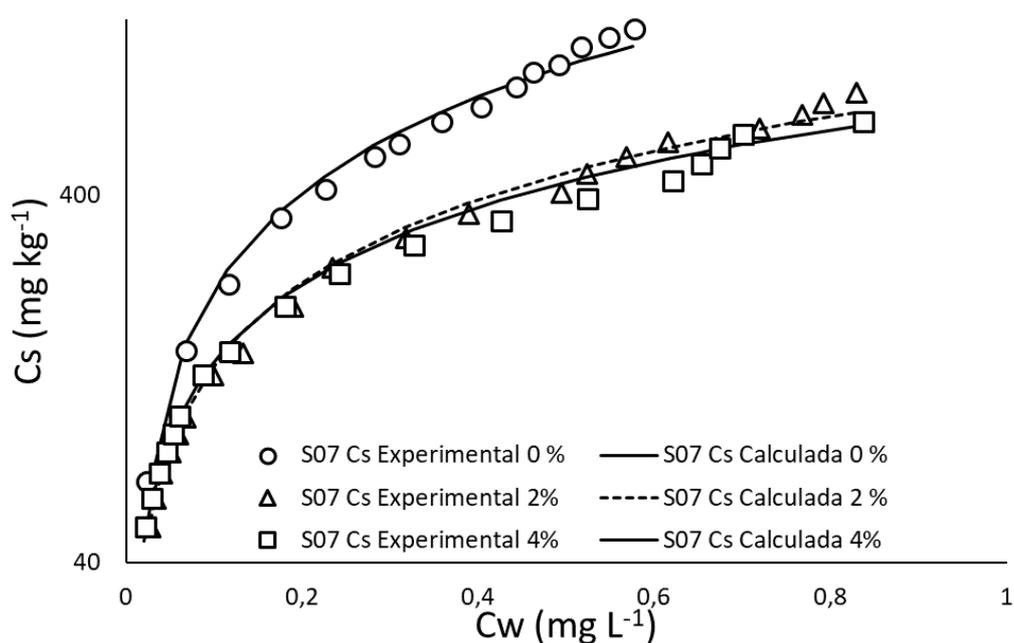


Figura 4.39. Isothermas de sorción para DAN en el suelo S07 con biochar recién preparado al 2 % y 4 % y sin éste (0%)

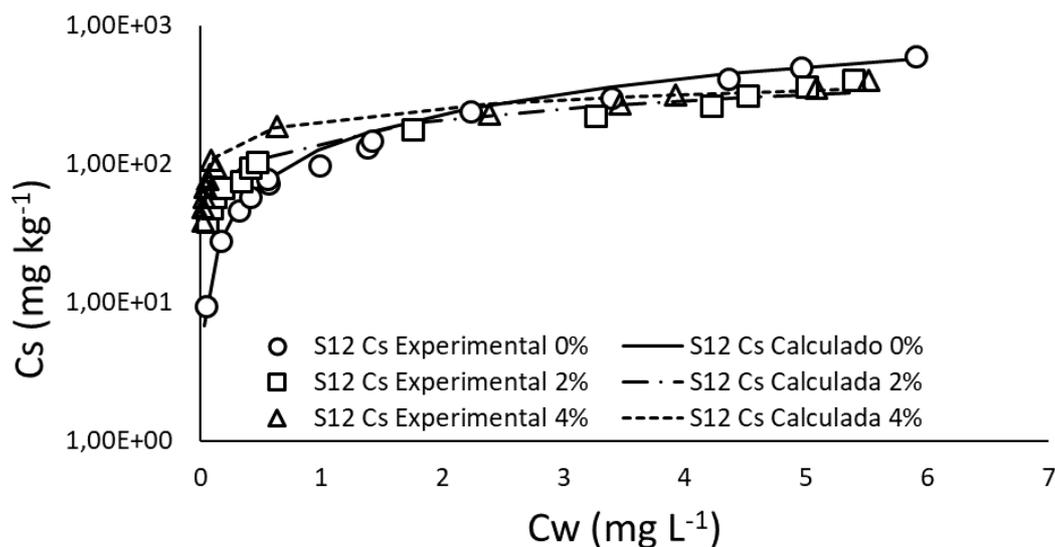


Figura 4.40. Isotermas de sorción para DAN en el suelo S12, al 2 % y 4 % en biochar recién preparados y al 0% en biochar

Sin embargo, tal como se puede apreciar en la figura 4.40, el suelo S12 sí que mejora su capacidad de sorción al añadir biochar, tanto al nivel del 2% como del 4%, siendo mayor en este último. En realidad, esta mejora se obtiene a concentraciones en fase acuosa por debajo de 2 mg/L; por encima de ella hay una ligera disminución en su capacidad de sorción.

En cuanto a los resultados obtenidos para la sorción de ENR en los suelos modificados con biochar, las figuras 4.41 y 4.42 muestran las isotermas obtenidas para los suelos S07 y S12, respectivamente. En la primera de ellas (S07) no se observa una diferencia significativa de la capacidad de sorción en el intervalo de C_w obtenido, por lo que en este caso podemos decir que la adición de biochar al 2% o 4% no tiene efecto en cuanto a la retención de ENR por este tipo de suelo.

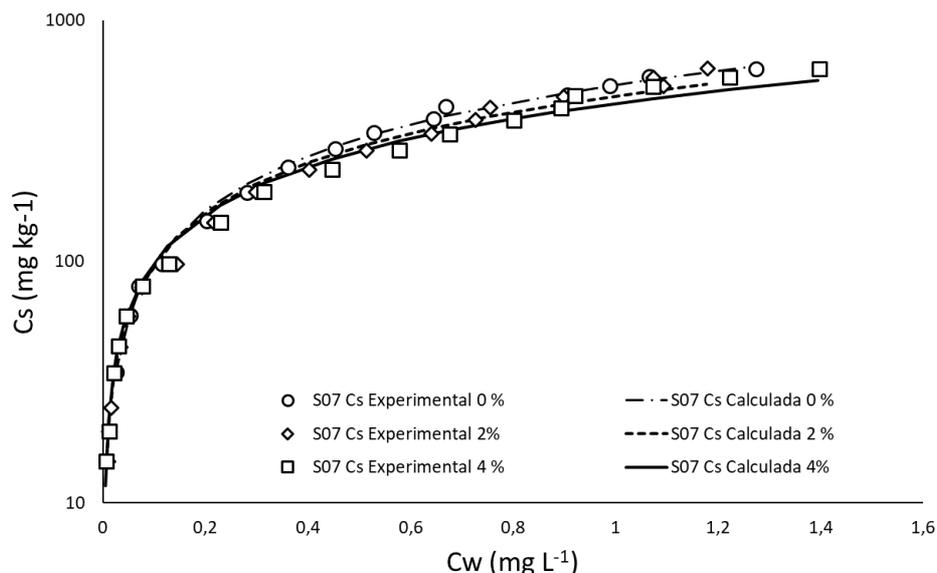


Figura 4.41. Isothermas de sorción para ENR en el suelo S07 con biochar al 2 % y al 4 % recién preparados

No obstante, y como en el caso de la DAN, para el suelo S12 las isothermas de sorción de ENR en presencia o no de biochar sí que presentan diferencias significativas (figura 4.42); en este caso la mejora se obtiene a concentraciones de ENR en la solución en equilibrio inferiores a 1,5 y 3 mg/L, dependiendo del contenido en biochar. No obstante, para concentraciones mayores de 3 mg/L, el suelo original presenta mayor capacidad de sorción.

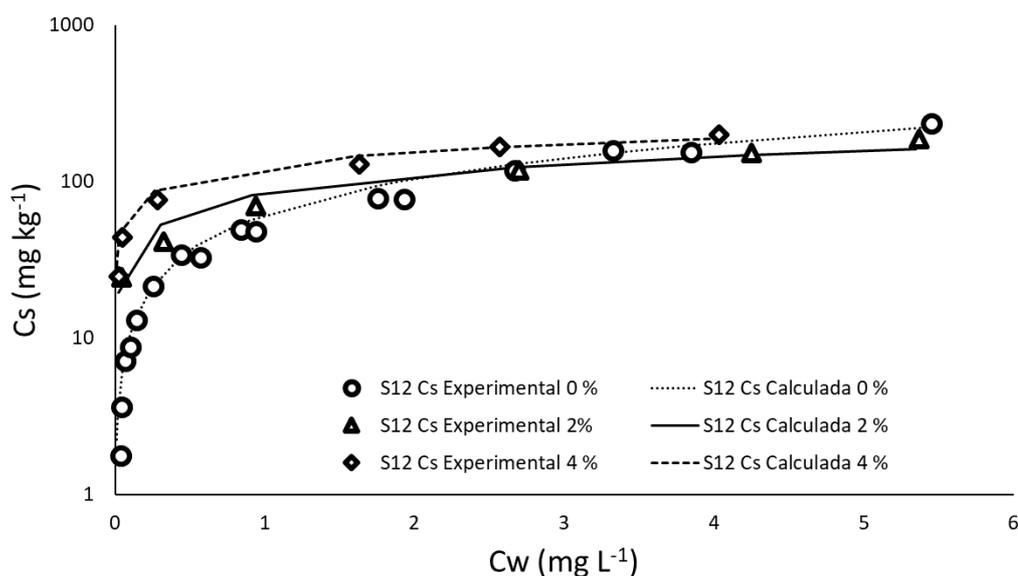


Figura 4.42. Isothermas de sorción para ENR en el suelo S12 con biochar al 2 % y al 4 % recién preparados

4.3.2.1 Isotermas de DAN y ENR en suelos modificados con biochar y envejecidos

En este apartado se ha estudiado la sorción de los dos suelos modificados con biochar para DAN y ENR, pero en este caso las muestras de suelo/biochar al 2% y 4% se han sometido a un tratamiento para simular las condiciones reales de campo después de un tiempo de enmienda. Dicho tratamiento se describe en el apartado 3.3.4; las isotermas correspondientes se han obtenido después de añadir la cantidad de fluoroquinolona apropiada a las muestras de suelo/biochar “envejecidas”.

La figura 4.43 muestra las isotermas obtenidas para DAN para el suelo S07 envejecido con los dos niveles de adición de biochar. Como en el caso de muestras recién preparadas (Figura 4.39), se observa que la adición de biochar da lugar a una disminución de la sorción. No obstante, si para las muestras recién preparadas los dos niveles de biochar daban lugar a isotermas equivalentes, en este caso (muestras envejecidas), la adición de biochar al 4% presenta una mayor sorción de DAN que en la enmienda al 2%.

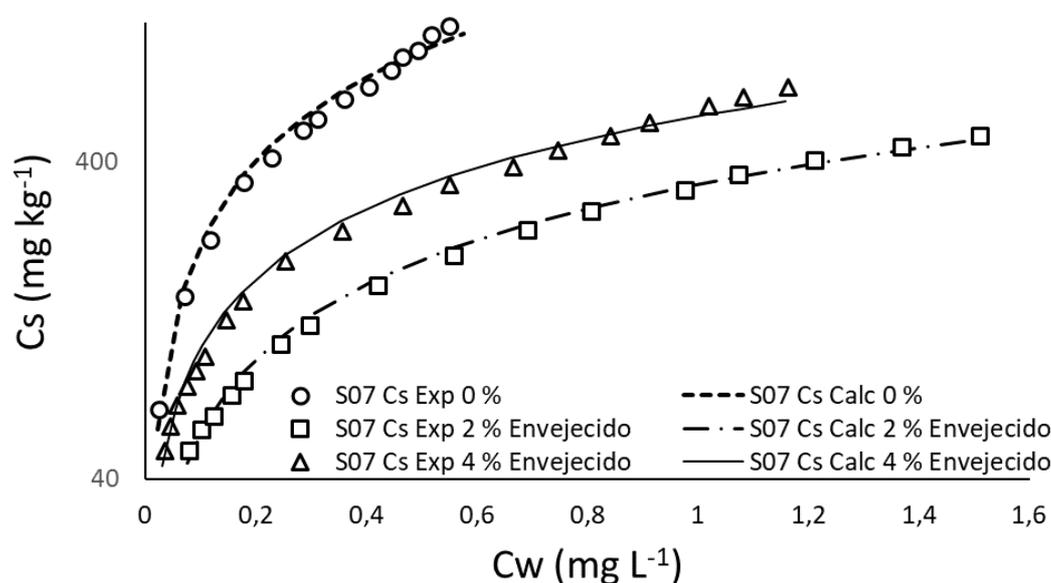


Figura 4.43. Isotermas de sorción para DAN en el suelo S07 al 0% y al 2 % y al 4 % en biochar envejecido

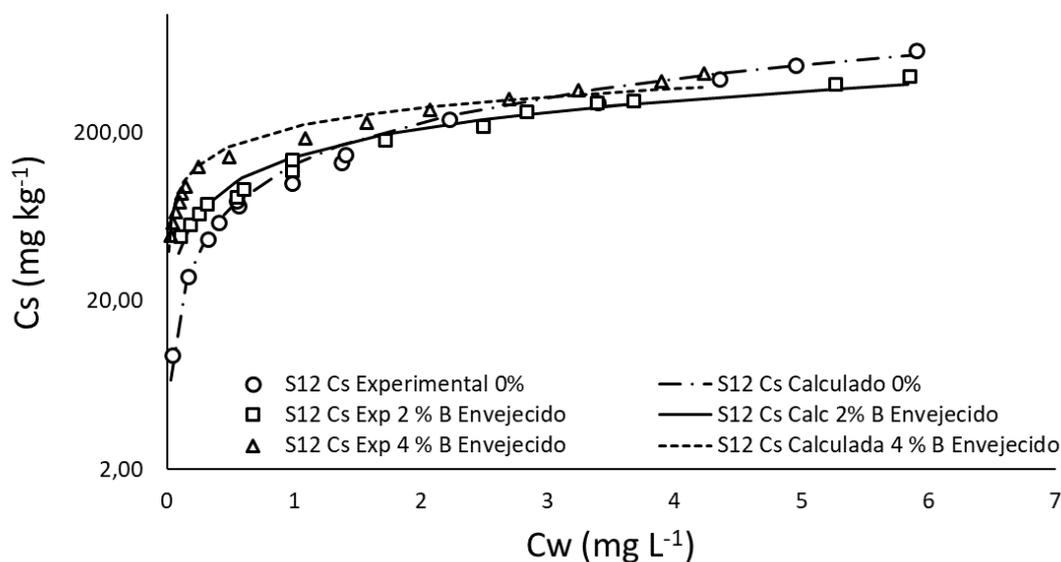


Figura 4.44. Isotermas de sorción para DAN en el suelo S12 al 0% y al 2 % y al 4 % en biochar envejecido

La sorción de DAN al suelo arenoso S12, después de envejecer las muestras, da lugar a las isotermas representadas en la Figura 4.44, en las que se observa una mejora de la sorción a concentraciones pequeñas. Para la enmienda al 2% de biochar, la capacidad de sorción se ve aumentada por debajo de 1 mg L⁻¹ y para el ensayo con biochar al 4% se obtiene mejora a concentraciones por debajo de 3 mg L⁻¹, aproximadamente.

En las figuras siguientes se compara el efecto de envejecimiento para los dos niveles de enmienda. Así, en la Figura 4.45 se representan conjuntamente las isotermas obtenidas para el suelo S07, sin biochar, y añadido al 2% en peso recién preparado y envejecido. En ella se observa una clara disminución de la sorción con el tiempo de haber preparado la enmienda.

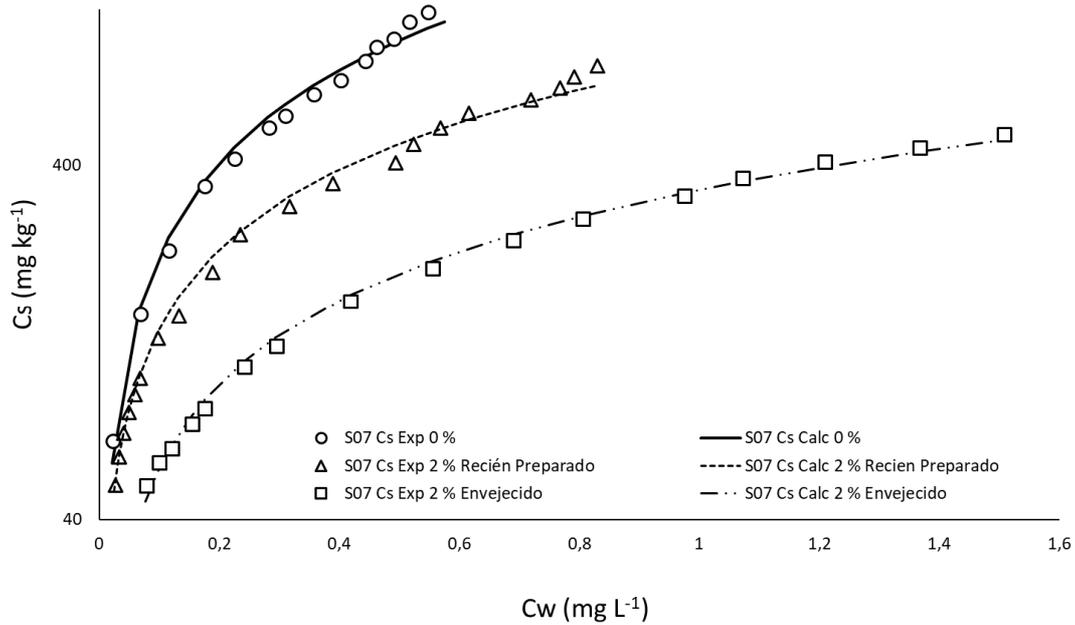


Figura 4.45. Isotermas de sorción para DAN en el suelo S07 al 2 % en biochar recién preparado y envejecido

En el caso de realizar la enmienda al 4% de biochar, el efecto del envejecimiento es similar que al 2%, pero en este caso la disminución de la sorción con el tiempo es menos acusada.

