



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análisis cualitativo y cuantitativo de fármacos en peces por espectrometría de masas de alta resolución de cuadrupolo-tiempo de vuelo

Juan Manuel Peña Herrera

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.

Programa de Doctorado
Química Analítica y Medio Ambiente

Análisis cualitativo y cuantitativo de fármacos en peces por espectrometría de masas de alta resolución de cuadrupolo-tiempo de vuelo

Memoria de Tesis presentada
para optar al grado
Doctor
por la Universidad de Barcelona a
Juan Manuel Peña Herrera

Co-Directora
Dra. Sandra Pérez Solsona
Científica Titular
IDAEA-CSIC

Co-Director
Prof. Damià Barceló Culleres
Profesor Investigación
IDAEA-CSIC

Tutora
Mercé Granados Juan
Profesora titular
Universidad
de Barcelona

Barcelona, febrero 2020

La **Dra. Sandra Pérez Solsona**, científica titular del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua, IDAEA perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC y El profesor **Dr. Damià Barceló Cullerès**, investigador del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua, IDAEA perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC,

Certifican:

Que la presente memoria presentada para optar al título de Doctor, titulada “**Análisis cualitativo y cuantitativo de fármacos en peces por espectrometría de masas de alta resolución de cuadrupolo-tiempo de vuelo**” ha sido realizada bajo nuestra dirección por el Sr. **Juan Manuel Peña Herrera** en el Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua, IDAEA perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC; y que todos los resultados presentados son fruto de las experimentaciones realizadas por el mencionado doctorando.

Barcelona, febrero 2020

Dra. Sandra Pérez Solsona

Prof. Damià Barceló Cullerès

Financiamiento

Juan Manuel Peña Herrera ha sido financiado por el gobierno de Colombia a través del **Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS**, como beneficiario del Programa Nacional de Formación de Investigadores bajo la convocatoria *No. 568 Estudio de Doctorado en el Exterior – Año 2012*. En diciembre del 2019, **COLCIENCIAS** pasa a ser **Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación - MinCiencias**. <https://minciencias.gov.co>

Los trabajos realizados durante el desarrollo de la tesis han sido financiados principalmente por:

-La **Unión Europea** en el marco del 7º Programa de financiamiento para la investigación, desarrollo tecnológico y la demostración en el convenio de subvención nº 603629-ENV-2013-6.2.1-**Globaqua**. <http://www.globaqua-project.eu/en/home/>

-La **Unión Europea** a través de EU-MINECO WaterWorks2015 con el proyecto *Assessing the fate of pesticides and wastewater-borne contaminants in agricultural crops and their environmental risks (AWARE)*. Call 2016 (JPI) (PCIN-2017-067). <https://www.jpi-awareproject.eu/>

-El **gobierno de España** a través del proyecto de plan nacional: herramientas y tecnologías inteligentes para la evaluación del destino ambiental y el riesgo de los contaminantes en un nuevo escenario de cambio climático, **CICLIC** con referencia número RTI2018-097158-B-C33

El diseño gráfico de la presente tesis, las ilustraciones, el diseño de las portadas y las portadillas fue realizado por la **diseñadora gráfica, Mónica Peña Herrera**

E-mail: Nicap33@hotmail.com

*Not everything that can be measured is worth measuring,
and not everything worth measuring is measurable.*

Elliot W. Eisner

1933-2014

A mi familia, que me ha convertido en una persona super-poderosa:
mi padre, me ha enseñado el poder de la paciencia y la perseverancia;
mi madre, me ha encantado con el poder de la tenacidad y la resistencia;
Mónica, me ha deslumbrado con el poder de vivir la vida en colores;
Carlos Eduardo, me ha convencido usando el poder de negociar con buenas razones;
Santiago, ha sacado mi lado más humano con el poder de entender la diversidad social;
y Miguel Ángel, quien me ha dado el poder de soñar.

Agradecimientos

En estas pocas líneas espero poder expresar toda mi gratitud a aquellos que hicieron este proceso posible y más ameno.

Sandra, gracias por llevarme hasta el final de la tesis. Gracias por todo el trabajo realizado en conjunto, por la ayuda dentro y fuera del instituto, por la dirección, la amistad, las buenas charlas y buena actitud todo el tiempo. Espero que sigan saliendo muchos más proyectos. Mucho ánimo.

Al Profesor Dr. Damià Barceló. Gracias por haberme recibido dentro del grupo y permitirme hacer los trabajos dentro del instituto, por dejarme ser parte de un grupo de investigación tan importante y reconocido, del cual aprendí muchísimo.

Profesora Dra. Mercé Granados. Muchas gracias por los consejos, ayuda y tiempo dedicado para poder llevar la tesis a buen término con la tutoría.

Gracias a todas las personas del IDAEA, con los cuales pude compartir buenas conversaciones y momentos en el laboratorio, la oficina y el comedor:

Ester, Mavi, Božo, Máximo, Manu, Adrià, Andrea, Berta, Gemma, Ana, Òscar, Josep, Marta y Diana. También agradezco a los otros investigadores del grupo: Miren, Marinella, Ethel, Antoni y Silvia. Y al doctor Jaume.

Roser y Dori. Muchas gracias por la ayuda en todo. He aprendido mucho de ustedes. Siempre estaré muy agradecido por los consejos, ayudas técnicas y personales.

Claramente, agradecido como nadie, con todos aquellos que compartí más allá del laboratorio: Samu (el más guapu), Jose (estamos charlando....), Mari... que no paras de hacer actividades, y ahora en bici. Sigue así. No pares.

Marianne: gracias por todo el apoyo, la ayuda incondicional, los buenos momentos, charlas, paseos, la logística en todo momento, las cenas y la inmobiliaria ;-).

Cris Postigo: muchas gracias por las buenas charlas, los consejos, la ayuda, y sobretodo por escuchar. Eras la mejor en eso (y en mi concepto, en muchas cosas más).

Nico (Lukas): Gracias por tanta afinidad conmigo, para tratar de inventar cosas, desarmar y arreglar cosas dañadas y en fin desarrollar la creatividad. Me gustó mucho compartir contigo todo mi doctorado. Muchas gracias por la ayuda, por los consejos, por las palabras de aliento

y por compartir tu conocimiento y tu tiempo tanto en el CSIC, como por fuera. Han sido muy buenos momentos. Sigue creando, inventando y sobretodo, no dejes de hacer lo que te gusta. Un abrazo gigante y muchos éxitos.

Mis compañeras de lucha del y durante el doctorado:

Cris (politas): Muchas gracias por la eterna sonrisa. Por las charlas de chorradas. Por siempre recibirlo a uno, así estuvieras ocupada. Muchas gracias por compartir tantos momentos e historias. Espero que te estes disfrutando Brazil. Y que te sigas disfrutando todos y cada uno de los lugares y momentos de tu vida. Gracias por hacerme entender que *hay más aviones en el fondo del mar, que barcos en el cielo.*

Gabri. Palabras me faltan para agradecerte todo el tiempo, el apoyo, la amistad incondicional, por compartir el apartamento, tu vida y tu familia conmigo. Por toda la ayuda, dentro, pero sobretodo fuera del lab. Me la pasé de lujo compartiendo contigo este tiempo. Mil..i Mil gracias por todo. Sé que ahora vendrán las cosas buenas. *No te permiten soñar algo, sin permitirte que se vuelva realidad. Sin embargo, puede que te cueste trabajo.* Mucho ánimo, energía, miles de abrazos y solo lo mejor para ti.

Agradezco tambien a la gente que está en el exterior y con los cuales he podido compartir de una u otra manera y que me ayudaron a sacar el doctorado adelante desde Colombia, Argentina, Francia, Italia, Brazil, Costa Rica, Alemania, Grecia, entre otros que seguro se me escapan en este momento.

Finalmente agradecer a Colciencias (hoy Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación, MinCiencias) por financiar mis estudios de doctorado en el exterior.

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	ix
Abreviaciones y acrónimos.....	xv
Resumen y Abstract	1
Resumen	3
Abstract	7
Capítulo 1. Introducción.....	11
1.1 Fármacos: producción y consumo.....	13
1.2 Entrada de los fármacos al medio ambiente	16
1.3 Tratamiento de aguas residuales	19
1.4 Presencia de fármacos en las aguas superficiales.....	21
1.5 Partición de los fármacos entre el agua del río y la biota	23
1.6 Análisis de fármacos en muestras de peces	33
1.6.1 Tratamiento de la muestra.....	34
1.6.2 Purificación del Extracto	35
1.6.3 Análisis de fármacos por LC-MS	37
1.6.4 Efecto matriz	37
1.6.5 Analizadores MS	38
1.6.6 Analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo, Q-TOF	40
1.6.7 Análisis Cuantitativo	44
1.6.8 Análisis Cualitativo	48
Capítulo 2. Justificación y objetivos de la tesis	53
2.1 Justificación	55