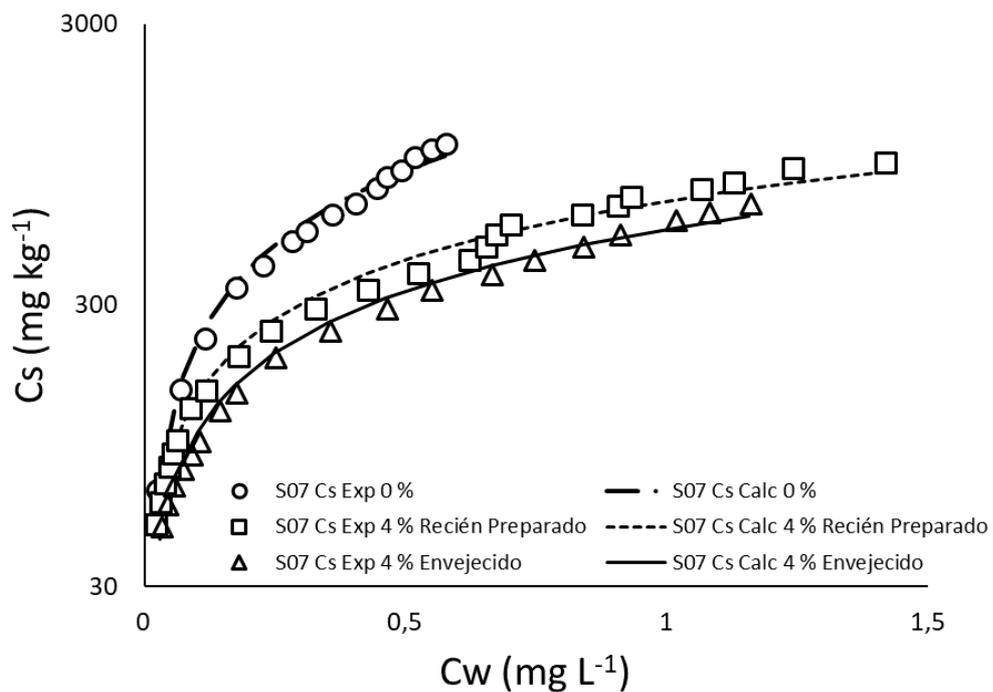


Figura 4.46. Isotermas de sorción para DAN en el suelo S07 al 4 % en biochar recién preparado y envejecido

En el caso del suelo S12, el envejecimiento de las muestras ya sea para la enmienda al 2% o 4%, no presenta diferencias significativas de comportamiento en su evolución con el tiempo, como se observa en las figuras 4.47 (al 2%) y 4.48 (4%). Este suelo, al contrario del suelo S07, sí mejora su capacidad de sorción tanto con la adición de biochar recién preparado como envejecido al 2% o 4%. Aunque es importante observar que esto ocurre a concentraciones por debajo de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, para la enmienda al 2%, y de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, cuando ésta se lleva a cabo al 4%.

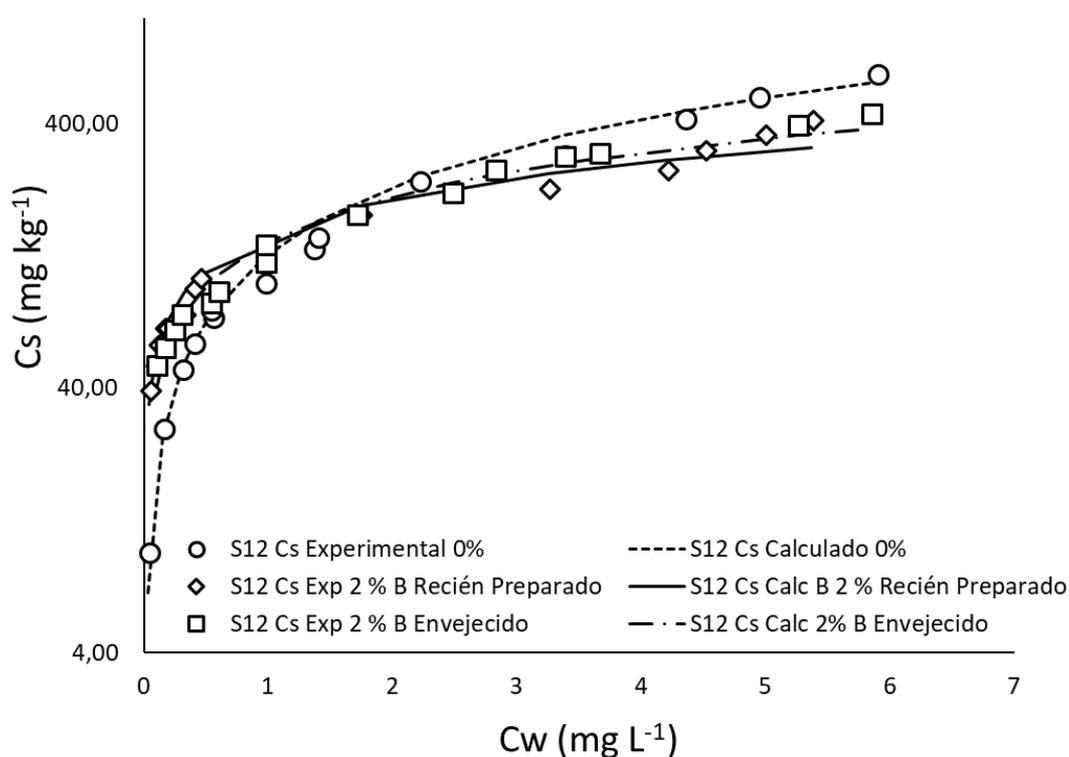


Figura 4.47. Isotermas de sorción para DAN en el suelo S12 al 2 % en biochar recién preparado y envejecido

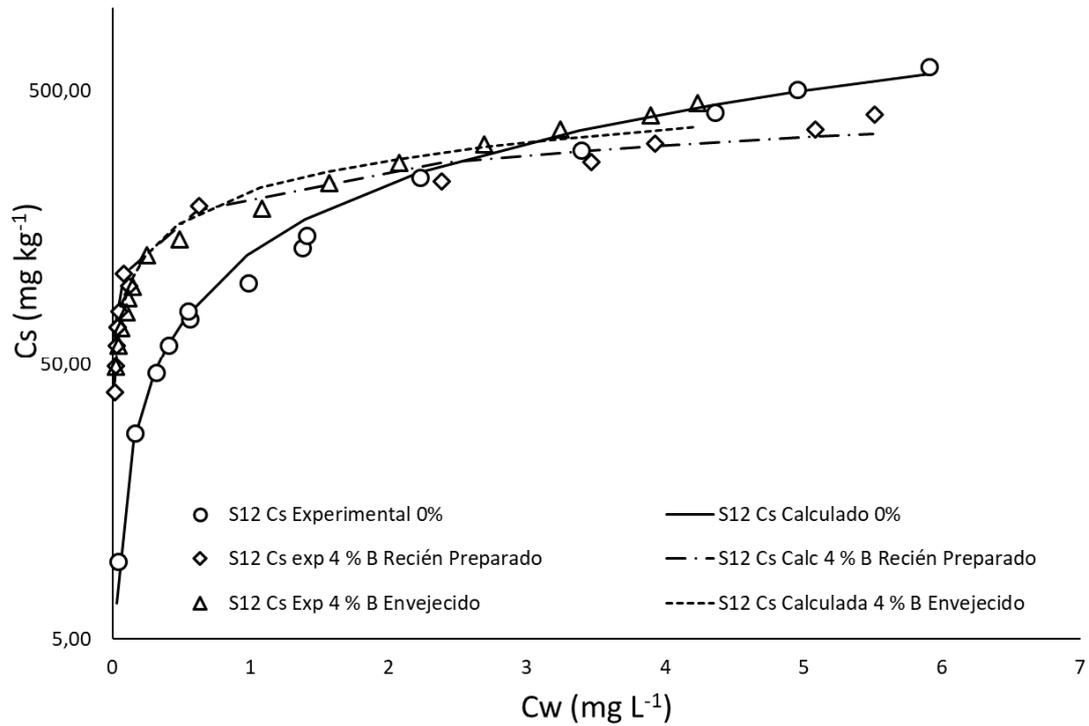


Figura 4.48. Isotermas de sorción para DAN en el suelo S12 al 4 % en biochar recién preparado y envejecido

Para el caso de la ENR, el efecto del envejecimiento de las muestras de suelo con biochar añadido se muestra en las figuras siguientes.

En la figura 4.49 se representan las isotermas obtenidas para el suelo S07 con enmiendas al 2% y 4% de biochar, y envejecido posteriormente. Al contrario que en las muestras recién preparadas (Figura 4.41), donde no se observaban diferencias significativas entre el suelo original o las enmiendas, el proceso de envejecimiento sí que da lugar a cambios importantes, disminuyendo la sorción a medida que aumenta el contenido en biochar.

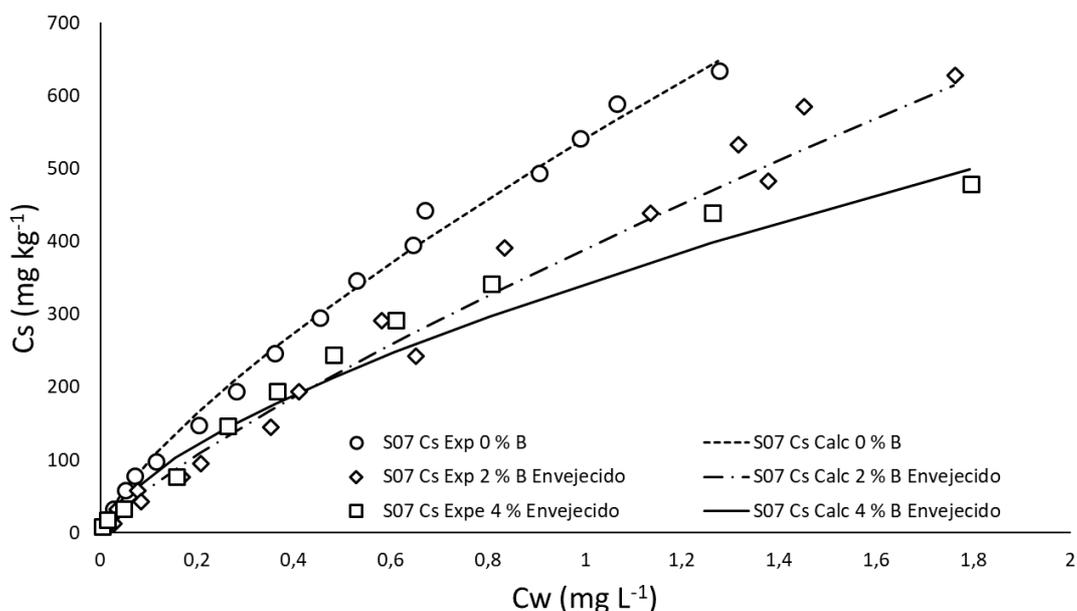


Figura 4.49. Isotermas de sorción para ENR en el suelo S07 con biochar envejecido al 2 % y al 4 %

Sin embargo, para el suelo arenoso S12, la enmienda de biochar sí que da como resultado una mejora en la sorción, que aumenta con la cantidad de biochar añadido, aunque como en el caso sin envejecer, a concentraciones mayores de 2 – 3 mg L⁻¹ de ENR en disolución, la sorción es mayor en el suelo sin tratar (figura 4.50).

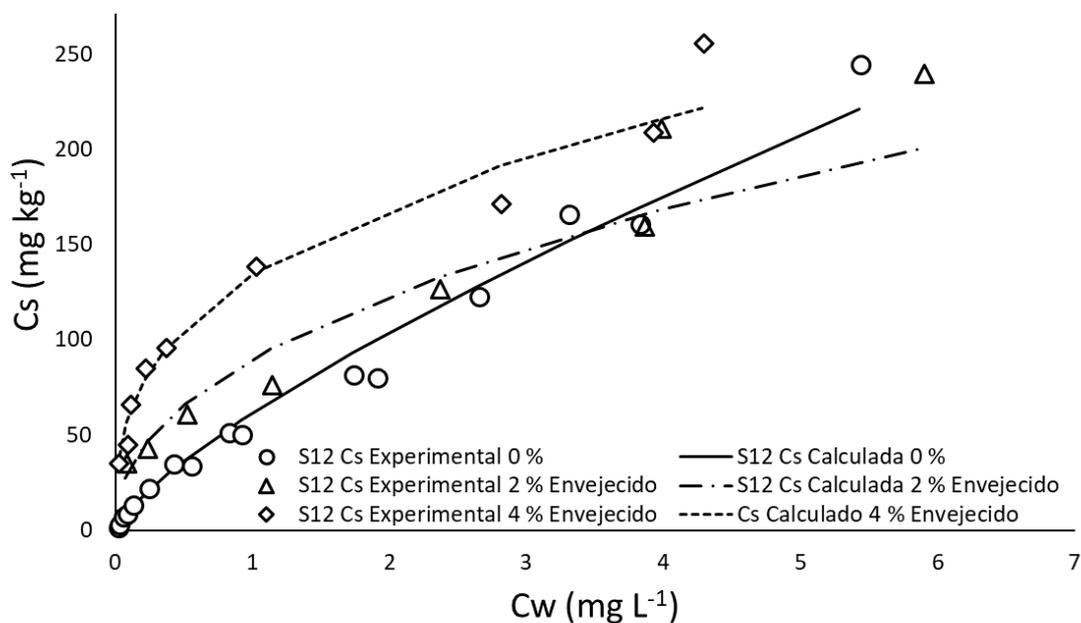


Figura 4.50. Isotermas de sorción para ENR en el suelo S12 con biochar envejecido al 2 % y al 4 %

Como se ha efectuado en el caso de la DAN, a continuación, presentaremos las isotermas correspondientes a la ENR, separadamente a los dos niveles de adición de biochar, para comparar el efecto del envejecimiento de las muestras.

En primer lugar, la figura 4.51 muestra el efecto del envejecimiento en la sorción de ENR en el suelo S07 a un nivel de enmienda del 2%. En ella se observa que, aunque no hay diferencias importantes entre la sorción para el suelo original y el de la enmienda al 2% recién preparadas, si que se observa una disminución importante en las muestras envejecidas.

Para el nivel de adición del 4% de biochar, y muestras envejecidas, el comportamiento es similar, como se indica en la figura 4.52.

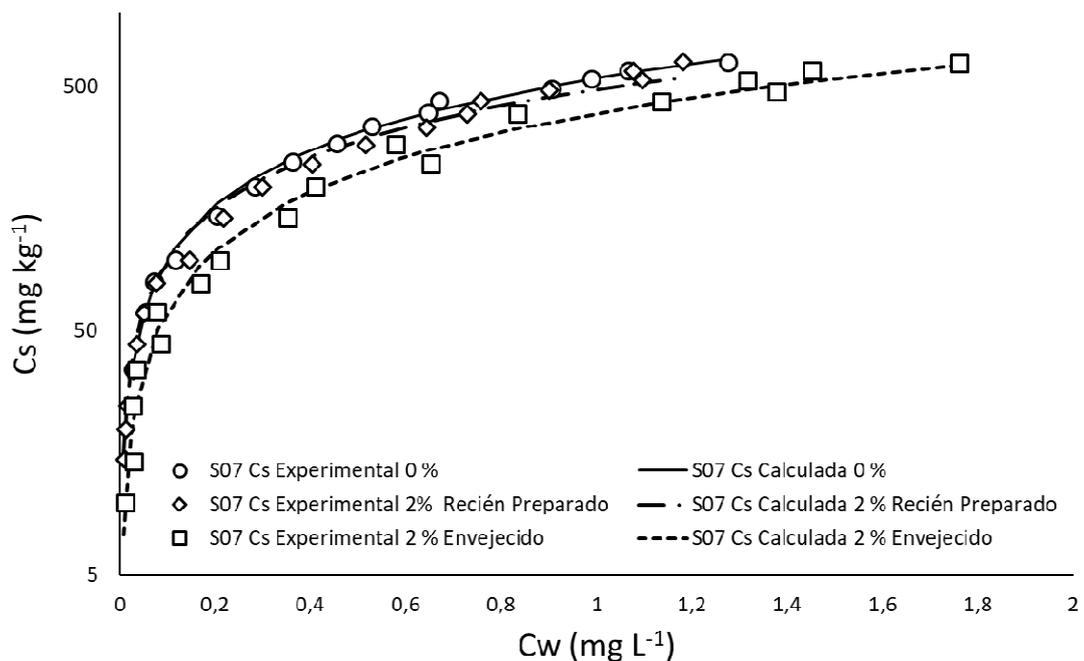


Figura 4.51. Isotermas de sorción para ENR en el suelo S07 con biochar al 2 % recién preparado y envejecido

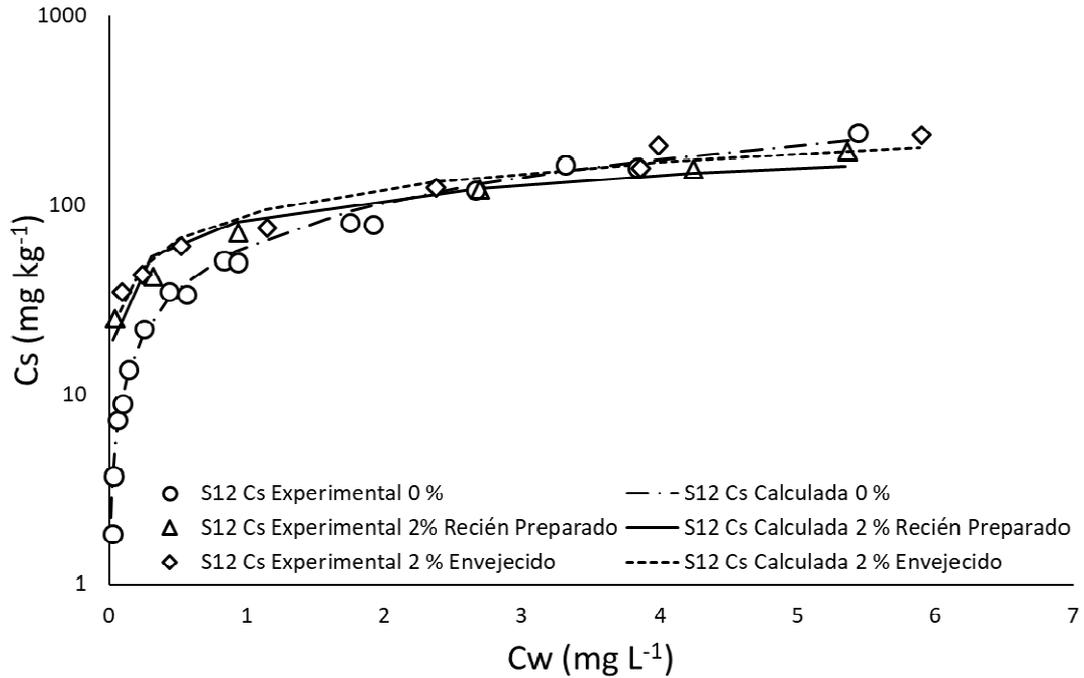


Figura 4.53. Isothermas de sorción para ENR en el suelo S12 con biochar al 2 % recién preparado y envejecido

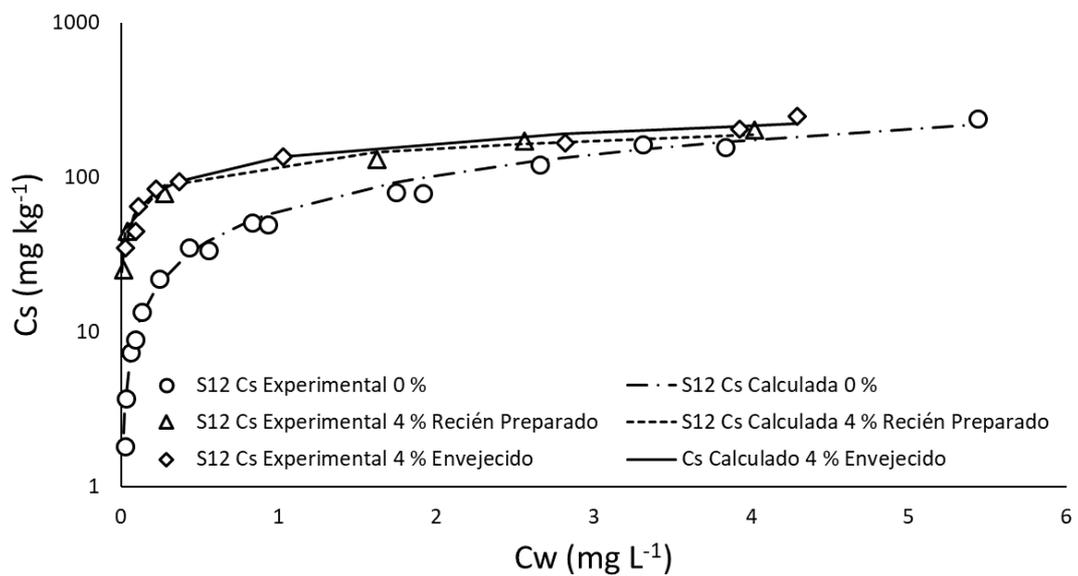


Figura 4.54. Isothermas de sorción para ENR en el suelo S12 con biochar al 4 % recién preparado y envejecido

La Tabla 4.22 muestra los parámetros conseguidos a partir de los ajustes al modelo de Freundlich de los datos obtenidos experimentalmente tras obtener las isothermas de sorción de DAN y ENR en los suelos estudiados.

Podemos observar en esta tabla que el parámetro de linealidad N , disminuye al pasar de un contenido en biochar del 2% al 4%, tanto para muestras recién preparadas como envejecidas para las dos fluoroquinolonas en los dos suelos estudiados. Ello indica un aumento en la heterogeneidad de los “sites” de sorción. Por otra parte, el valor de K_F disminuye con el envejecimiento en el suelo S07 para las dos quinolonas, mientras que este parámetro aumenta ligeramente con el tiempo en el suelo S12, también en las dos fluoroquinolonas.

Para comparar la magnitud de la sorción de la DAN y la ENR en los suelos S07 y S12, la tabla 4.23 muestra los coeficientes de sorción (K_d) obtenidos a tres diferentes concentraciones de C_w : 0,1 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹ y 1,0 mg L⁻¹, en suelos al 0 %, 2 % y 4 % de biochar recién preparado y envejecido.

Tabla 4.22. Parámetros de sorción obtenidos del ajuste de los datos al modelo de Freundlich para la DAN y la ENR en los suelos S07 y S12 a diferentes concentraciones de biochar

Fluoro-quinolona	Suelo	% Biochar	Enmienda ^a	K _F (s.d.)	N (s.d.)
DAN	S07	2	RP	773,9 (20,5)	0,75 (0,01)
	S07	4	RP	702,9 (16,7)	0,69 (0,01)
	S07	2	E	341,1 (5,6)	0,79 (0,01)
	S07	4	E	557,9 (13,7)	0,73 (0,01)
	S12	2	RP	152,1 (5,11)	0,45 (0,02)
	S12	4	RP	211,9 (6,3)	0,29 (0,01)
	S12	2	E	143,5 (4,7)	0,56 (0,03)
	S12	4	E	216,1 (7,6)	0,37 (0,02)
ENR	S07	2	RP	486,3 (17,7)	0,69 (0,01)
	S07	4	RP	452,8 (17,4)	0,66 (0,02)
	S07	2	E	389,9 (24,3)	0,81 (0,03)
	S07	4	E	342,5 (35,4)	0,65 (0,04)
	S12	2	RP	84,5 (8,0)	0,39 (0,06)
	S12	4	RP	127,5 (5,8)	0,28 (0,02)
	S12	2	E	90,1 (6,2)	0,45 (0,05)
	S12	4	E	134, (6,8)8	0,34 (0,03)

^a: RP: recién preparada, E: envejecida

Tabla 4.23. Valores calculados de K_d para la DAN y la ENR en suelos tratados con biochar recién preparado y envejecido

Fluoro-quinolona	Suelo	% Biochar	Enmienda ^a	K_d (0,1 mgL ⁻¹)	K_d (0,5 mgL ⁻¹)	K_d (1 mgL ⁻¹)
DAN	S07	0		2224.7	1799.2	1642.1
	S07	2	RP	1377.6	920.6	773.9
	S07	4	RP	1420.1	868.6	702.9
	S07	2	E	558.5	395.7	341.1
	S07	4	E	1042.6	673.4	557.9
	S12	0		184.4	143.4	128.7
	S12	2	RP	538.2	222.5	152.1
	S12	4	RP	1083.0	346.3	211.9
	S12	2	E	398.2	195.1	143.5
	S12	4	E	918.8	334.1	216.1
ENR	S07	0		982.1	647.6	541.3
	S07	2	RP	990.8	602.5	486.3
	S07	4	RP	997.5	574.3	452.8
	S07	2	E	610.4	446.2	389.9
	S07	4	E	774.5	437.9	342.5
	S12	0		106.9	72.5	61.3
	S12	2	RP	347.0	129.2	84.5
	S12	4	RP	666.0	209.7	127.5
	S12	2	E	318.2	131.7	90.1
	S12	4	E	610.7	212.1	134.5

^a: RP: recién preparada, E: envejecida

En las dos figuras que siguen (4.55 y 4.56) podemos observar las diferencias en sorción entre los suelos S07 y S12 con la DAN y con la ENR.

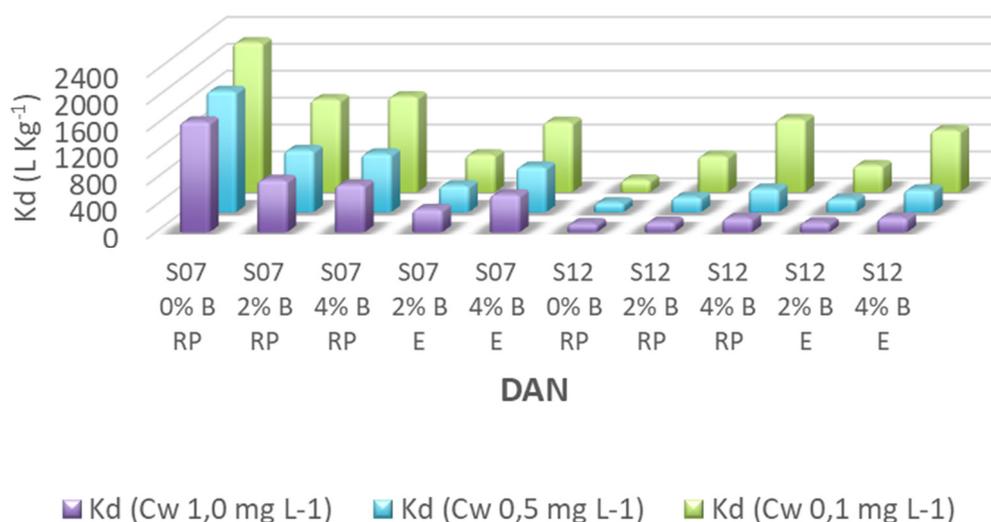


Figura 4.55. Coeficiente de sorción K_d para la DAN a diferentes concentraciones, y niveles de biochar en disolución para los suelos S07 y S12

La figura 4.55 nos indica cómo la K_d disminuye conforme aumenta la concentración de DAN en los suelos. También se observa que el suelo más arenoso (S12) presenta valores de K_d menores que los del suelo franco-arcilloso-limoso (S07). Además, es posible observar en esta gráfica que la cantidad de biochar añadido al suelo, así como su posterior envejecimiento no supone una mejoría en la capacidad de sorción del suelo S07, pero sí para el suelo S12.

Para el caso de la ENR, la figura 4.56 nos indica que K_d disminuye conforme aumenta la concentración de ENR en los suelos, como sucede con la DAN. También, podemos observar que el suelo franco-arcilloso-limoso S07 presenta coeficientes de sorción mayores que los exhibidos por el suelo arenoso S12, con o sin biochar añadido. Además, la cantidad de biochar utilizado como enmienda no supone una mejoría en la capacidad de sorción del suelo S07.

Por otro lado, esta figura también muestra que la adición de biochar mejora la sorción del suelo S12, tanto para la mezcla recién preparada como envejecida.

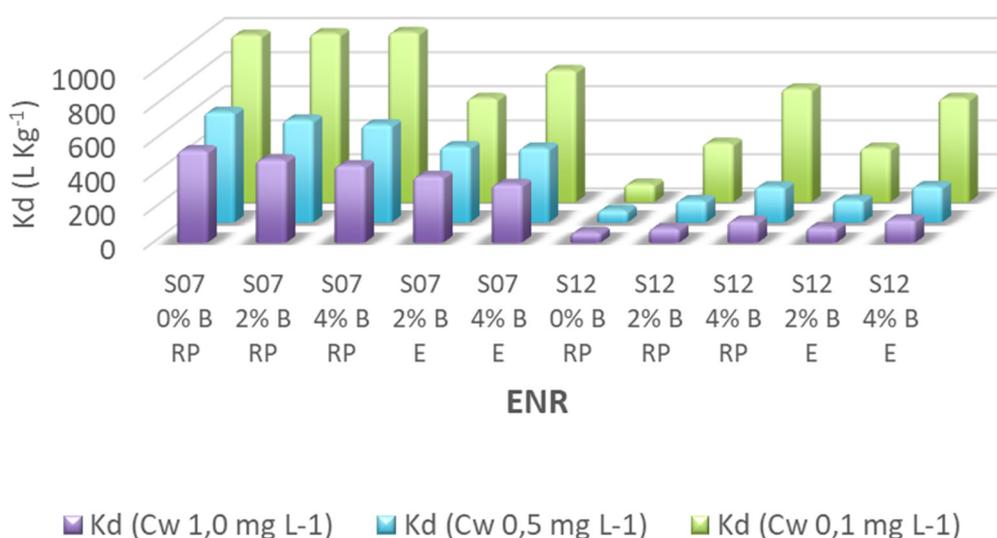


Figura 4.56. Coeficiente de sorción K_d para la ENR a diferentes concentraciones, y niveles de biochar en disolución para los suelos S07 y S12

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos para ambas fluoroquinolonas estudiadas, se ha comprobado que, aunque el suelo arenoso (S12) presenta menor capacidad de sorción, ésta mejora al ser enriquecido con biochar, lo cual no sucede con el suelo franco-arcilloso-limoso (S07); de hecho, en este caso hay una disminución del coeficiente de sorción para estas fluoroquinolonas al añadir biochar. Este efecto indica que los “sites” del suelo S07 que permiten la sorción de las fluoroquinolonas quedan parcialmente ocupados por los grupos funcionales que contienen las partículas de biochar.

Estos resultados son coherentes con el contenido de materia orgánica de los suelos y su CEC; el suelo S07 posee una CEC de $16,2 \text{ meq } 100\text{g}^{-1}$, mientras que la del suelo S12 es de $3,7 \text{ meq } 100\text{g}^{-1}$. Por otro lado, S07 presenta un contenido de carbono orgánico del 1,13 %, mientras que el suelo S12 no contiene. Por tanto, el suelo S07 no necesita ser enriquecido con biochar para mejorar su capacidad de sorción, mientras que S12 sí.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los estudios de sorción en mezclas suelo/biochar, es posible indicar que existe la posibilidad de utilizar al biochar como enmienda para suelos arenosos que posean características fisicoquímicas muy similares al suelo estudiado.

Adicionalmente, se comenta a continuación las especies mayoritarias de las fluoroquinolonas en las isotermas realizadas en presencia de biochar. Para ello, tomamos en cuenta, en primer lugar, los valores de pH medidos en el equilibrio de sorción, que se muestran en la tabla, para los suelos estudiados con ambas fluoroquinolonas, DAN y ENR.