2.2	Objetivos.....	56
Capítulo 3. Parte experimental		59
3.1	Reactivos y disoluciones.....	61
3.2	Instrumentación	75
3.2.1	Cromatografía líquida y espectrometría de masas	75
3.2.2	Otros instrumentos y equipos de laboratorio	75
3.3	Muestras.....	76
3.4	Metodologías	78
3.4.1	Análisis de fármacos en músculo de pez liofilizado, método 1.....	78
3.4.2	Análisis de fármacos en músculo de pez fresco, método 2.....	83
3.4.3	Análisis de la distribución de fármacos en el organismo de los peces	98
Capítulo 4: Resultados y discusión.....		101
4.1	Análisis de fármacos en músculo de pez liofilizado, método 1	103
4.1.1	Optimización de las condiciones de análisis HPLC-MS/MS.....	103
4.1.2	Determinación de contenido de agua y grasa.....	104
4.1.3	Optimización de la extracción de fármacos	105
4.1.4	Optimización de la purificación del extracto	108
4.1.5	Validación del método	110
4.1.6	Aplicación al análisis en muestras ambientales.....	116
4.2	Análisis de fármacos en músculo de pez fresco, método 2	117
4.2.1	Análisis UPLC-MS/MS.....	117
4.2.2	Protocolo de extracción y purificación	118
4.2.3	Validación del método	123
4.2.4	Análisis de compuestos diana en muestras de peces.....	130
4.2.5	Análisis de compuestos sospechosos en muestras de peces.....	133

4.3 Comparación entre los dos métodos analíticos desarrollados para el análisis de fármacos en muestras de peces	142
4.4 Estudio de la distribución de fármacos en el organismo de los peces	152
Capítulo 5. Conclusiones.....	183
Bibliografía	193

Abreviaciones y acrónimos

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AIF: Fragmentación de todos los iones (*All Ion Fragmentation*)

APCI: Ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

APPI: Foto-ionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Photo-Ionization*)

ASE: Extracción acelerada con solventes (*Accelerated Solvent Extraction*)

CAS: Lodos convencionales activados (*Conventional Activated Sludge*)

Da: Dalton (Unidad de m/z)

DDD: Dosis Diaras Definidas

DIA: Adquisición de datos independiente (*data-independent acquisition*)

DHD: Dosis Diarias Definidas por cada 1000 habitantes por día

DOM: Materia Orgánica Disuelta (*Dissolved Organic Matter*)

dw: Peso seco (*dry weight*)

EDAR: Estación depuradora de aguas residuales

EMR: Eliminación mejorada de matriz (*Enhanced Matrix Removal*)

ESI: Ionización por electro-espray (*Electrospray Ionization*)

FDA: Administración de medicamentos y alimentos (*Food and Drug Administration*)

fw: Peso fresco (*fresh weight*)

FWHM: Anchura máxima (de pico) a media altura (*Full Width Half Maximum*)

GPC: Cromatografía de Exclusión Molecular (*Gel-Permeation chromatography*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión, o alta eficiencia (*High-Performance (High-Pressure) Liquid Chromatography*)

HRAMS: Espectrometría de masas de alta resolución y precisión (*High Resolution Accurate Mass Spectrometry*)

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución (*High Resolution Mass Spectrometry*)

IDA: Adquisición dependiente de la información (*Information Dependent Acquisition*)

ILIS: Estándar Interno marcado isotópicamente (*Isotopically Labeled Internal Standard*)

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

iPrOH: isopropanol

LC: Cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*)

LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (*Liquid Chromatography-mass spectrometry*)

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

LOD: Límite de detección (*limit of detection*)

LOQ: Límite de cuantificación (*limit of quantitation*)

MAE: Extracción asistida por microondas (*microwave assisted extraction*)

MBR: Reactor Biológico de Membrana (*Membrane Biological Reactor*)

MeCN: Acetonitrilo

MeOH: Metanol

MRL: Límites máximos de residuos (*Maximum Residue Limits*)

MRM: Monitoreo de reacciones múltiples (*Multiple Reaction Monitoring*)

MS: Espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*)

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

m/z: Relación masa – carga

NIST: Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, (*National Institute of Standards and Technology*)

NOAEL: Nivel de Efectos Adversos No Observables (*No Observable Adverse Effect Level*)

OECD: Organización para la cooperación económica y el desarrollo (*Organization for Economic Cooperation and Development*)

PBT: Persistencia, bioacumulación y toxicidad

PCP: Productos de cuidado personal (*personal care products*)

PLE: Extracción líquida presurizada (*Pressurized Liquid Extraction*)

POM: Material Orgánico Particulado (*Particulate Organic Matter*)

ppm: partes por millón

psi: libras por pulgada cuadrada (*pounds-force per square inch*)

QqQ: Triple cuadrupolo

QuEChERS: Rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro; (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

RT: Tiempo de retención (*retention time*)

r²: Coeficiente de determinación

S/N: relación señal/ruido (*signal/noise*)

SPE: Extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME: Micro-extracción en fase sólida (*Solid-Phase Micro-Extraction*)

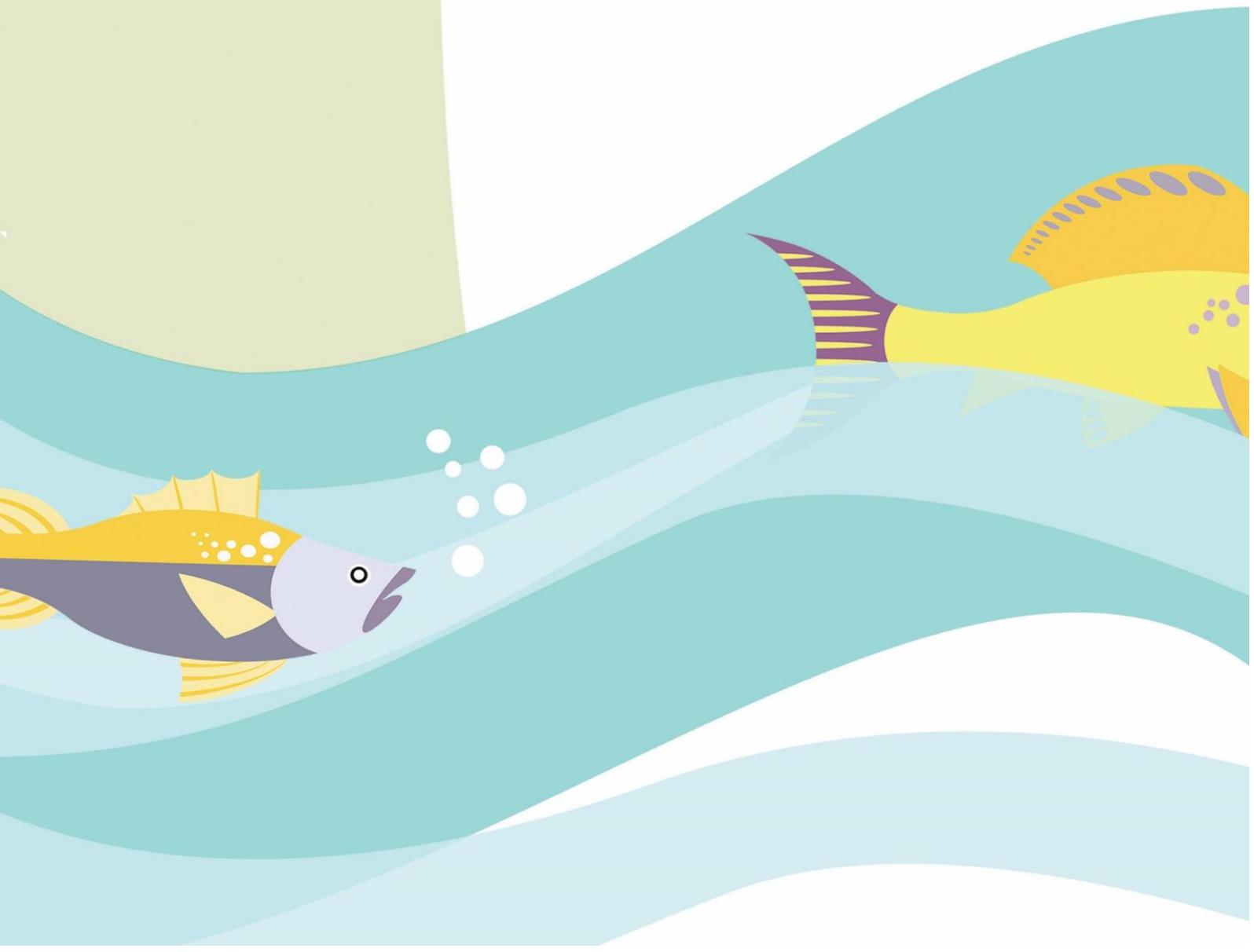
SS: sólidos en suspensión

TP: Producto de transformación (*transformation product*)

UPLC: Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (*Ultra High-Performance Liquid Chromatography*)

USE: Extracción soportada por ultrasonido (*ultrasound extraction*)

Resumen y Abstract



Resumen

Los fármacos son, en su mayoría, sustancias químicas sintéticas que se utilizan para la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y/o la cura de enfermedades, tanto en animales como en humanos. El cambio en los estilos de vida que incluyen la malnutrición, el consumo de alcohol, el tabaco, el abuso de drogas, el estrés, las dietas poco saludables, las largas sesiones de trabajo, y el sedentarismo, entre otros, han promovido el consumo de fármacos. Este crecimiento del consumo es particularmente notable en los países desarrollados, como, por ejemplo, aquellos que forman parte de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, OECD. En algunos casos, el incremento del consumo de fármacos se ha elevado hasta en un 1500 % en países como Dinamarca en 15 años (en el caso de los fármacos hipolipemiantes). Aunque el objetivo principal del uso de fármacos es mejorar la calidad de vida de los seres humanos y de la sociedad en general, la liberación continua de residuos de medicamentos en el medio ambiente a través de una variedad de fuentes, puede dar lugar a que la fauna se vea expuesta a los fármacos de manera continua y a largo plazo, con posibles efectos no deseados en los organismos no diana.