Tabla 4.24. Valores promedio de pH en el equilibrio para los experimentos de sorción en mezclas suelo/biochar recién preparados y envejecidos

Fluoroquinolona	Suelo	Cantidad de Biochar añadido				
		Recién Preparado			Envejecido	
		0 %	2 %	4 %	2 %	4 %
DAN	S07	7,82	7,85	7,94	8,46	8,34
	S12	7,38	8,54	8,72	8,09	8,52
ENR	S07	7,82	7,65	7,75	7,56	7,64
	S12	7,38	8,09	8,28	7,76	7,93

De los valores de pH en equilibrio podemos ver que la adición de biochar provoca un ligero aumento de pH en las muestras recién preparadas con el suelo S12, que con el envejecimiento disminuye, aunque sin llegar al pH del suelo original. Ello da lugar a que en el caso de la ENR aumente la fracción de la especie aniónica, efecto que en la DAN tiene lugar en menor extensión debido a la diferencia en su pK_{a2} (8,25 en ENR y 8,94 en DAN). De todas maneras, podemos indicar que, en la mayoría de los casos indicados, las especies neutra y zwitteriónica son las mayoritarias en disolución, y por tanto son las que se retienen con preferencia tanto al biochar como a la fracción de suelo.

Los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta las características fisicoquímicas de los suelos y la composición del biochar, parecen indicar que el mecanismo de sorción preferente por las fluoroquinolonas DAN y ENR, en estos suelos en particular, es el enlace de hidrógeno (345) debido a la presencia de los grupos carboxilos de las fluoroquinolonas en su estado neutro.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, se desprenden las siguientes conclusiones:

A partir de los estudios sobre la distribución entre agua/octanol de las fluoroquinolonas estudiadas en función del pH, a una temperatura de 25°C y fuerza iónica de 0,15 M (en NaCl) podemos decir que:

1. Se han determinado las constantes de disociación de los grupos carboxílico (pK_{a1}) y amino (pK_{a2}), obteniendo valores de pK_{a1} que oscilan entre 5,60 y 6,50 (para DIF y DAN, respectivamente), y de pK_{a2} entre 7,99 y 9,09 (DIF y SAR, respectivamente). Por tanto, a valores de pH comprendidos entre pK_{a1} y pK_{a2} predomina la especie neutra/zwitteriónica (HQ) mientras que la catiónica (H_2Q^+) y la aniónica (Q^-) son las mayoritarias para valores de $pH < pK_{a1}$ y $pH > pK_{a2}$, respectivamente.
2. Las especies catiónica y neutra/zwitteriónica de estas fluoroquinolonas se pueden distribuir entre agua/octanol, existiendo variaciones importantes para la constante de distribución de la especie neutra (expresada como $\log K_{ow}$) entre estos fármacos, oscilando entre 0,68 (DIF) y -0,94 (MAR); la constante de distribución de la especie catiónica (como $\log K_{D+}$) varía entre -0,83 (DIF) y -1,81 (MAR). Se han obtenido indicios de una posible extracción de la especie aniónica, pero en las condiciones experimentales no se ha obtenido una cantidad apreciable como para poder determinar su constante de equilibrio.
3. Las fluoroquinolonas estudiadas presentan una lipofilidad de baja a moderada: los mayores valores de $\log D$ entre agua/octanol a pH fisiológico se obtienen para DIF y ENR (0,60 y 0,33, respectivamente), mientras que MAR y SAR presentan la menor lipofilidad ($\log D$ de -0,97 y -0,71, respectivamente); la DAN presenta un valor intermedio (-0,30).

De los estudios de sorción de las fluoroquinolonas estudiadas sobre un conjunto de 14 suelos de diferentes características podemos decir que:

4. En todos los casos, los datos experimentales C_s/C_w de las isothermas obtenidas se han podido ajustar al modelo de Freundlich. Los parámetros de este modelo presentan una alta variabilidad dependiendo de la fluoroquinolona y el tipo de suelo. Así, la constante de Freundlich (K_F) oscila entre 50 y 90000, aproximadamente, mientras que el parámetro de linealidad (N) varía entre 0,43 y 1,66.
5. Se ha calculado el coeficiente de distribución para $C_w=0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($\log K_{d 0,1}$) para poder comparar la intensidad de sorción entre los diferentes sistemas estudiados. Los valores mayores de esta magnitud se obtienen en general para el suelo S02, exceptuando la MAR, cuyo valor máximo corresponde al suelo S03.
6. El tratamiento multivariante de los datos experimentales, que incluyen las características de los suelos y los valores de $\log K_{d 0,1}$, mediante análisis por componentes principales (PCA) ha confirmado que la sorción en suelos de las fluoroquinolonas estudiadas se ve favorecida, en general, por la acidez del suelo, su capacidad de intercambio catiónico (CEC), el contenido de carbono orgánico (OC) y por su contenido en partículas de menor diámetro (arcilla). Por tanto, suelos de pH básico, valores bajos de OC y CEC y de textura arenosa presentan baja capacidad de retención de estas fluoroquinolonas.
7. Se han desarrollado modelos de predicción de $\log K_{d 0,1}$ de las diferentes fluoroquinolonas a partir de las características fisicoquímicas de los suelos (pH, CEC, OC y textura). Estos modelos se han obtenido mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR), dando lugar a una buena predicción de la sorción, con errores de predicción en general por debajo de 0,2 unidades de $\log K_{d 0,1}$.

Finalmente, los estudios de sorción de DAN y ENR en Biochar, y en mezclas de éste con los suelos S07 y S12 permiten deducir que:

8. DAN y ENR presentan una elevada sorción en Biochar, especialmente entre el intervalo de pH 2 – 8; en este rango, el valor de logD para estas fluoroquinolonas es mayor que 3,5, siendo el valor máximo de 5,2 para ENR y de 5 para DAN. Las curvas logD/pH indican la sorción en Biochar de las especies catiónica, neutra/zwitteriónica y aniónica de estos fármacos, análogamente a los resultados de la distribución entre agua/octanol.
9. La enmienda de Biochar a los suelos S07 y S12, al 2% y 4% en peso, con objeto de mejorar la capacidad de retención de estas fluoroquinolonas y evitar su dispersión en el medio ambiente, ha dado lugar a resultados dispares, tanto recién preparada como envejecida,: en el suelo S07 (de pH 7,46 , con valores intermedios de CEC, OC y arcilla) la adición de Biochar ha dado lugar a una disminución en la capacidad de sorción de estos fármacos; en cambio, en el suelo S07 (pH 7,9 , de baja CEC, sin OC y arenoso) esta enmienda ha dado lugar a una mejora significativa en la sorción de DAN y ENR, comparada con el suelo original. Por tanto, esta enmienda es adecuada en suelos arenosos y con poca capacidad de sorción, mientras que, en suelos de características intermedias, como el S07, está contraindicada, presumiblemente debido a que el Biochar ocupa los “sites” de sorción de las fluoroquinolonas.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Antibiotics. URL: <https://medlineplus.gov/antibiotics.html> (accessed Jun 22, 2018).
2. Antibiotics: All You Need To Know. URL: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/10278.php> (accessed Jun 22, 2018).
3. Sánchez-B., P.; Muñoz-M., R.; Gutiérrez-M, N. P. Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Spei Domus*. 2012, 8 (17), 31-37.
4. Nicolaou, K. C.; Chen, J. S.; Edmonds, D. J.; Estrada, A. A. Recent Advances in the Chemistry and Biology of Naturally Occurring Antibiotics. *J. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009, 48 (4), 660–719.
5. Etebu, E.; Ariekpar, I. Antibiotics: Classification and Mechanisms of Action with Emphasis on Molecular Perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 4, 90-101.
6. Peach, K. C.; Bray, W. M.; Winslow, D.; Linington, P. F.; Linington, R. G. Mechanism of Action-Based Classification of Antibiotics Using High-Content Bacterial Image Analysis. *J. Mol. Biosyst.* 2013, 9 (7), 1837–1848.
7. Landers, T. F.; Cohen, B.; Wittum, T. E.; Larson, E. L. A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public. Health. J. Rep.* 2012, 127 (1), 4–22.
8. Antimicrobials in Agriculture and the Environment. Reducing Unnecessary Use and Waste. In: Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance. Chaired by J. O'Neill. Mayo 2016. Disponible en: URL: <http://am-rreview.org/>
9. Stokstad, E. L. R.; Jukes, T. H. The Multiple Nature of the Animal Protein Factor. *J. Biol. Chem.* 1949, 180 (2), 647–654.
10. Stokstad, E. L. R.; Jukes, T. H. Further Observations on the “Animal Protein Factor” Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. *J. Biol. Chem.* 1950, 73 (3), 523–528.
11. Boxall, A. B. A.; Fogg, L. A.; Blackwell, P. A.; Kay, P.; Pemberton, E. J.; Croxford, A. Veterinary Medicines in the Environment. *J. Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2004, 180, 1–91.

12. Borràs, S.; Companyó, R.; Granados, M.; Guiteras, J.; Pérez-Vendrell, A. M.; Brufau, J.; Medina, M.; Bosch, J. Analysis of Antimicrobial Agents in Animal Feed. *J. TrAC Trends in Anal. Chem.* 2011, 30 (7), 1042–1064.
13. Kumar, K.; C. Gupta, S.; Chander, Y.; Singh, A. K. Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment. In *Advances in Agronomy*; Academic Press, 2005, 87, 1–54.
14. Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal (Texto pertinente a efectos del EEE); 2003; Vol. 268.
15. Jensen, B. B. The Impact of Feed Additives on the Microbial Ecology of the Gut in Young Pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 1998, 7 (Suppl. 1), 45–64.
16. Errecalde, J. O.; Fao, R. (Italy) D. de P. y S. A. spa. Uso de Antimicrobianos En Animales de Consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. 2004.
17. McManus, P. S. Uso de antibióticos en el control de enfermedades de las plantas. *J. Enf. Infec. y Microbiol.* 1999, 19(4), 192-6.
18. OMS. Uso de los antimicrobianos. Farmacorresistencia. URL: <http://www.who.int/drugresistance/use/es/> (accessed Agosto 04, 2015).
19. European Centre for Disease Prevention and Control ECDC. Surveillance Report. Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012. Stockholm: 2014. URL: <https://ecdc.europa.eu>.
20. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios AEMPS. Notas informativas. Reunión de coordinación del Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos. 2015. URL: https://www.aemps.gob.es/en/informa/notasInformativas/laAEMPS/2015/NIAEMPS_07-2015-reunion-plan-antibioticos-2015.htm (accessed Jun 22, 2018).
21. European Medicines Agency EMA, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption ESVAC. Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012. Fourth ESVAC Report. 128. 2014.
22. Vílchez, J. L.; Navalón, A.; Araujo, L.; Prieto, A. Determination of Danofloxacin and Marbofloxacin in Milk Samples by Micellar Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Anal. Lett.* 2007, 40 (3), 601–613.

23. Martinez-Porchas, M.; Martinez-Cordova, L. R. World Aquaculture: Environmental Impacts and Troubleshooting Alternatives. *Sci. World J.* 2012, 2012, 9.
24. U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States Report. 2013. Antibiotic/Antimicrobial Resistance. URL: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html> (accessed Jun 22, 2018).
25. Inglis, V. Antibacterial Chemotherapy in Aquaculture: Review of Practice, Associated Risks and Need for Action; In: J. R. Arthur, C. R. Lavilla-Pitogo, & R. P. Subasinghe (Eds.) *Use of Chemicals in Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines* (pp. 7-22). Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center SEAFDEC. 2000, 7–22.
26. Aminov, R. I. Minireview. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *J. Environ. Microbiol.*, 2009, 11(12), 2970–2988.
27. Tenover, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American J. Med.* 2006, 119 (6), S3–S10.
28. Martín, J.; Camacho-Muñoz, M. A. D.; Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Distribution and Temporal Evolution of Pharmaceutically Active Compounds alongside Sewage Sludge Treatment. Risk Assessment of Sludge Application onto Soils. *J. Environ. Manage.*, 2012, 102, 18–25.
29. Herrera-Herrera, A. V.; Hernández-Borges, J.; Borges-Miquel, T. M.; Rodríguez-Delgado, M. Á. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with Ultra-High Performance Liquid Chromatography for the Simultaneous Determination of 25 Sulfonamide and Quinolone Antibiotics in Water Samples. *J. Pharm. & Biomedic. Analys.* 2013, 75, 130–137.
30. Hughes, S. R.; Kay, P.; Brown, L. E. Global Synthesis and Critical Evaluation of Pharmaceutical Data Sets Collected from River Systems. *J. Environ. Sci. Technol.* 2013, 47 (2), 661–677.
31. Tadeo, J. L.; Sánchez Brunete, C.; Albero, B.; García Valcárcel, A. I.; Pérez. R. A. Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples. *Cent. Eur. J. Chem.* 2012, 10(3), 480-520.

32. Shi, Y.; Gao, L.; Li, W.; Liu, J.; Cai, Y. Investigation of Fluoroquinolones, Sulfonamides and Macrolides in Long-Term Wastewater Irrigation Soil in Tianjin, China. *Bulletin of Environ. Cont. & Toxicol.* 2012, 89 (4), 857–861.
33. Li, W.; Shi, Y.; Gao, L.; Liu, J.; Cai, Y. Occurrence of Antibiotics in Water, Sediments, Aquatic Plants, and Animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosph.* 2012, 89 (11), 1307–1315.
34. Gottschall, N.; Topp, E.; Metcalfe, C.; Edwards, M.; Payne, M.; Kleywegt, S.; Russell, P.; Lapen, D. R. Pharmaceutical and Personal Care Products in Groundwater, Subsurface Drainage, Soil, and Wheat Grain, Following a High Single Application of Municipal Biosolids to a Field. *Chemosph.* 2012, 87 (2), 194–203.
35. Gao, L.; Shi, Y.; Li, W.; Niu, H.; Liu, J.; Cai, Y. Occurrence of Antibiotics in Eight Sewage Treatment Plants in Beijing, China. *Chemosph.* 2012, 86 (6), 665–671.
36. Zhou, L.-J.; Ying, G.-G.; Liu, S.; Zhao, J.-L.; Chen, F.; Zhang, R.-Q.; Peng, F.-Q.; Zhang, Q.-Q. Simultaneous Determination of Human and Veterinary Antibiotics in Various Environmental Matrices by Rapid Resolution Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2012, 1244, 123–138.
37. Jia, A.; Wan, Y.; Xiao, Y.; Hu, J. Occurrence and Fate of Quinolone and Fluoroquinolone Antibiotics in a Municipal Sewage Treatment Plant. *J. Water Res.* 2012, 46 (2), 387–394.
38. Kim, K.-R.; Owens, G.; Kwon, S.-I.; So, K.-H.; Lee, D.-B.; Ok, Y. S. Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *J. Water, Air, & Soil Poll.*, 2011, 214 (1–4), 163–174.
39. Chen, Y.; Zhang, H.; Luo, Y.; Song, J. Occurrence and Dissipation of Veterinary Antibiotics in Two Typical Swine Wastewater Treatment Systems in East China. *J. Environ. Monit. Assess.* 2012, 184 (4), 2205–2217.
40. Zhou, X.; Chen, C.; Yue, L.; Sun, Y.; Ding, H.; Liu, Y. Excretion of Enrofloxacin in Pigs and Its Effect on Ecological Environment. *J. Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2008, 26 (3), 272–277.
41. Kim, S.-C.; Carlson, K. Temporal and Spatial Trends in the Occurrence of Human and Veterinary Antibiotics in Aqueous and River Sediment Matrices. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41 (1), 50–57.

42. Kümmerer, K. Pharmaceuticals in the Environment. *Annual Review of Environment and Resources* 2010, 35 (1), 57–75.
43. Speltini, A.; Sturini, M.; Maraschi, F.; Profumo, A. Fluoroquinolone Antibiotics in Environmental Waters: Sample Preparation and Determination. *J. Separation Sci.* 2010, 33 (8), 1115–1131.
44. Kümmerer, K. Antibiotics in the Aquatic Environment--a Review--Part I. *Chemosph.* 2009, 75 (4), 417–434.
45. Kümmerer, K. Antibiotics in the Aquatic Environment--a Review--Part II. *Chemosph.* 2009, 75 (4), 435–441.
46. Zhou, J.; Xue, X.; Chen, F.; Zhang, J.; Li, Y.; Wu, L.; Chen, L.; Zhao, J. Simultaneous Determination of Seven Fluoroquinolones in Royal Jelly by Ultrasonic-Assisted Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Sep. Sci.* 2009, 32 (7), 955–964.
47. Gao, Y.; Sun, X.; Sun, Z.; Zhao, N.; Li, Y. Toxic Effects of Enrofloxacin on Growth Rate and Catalase Activity in *Eisenia Fetida*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2008, 26 (2), 177–180.
48. Kemper, N. Veterinary Antibiotics in the Aquatic and Terrestrial Environment. *Ecolog. Indicat.* 2008, 8 (1), 1–13.
49. Boxall, A. B. A.; Johnson, P.; Smith, E. J.; Sinclair, C. J.; Stutt, E.; Levy, L. S. Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (6), 2288–2297.
50. Park, H.-R.; Kim, T. H.; Bark, K.-M. Physicochemical Properties of Quinolone Antibiotics in Various Environments. *Eur. J. Med. Chem.* 2002, 37 (6), 443–460.
51. Daughton, C. G.; Ternes, T. A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environ. Health Perspect.* 1999, 107 (Suppl 6), 907–938.
52. Segura, P. A.; François, M.; Gagnon, C.; Sauvé, S. Review of the Occurrence of Anti-Infectives in Contaminated Wastewaters and Natural and Drinking Waters. *Environ. Health Perspect.* 2009, 117 (5), 675–684.
53. Boxall, A. B. A.; Blackwell, P.; Cavallo, R.; Kay, P.; Tolls, J. The Sorption and Transport of a Sulphonamide Antibiotic in Soil Systems. *Toxicol. Lett.* 2002, 131 (1–2), 19–28.