Una vez que los fármacos entran en el organismo objetivo, en el caso de los seres humanos generalmente por vía oral, están sujetos a procesos de biotransformación por medio del receptor biológico que convierten el fármaco madre en uno o varios metabolitos de actividad generalmente reducida. Sin embargo, la fracción intacta del fármaco administrado se excreta y llega así a las aguas residuales municipales. Adicionalmente, la eliminación inapropiada de los medicamentos no utilizados puede aumentar la carga de los fármacos en los flujos de residuos que finalmente se recogen en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs). Aparte del metabolismo de las sustancias farmacéuticas por medio de enzimas en los seres humanos, o en los animales en el caso de los medicamentos veterinarios, se pueden generar productos de transformación (TP) por diversos medios, incluyendo procesos físicos, químicos y biológicos.

Las EDARs, que principalmente sirven para reducir el contenido de materia orgánica en el flujo de residuos y, por lo tanto, para disminuir la demanda biológica de oxígeno del agua tratada, se pueden considerar como un importante colector de aguas con su gran diversidad de microorganismos que degradan las sustancias orgánicas. Lamentablemente, las EDARs municipales que se basan en tecnologías de tratamiento estándar con etapas físicas y biológicas, no están optimizadas para la eliminación completa de los fármacos. Las tecnologías de tratamiento avanzadas, como los procesos de oxidación avanzados, han demostrado ser muy prometedoras para mejorar la eficiencia de eliminación de fármacos en la planta piloto, pero su implementación en plantas a escala real no está todavía extendida.

Por lo tanto, los vertidos de efluentes de las EDARs a los cuerpos de agua naturales, contienen trazas de una multitud de fármacos en concentraciones comprendidas entre 1 ng/L y 1000 µg/L. A pesar de las cantidades relativamente bajas, la exposición crónica a los fármacos puede comprometer la salud de los organismos acuáticos en los hábitats contaminados. Además de la presencia de fármacos en las aguas residuales domésticas, los fármacos también pueden llegar a los cuerpos de agua por medio de la escorrentía de los vertederos y por la eliminación de los desechos de animales, particularmente de las unidades con prácticas de agricultura intensiva donde el uso de medicamentos para la prevención de la propagación de enfermedades es común.

De una forma u otra, los fármacos, sus metabolitos humanos y sus TP están en contacto permanente con la biota que habita en las aguas naturales. Los fármacos disueltos en el agua pueden entrar en los peces a través de la piel y las branquias, y pueden ser consumidos a través de la dieta. Por analogía a la distribución y eliminación de los fármacos en el cuerpo humano, los fármacos pueden distribuirse en varios órganos y tejidos con un perfil distinto y pueden transformarse en metabolitos. Teniendo en cuenta que las moléculas de los fármacos están inicialmente diseñadas para interactuar con receptores específicos a través de una serie de interacciones moleculares, la función y la estructura de los peces expuestos, pueden verse alteradas.

En la presente tesis doctoral se desarrollaron métodos analíticos para la determinación de fármacos de uso humanos en el tejido muscular de los peces, incluyendo la comparación y optimización de diferentes tipos de extracciones donde también se optimizó la purificación de los extractos. Para la detección y cuantificación, se utilizó la cromatografía líquida (LC) acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) en un instrumento QToF, en modo Full MS y *SWATH*. Las validaciones de los métodos abarcaron hasta 47 fármacos en análisis específicos de 14 familias terapéuticas. Además, se realizó un análisis de compuestos sospechosos utilizando una lista con más de 500 fármacos, metabolitos, drogas de abuso y TPs.

Los dos métodos analíticos validados utilizaron la extracción de tipo QuEChERS o la extracción por ultrasonido. En el primero, a una extracción sólido-líquido le seguía la separación del disolvente orgánico de la fase acuosa mediante *salting-out*. La limpieza de los extractos tenía como objetivo eliminar el material lipídico, que puede constituir una fracción considerable del tejido de los peces. Los lípidos co-extraídos fueron eliminados por medio de adsorbentes específicos de tipo dispersivo, como el EMR-lipid removal y el adsorbente Z-Sep.

Se aprovechó el modo de adquisición SWATH del instrumento QToF-MS utilizado un modelo Sciex X500R, en el que la adquisición de datos ultrarrápida alterna entre el modo MS para la detección de iones moleculares con hasta diez adquisiciones secuenciales de fragmentación de todos los iones, cada una de las cuales cubre una ventana de m/z 90-100 Da de amplitud.

Las validaciones de los métodos incluyeron los parámetros de recuperación, precisión, efecto de la matriz, reproducibilidad, sensibilidad, robustez y linealidad. El primer método validado realizado con extracción QuEChERS, desarrollado para matrices de músculo de peces liofilizado, a 3 niveles diferentes de concentración hasta 500 ng/g peso seco (dw) de pez, se aplicó a 16 muestras recogidas en dos ríos diferentes de Italia y Grecia. El análisis cuantitativo reveló la presencia de sotalol, carbamazepina, trimetoprima, ketoprofeno, acetaminofén, propranolol y venlafaxina en concentraciones hasta 80 ng/g de pescado (dw).

A diferencia del primer método, con su amplio pero limitado número de analitos, el segundo método validado incluía también la detección de compuestos por análisis de sospechosos (*suspect screening analysis*). En esta metodología se examinaron muestras de pescado fresco (fw) para detectar la presencia de 47 fármacos en modo direccionado validados hasta 50 ng/g de pez (fw). Como complemento de la metodología validada, se incluyeron más de 500 fármacos, drogas de abuso, metabolitos y TPs para el análisis por *suspect screening*. Los resultados positivos se confirmaron considerando tanto los iones moleculares como los iones de fragmentos característicos apoyados por la base de datos de la biblioteca instrumental, que incluye la biblioteca *SCIEX All-In-One HR-MS/MS* y también el paquete de biblioteca NIST 2017, que compilan espectros en alta resolución para más de 17000 compuestos. La confirmación también fue apoyada por la base de datos online *ChemSpider* que está conectada con el software analítico SCIEX O.S.

La aplicación de este método a 32 muestras de peces de 4 ríos de Europa: Italia (Adige), Grecia (Evrotas), España (Llobregat) y un río transfronterizo que atraviesa Eslovenia, Croacia, Bosnia y Herzegovina y Serbia (Sava); dió lugar a la detección de bezafibrato, cafeína, carbamazepina, claritromicina, diltiazem, furazolidona, ketoprofeno, sulfapiridina, trimetoprima y verapamilo en concentraciones hasta 69 ng/g de pescado (fw). Mediante el análisis por *suspect screening*, se detectaron y confirmaron con éxito en las muestras analizadas benzoilecgonina, cocaína, nicotina y ofloxacina.

Otro aspecto de esta tesis se refiere a la investigación de la acumulación organo-específica de los fármacos en peces de agua dulce autóctonos recogidos en el río Llobregat, en Cataluña, España. La detección y, cuando fue posible, la cuantificación, se dirigió a diez biofluidos, órganos y tejidos. Se analizaron las agallas, bilis, cerebro, corazón, hígado,

músculo, páncreas, piel, plasma y riñón de 12 muestras pertenecientes a cuatro especies comunes de la parte baja del río cerca de Barcelona, haciendo análisis direccionado específico y análisis de compuestos sospechosos. Adicionalmente, se monitorizó el agua del río en busca de los mismos compuestos.

Mientras que en las muestras de agua se identificaron 53 sustancias por medio de un análisis direccionado *y/o suspect screening*, en uno o varios órganos de cada especie se detectaron hasta 34 compuestos. La evaluación semicuantitativa indicó la distribución preferencial de los fármacos, las drogas de abuso, los metabolitos y los TPs en el riñón, la piel, el hígado, el cerebro y el páncreas.

Abstract

Pharmaceuticals are, mostly synthetic, chemical substances used for the prevention, diagnosis, treatment and/or cure of diseases, in both animals and humans. The changing lifestyle that includes malnutrition, alcohol consumption, smoking, drug abuse, stress, unhealthy diet, long working sessions, sedentarism, and so on has promote the consumption of pharmaceuticals. This growth in consumption is particularly noticeable in developed countries, for example those that are part of the Organization for Economic Cooperation and Development, OECD. In some cases, the increament of pharmaceuticals compsumption has raised up to 1500 % in countries as Denmark in 15 years (e.g. for lipid modifying agents). Although the main objective of the use of pharmaceuticals is to improve the quality of life of humans and of society in general, the continuous release of drug residues into the environment through a variety of sources may result in long-term exposure of wildlife with potential undesired effects on non-target organisms.

Once pharmaceuticals have entered the target organism, in humans most frequently by the oral route, they are subject to biotransformation processes, which convert the parent drug into one or several metabolites of usually reduced activity towards the biological receptor. The intact fraction of the administered drug, however, is excreted and thus reaches municipal wastewater. In addition, inappropriate disposal of unused drugs may further add to the burden of drugs in waste streams eventually being collected in wastewater treatment plants (WWTP). Apart from the enzyme-mediated metabolism of pharmaceutical substances in humans, or in animals in case of veterinary drugs, transformation products (TPs) can be generated by various means, including physical, chemical and biological processes.

Wastewater treatment plants, which primarily serve to reduce the content of organic matter in the waste stream, and thereby to lower the biological oxygen demand of the treated water, can be thought of as an important sink with its highly diverse pool of microorganisms degrading organic substances. Unfortunately, municipal WWTPs relying on standard conventional treatments with physical and biological stages are not optimized for complete elimination of drugs. Advanced treatment technologies, such as advanced oxidation processes, have shown great promise to enhance the removal efficiency of drugs in pilot plant but their implementation in full-scale plants is not yet widespread.

Therefore, effluent discharges from WWTPs into natural water bodies contain trace amounts of a multitude of drugs at concentrations in the ng/L to µg/L range. Despite the relatively low amounts, chronic drug exposure may compromise the health of aquatic organisms in contaminated habitats. In addition to the presence of pharmaceuticals in domestic wastewater,

pharmaceutical compounds in water bodies may also originate from landfill run-off and from disposal of animal wastes, particularly from units with intensive farming practices where the use of drugs for the prevention of disease spreading is commonplace.

In one way or another, pharmaceuticals, their human metabolites, and their TPs are in permanent contact with biota inhabiting natural waters. Pharmaceuticals dissolved in water may enter fish through the skin and the gills, and can be taken up in the bound state through the diet. Similarly to the distribution and elimination of drugs in the human body, drugs can partition into the various organs and tissues with distinct profile and can be transformed into metabolites. Taking into account that drug molecules are initially designed to interact with specific receptors through a number of molecular interactions the function and structure of exposed fish may be altered.

In the present PhD thesis, analytical methods were developed for the determination of human pharmaceuticals in muscle fish tissue, including the comparison and optimization of different types of extractions. The cleanup of the extracts was also optimized. For detection and quantification, liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry on a QToF instrument, in Full MS and SWATH mode was used. The method validations covered up to 47 pharmaceuticals in targeted analysis from 14 therapeutic classes. Additionally, suspect screening analysis using a list with more than 500 pharmaceuticals, metabolites, drugs of abuse, and TPs was performed.

The two validated analytical methodologies used either QuEChERS extraction or ultrasound extraction. In the former, a solid-liquid extraction was followed by separation of the organic solvent from the aqueous phase by salting-out. The cleanup of the extracts aimed at removing lipidic material, which may constitute a considerable fraction of fish tissue. Coextracted lipids were eliminated by specific dispersive-type adsorbents, namely EMR-lipid removal and Z-Sep adsorbent.

It took advantage of the so-called SWATH acquisition mode of the used QToF-MS instrument in a Sciex X500R, where ultra-fast data recording alternates between MS-only mode for the detection of molecular ions with up to ten sequential SWATH windows acquisitions, each of which covering an m/z 90-100 Da - wide window.

The validations of the overall methods included the parameters recovery, precision, matrix effect, reproducibility, sensitivity, robustness, and linearity. The first validated method performed with QuEChERS extraction, developed for freeze-dried fish muscle matrices, at 3 different levels of concentration up to 500 ng/g fish dw was applied to 16 samples collected from two different rivers in Italy and Greece. The quantitative analysis revealed the presence

of of sotalol, carbamazepine, trimethoprim, ketoprofen, acetaminophen, propranolol and venlafaxine at concentrations of as high as 80 ng/g of fish (dw).

Unlike the first method with its broad yet limited number of analytes, the second validated methodology included also a suspect screening analysis. In this method, fish fresh samples were examined for the presence of 47 pharmaceuticals in targeted mode validated at 3 levels of concentration up to 50 ng/g of fish fw. Complementary to the validated method, more than 500 pharmaceuticals, abuse drugs, metabolites, and TPs were included for analysis by suspect screening. Positive findings were confirmed by considering both molecular ions and characteristic fragment ions supported by the instrumental library database, that includes the SCIEX All-In-One HR-MS/MS library and also the NIST 2017 library bundle, that compile spectra in high resolution for more than 17000 compounds. Confirmation was also supported using the free online chemical database ChemSpider connected with the analytical SCIEX O.S. software.

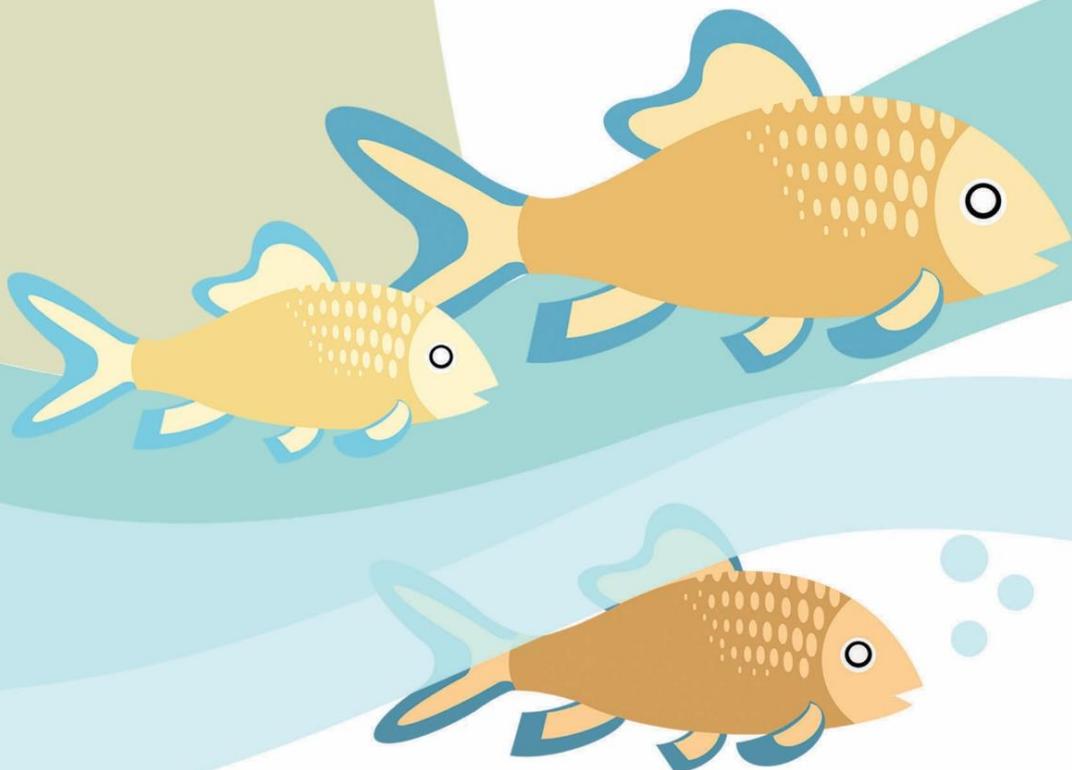
Application of this method for 32 fish samples from 4 European rivers: Italy (Adige), Greece (Evrotas), Spain (Llobregat), and a transboundary river crossing Slovenia, Croatia, Bosnia and Herzegovina, and Serbia (Sava); resulted in the detection of bezafibrate, caffeine, carbamazepine, clarithromycin, diltiazem, furazolidone, ketoprofen, sulfapiridine, trimethoprim and verapamil up to a maximum concentration of 69 ng/g of fish. Using suspect screening, benzoylecgonine, cocaine, nicotine, and ofloxacin were successfully detected and confirmed in the analyzed samples.

A further aspect of this thesis dealt with investigating the organ-specific distribution of drugs in native freshwater fish collected from the Llobregat river in NW Spain. Detection, and where possible, quantification, addressed ten biofluids, organs, and tissues. The processing of gills, bile, brain, heart, liver, muscle, pancreas, skin, plasma, and kidney from 12 samples belonging to four prominent species of the lower section of the river near Barcelona was followed by targeted and suspect screening analysis. In addition, the river water was monitoring for the occurrence of drugs.

While in the water samples, 53 substances were identified by either targeted or suspect analysis, as many as 34 compounds were detected in one or several organs of each species. Semi-quantitative assessment suggested preferential distribution of the pharmaceuticals, drugs of abuse, metabolites and TPs into kidney, skin, liver, brain and pancreas.

CAPÍTULO 1

Introducción



En el día a día, una cantidad casi incontable de compuestos contaminantes, se descargan sobre los sistemas de drenaje y conductos de aguas residuales en todo el mundo. El manejo que reciben estas aguas no siempre es el más adecuado, por lo que las aguas naturales presentan altas cargas de contaminantes, lo que hace cada vez más difícil su recuperación. Algunos de esos contaminantes son de uso diario en la población mundial; por ejemplo, los productos de aseo y de cuidado personal, incluyendo un tipo de productos que se encuentran entre los más consumidos en el planeta: los fármacos.

Por definición, los fármacos, son todas aquellas sustancias químicas con diversas propiedades fisicoquímicas que permiten la prevención, diagnóstico, tratamiento y/o cura de enfermedades en humanos y/o animales. Dichos compuestos generalmente están diseñados para actuar en órganos dianas u objetivos específicos dentro del cuerpo (órganos, tejidos, sistemas, etc.) y con una duración del efecto variable. Por eso mismo, los fármacos se clasifican de acuerdo a su propósito terapéutico u objetivo; por ejemplo: antibióticos, analgésicos, dermatológicos, cardiovasculares, entre otros ¹⁻³.

1.1 Fármacos: producción y consumo

La importancia de los fármacos en la sociedad, radica en su papel para mantener la salud pública en condiciones aceptables para una comunidad específica, al igual que mejorar la calidad de vida de cada uno de los individuos que la componen. Es por ello que los valores de consumo no son iguales en todos los países; cada comunidad tiene diferentes necesidades de acuerdo al ambiente en el que viva, como la temperatura ambiental, flora y fauna circundante, hábitos alimenticios, situación económica, presencia de algún tipo de eventualidades como desastres naturales, derrumbes, sequías, entre otros. Adicionalmente, el consumo de medicamentos se ve afectado por factores políticos como, la organización del sistema de salud del país y la prescripción de medicamentos que incluyen dosis, duración del tratamiento, y/o un aumento o disminución de algún brote en cierto momento y lugar.