54. Halling-Sørensen, B.; Nors Nielsen, S.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Holten Lützhøft, H. C.; Jørgensen, S. E. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment--a Review. *Chemosph.* 1998, 36 (2), 357–393.
55. Boxall, A. B. A.; Kolpin, D. W.; Halling-Sørensen, B.; Tolls, J. Peer Reviewed: Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks? *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37 (15), 286A-294A.
56. Lindberg, R. H.; Wennberg, P.; Johansson, M. I.; Tysklind, M.; Andersson, B. A. V. Screening of Human Antibiotic Substances and Determination of Weekly Mass Flows in Five Sewage Treatment Plants in Sweden. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39 (10), 3421–3429.
57. Baguer, A. J.; Jensen, J.; Krogh, P. H. Effects of the Antibiotics Oxytetracycline and Tylosin on Soil Fauna. *Chemosph.* 2000, 40 (7), 751–757.
58. Tolls, J. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35 (17), 3397–3406.
59. Berger, K.; Bonn U.; Germany, P.; Petersen, B.; Buening-Pfaue, H. Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food chain. *Archiv fuer Lebensmittelhygiene. Germany, F.R.* 1986.
60. de la Torre, A.; Iglesias, I.; Carballo, M.; Ramírez, P.; Muñoz, M. J. An Approach for Mapping the Vulnerability of European Union Soils to Antibiotic Contamination. *Sci. Total Environ.* 2012, 414, 672–679.
61. Stumpf, M.; Ternes, T. A.; Wilken, R. D.; Rodrigues, S. V.; Baumann, W. Polar Drug Residues in Sewage and Natural Waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.* 1999, 225 (1–2), 135–141.
62. Heberer, T. Occurrence, Fate, and Removal of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment: A Review of Recent Research Data. *Toxicol. Lett.* 2002, 131 (1–2), 5–17.
63. Heberer, T. Tracking Persistent Pharmaceutical Residues from Municipal Sewage to Drinking Water. *J. Hydrology* 2002, 266 (3), 175–189.
64. R. Alexy, K. Kummerer. Organic pollutants in the water cycle: properties, occurrence, analysis and environmental relevance of polar compounds. Thorsten Reemtsma MJ, editor. Weinheim, Chichester: Wiley-VCH; 2006.

65. Minh, T. B.; Leung, H. W.; Loi, I. H.; Chan, W. H.; So, M. K.; Mao, J. Q.; Choi, D.; Lam, J. C. W.; Zheng, G.; Martin, M.; et al. Antibiotics in the Hong Kong Metropolitan Area: Ubiquitous Distribution and Fate in Victoria Harbour. *Mar. Pollut. Bull.* 2009, 58 (7), 1052–1062.
66. Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Kolpin, D. W.; Costanzo, S. D. The Occurrence of Antibiotics in an Urban Watershed: From Wastewater to Drinking Water. *Sci. Total Environ.* 2009, 407 (8), 2711–2723.
67. Golet, E. M.; Alder, A. C.; Giger, W. Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36 (17), 3645–3651.
68. Kümmerer, K. Significance of Antibiotics in the Environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 52 (1), 5–7.
69. Ye, Z.; Weinberg, H. S.; Meyer, M. T. Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated Drinking Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2007, 79 (3), 1135–1144.
70. Stockewell, V. O.; Duffy, B. Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev. Sci. Tech.* 2012, 31(1), 199-210.
71. Velagaleti, R.; Burns, P. K.; Gill, M.; Prothro, J. Impact of Current Good Manufacturing Practices and Emission Regulations and Guidances on the Discharge of Pharmaceutical Chemicals into the Environment from Manufacturing, Use, and Disposal. *Environ. Health Perspect.* 2002, 110 (3), 213–220.
72. Li, X.-W.; Xie, Y.-F.; Li, C.-L.; Zhao, H.-N.; Zhao, H.; Wang, N.; Wang, J.-F. Investigation of Residual Fluoroquinolones in a Soil–Vegetable System in an Intensive Vegetable Cultivation Area in Northern China. *Sci. Total Environ.* 2014, 468–469, 258–264.
73. Gajda, A.; Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Gbylik, M.; Bladek, T. Determination of (Fluoro) Quinolones in Eggs by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Confirmation by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem.* 2012, 135 (2), 430–439.

74. Ribeiro, C. C.; Orlando, R. M.; Rohwedder, J. J. R.; Reyes, F. G. R.; Rath, S. Electric Field-Assisted Solid Phase Extraction and Cleanup of Ionic Compounds in Complex Food Matrices: Fluoroquinolones in Eggs. *Talanta* 2016, 152, 498–503.
75. Liu, F.; Ying, G.-G.; Tao, R.; Zhao, J.-L.; Yang, J.-F.; Zhao, L.-F. Effects of Six Selected Antibiotics on Plant Growth and Soil Microbial and Enzymatic Activities. *Environ. Pollut.* 2009, 157 (5), 1636–1642.
76. Thiele-Bruhn, S.; Beck, I.-C. Effects of Sulfonamide and Tetracycline Antibiotics on Soil Microbial Activity and Microbial Biomass. *Chemosph.* 2005, 59 (4), 457–465.
77. Westergaard, K.; Müller, A. K.; Christensen, S.; Bloem, J.; Sørensen, S. J. Effects of Tylosin as a Disturbance on the Soil Microbial Community. *Soil Biol. & Biochem.* 2001, 33 (15), 2061–2071.
78. Schmitt, H.; van Beelen, P.; Tolls, J.; van Leeuwen, C. L. Pollution-Induced Community Tolerance of Soil Microbial Communities Caused by the Antibiotic Sulfachloropyridazine. *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38 (4), 1148–1153.
79. World Health Organization WHO. Anti-Infective Drug Resistance Surveillance and Containment Team. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance: executive summary. 2001. Geneva. <http://www.who.int/iris/handle/10665/66872> (accessed Jun 22, 2018).
80. AEMPS Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Plan Estratégico y de Acción para Reducir el Riesgo de Selección y Diseminación de Resistencias a los Antibióticos. 2014. Edita y distribuye: AEMPS. URL <http://www.aemps.gob.es>. Fecha de publicación en www.aemps.gob.es: 27 de noviembre de 2014.
81. Soni, K. Fluoroquinolones: Chemistry & Action – A Review. *Indo Global J. Pharm. Sci.* 2012, 2(1), 43-53.
82. Sheehan, G.; Chew, N. S. Y. The History of Quinolones. In *Fluoroquinolone Antibiotics; Milestones in Drug Therapy*; Birkhäuser, Basel, 2003, 1–10.
83. Azanza, J. R.; Quetglas, E. G.; Sádaba, B.; Gómez-Giu, A. Tenofovir: farmacología e interacciones. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2008, 2–6.
84. Pintilie, L. Chapter 12: Quinolones: Synthesis and Antibacterial Activity. In: *Antimicrobial Agents*. Edited by Varaprasad Bobbarala. 2012.

85. Andriole, V. T. (Editor). *The Quinolones*. Third Edition. Academic Press. 2000.
URL: <https://www.elsevier.com/books/the-quinolones/andriole/978-0-12-059517-4> (accessed Jun 22, 2018).
86. Belal, F.; Al-Majed, A. A.; Al-Obaid, A. M. Methods of Analysis of 4-Quinolone Antibacterials. *Talanta* 1999, 50 (4), 765–786.
87. Rothlin, R. P. Quinolonas: revision historica. *Medicina (B.Aires)* 1999, 59 (supl.1), 3–7.
88. Oliphant, C. M.; Green, G. M. Quinolones: A Comprehensive Review. *Am. Fam. Physician* 2002, 65 (3), 455–464.
89. King, D. E.; Malone, R.; Lilley, S. H. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *Am. Fam. Physician* 2000, 61 (9), 2741–2748.
90. Zhanel, G. G.; Walkty, A.; Vercaigne, L.; Karlowsky, J. A.; Embil, J.; Gin, A. S.; Hoban, D. J. The New Fluoroquinolones: A Critical Review. *Can. J. Infect. Dis.* 1999, 10 (3), 207–238.
91. Sharma, P. C.; Jain, A.; Jain, S. Fluoroquinolone Antibacterials: A review on Chemistry, Microbiology and Therapeutic Prospects. *Acta Pol. Pharm.* 2009, 66(6), 587-604.
92. Uivarosi, V. Metal Complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications: An Update. *Molecules* 2013, 18 (9), 11153–11197.
93. Ball, P. Quinolone Generations: Natural History or Natural Selection? *J Antimicrob. Chemother.* 2000, 46 (suppl_3), 17–24.
94. Mitscher, L. A.; Ma, Z. Structure-activity relationships of quinolones. In: Ronald A.R., Low D.E. (eds) *Fluoroquinolone Antibiotics. Milestones in Drug Therapy*. Birkhäuser, Basel 2003, 11–48.
95. Turel, I. The Interactions of Metal Ions with Quinolone Antibacterial Agents. *Coordin. Chem. Reviews* 2002, 232 (1), 27–47.
96. Alós, J.-I. Quinolonas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2003; 21(5), 261–268.
97. Fernandes, P. B. Mode of Action, and In Vitro and In Vivo Activities of the Fluoroquinolones. *The J. Clinic. Pharmacol.* 28 (2), 156–168.
98. Domagala, J. M.; Hanna, L. D.; Heifetz, C. L.; Hutt, M. P.; Mich, T. F.; Sanchez, J. P.; Solomon, M. New Structure-Activity Relationships of the Quinolone Antibacterials Using the Target Enzyme. The Development and Application of a DNA Gyrase Assay. *J. Med. Chem.* 1986, 29 (3), 394–404.

99. Drlica, K.; Zhao, X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997, 61 (3), 377–392.
100. Blondeau, J. M. Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance. *Surv. Ophthalmol.* 2004, 49 (Suppl_2), S73-78.
101. Maxwell, A. The Molecular Basis of Quinolone Action. *J. Antimicrob. Chemother.* 1992, 30 (4), 409–414.
102. Schaumann, R.; Rodloff, A. C. Activities of Quinolones Against Obligately Anaerobic Bacteria. *Ingenta Connect*. URL: <http://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/aiamc/2007/00000006/00000001/art00004?crawler=true> (accessed Jun 22, 2018).
103. Peterson, L. R. Quinolone Molecular Structure-Activity Relationships: What We Have Learned about Improving Antimicrobial Activity. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33 (Suppl_3), S180-186.
104. Cozzarelli, N. R. DNA Gyrase and the Supercoiling of DNA. *Sci.* 1980, 207 (4434), 953–960.
105. Mitscher, L. A. Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chem. Rev.* 2005, 105 (2), 559–592.
106. Shen, L. L.; Chu, D. T. W. Type II DNA topoisomerases as antibacterial targets. *Curr. Pharm. Des.* 1996, 2, 195–208.
107. Guerrini, V.; De Rosa, M.; Pasquini, S.; Mugnaini, C.; Brizzi, A.; Cuppone, A. M.; Pozzi, G.; Corelli, F. New Fluoroquinolones Active against Fluoroquinolones-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains. *Tuberculosis (Edin)* 2013, 93 (4), 405–411.
108. Hooper, D. C. Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 31 (Suppl_2), S24-28.
109. Ho, P.-L.; Cheng, V. C. C. Epidemiology and Mechanisms of Resistance. In *Fluoroquinolone Antibiotics; Milestones in Drug Therapy*; Birkhäuser, Basel, 2003, 49–71.
110. Sukul, P.; Spitteller, M. Fluoroquinolone Antibiotics in the Environment. *Rev Environ. Contam. Toxicol.* 2007, 191, 131–162.

111. Halling-Sørensen, B.; Sengeløv, G.; Ingerslev, F.; Jensen, L. B. Reduced Antimicrobial Potencies of Oxytetracycline, Tylosin, Sulfadiazin, Streptomycin, Ciprofloxacin, and Olaquinox Due to Environmental Processes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2003, 44 (1), 7–16.
112. European Food Safety Authority EFSA, European Centre for Disease Prevention and Control ECDC. Scientific report. 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. URL: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4036> (accessed Jun 22, 2018).
113. Junta de Andalucía. Programa del Servicio Andaluz de Salud dirigido por la Escuela Andaluza de Salud Pública. *Boletín terapéutico Andaluz.* 1999, 15(2).
114. Sigma Aldrich. SDS Search and Product Safety Center. URL: <https://www.sigmaldrich.com/safety-center.html>
115. ChemSpider. Base de Datos de Estructuras Químicas. URL: <http://www.chemspider.com>
116. Marengo, J. R.; Kok, R. A.; O'Brien, K.; Velagaleti, R. R.; Stamm, J. M. Aerobic Biodegradation of (14C)-Sarafloxacin Hydrochloride in Soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 1997, 16 (3), 462–471.
117. Alexy, R.; Kümpel, T.; Kümmerer, K. Assessment of Degradation of 18 Antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosph.* 2004, 57 (6), 505–512.
118. Díaz-Cruz, M. S.; López de Alda, M. J.; Barceló, D. Environmental Behavior and Analysis of Veterinary and Human Drugs in Soils, Sediments and Sludge. *TrAC Trends in Anal. Chem.* 2003, 22 (6), 340–351.
119. Bai, A.; Meng, W.; Xu, J.; Zhang, Y.; Guo, C. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Liao River Basin in China. *Environ. Sci. Processes Impacts* 2014, 16, 586.
120. Gao, L.; Shi, Y.; Li, W.; Liu, J.; Cai, Y. Occurrence, Distribution and Bioaccumulation of Antibiotics in the Haihe River in China. *J. Environ. Monit.* 2012, 14 (4), 1248–1255.
121. Zhang, Z.; Liu, J.; Feng, T.; Yao, Y.; Gao, L.; Jiang, G. Time-Resolved Fluoroimmunoassay as an Advantageous Analytical Method for Assessing the Total Concentration and Environmental Risk of Fluoroquinolones in Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47 (1), 454–462.

122. Sim, W.-J.; Lee, J.-W.; Lee, E.-S.; Shin, S.-K.; Hwang, S.-R.; Oh, J.-E. Occurrence and Distribution of Pharmaceuticals in Wastewater from Households, Livestock Farms, Hospitals and Pharmaceutical Manufactures. *Chemosph.* 2011, 82 (2), 179–186.
123. Verlicchi, P.; Al Aukidy, M.; Galletti, A.; Petrovic, M.; Barceló, D. Hospital Effluent: Investigation of the Concentrations and Distribution of Pharmaceuticals and Environmental Risk Assessment. *Sci. Total Environ.* 2012, 430, 109–118.
124. Chen, Y.; Rosazza, J. P.; Reese, C. P.; Chang, H. Y.; Nowakowski, M. A.; Kiplinger, J. P. Microbial Models of Soil Metabolism: Biotransformations of Danofloxacin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1997, 19 (5–6), 378–384.
125. Marengo, J. R.; Kok, R. A., Burrows, L. A. Biodegradation of C14-Sarafloxacin Hydrochloride, A Fluoroquinolone Antimicrobial by Phanerochaete Chrysosporium. *J. Sci. Ind. Res.* 2001, 60, 121-130.
126. Rosendahl, I.; Siemens, J.; Kindler, R.; Groeneweg, J.; Zimmermann, J.; Czerwinski, S.; Lamshöft, M.; Laabs, V.; Wilke, B.-M.; Vereecken, H.; et al. Persistence of the Fluoroquinolone Antibiotic Difloxacin in Soil and Lacking Effects on Nitrogen Turnover. *J. Environ. Qual.* 2012, 41 (4), 1275–1283.
127. Lutgens, F. K.; Tarbucks, E. J. *Ciencias de la Tierra. Una introducción a la Geología Física. Volumen II. 8a edición.* 2005.
128. Pierzynski, G. M.; Vance, G. F.; Sims, J. T. *Soils and Environmental Quality, Second Edition;* CRC Press: Boca Raton, 2000.
129. Manahan, S. E. *Environmental Chemistry, Seventh Edition;* Taylor & Francis, 1999.
130. Blondeau, J. M. Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance. *Survey of Ophthalmology* 2004, 49 (2, Suppl_2), S73–S78.
131. Singer, M. J.; Munns, D. N. *Soils: An Introduction, 5th ed.;* Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, 2002.
132. Soil Science Society of America. *Soils.* URL: <https://www.soils.org/> (accessed Julio 14, 2015).