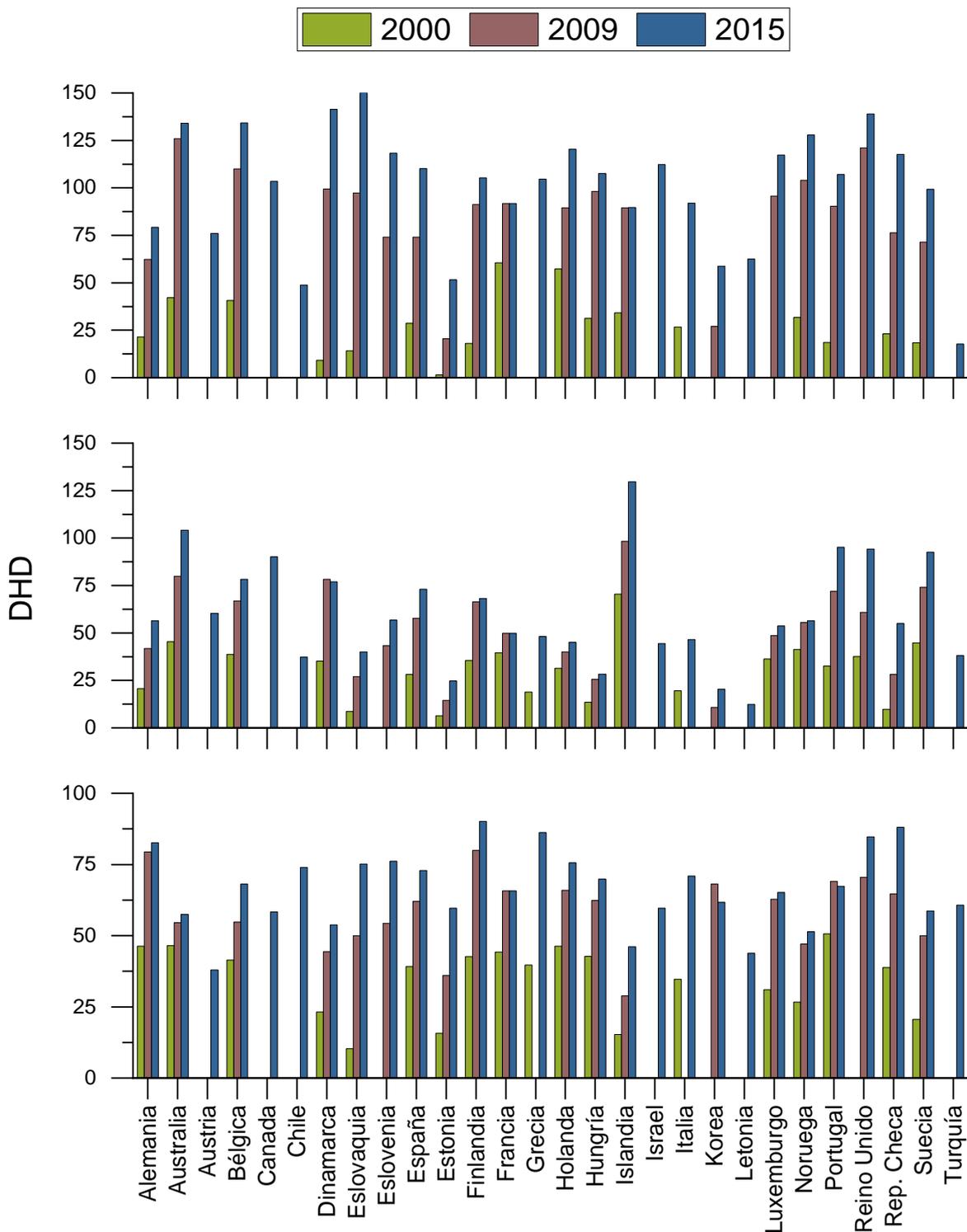


Figura 1. Tendencias de consumo de fármacos en los años 2000, 2009 y 2015 para países miembros de la OECDE. Valores expresados en unidades de dosis diarias definidas por cada 1000 habitantes y día (DHD). Parte superior: fármacos reductores de colesterol; Parte media: fármacos antidiabéticos; Parte inferior: fármacos antidepressivos. Fuente: 4-5.

En la *Figura 1* se presentan variaciones regionales en el consumo de fármacos, donde se observan las dosis diarias definidas (DDD) por cada 1000 habitantes por día (DHD) en diferentes países pertenecientes a la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo, OECD (por sus siglas en inglés *Organization for Economic Cooperation and Development*)⁴⁻⁶. En la figura se observan las tendencias de consumo en 28 países en los años 2000, 2009, y 2015 para 3 grupos de familias de fármacos diferentes. El aumento del consumo de los tres grupos de fármacos presentados para países como Dinamarca, Eslovaquia, España, Finlandia, Portugal, República Checa, y Suecia es evidente entre el 2000 y el 2009, aunque no es tan notoria cuando se analiza la variación entre el 2009 y el 2015. Lo que sí es significativo es el continuo aumento de las DHD en todos los países, a lo largo del tiempo, donde llegó a multiplicarse hasta 10 veces (contando desde el año 2000), como en el caso de los fármacos para la reducción del colesterol (parte superior, *Figura 1*), y cuyo aumento es mucho más notorio que en los otros dos grupos de medicamentos que se presentan en la misma gráfica.

De manera similar, a nivel local, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) presenta informes públicos de consumo de diversas familias de fármacos entre los años 2000 y 2018 en España y su respectiva comparación con respecto al consumo a nivel global. De los informes se puede concluir que hay ciertos tipos de medicamentos que se han mantenido con un consumo estable en España durante el periodo enmarcado entre las dos últimas décadas (años 2000-2018) representados en la *Figura 2*, como es el caso de medicamentos para la hipertensión (9 dosis diarias por cada 1000 habitantes en promedio), antiepilépticos (16 dosis diarias por cada 1000 habitantes en promedio), betabloqueantes (23 dosis diarias por cada 1000 habitantes en promedio) o los diuréticos (44 dosis diarias por cada 1000 habitantes en promedio). Sin embargo, en la misma figura también se muestra una tendencia de aumento en el consumo de medicamentos en otras familias de fármacos como es el caso de los fármacos hipnóticos (de 17 a 31 dosis diarias por cada 1000 habitantes entre 2000 y 2012), ansiolíticos (de 39 a 58 dosis diarias por cada 1000 habitantes; entre 2000 y 2012), los fármacos que actúan sobre el sistema renal (de 168 a 179 dosis diarias por cada 1000 habitantes; entre 2010 y 2018), antidiabéticos

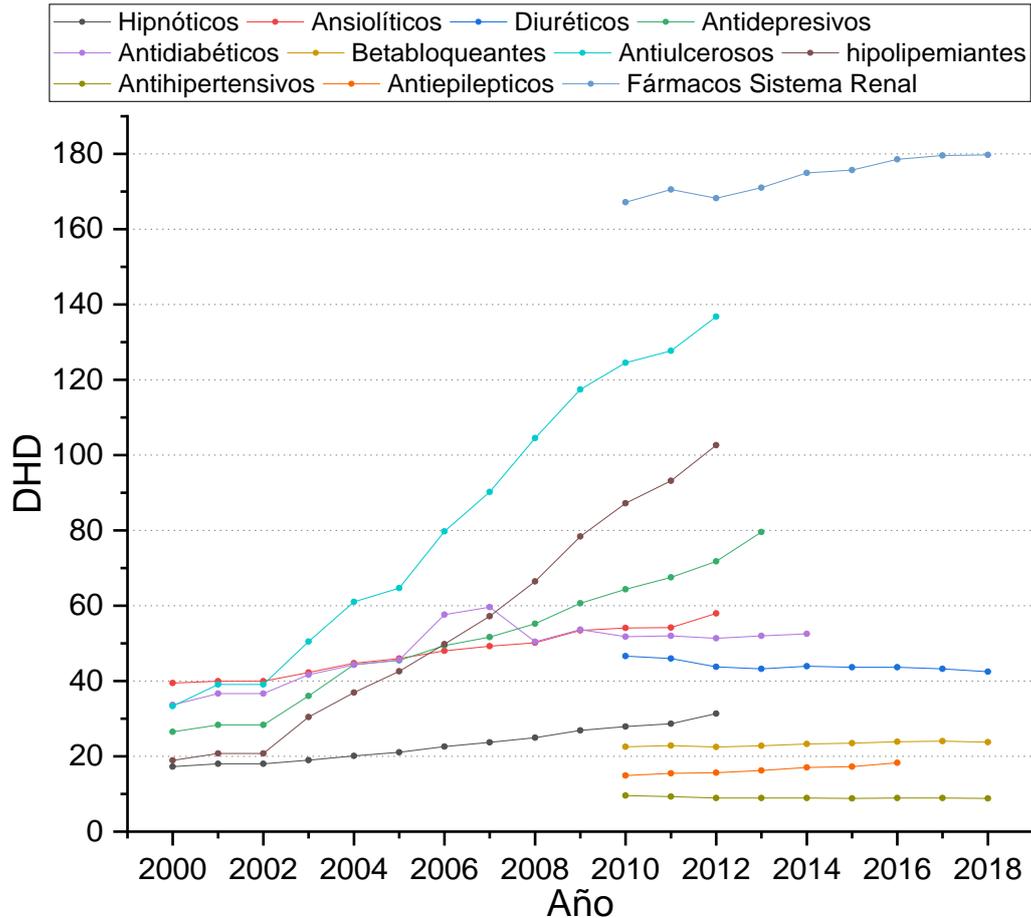


Figura 2. Historico consumo de fármacos en España años 2000 - 2018. DHD: dosis diarias definidas por cada 1000 habitantes y día (DHD). Fuente: 7.

(de 45 a 70 dosis diarias por cada 1000 habitantes; entre 2000 y 2014), y algunos casos muy evidentes de aumento de consumo como antidepresivos (de 25 a 80 dosis diarias por cada 1000 habitantes; entre 2000 y 2013), antiulcerosos (de 30 a 135 dosis diarias por cada 1000 habitantes; entre 2000 y 2012), y los hipolipemiantes (entre 18 y 100 dosis diarias por cada 1000 habitantes; entre 2000 y 2012) ⁷.

1.2 Entrada de los fármacos al medio ambiente

El aumento tanto de la producción industrial, así como del consumo de medicamentos, ha desatado un aumento en la entrada de fármacos al medio ambiente. Esto conlleva a una gran preocupación general en la comunidad científica, por los efectos que presentan la continua exposición de la fauna y la flora a un gran número de productos en diversas concentraciones, y cada uno con su respectiva actividad biológica ⁸. Hoy en día, el impacto y los riesgos que pueden tener los fármacos en el medio ambiente deben ser evaluados para su producción y comercialización. Dicha evaluación se realiza monitoreando *la persistencia, la bioacumulación y la toxicidad (PBT)* de los productos, de acuerdo a la directiva 2001/83/CE del parlamento

europeo, que a su vez fue modificada el 15 noviembre del 2018 ⁹. *La persistencia* está relacionada con las sustancias activas que no se degradan en el medio ambiente; *la bioacumulación* es el proceso por el cual una sustancia activa se acumula en un organismo determinado; y *la toxicidad* se define como el grado de efectividad de una sustancia tóxica, es decir una sustancia que contiene veneno o produce envenenamiento ¹⁰.

La presencia de fármacos (y muchos otros compuestos) en las aguas contaminadas o en recursos hídricos, es un fenómeno común y permanente a nivel global ^{3, 10-16}. En general está muy bien documentado que una de las principales rutas de entrada de los fármacos al medio acuático es a través de las aguas residuales ^{15, 17-33}. Ahora bien, la presencia de los fármacos en las aguas residuales puede tener varios orígenes: (i) los fármacos consumidos de uso doméstico (animales / humanos) y hospitalario, (ii) el uso de medicinas veterinarias en las granjas de producción animal y piscifactorías, y (iii) descargas de empresas de químicos relacionadas con los fármacos.

La presencia de los fármacos en las aguas residuales de uso doméstico y hospitalario se debe a que los productos después de ser ingeridos por los humanos, no son metabolizados por completo, lo que hace que durante los procesos de excreción (orina, heces, sudor) y lavado (en caso de uso tópico) se excreten o remuevan de la piel en sus formas biológicamente activas. Pero también pueden llegar en sus formas metabolizadas ³². El metabolismo o la biotransformación de los fármacos es el proceso por el cual los organismos vivos efectúan cambios bioquímicos en una molécula. Estas formas metabolizadas o metabolitos, son productos de la reacción enzimática con el fármaco de origen que generalmente se producen en el hígado, los riñones, el tracto gastrointestinal, y en menor proporción en los pulmones y el plasma de los animales y humanos ³⁴⁻³⁶. Dichos productos metabólicos pueden llegar a ser inocuos, menos tóxicos, o más tóxicos que el compuesto de origen o compuesto padre ³⁷⁻³⁸. Los metabolitos predominantes de los fármacos en el ser humano, generalmente se determinan durante el desarrollo del fármaco, ya que muchos de ellos se eliminan principalmente como metabolitos. Por ejemplo, entre el 0 y el 15 % del diclofenaco, el ibuprofeno y el naproxeno se excretan como compuestos padres, y el resto, son formas metabolizadas ³⁹⁻⁴⁰.

El metabolismo de los fármacos se puede dividir en dos fases, fase I y fase II. Algunos fármacos sólo experimentan reacciones de fase I o reacciones de fase II. Por lo tanto, la numeración de las fases es una clasificación funcional, no secuencial. Pero cuando se tienen los dos tipos de reacciones, generalmente, pero no siempre, las reacciones se producen de manera secuencial.

Los metabolitos de fase I, son los metabolitos directamente productos de la reacción enzimática dentro del organismo, en las cuales generalmente se pierde o se altera la actividad fármacológica, y tienen como resultado la oxidación, hidroxilación, dealquilación, sulfoxidación, y/o la hidrólisis del fármaco de origen. Estos productos de la fase I pueden ser especies fármacológicamente activas o inactivas y suelen representar sustratos para las enzimas de fase II ^{34-36, 41-42}.

Los metabolitos de fase II, son productos conjugados procedentes de una o más reacciones de conjugación sintética entre el fármaco y una molécula endógena o, entre un metabolito de fase I y una molécula endógena. El resultado de las reacciones de fase II son productos de mayor polaridad en comparación con los fármacos originales, lo que permite que se excreten más fácilmente en la orina o la bilis a fin de detoxificar el organismo y que por lo general, aunque no siempre, son fármacológicamente inactivos. Este tipo de reacciones dan como resultado moléculas de glucurónidos (con O o N), sulfatos, aductos de glutatión, conjugaciones con aminoácidos como la glicina, o la taurina entre otros ^{34, 36, 42-43}.

Gran parte de la presencia de los fármacos en las aguas residuales domésticas y hospitalarias, se debe al manejo inadecuado de productos caducados, sobrantes, y sus respectivos envases a través de las aguas de baño (lavamanos y cisternas) y/o las basuras ⁴⁴⁻⁴⁵. Sin embargo, en este tipo de aguas residuales suelen contener también una alta carga de microorganismos patógenos, nutrientes, materia orgánica, drogas recreativas, drogas ilegales de abuso, sustancias endocrinas y productos de cuidado personal ²⁹.

Con respecto al uso de medicinas veterinarias en la producción animal, los fármacos usados en la alimentación o el bienestar saludable de los animales, son excretados al suelo y el estiércol se reutiliza como abono fertilizante en cultivos. Una vez en el suelo, con ayuda de agua lluvia, o agua de riego, los fármacos se solubilizan en el agua y se movilizan a otras fuentes hídricas a través del lixiviados ⁴⁶⁻⁴⁷. Las aguas residuales de producción ganadera y de acuicultura de base terrestre, suelen contener materia orgánica (a menudo a muy altas concentraciones), nutrientes disueltos y residuos veterinarios como fármacos de uso animal, por ejemplo, antibióticos y hormonas de crecimiento artificial. Los antibióticos son usados, principalmente, para impedir (uso profiláctico) y tratar (uso terapéutico) infecciones bacterianas, por ejemplo, durante la producción de peces y mariscos, ²⁹.

Adicionalmente, diferentes actividades humanas afectan la naturaleza de las aguas naturales. Por ejemplo, las descargas de las empresas por medio de las aguas residuales industriales, que son muy variadas dependiendo del tipo de industria. En el caso de la industria química y específicamente, la industria farmacéutica, se presenta un aporte importante de fármacos sí

no son tratadas adecuadamente, sin embargo, el mayor aporte, sigue siendo el de la excreción y metabolismo de los pacientes a través del agua residual ⁴⁸. De esta manera, se detecta la presencia de fármacos en fuentes hídricas naturales, como son las aguas superficiales, subterráneas, ríos, lagunas, depósitos de agua, e incluso en el agua potable ⁴⁹⁻⁵⁰. La reutilización de las aguas residuales tratadas en riegos de cultivos, al igual que el uso de los lodos de depuradoras como abono, hace que los fármacos lleguen a través de la infiltración a fuentes hídricas naturales ^{14, 51-54}.

La persistencia de estos compuestos en las aguas se debe principalmente a su permanente entrada al medio, su baja volatilidad, su alta solubilidad en agua y su baja biodegradabilidad. Por ejemplo, algunos fármacos tienen la capacidad de ser persistentes en la naturaleza y mantenerse biológicamente activos por mucho tiempo, casos como en naproxeno, el sulfametoxazol y la eritromicina pueden resistir hasta un año en la naturaleza estando biológicamente activos, mientras que el ácido clofibrico se puede mantener en su forma original por varios años ⁵⁵. Explicaciones gráficas y bien documentadas de las fuentes de origen y el transporte de los fármacos en el medio ambiente se pueden encontrar en muchos trabajos científicos ^{47, 56}.

1.3 Tratamiento de aguas residuales

Aunque se tiene legislado que las aguas residuales sean tratadas en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), en muchos países no industrializados, las aguas residuales se descargan a las aguas naturales sin ningún tratamiento, o con tratamientos muy básicos. Así lo demuestra el informe de las naciones unidas *Wastewater: The Untapped Resource* del 2017 ²⁹. En dicho informe se presentan los porcentajes de agua no tratada en el 2015 en los países con bajos ingresos (92 %), en países con ingresos medio-bajos (72 %), en países con ingresos medios (62 %), y en países con altos ingresos (30 %), con aspiraciones de reducir cada uno de esos porcentajes a la mitad para el año 2030 ²⁹.