133. United States Department of Agriculture USDA. Soil Taxonomy. NRCS Soils. 1999. URL: <https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/main/soils/survey/class/taxonomy/> (accessed Jun 22, 2018).
134. Porta Casanellas, J.; López-Acevedo R. M.; de Laburu, R. C. Edafología para la Agricultura y el Medio Ambiente. Madrid: Mundi-Prensa; 1994.
135. Horton, R.; Horn, R.; Bachmann, J.; Peth, S., Eds. Essential Soil Physics: An Introduction to Soil Processes, Functions, Structure and Mechanics; CSIRO Publishing: Stuttgart, 2016.
136. Bohn, H. L.; Myer, R. A.; O'Connor, G. A. Soil Chemistry, 3rd Edition; Wiley. New York, 2001.
137. Brady, N. C. The Nature and Properties of Soils; Macmillan Publishing Company Incorporated, 1990.
138. R. Hernández Gil. Fisiología Vegetal, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes - Mérida – Venezuela e-mail: rubenhg@ula.ve Revisado: 07 de abril de 2005. Bioenergética - Botánica - Ecofisiología. URL: <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/ecofisiologia> (accessed Julio 21, 2015).
139. Essington, M. E. Soil and Water Chemistry: An Integrative Approach, 1 edition.; CRC Press: Boca Raton, 2003.
140. Sposito, G. The Chemistry of Soils, 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford; New York, 2008.
141. Fish, H.; Hewitt, C. N. Understanding Our Environment: An Introduction to Environmental Chemistry and Pollution, Third edition. Harrison, R. M., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 1999.
142. Evangelou, V. P. Environmental Soil and Water Chemistry: Principles and Applications, 1 edition.; Wiley-Interscience: New York, 1998.
143. Hillel, D. Introduction to Environmental Soil Physics, 1 edition.; Academic Press: Amsterdam; Boston, 2003.
144. Mulder, J.; Cresser, M. S. 5 Soil and Soil Solution Chemistry. Cap 5. Soil and soil solution chemistry. Biogeochemistry of Small Catchments: A Tool for Environmental Research Edited by B. Moldan and J. Cerny. Published by John Wiley & Sons Ltd. 1994.

145. Scalenghe, R. Soils: Basic Concepts and Future Challenges edited by Giacomo Certini. Cambridge University Press. 2006.
146. United State Department of Agriculture USDA. Soil Education. NRCS Soils Horizontes del suelo. URL: <https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/edu/>. Accesado en Agosto 17, 2015.
147. Hemond, H. F.; Fechner, E. J. Chemical Fate and Transport in the Environment, Second Edition; Academic Press: San Diego, 1999.
148. Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental Health Sciences, 1 edition.; Mackay, D., Boethling, R. S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2000.
149. Pignatello, J. J. Dynamic Interactions of Natural Organic Matter and Organic Compounds. J. Soils Sediments 2012, 12 (8), 1241–1256.
150. Schwarzenbach, R. P.; Gschwend, P. M.; Imboden, D. M. Environmental Organic Chemistry, Edición: 2nd Revised edition.; John Wiley & Sons Inc: New York, 2002.
151. Chiou, C. T.; Kile, D. E.; U. S. Department of the Interior. U. S. Geological Survey. Contaminant Sorption by Soil and Bed Sediment; Is There a Difference? Fact Sheet; USGS Numbered Series 087–00; U.S. Geological Survey, 2000.
152. Drillia, P.; Stamatelatu, K.; Lyberatos, G. Fate and Mobility of Pharmaceuticals in Solid Matrices. Chemosph. 2005, 60 (8), 1034–1044.
153. Boxall, A. B. A. Organisation for Economic Cooperation and Development OECD. New and Emerging Water Pollutants Arising from Agriculture. Report 2012.
154. Bourdeau, P., Haines, J. A., Klein, W., Murti, C. R. K., Eds. Ecotoxicology and Climate: With Special Reference to Hot and Cold Climates. 1 edition. Wiley: Chichester England; New York, 1989.
155. Kassim, T. A.; Simoneit, B. R. T., (Editors). Pollutant-Solid Phase Interactions Mechanisms, Chemistry and Modeling. In: Water Pollution. Environmental Impact Assessment of Recycled Wastes on Surface and Ground Waters; Risk Analysis. Part of the The Handbook of Environmental Chemistry book series (HEC, volume 2). Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2001.

156. US Environmental Protection Agency, EPA. Reinbold, K. A.; Hassett, J. J.; Means, J. C.; Banwart, W. L. (Editors). Adsorption of Energy-Related Organic Pollutants: A Literature Review. 1979.
157. Chiou, C. T. Partition and Adsorption of Organic Contaminants in Environmental Systems, 1 edition.; Wiley-Interscience: Hoboken, N.J, 2002.
158. Chiou, C. T.; McGroddy, S. E.; Kile, D. E. Partition Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Soils and Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 1998, 32 (2), 264–269.
159. von Oepen, B.; Kördel, W.; Klein, W. Sorption of Nonpolar and Polar Compounds to Soils: Processes, Measurements and Experience with the Applicability of the Modified OECD-Guideline 106. *Chemosph.* 1991, 22 (3), 285–304.
160. Tolls, J. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35 (17), 3397–3406.
161. Organisation for Economic Co-operation and Development OECD. Test No. 312: Leaching in Soil Columns. 1999. URL: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-312-leaching-in-soil-columns_9789264070561-en (accessed Jun 23, 2018).
162. Organisation for Economic Co-operation and Development OECD. Test No. 106: Adsorption -- Desorption Using a Batch Equilibrium Method. 1999. URL: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-106-adsorption-desorption-using-a-batch-equilibrium-method_9789264069602-en (accessed Jun 23, 2018).
163. United States Environmental Protection Agency US EPA. Office of Air and Radiation. EPA 402-R-99-004^a. Understanding Variation in Partition Coefficient, K_d, values. Volume I: The K_d Model, Methods of Measurement, and Application of Chemical Reaction Codes. 1999. URL: <https://www.epa.gov/radiation/understanding-variation-partition-coefficient-kd-values> (accessed Jun 23, 2018).
164. Von Oepen, B.; Kördel, W.; Klein, W. Soil Preparation for the Estimation of Adsorption Coefficients (K_{oc}) of Organic Chemicals. *Chemosph.* 1989, 18 (7), 1495–1511.
165. Giles, C. H.; Smith, D.; Huitson, A. A General Treatment and Classification of the Solute Adsorption Isotherm. I. Theoretical. *J. Colloid and Interface Sci.* 1974, 47 (3), 755–765.

166. Hinz, C. Description of Sorption Data with Isotherm Equations. *Geoderma* 2001, 99 (3), 225–243.
167. Huang, W.; Weber, W. J. A Distributed Reactivity Model for Sorption by Soils and Sediments. 10. Relationships between Desorption, Hysteresis, and the Chemical Characteristics of Organic Domains. *J. Environ. Sci. Technol.* 1997, 31 (9), 2562–2569.
168. Jantunen, A. P. K.; Koelmans, A. A.; Jonker, M. T. O. Modeling Polychlorinated Biphenyl Sorption Isotherms for Soot and Coal. *J. Environ. Pollut.* 2010, 158 (8), 2672–2678.
169. Kinniburgh, D. G. General Purpose Adsorption Isotherms. *J. Environ. Sci. Technol.* 1986, 20 (9), 895–904.
170. Voice, T. C.; Weber, W. J. Sorption of Hydrophobic Compounds by Sediments, Soils and Suspended Solids—I. Theory and Background. *J. Water Research* 1983, 17 (10), 1433–1441.
171. Hamdaoui, O.; Naffrechoux, E. Modeling of Adsorption Isotherms of Phenol and Chlorophenols onto Granular Activated Carbon. Part I. Two-Parameter Models and Equations Allowing Determination of Thermodynamic Parameters. *J. Hazard. Mater.* 2007, 147 (1–2), 381–394.
172. International Biochar Initiative IBI. Biochar. URL: <http://www.biochar-international.org/biochar>. Consultado en abril 20, 2018.
173. Lehmann, J., Joseph, S., (Editors). *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*, 1 edition. Earthscan Publications Ltd. London; Sterling, VA, 2009.
174. Sohi, S.; Loez-Capel, E.; Krull, E.; Bol, R. Biochar's Roles in Soil and Climate Change: A Review of Research Needs. CSIRO Land and Water Science Report 2009, 5 (09), 1–57.
175. Demirbas, A.; Arin, G. An Overview of Biomass Pyrolysis. *J. Energ. Sourc.* 2002, 24 (5), 471–482.
176. Sluiter, A. Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005. Technical Report 2008, 12.
177. Jahirul, M. I.; Rasul, M. G.; Chowdhury, A. A.; Ashwath, N. Biofuels Production through Biomass Pyrolysis —A Technological Review. *J. Energies* 2012, 5 (12), 4952–5001.

178. Tustin, J., (Editor). The International Energy Agency IEA. Bioenergy Annual Report 2006. IEA Bioenergy Secretary, Rotorua, New Zealand. URL: <https://nachhaltigwirtschaften.at/en/iea/publications/iea-bioenergy-annual-report-2006.php> (accessed April 20, 2018).
179. Bird, M. I.; Ascough, P. L.; Young, I. M.; Wood, C. V.; Scott, A. C. X-Ray Microtomographic Imaging of Charcoal. *J. Archaeological Sci.* 2008, 35 (10), 2698–2706.
180. Puri, B. R.; Jr. Walker, P. L., (Editors). *Chemistry and Physics of Carbon. A Series of Advances.* Marcel Dekker Inc., 1970, 6, 191-282.
181. Leon Leon, C. A.; Radovic, L. R.; M. Dekker (Editor). *Chemistry and Physics of Carbon.* New York. 1992.
182. Kwapinski, W.; Byrne, C. M. P.; Kryachko, E.; Wolfram, P.; Adley, C.; Leahy, J. J.; Novotny, E. H.; Hayes, M. H. B. Biochar from Biomass and Waste. *J. Waste and Biomass Valorization* 2010, 1 (2), 177–189.
183. Prakongkep, N.; Gilkes, R. J.; Wiriyakitnateekul, W.; Duangchan, A.; Darunsontaya, T. The Effects of Pyrolysis Conditions on the Chemical and Physical Properties of Rice Husk Biochar. *Inter. J. Material Sci.* 2013, 3 (3), 97-103.
184. Kloss, S.; Zehetner, F.; Dellantonio, A.; Hamid, R.; Ottner, F.; Liedtke, V.; Schwanninger, M.; Gerzabek, M. H.; Soja, G. Characterization of Slow Pyrolysis Biochars: Effects of Feedstocks and Pyrolysis Temperature on Biochar Properties. *J. Environ. Qual.* 2012, 41 (4), 990–1000.
185. Khanmohammadi, Z.; Afyuni, M.; Mosaddeghi, M. R. Effect of Pyrolysis Temperature on Chemical and Physical Properties of Sewage Sludge Biochar. *J. Waste Manag. Res.* 2015, 33 (3), 275–283.
186. Wang, X.; Zhou, W.; Liang, G.; Song, D.; Zhang, X. Characteristics of Maize Biochar with Different Pyrolysis Temperatures and Its Effects on Organic Carbon, Nitrogen and Enzymatic Activities after Addition to Fluvo-Aquic Soil. *J. Sci. Total Environ.* 2015, 538, 137–144.
187. Kambo, H. S.; Dutta, A. A Comparative Review of Biochar and Hydrochar in Terms of Production, Physico-Chemical Properties and Applications. *J. Renewable & Sustainable Energ. Reviews* 2015, 45, 359–378.

188. Demirbas, A. Effects of Temperature and Particle Size on Bio-Char Yield from Pyrolysis of Agricultural Residues. *J. Anal. & Appl. Pyrolysis* 2004, 2 (72), 243–248.
189. Purakayastha, T. J.; Das, K. C.; Gaskin, J.; Harris, K.; Smith, J. L.; Kumari, S. Effect of Pyrolysis Temperatures on Stability and Priming Effects of C3 and C4 Biochars Applied to Two Different Soils. *J. Soil & Tillage Resear.* 2016, 155, 107–115.
190. Chun, Y.; Sheng, G.; Chiou, C. T.; Xing, B. Compositions and Sorptive Properties of Crop Residue-Derived Chars. *J. Environ. Sci. Technol.* 2004, 38 (17), 4649–4655.
191. Jeong, C. Y.; Dodla, S. K.; Wang, J. J. Fundamental and Molecular Composition Characteristics of Biochars Produced from Sugarcane and Rice Crop Residues and By-Products. *Chemosph.* 2016, 142, 4–13.
192. Sun, K.; Kang, M.; Ro, K. S.; Libra, J. A.; Zhao, Y.; Xing, B. Variation in Sorption of Propiconazole with Biochars: The Effect of Temperature, Mineral, Molecular Structure, and Nano-Porosity. *Chemosph.* 2016, 142, 56–63.
193. Keiluweit, M.; Nico, P. S.; Johnson, M. G.; Kleber, M. Dynamic Molecular Structure of Plant Biomass-Derived Black Carbon (Biochar). *J. Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 (4), 1247–1253.
194. Schmidt, M. W. I.; Noack, A. G. Black Carbon in Soils and Sediments: Analysis, Distribution, Implications, and Current Challenges. *J. Global Biogeochem. Cycles* 2000, 14 (3), 777–793.
195. Qadeer, R.; Hanif, J.; Saleem, M.; Afzal, M. Characterization of activated-charcoal. *J Chem. Soc. Pak.* 1994, 16(4), 229-35.
196. Mochidzuki, K.; Soutric, F.; Tadokoro, K.; Antal, M. J.; Tóth, M.; Zelei, B.; Várhegyi, G. Electrical and Physical Properties of Carbonized Charcoals. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* 2003, 42 (21), 5140–5151.
197. Zawadzki, J.; Wisniewski, M. ¹³C NMR Study of Cellulose Thermal Treatment. *J. Anal. & Appl. Pyrolysis* 2002, 62 (1), 111–121.
198. Brennan, J. K.; Bandosz, T. J.; Thomson, K. T.; Gubbins, K. E. Water in Porous Carbons. *J. Colloids & Surfaces A: Physicochem. & Eng. Aspects* 2001, 187–188, 539–568.

199. Bourke, J.; Manley-Harris, M.; Fushimi, C.; Dowaki, K.; Nunoura, T.; Antal, M. J. Do All Carbonized Charcoals Have the Same Chemical Structure? 2. A Model of the Chemical Structure of Carbonized Charcoal. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* 2007, 46 (18), 5954–5967.
200. Amonette, J. E.; Joseph, S. Lehmann, J.; Joseph, S. (Editors). Characteristics of Biochar: microchemical properties. In: *Biochar for environmental management: science and technology*. Taylor & Francis. 2009.
201. Ippolito, J. A.; Laird, D. A.; Busscher, W. J. Environmental Benefits of Biochar. *J. Environ. Qual.* 2012, 41 (4), 967–972.
202. Subedi, R.; Taupe, N.; Pelissetti, S.; Petruzzelli, L.; Bertora, C.; Leahy, J. J.; Grignani, C. Greenhouse Gas Emissions and Soil Properties Following Amendment with Manure-Derived Biochars: Influence of Pyrolysis Temperature and Feedstock Type. *J. Environ. Manage.* 2016, 166, 73–83.
203. Sparkes, J. *Biochar: Implications for Agricultural Productivity*; ABARES: Canberra, A.C.T., 2011.
204. Woolf, D.; Amonette, J. E.; Street-Perrott, F. A.; Lehmann, J.; Joseph, S. Sustainable Biochar to Mitigate Global Climate Change. *J. Nature Communications* 2010, 1, 56.
205. Montanarella, L.; Lugato, E. The Application of Biochar in the EU: Challenges and Opportunities. *J. Agronomy* 2013, 3 (2), 462–473.
206. Reddy Nakka, S. B. *Biocharculture: Biochar for Environment and Development*. First Edition. 2014.
207. Doan, T. T.; Henry-des-Tureaux, T.; Rumpel, C.; Janeau, J.-L.; Jouquet, P. Impact of Compost, Vermicompost and Biochar on Soil Fertility, Maize Yield and Soil Erosion in Northern Vietnam: A Three Year Mesocosm Experiment. *J. Sci. Total Environ.* 2015, 514, 147–154.
208. Jin, Y.; Liang, X.; He, M.; Liu, Y.; Tian, G.; Shi, J. Manure Biochar Influence upon Soil Properties, Phosphorus Distribution and Phosphatase Activities: A Microcosm Incubation Study. *Chemosph.* 2016, 142, 128–135.
209. Han, F.; Ren, L.; Zhang, X.-C. Effect of Biochar on the Soil Nutrients about Different Grasslands in the Loess Plateau. *J. Catena* 2016, 137, 554–562.

210. Novak, J.; Sigua, G.; Watts, D.; Cantrell, K.; Shumaker, P.; Szogi, A.; Johnson, M. G.; Spokas, K. Biochars Impact on Water Infiltration and Water Quality through a Compacted Subsoil Layer. *Chemosph.* 2016, 142, 160–167.
211. Oh, S.-Y.; Seo, Y.-D.; Kim, B.; Kim, I. Y.; Cha, D. K. Microbial Reduction of Nitrate in the Presence of Zero-Valent Iron and Biochar. *J. Bioresource Tech.* 2016, 200, 891–896.
212. Yu, X.-Y.; Ying, G.-G.; Kookana, R. S. Reduced Plant Uptake of Pesticides with Biochar Additions to Soil. *Chemosph.* 2009, 76 (5), 665–671.
213. Rees, F.; Sterckeman, T.; Morel, J. L. Root Development of Non-Accumulating and Hyperaccumulating Plants in Metal-Contaminated Soils Amended with Biochar. *Chemosph.* 2016, 142, 48–55.
214. Jiang, S.; Huang, L.; Nguyen, T. A. H.; Ok, Y. S.; Rudolph, V.; Yang, H.; Zhang, D. Copper and Zinc Adsorption by Softwood and Hardwood Biochars under Elevated Sulphate-Induced Salinity and Acidic PH Conditions. *Chemosph.* 2016, 142, 64–71.
215. Hu, Q.; Yang, H.; Yao, D.; Zhu, D.; Wang, X.; Shao, J.; Chen, H. The Densification of Bio-Char: Effect of Pyrolysis Temperature on the Qualities of Pellets. *J. Bioresource Tech.* 2016, 200, 521–527.
216. Subedi, R.; Taupe, N.; Pelissetti, S.; Petruzzelli, L.; Bertora, C.; Leahy, J. J.; Grignani, C. Greenhouse Gas Emissions and Soil Properties Following Amendment with Manure-Derived Biochars: Influence of Pyrolysis Temperature and Feedstock Type. *J. Environ. Manage.* 2016, 166, 73–83.
217. Kuppusamy, S.; Thavamani, P.; Megharaj, M.; Venkateswarlu, K.; Naidu, R. Agronomic and Remedial Benefits and Risks of Applying Biochar to Soil: Current Knowledge and Future Research Directions. *J. Environ. Inter.* 2016, 87, 1–12.
218. Drake, J. A.; Carrucan, A.; Jackson, W. R.; Cavagnaro, T. R.; Patti, A. F. Biochar Application during Reforestation Alters Species Present and Soil Chemistry. *J. Sci. Total Environ.* 2015, 514, 359–365.
219. Clough, T. J.; Condon, L. M.; Kammann, C.; Müller, C. Review. A Review of Biochar and Soil Nitrogen Dynamics. *J. Agronomy* 2013, 3, 275-293.
220. Rees, F.; Simonnot, M. O.; Morel, J. L. Short-Term Effects of Biochar on Soil Heavy Metal Mobility Are Controlled by Intra-Particle Diffusion and Soil pH Increase. *Europ. J. Soil Sci.* 65 (1), 149–161.

221. Smebye, A.; Alling, V.; Vogt, R. D.; Gadmar, T. C.; Mulder, J.; Cornelissen, G.; Hale, S. E. Biochar Amendment to Soil Changes Dissolved Organic Matter Content and Composition. *Chemosph.* 2016, 142, 100–105.
222. Marks, E. A. N.; Mattana, S.; Alcañiz, J. M.; Pérez-Herrero, E.; Domene, X. Gasifier Biochar Effects on Nutrient Availability, Organic Matter Mineralization, and Soil Fauna Activity in a Multi-Year Mediterranean Trial. *J. Agricul. Ecosyst. & Environ.* 2016, 215, 30–39.
223. García-Jaramillo, M.; Cox, L.; Knicker, H. E.; Cornejo, J.; Spokas, K. A.; Hermosín, M. C. Characterization and Selection of Biochar for an Efficient Retention of Tricyclazole in a Flooded Alluvial Paddy Soil. *J. Hazardous Mat.* 2015, 286, 581–588.
224. Zimmerman, A. R.; Gao, B. Cap I. Biochar and Soil Biota. In: *The Stability of Biochar in the Environment*. CRC Press. Taylor And Francis Group. 2013.
<https://www.taylorfrancis.com/books/e/9781466576513/chapters/10.1201%2Fb14585-3> (accessed Jun 23, 2018).
225. Radovic, L. R.; Moreno-Castilla, C.; Rivera-Utrilla, J. Carbon Materials as Adsorbents in Aqueous Solutions. *J. Chem. & Phys. of Carbon* 2001, 27, 227–406.
226. Brennan, J. K.; Bandosz, T. J.; Thomson, K. T.; Gubbins, K. E. Water in Porous Carbons. *J. Colloids & Surfaces A: Physicochem. & Engin. Aspects* 2001, 187 (188), 539–568.
227. Zhu, D.; Kwon, S.; Pignatello, J. J. Adsorption of Single-Ring Organic Compounds to Wood Charcoals Prepared under Different Thermochemical Conditions. *J. Environ. Sci. Technol.* 2005, 39 (11), 3990–3998.
228. Garrido, G.; Ràfols, C.; Bosch, E. Acidity Constants in Methanol/Water Mixtures of Polycarboxylic Acids Used in Drug Salt Preparations: Potentiometric Determination of Aqueous pKa Values of Quetiapine Formulated as Hemifumarate. *Europ. J. Pharma. Sci.* 2006, 28 (1), 118–127.
229. Babić, S.; Horvat, A. J. M.; Mutavdžić Pavlović, D.; Kaštelan-Macan, M. Determination of pKa Values of Active Pharmaceutical Ingredients. *J. TrAC Trends in Anal. Chem.* 2007, 26 (11), 1043–1061.

230. Ishihama, Y.; Nakamura, M.; Miwa, T.; Kajima, T.; Asakawa, N. A Rapid Method for pKa Determination of Drugs Using Pressure-Assisted Capillary Electrophoresis with Photodiode Array Detection in Drug Discovery. *J Pharm. Sci* 2002, 91 (4), 933–942.
231. Meloun, M.; Srovný, T.; Vrána, A. The Thermodynamic Dissociation Constants of Losartan, Paracetamol, Phenylephrine and Quinine by the Regression Analysis of Spectrophotometric Data. *J. Analytica Chimica Acta* 2005, 533 (1), 97–110.
232. Kerns, E. H.; Di, L. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: From ADME to Toxicity Optimization*, First Edition. Academic Press: Amsterdam; Boston, 2008.
233. Barbosa, J.; Barrón, D.; Jiménez-Lozano, E.; Sanz-Nebot, V. Comparison between Capillary Electrophoresis, Liquid Chromatography, Potentiometric and Spectrophotometric Techniques for Evaluation of pKa Values of Zwitterionic Drugs in Acetonitrile–Water Mixtures. *J. Analytica Chimica Acta* 2001, 437 (2), 309–321.
234. Sun, N.; Avdeef, A. Biorelevant pKa (37°C) Predicted from the 2D Structure of the Molecule and Its pKa at 25°C. *J. Pharm. Biomedical Analysis* 2011, 56 (2), 173–182.
235. Tam, K. Y.; Avdeef, A.; Tsinman, O.; Sun, N. The Permeation of Amphoteric Drugs through Artificial Membranes--an in Combo Absorption Model Based on Paracellular and Transmembrane Permeability. *J. Med. Chem.* 2010, 53 (1), 392–401.
236. Klein, W. Cap. 3.1 Mobility of Environmental Chemicals, Including Abiotic Degradation. In: *Ecotoxicology and Climate*. Bourdeau, P.; Haines, J. A.; Klein, W.; Krishna Murti, C. R., (Editors). John Wiley & Sons Ltd. 1989.
237. Gores, H. J.; Meloun, M.; Havel, J.; Högfeltdt, E. *Computation of Solution Equilibria: A Guide to Methods in Potentiometry, Extraction and Spectrophotometry*. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry. Masson, M. R.; Chalmers, R. A., translation Editors. Ellis Horwood Ltd, Chichester 1988.
238. Reijenga, J. C.; Hoof, A. J. F. van; Loon, A. H. M. van; Teunissen, A. J. P. Development of Methods for the Determination of pKa Values. *J. Anal. Chem. Insights* 2013, 8 (1), 53–71.
239. Niazi, S. K. *Handbook of Preformulation: Chemical, Biological, and Botanical Drugs*; CRC Press, 2006.

240. Sun, J.; Sakai, S.; Tauchi, Y.; Deguchi, Y.; Chen, J.; Zhang, R.; Morimoto, K. Determination of Lipophilicity of Two Quinolone Antibacterials, Ciprofloxacin and Grepafloxacin, in the Protonation Equilibrium. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002, 54 (1), 51–58.
241. Batistela, V. R.; Pellosi, D. S.; de Souza, F. D.; da Costa, W. F.; de Oliveira Santin, S. M.; de Souza, V. R.; Caetano, W.; de Oliveira, H. P. M.; Scarminio, I. S.; Hioka, N. PKa Determinations of Xanthene Derivates in Aqueous Solutions by Multivariate Analysis Applied to UV-Vis Spectrophotometric Data. *J. Spectrochem. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2011, 79 (5), 889–897.
242. Singh, S.; Sharda, N.; Mahajan, L. Spectrophotometric Determination of PKa of Nimesulide. *Inter. J. Pharm.* 1999, 176 (2), 261–264.
243. Seok, Y.-J.; Yang, K.-S.; Kang, S.-O. A Simple Spectrophotometric Determination of Dissociation Constants of Organic Compounds. *J. Analytica Chimica Acta* 1995, 306 (2), 351–356.
244. Tam, K. Y.; Takács-Novák, K. Multi-Wavelength Spectrophotometric Determination of Acid Dissociation Constants: A Validation Study. *J. Analytica Chimica Acta* 2001, 434 (1), 157–167.
245. Roda, G.; Dallanoce, C.; Gambaro, V.; Grazioso, G.; Liberti, V.; Matera, C.; Quadri, M.; Amici, M. D. Determination of Acid Dissociation Constants of Poorly Water-Soluble Nicotinic Ligands by Means of Electrophoretic and Potentiometric Techniques. *J. Pharm. Anal. Acta* 2015, 6 (7).
246. Barbosa, J.; Bergés, R.; Toro, I.; Sanz-Nebot, V. Protonation Equilibria of Quinolone Antibacterials in Acetonitrile-Water Mobile Phases Used in LC. *Talanta* 1997, 44 (7), 1271–1283.
247. Barbosa, J.; Bergés, R.; Toro, I.; Sanz-Nebot, V. Dissociation Constants and Preferential Solvation of Fluoroquinolones in Hydroorganic Mixtures Used in LC. *Inter. J. Pharm.* 1997, 149 (2), 213–225.
248. Qiang, Z.; Adams, C. Potentiometric Determination of Acid Dissociation Constants (pKa) for Human and Veterinary Antibiotics. *J. Water Res.* 2004, 38 (12), 2874–2890.
249. Völgyi, G.; Baka, E.; Box, K. J.; Comer, J. E. A.; Takács-Novák, K. Study of pH-Dependent Solubility of Organic Bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch Relationship. *J. Anal. Chim. Acta* 2010, 673 (1), 40–46.

250. Shoghi, E.; Romero, L.; Reta, M.; Ràfols, C.; Bosch, E. Enthalpies and Constants of Dissociation of Several Neutral and Cationic Acids in Aqueous and Methanol/Water Solutions at Various Temperatures. *J. Pharm. & Biomed. Analysis* 2009, 49 (4), 923–930.
251. Wróbel, R.; Chmurzýnski, L. Potentiometric pKa determination of standard substances in binary solvent systems. *Analytica Chimica Acta* 2000; 405:303–308.
252. Fallavena, P. R. B.; Schapoval, E. E. S. pKa Determination of Nimesulide in Methanol—Water Mixtures by Potentiometric Titrations. *Inter. J. Pharm.* 1997, 158 (1), 109–112.
253. Erdemgil, F. Z.; Sanli, S.; Sanli, N.; Ozkan, G.; Barbosa, J.; Guiteras, J.; Beltrán, J. L. Determination of pK(a) Values of Some Hydroxylated Benzoic Acids in Methanol-Water Binary Mixtures by LC Methodology and Potentiometry. *Talanta* 2007, 72 (2), 489–496.
254. Martínez, V.; Maguregui, M. I.; Jiménez, R. M.; Alonso, R. M. Determination of the PKa Values of Beta-Blockers by Automated Potentiometric Titrations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 23 (2–3), 459–468.
255. Chamberlain, K.; Evans, A. A.; Bromilow, R. H. 1-Octanol/Water Partition Coefficient (Kow) and pKa for Ionisable Pesticides Measured by A pH-Metric Method. *J. Pesticide Sci.* 47 (3), 265–271.
256. Bosch, E.; Ràfols, C.; Rosés, M. Variation of Acidity Constants and PH Values of Some Organic Acids in Water—2-Propanol Mixtures with Solvent Composition. Effect of Preferential Solvation. *J. Analytica Chimica Acta* 1995, 302 (1), 109–119.
257. Lin, C.-E.; Deng, Y.-; Liao, W.-S.; Sun, S.-W.; Lin, W.-Y.; Chen, C.-C. Electrophoretic Behavior and pKa Determination of Quinolones with a Piperazinyl Substituent by Capillary Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1051 (1–2), 283–290.
258. Buckenmaier, S. M. C.; McCalley, D. V.; Euerby, M. R. Determination of pKa Values of Organic Bases in Aqueous Acetonitrile Solutions Using Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2003, 1004 (1–2), 71–79.
259. Matoga, M.; Laborde-Kummer, E.; Langlois, M. H.; Dallet, P.; Bosc, J. J.; Jarry, C.; Dubost, J. P. Determination of pKa Values of 2-Amino-2-Oxazolines by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2003, 984 (2), 253–260.

260. Caliaro, G. A.; Herbots, C. A. Determination of pKa Values of Basic New Drug Substances by CE. *J. Pharm. & Biomedical Analysis* 2001, 26 (3), 427–434.
261. Manderscheid, M.; Eichinger, T. Determination of pKa Values by Liquid Chromatography. *J Chromatogr. Sci.* 2003, 41 (6), 323–326.
262. Jiménez-Lozano, E.; Marqués, I.; Barrón, D.; Beltrán, J. L.; Barbosa, J. Determination of pKa Values of Quinolones from Mobility and Spectroscopic Data Obtained by Capillary Electrophoresis and a Diode Array Detector. *J. Analytica Chimica Acta* 2002, 464 (1), 37–45.
263. Caron, G.; Ermondi, G.; Damiano, A.; Novaroli, L.; Tsinman, O.; Ruell, J. A.; Avdeef, A. Ionization, Lipophilicity, and Molecular Modeling to Investigate Permeability and Other Biological Properties of Amlodipine. *J. Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12 (23), 6107–6118.
264. Völgyi, G.; Ruiz, R.; Box, K.; Comer, J.; Bosch, E.; Takács-Novák, K. Potentiometric and Spectrophotometric pKa Determination of Water-Insoluble Compounds: Validation Study in a New Cosolvent System. *J. Analytica Chimica Acta* 2007, 583 (2), 418–428.
265. Avdeef, A.; Box, K. J.; Comer, J. E.; Gilges, M.; Hadley, M.; Hibbert, C.; Patterson, W.; Tam, K. Y. pH-Metric Log P 11. PKa Determination of Water-Insoluble Drugs in Organic Solvent-Water Mixtures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 20 (4), 631–641.
266. Takács-Novák, K.; Box, K. J.; Avdeef, A. Potentiometric pKa Determination of Water-Insoluble Compounds: Validation Study in Methanol/Water Mixtures. *Inter. J. Pharmaceutics* 1997, 151 (2), 235–248.
267. Takács-Novák, K.; Tam, K. Y. Multiwavelength Spectrophotometric Determination of Acid Dissociation Constants: Part V: Microconstants and Tautomeric Ratios of Diprotic Amphoteric Drugs. *J. Pharm. & Biomedical Analysis* 2000, 21 (6), 1171–1182.
268. Körner, R.; Sushko, I.; Novotarskyi, S.; Tetko, I. V. In Silico pKa Prediction. *J. Cheminformatics* 2012, 4 (1), P55.
269. D. C. Young. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*. John Wiley & Sons, Inc. 2001.