El objetivo de los tratamientos de agua residual en las EDARs consiste en remover, o transformar los productos contaminantes por tratamientos primarios, secundarios y avanzados (*Figura 3*). Sin embargo, no todos los productos presentes en los influentes de las depuradoras, tienen el mismo destino. Durante el tratamiento, algunos productos son removidos y algunos otros son transformados, inclusive produciendo compuestos o productos de transformación que en algunos casos pueden ser más tóxicos o dañinos ambientalmente que el fármaco o metabolito de origen ⁵⁷. Todo esto es debido a que la remoción de fármacos de las aguas residuales no solo depende de las propiedades fisicoquímicas de los

compuestos, sino que es también dependiente de los procesos que tienen luego en las EDARs, produciendo diferentes porcentajes de remoción de los fármacos ^{56, 58-62}.

Las EDARs funcionan bajo un principio básico o un esquema genérico de un pretratamiento, un tratamiento primario, un tratamiento secundario y en algunos casos un tratamiento avanzado, como se presenta en la *Figura 3*.

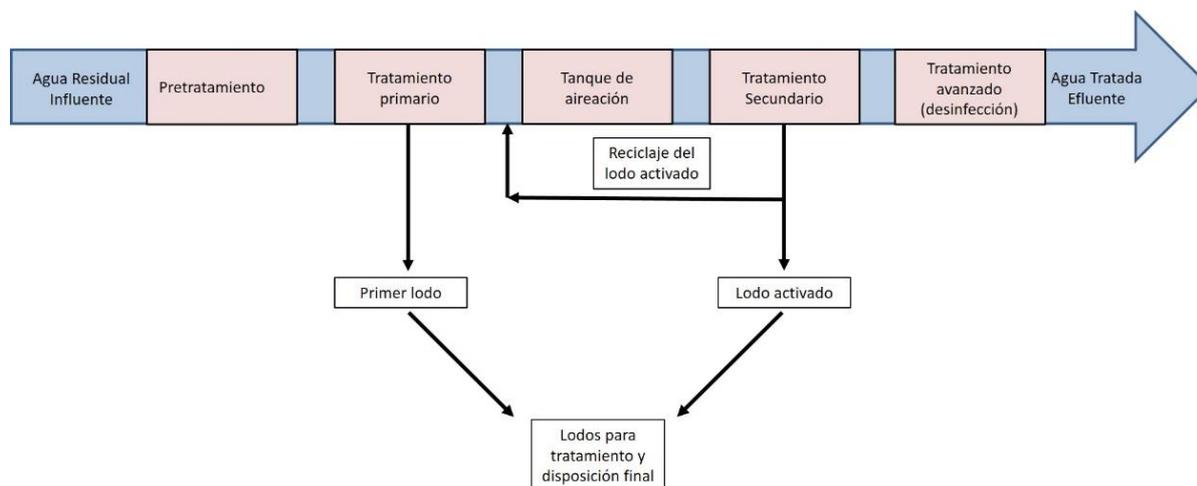


Figura 3. Esquema general de una Estación Depuradora de Aguas Residuales, EDAR. Adaptado de fuentes: 63 - 64.

Durante el pretratamiento, se busca remover los residuos sólidos más grandes, sacar las arenas, eliminar las grasas y regular el flujo de entrada de agua.

Durante el tratamiento primario, sedimentaran las partículas sólidas más pesadas, y se retiran las grasas, aceites y residuos sólidos ligeros que puedan flotar durante el tiempo en que el agua se queda estancada a manera de reposo, en un tanque. Durante estos dos primeros tratamientos, la remoción de fármacos suele ser muy baja ⁶⁵⁻⁶⁹.

Durante el tratamiento secundario se degrada la materia orgánica disuelta en las aguas residuales, con ayuda de procesos biológicos. El uso de bacterias en este tipo de tratamiento es comúnmente soportado con lodos activados, conocidos por su nombre en inglés *Conventional Activated Sludge, CAS*; o también usando *Membrane Biological Reactor, MBR*. Durante este tratamiento, la materia orgánica disuelta se reduce por medio de degradaciones biológicas o por procesos físicos de adsorción hasta en un 90 % ⁶⁴. Sin embargo, se conocen casos de metabolitos conjugados de glucurónidos o sulfatos que se rompen, liberando lo que sería el principio activo del fármacos y generando así mayor concentración de los mismos a la salida de la EDAR que a la entrada, como por ejemplo el N₄-acetilsulfametoxazol, o las hormonas estrona-glucuronido, o 17-β-estradiol-glucuronido que se retransforma en el antibiótico u hormona de procedencia ^{38, 70-71}. Durante este tratamiento secundario, se obtiene

una biomasa, que se separa nuevamente por sedimentación y el agua tratada puede liberarse como efluente a las aguas naturales.

En algunos casos, las EDARs cuentan con tratamientos avanzados que son más específicos y que pueden incluir sistemas de desinfección. Estos tratamientos están implementándose cada vez más, aunque su implementación depende en gran medida de su costo, y generalmente es aplicado a las aguas que serán descargadas sobre ecosistemas controlados o que serán aguas reutilizadas en riego, para generación de agua potable, recarga de acuíferos, entre otros. Este tratamiento específico contiene procesos de filtración, eliminación de nutrientes, y/o desinfección. Con dichos tratamientos avanzados, se logra, en algunos casos, eliminar hasta el 80 % de los fármacos presentes en las aguas residuales^{56, 58}. Teniendo en cuenta que en los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas de tratamientos específicos, en aras de mejorar la remoción de los contaminantes de las aguas residuales, se detallaron los procesos convencionales y avanzados para la remoción de fármacos en aguas residuales en la publicación de un capítulo del libro ***Integrated and Sustainable Environmental Remediation*** de la Sociedad Americana de Química (*American Chemical Society, ACS*) en su colección de publicaciones *ACS Symposium Series*⁷².

1.4 Presencia de fármacos en las aguas superficiales

Después del tratamiento de las aguas residuales, aún persisten en los efluentes muchos contaminantes entre los que se encuentran los fármacos, con un variado rango de concentraciones, ya que las EDARs no están diseñadas para remover este tipo de compuestos^{37-38, 59-61, 73-74}. La presencia de los fármacos en las aguas residuales tratadas, y por ende, en las aguas superficiales, es un problema que se viene estudiando hace aproximadamente 20 años. En la *Figura 4* se presentan concentraciones de fármacos reportados en aguas superficiales en diferentes estudios con detecciones hasta por encima de los 600 ng/L como la hidroclorotiazida, el ibuprofeno, la oxycodona, la paraxantina, el sulfametoxazol, y el valsartán.

Como se observa en la *Figura 4*, la concentración de los fármacos que se encuentran en las aguas superficiales es variable. Además, va cambiando a lo largo del tiempo y con el recorrido del agua, gracias a procesos de atenuación natural y procesos fisicoquímicos. Desde el punto de vista de procesos naturales, se encuentran los procesos físicos como la dispersión y la dilución, los cuales no alteran la estructura química del fármaco, pero su concentración se puede llegar a reducir incluso un orden de magnitud con respecto a las concentraciones detectadas en las EDARs^{33, 59, 71, 75-78}. También se encuentra variación por procesos de sorción (que incluye absorción y adsorción)⁷⁹⁻⁸². Igualmente hay una disminución de la