270. Seybold, P. G.; Shields, G. C. Computational Estimation of PKa Values. Wiley Interdisciplinary Reviews: J. Comput. Molecular Sci. 2015, 5 (3), 290–297.
271. Alongi, K.; Shields, G. Theoretical Calculations of Acid Dissociation Constants: A Review Article. J. Annual Reports in Computational Chemistry 2010, 113–138.
272. ChemAxon - Software Solutions and Services for Chemistry & Biology. URL: <https://chemaxon.com/products/chemicalize> (accessed Jun 25, 2018).
273. Compudrug. URL: <http://www.compudrug.com/> (accessed Jun 23, 2018).
274. Platforms and Products: ACD/Labs. URL: <https://www.acdlabs.com/products/> (accessed Jun 23, 2018).
275. Schrödinger. Scientific developing of chemical simulation software for use in pharmaceutical, biotechnology, and materials research. URL: <https://www.schrodinger.com/> (accessed Jun 23, 2018).
276. Schrödinger. QikProp. URL: <https://www.schrodinger.com/qikprop> (accessed Jun 24, 2018).
277. Simulations Plus. Modeling & Simulation Software. Consulting Solutions. URL: <https://www.simulations-plus.com/> (accessed Jun 24, 2018).
278. Corporation, C. ChemDraw Prime. URL: http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/details/Default.aspx?fid=14&pid=737 (accessed Jun 24, 2018).
279. ARChem: Automated Reasoning in Chemistry. URL: <http://archemcalc.com/sparc.html> (accessed Jun 24, 2018).
280. Virtual Computational Chemistry Laboratory VCCLAB. URL: <http://www.vcclab.org/> (accessed Jun 24, 2018).
281. Dearden, J.; Worth, A. JRC Scientific and Technical Repot. In Silico Prediction of Physicochemical Properties. European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection. 2007.
282. Rutkowska, E.; Pajak, K.; Józwiak, K. Lipophilicity--Methods of Determination and Its Role in Medicinal Chemistry. J. Acta Pol. Pharm. 2013, 70 (1), 3–18.

283. Wasik, S. P.; Tewari, Y. B.; Miller, M. M.; Purnell, J. H. Measurements of the Octanol/Water Partition Coefficient by Chromatographic Methods. *J. Resea. Nat. Bureau of Standards* 1982, 87 (4), 311.
284. Giaginis, C.; Tsantili-Kakoulidou, A. Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review. *J. Liquid Chrom. & Related Tech.* 2007, 31 (1), 79–96.
285. Degim, T.; Zaimoglu, V.; Akay, C.; Degim, Z. pH-Metric Log K Calculations of Famotidine, Naproxen, Nizatidine, Ranitidine and Salicylic Acid. *J. Farmaco.* 2001, 56 (9), 659–663.
286. Hartmann, T.; Schmitt, J. Lipophilicity - beyond Octanol/Water: A Short Comparison of Modern Technologies. *J. Drug Discov. Today Tech.* 2004, 1 (4), 431–439.
287. Krass, J. D.; Jastorff, B.; Genieser, H.-G. Determination of Lipophilicity by Gradient Elution High-Performance Liquid Chromatography. *J. Anal. Chem.* 1997, 69 (13), 2575–2581.
288. Mackay, D.; Fraser, A. Bioaccumulation of Persistent Organic Chemicals: Mechanisms and Models. *J. Environ. Poll.* 2000, 110 (3), 375–391.
289. Hermens, J. L. M.; Bruijn, J. H. M. de; Brooke, D. N. The Octanol–Water Partition Coefficient: Strengths and Limitations. *J. Environ. Tox. & Chem.* 32 (4), 732–733.
290. Seth, R.; Mackay, D.; Muncke, J. Estimating the Organic Carbon Partition Coefficient and Its Variability for Hydrophobic Chemicals. *J. Environ. Sci. Tech.* 1999, 33 (14), 2390–2394.
291. Chin, Y.-P.; Weber, W. J.; Voice, T. C. Determination of Partition Coefficients and Aqueous Solubilities by Reverse Phase Chromatography—II: Evaluation of Partitioning and Solubility Models. *J. Water Resea.* 1986, 20 (11), 1443–1450.
292. Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. Partition Coefficients and Their Uses. *J. Chem. Rev.* 1971, 71 (6), 525–616.
293. Pajak, K.; Józwiak, K. Review. Lipophilicity of methods of determination and its role in medicinal chemistry. *J. Acta Poloniae Pharmac. Drug Resea.* 2013; 70(1):3-18.

294. Caço, A. I.; Tomé, L. C.; Dohrn, R.; Marrucho, I. M. Protonation Equilibria and Lipophilicity of Sarafloxacin. *J. Chem. Eng. Data* 2010, 55 (9), 3160–3163.
295. Montero, M. T.; Freixas, J.; Hernández-Borrell, J. Expression of the Partition Coefficients of a Homologous Series of 6-Fluoroquinolones. *Inter. J. Pharmaceutics* 1997, 149 (2), 161–170.
296. Langlois, M.-H.; Montagut, M.; Dubost, J.-P.; Grellet, J.; Saux, M.-C. Protonation Equilibrium and Lipophilicity of Moxifloxacin. *J. Pharm. & Biomedical Analysis* 2005, 37 (2), 389–393.
297. Avdeef, A.; Box, K. J.; Comer, J. E. A.; Hibbert, C.; Tam, K. Y. pH-Metric LogP 10. Determination of Liposomal Membrane-Water Partition Coefficients of Ionizable Drugs. *J. Pharm. Res.* 1998, 15 (2), 209–215.
298. Dohta, Y.; Yamashita, T.; Horiike, S.; Nakamura, T.; Fukami, T. A System for LogD Screening of 96-Well Plates Using a Water-Plug Aspiration/Injection Method Combined with High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Anal. Chem.* 2007, 79 (21), 8312–8315.
299. Wattanasin, P.; Saetear, P.; Wilairat, P.; Nacapricha, D.; Teerasong, S. Zone Fluidics for Measurement of Octanol–Water Partition Coefficient of Drugs. *J. Anal. Chimica Acta* 2015, 860, 1–7.
300. Han, S.; Qiao, J.; Zhang, Y.; Yang, L.; Lian, H.; Ge, X.; Chen, H. Determination of N-Octanol/Water Partition Coefficient for DDT-Related Compounds by RP-HPLC with a Novel Dual-Point Retention Time Correction. *Chemosph.* 2011, 83 (2), 131–136.
301. Barzanti, C.; Evans, R.; Fouquet, J.; Gouzin, L.; Howarth, N. M.; Kean, G.; Levet, E.; Wang, D.; Wayemberg, E.; Yeboah, A. A.; et al. Potentiometric Determination of Octanol–Water and Liposome–Water Partition Coefficients (LogP) of Ionizable Organic Compounds. *J. Tetrahedron Lett.* 2007, 48 (19), 3337–3341.
302. Chamberlain, K.; Evans, A. A.; Bromilow, R. H. 1-Octanol/Water Partition Coefficient (K_{ow}) and pKa for Ionisable Pesticides Measured by a pH-Metric Method. *J. Pesticide Sci.* 47 (3), 265–271.
303. Barbato, F.; Cirocco, V.; Grumetto, L.; Immacolata La Rotonda, M. Comparison between Immobilized Artificial Membrane (IAM) HPLC Data and Lipophilicity in n-Octanol for Quinolone Antibacterial Agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007, 31 (5), 288–297.

304. Idowu, S. O.; Adeyemo, M. A.; Ogbonna, U. I. Engineering and Validation of a Novel Lipid Thin Film for Biomembrane Modeling in Lipophilicity Determination of Drugs and Xenobiotics. *J. Biol. Eng.* 2009, 3, 14.
305. Alelyunas, Y. W.; Pelosi-Kilby, L.; Turcotte, P.; Kary, M.-B.; Spreen, R. C. A High Throughput Dried DMSO LogD Lipophilicity Measurement Based on 96-Well Shake-Flask and Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry Detection. *J. Chromatogr. A.* 2010, 1217 (12), 1950–1955.
306. Krass, J. D.; Jastorff, B.; Genieser, H.-G. Determination of Lipophilicity by Gradient Elution High-Performance Liquid Chromatography. *J. Anal. Chem.* 1997, 69 (13), 2575–2581.
307. Liua, J.; Sun, J.; Wang, Y.; Li, H.; Sui, X.; Li, Y.; He, Z. Rapid determination of the octanol-water partition coefficients of neutral and basic drugs by microemulsion electrokinetic chromatography. *Asian J. Pharm. Sci.* 2008; 3 (4): 158-167.
308. Mannhold, R.; Poda, G. I.; Ostermann, C.; Tetko, I. V. Calculation of Molecular Lipophilicity: State-of-the-Art and Comparison of Log P Methods on More than 96,000 Compounds. *J. Pharm. Sci.* 2009, 98 (3), 861–893.
309. Gramatica, P. Chemometric Methods and Theoretical Molecular Descriptors in Predictive QSAR Modeling of the Environmental Behavior of Organic Pollutants. In: *Recent Advances in QSAR Studies, Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics.* Springer. 2010, 8, 327–366.
310. Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods. *J. Phys. Chem. A* 1998, 102 (21), 3762–3772.
311. Cheng, T.; Zhao, Y.; Li, X.; Lin, F.; Xu, Y.; Zhang, X.; Li, Y.; Wang, R.; Lai, L. Computation of Octanol-Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. *J. Chem. Inf. Model* 2007, 47 (6), 2140–2148.
312. Daylight. URL: <http://www.daylight.com/> (accessed Jun 23, 2018).
313. BioByte. URL: <http://www.biobyte.com/> (accessed Jun 23, 2018).
314. BioByte - Bio-Loom. URL: <http://www.biobyte.com/bb/prod/bioloom.html> (accessed Jun 23, 2018).

315. Molinspiration Cheminformatics. Calculation of molecular properties and bioactivity score. URL: <http://www.molinspiration.com/> (accessed Jun 24, 2018).
316. US EPA. EPI SuiteTM-Estimation Program Interface. URL: <https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/epi-suitetm-estimation-program-interface> (accessed Jun 23, 2018).
317. Hidalgo, A.; Mora-Diez, N. Novel Approach for Predicting Partition Coefficients of Linear Perfluorinated Compounds. *J. Theoretical Chemistry Accounts* 2016, 135 (1).
318. SRC, Inc. Scientific Tools and Models. URL: <https://www.srcinc.com/what-we-do/environmental/tools-and-models.html> (accessed Jun 23, 2018).
319. cLogP Calculation - Osiris Property Explorer <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/cLogP.html> (accessed Jun 24, 2018).
320. Tsantili-Kakoulidou, A.; Panderi, I.; Csizmadia, F.; Darvas, F. Prediction of Distribution Coefficient from Structure. 2. Validation of Prolog D, an Expert System. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86 (10), 1173–1179.
321. SLIPPER: LogP, LogC, LogD, LogSw, FA. URL: <http://www.chemdbsoft.com/slipper-logp-logc-logd-logsw-fa.html> (accessed Jun 24, 2018).
322. Baskin, I.; Varnek, A. Chapter 1: Fragment Descriptors in SAR/QSAR/QSPR Studies, Molecular Similarity Analysis and in Virtual Screening. In *Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening*; 2008, 1–43.
323. Tetko, I. V.; Gasteiger, J.; Todeschini, R.; Mauri, A.; Livingstone, D.; Ertl, P.; Palyulin, V. A.; Radchenko, E. V.; Zefirov, N. S.; Makarenko, A. S.; et al. Virtual Computational Chemistry Laboratory--Design and Description. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2005, 19 (6), 453–463.
324. Detector de Fluorescencia Serie Agilent 1100. Manual de Referencia. Agilent Technologies. 2000.
325. Agilent ChemStation. Understanding your ChemStation. Agilent Technologies. 2001.
326. Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D. Biochar effects on soil biota - A review. *J. Soil Biol. & Biochem.* 2011, 43 (9), 1812-36.

327. Perrin, D.D.; Dempsey, B. *Buffers for pH and Metal Ion Control*. Chapman and Hall, London 1974.
328. Billo, E. J. *Excel for Chemists: A Comprehensive Guide*, Second edition. John Wiley & Sons: New York, 2001.
329. Ross, D. L.; Elkinton, S. K.; Riley, C. M. Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. IV. 1-Octanol/water partition coefficients and their relationships to structure. *Int. J. Pharm.* 1992, 88, 379–389.
330. Bermejo, M.; Avdeef, A.; Ruiz, A.; Nalda, R.; Ruell, J.A.; Tsinman, O.; González, I.; Fernández, C.; Sánchez, G.; Garrigues, T.M.; Merino, V. PAMPA—a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, 21, 429–441.
331. Grabowski, T.; Jaroszewski, J.J.; Piotrowski, W. Correlations between no observed effect level and selected parameters of the chemical structure for veterinary drugs. *J. Toxicol. in Vitro.* 2010, 24, 953–959.
332. Cabrera Pérez, M. A.; González Díaz, H.; Fernández Teruel, C.; Plá-Delfina, J. M.; Bermejo Sanz, M. A novel approach to determining physicochemical and absorption properties of 6-fluoroquinolone derivatives: experimental assessment. *Europ. J. Pharm. & Biopharm.* 53 (2002) 317–325.
333. Beltrán, J. L.; Pignatello, J. J.; Teixidó, M. ISOT_Calc: A versatile tool for parameter estimation in sorption isotherms. *J. Comput. & Geosci.* 94, (2016) 11-17.
334. Yan, W.; Zhang, J.; Jing, C. Adsorption of Enrofloxacin on montmorillonite: Two-dimensional correlation ATR/FTIR spectroscopy study. *J. Colloid & Interface Sci.* 390 (2013) 196–203.
335. Carrasquillo, A. J.; Brul, G. L.; Mackay, A. A.; Vasudevan, D. Sorption of Ciprofloxacin and Oxytetracycline Zwitterions to Soils and Soil Minerals: Influence of Compound Structure. *J. Environ. Sci. Tech.* 2008, 42, 7634–7642.
336. Figueroa-Diva, R. A.; Vasudevan, D.; MacKay, A. A. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosph.* 79 (2010) 786–793.
337. Vasudevan, D.; Bruland, G. L.; Torrance, B. S.; Upchurch, V- G.; MacKay, A. A. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma* 151 (2009) 68–76.

338. Wang, X.; Yeon Lee, S.; Miller, K.; Welbourn, R.; Stocker, I.; Clarke, S.; Casford, M.; Gutfreund, P.; Skoda, M. W. A. Cation Bridging Studied by Specular Neutron Reflection. *J. Langmuir*. 2013, 29(18), 5520–5527.
339. Higgins, M. J.; Tom, L. A.; Sobeck, D. C. Case Study I: Application of the Divalent Cation Bridging Theory to Improve Biofloc Properties and Industrial Activated Sludge System Performance—Direct Addition of Divalent Cations. *J. Water Environ. Res.* 2004, 76(4), 344-352.
340. Pereira Leal, R. M.; Ferracciú Alleoni, L. R.; Tornisielo, V. L.; Borges Regitano, J. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. *Chemosph.* 2013, 92, 979–985.
341. Ötker Uslu, M.; Yediler, A.; Akmehmet Balcıoğlu, I.; Schulte-Hostede, S. Analysis and Sorption Behavior of Fluoroquinolones in Solid Matrices. *J. Water Air Soil Pollut.* 2008, 190, 55–63.
342. Dien, J.; Frishkoff, G. A. Event-related Potentials: A Methods Handbook. Introduction to Principal Components Analysis of Event-Related Potentials. Handy, T. (editor). Cambridge, Mass: MIT Press. 2005.
343. Polanco Martínez, J. M. The role of principal component analysis in the evaluation of air quality monitoring networks. Universidad de Santo Tomás. Colombia. *Revista: Comunicaciones en Estadística* 2016, 9 (2), 271–294.
344. Esbensen, K. H. *Multivariate Data Analysis – In Practice. An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design.* Fifth Edition. 2002 CAMO Process AS.
345. Wu, M.; Pan, B.; Zhang, D.; Xiao, D.; Li, H.; Wang, C.; Ning, P. The sorption of organic contaminants on biochars derived from sediments with high organic carbon content. *Chemosph.* 2013, 90, 782–788.