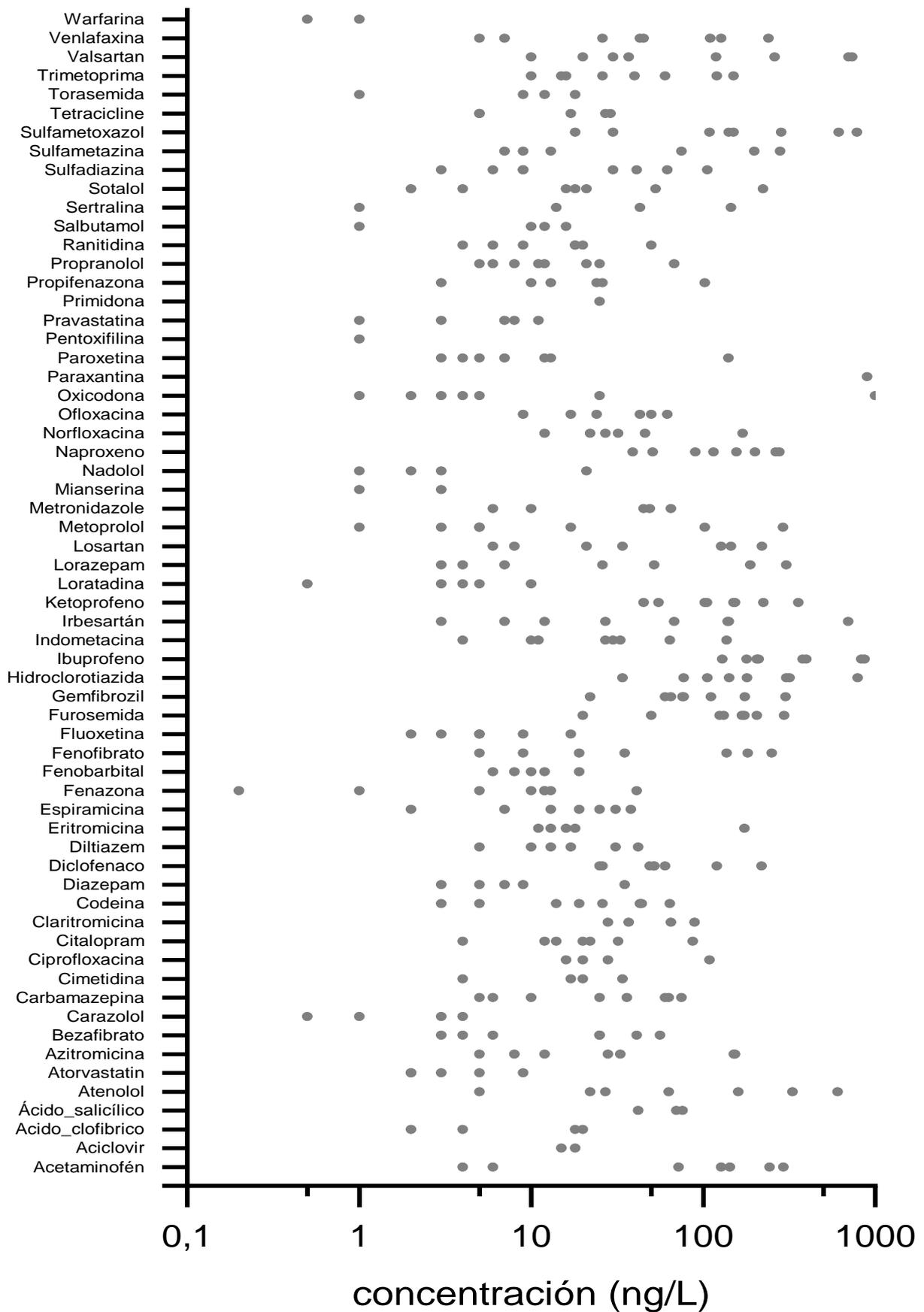


Figura 4. Detección y cuantificación de fármacos en aguas superficiales. Fuentes: 16, 18, 20, 25-27, 80, 83-90.

concentración de fármacos por procesos químicos que incluyen fotodegradación, hidrólisis y degradaciones catalíticas con el ambiente ⁹¹⁻⁹⁵. Finalmente hay procesos biológicos como la degradación biológica (por medio de hongos, microorganismos, plantas o animales), biosorción, y/o bioacumulación ^{71, 79, 82, 96-101}. En mucha menor proporción se encontrarían procesos de evaporación, que están afectados por la baja la presión de vapor de los fármacos, el peso molecular más alto que las moléculas volátiles, la alta polaridad y la solubilidad.

El estudio de los fármacos en sedimentos naturales y material particulado del río también se ha realizado en busca del destino ambiental de este tipo de contaminantes. Sin embargo, las concentraciones detectadas no son tan predominantes como en el caso de las aguas. Para citar algunos estudios se pueden presentar el caso de la investigación realizada por Arya y sus colaboradores ⁸⁰ en el río Potomac (Virginia, Estados Unidos), donde determinaron concentraciones de acetaminofén, difenhidramina, gemfibrozil, ibuprofeno, y trimetoprima entre 1 y 52 ng/g de sedimento. Al igual que los estudios realizados en nuestro grupo de investigación por Osorio y sus colaboradores ⁹⁰ en cuatro ríos españoles, donde se monitorizaron más de 70 fármacos en agua y sedimentos. Los análisis de este trabajo demostraron que mientras el total de las concentraciones en el agua variaban entre 759 y 13000 ng/L, las concentraciones en los sedimentos eran mucho más bajas y estables (entre 1000 y 1875 ng/g). Sin embargo, las variaciones en el agua se deben a varios factores como la época del año (dilución por lluvias o concentración por sequías) que también conllevan procesos de desorción de los fármacos de los sedimentos. Otro trabajo llevado a cabo en este instituto, realizado por da Silva y sus

colaboradores ⁷⁷ en el río Ebro (España) donde estudiaron sólidos suspendidos y sedimentos con detección de 30 y 34 fármacos respectivamente entre 0,5 y 657 ng/g. Estos valores de sorción en sedimentos y material particulado parece haber aumentado a lo largo del tiempo como se reporta en ¹⁰². Pero de manera general, debido a su polaridad, los fármacos tienden a mantenerse disueltos en la fase acuosa antes de adherirse a materiales particulados o sedimentos, lo que da como resultado que sus estudios en dichas matrices presenten valores de concentración, por lo general, más bajos ¹⁰³. Debido a las mayores concentraciones, y a la movilidad que tiene la fracción de fármacos que se mantiene en el agua, la probabilidad de que puedan entrar en contacto con los organismos acuáticos (flora y fauna) es mayor.

1.5 Partición de los fármacos entre el agua del río y la biota

Los fármacos presentes en agua, entran en contacto con los organismos acuáticos de manera prolongada. De esa manera, el fármaco, o cualquier otra sustancia disuelta en el agua, puede entrar al interior del organismo a través de las branquias y tejidos epiteliales. La acumulación

de un contaminante que ingresa a través de este medio se conoce como *bioconcentración*. Si el fármaco (o la sustancia contaminante) también ingresa al organismo a través de la dieta o por ingesta de sedimentos del fondo del río o mar, y se acumula en el pez, este proceso se conoce como *bioacumulación*. Finalmente, el proceso por el cual el fármaco o la sustancia contaminante, se transpasa acumulándose a través de dos o más niveles en la cadena trófica se llama biomagnificación ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Teniendo en cuenta que los organismos acuáticos interactúan unos con otros dentro de la cadena alimenticia, el conocimiento de la tendencia de la bioconcentración de los residuos de contaminantes provenientes del agua y de la ingesta por la dieta es importante, sobretodo cuando se evalúa los efectos de estos contaminantes por la exposición real en el medio ambiente.

La información sobre ecotoxicidad, bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación es necesaria y es útil desde el punto de vista de la regulación, y para la evaluación de otros procesos como por ejemplo, la absorción de los fármacos del agua en los organismos, seguido de la eliminación o transformación metabólica y/o acumulación como compuesto original. Una explicación de los procesos que sufren los fármacos desde el agua hacia el interior del pez, y su transformación interna, hacia la metabolización y posterior excreción, se presenta en la *Figura 5*, donde se demuestran que las vías de entrada de los fármacos hacia interior del organismo son básicamente la ingesta por la dieta, seguido por la absorción y difusión a través de las agallas (o en menores casos, por la piel). Dentro del organismo del pez, varios procesos pueden suceder como el transporte interno por los fluidos del pez y el tracto gastrointestinal, con acumulación en grasa y tejido lipídico. Si hay acumulación del fármaco, se verá un efecto de dilución (muy leve) por crecimiento del individuo. Finalmente, en diferentes órganos del pez, se sufren procesos metabólicos, que termina con una excreción y detoxificación del pez hacia el exterior.

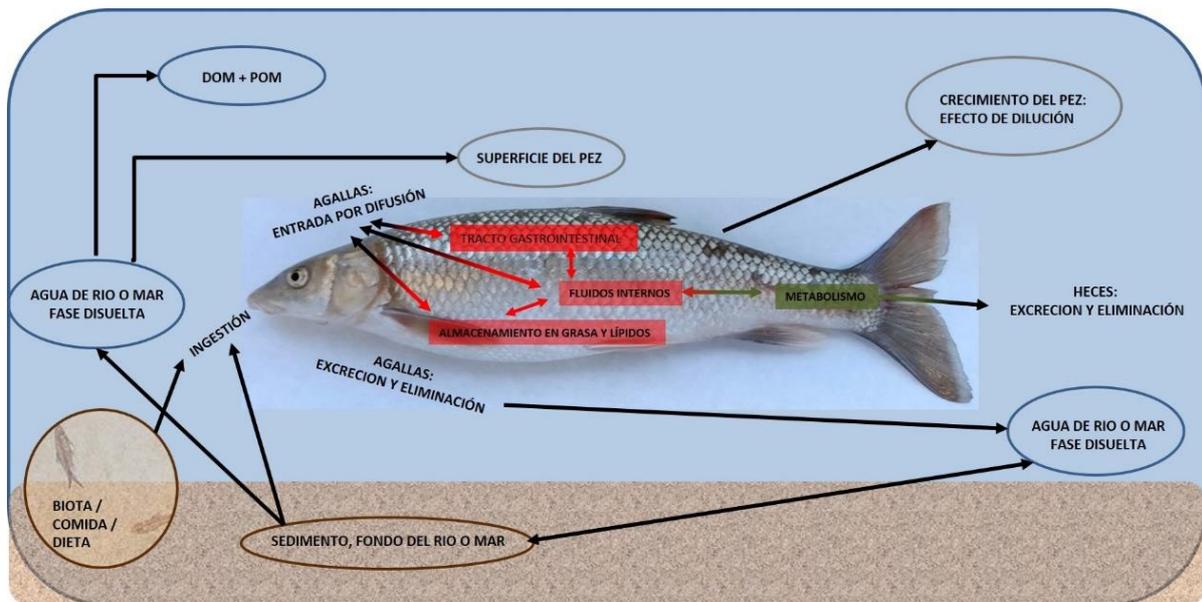


Figura 5. Diagrama explicativo de la transferencia de fármacos (y contaminantes) desde la fase acuosa hacia el interior del pez. DOM: Materia Orgánica Disuelta; POM: Material Orgánico Particulado. Adaptado de fuentes: 104, 106.

Hoy en día, ya se encuentran reportados diversos estudios que describen la toxicidad de los fármacos en peces y su (bio)-acumulación ¹⁰⁷. De hecho, el impacto que producen este tipo de contaminantes, debe ser evaluado midiendo la bioacumulación del fármaco en los organismos acuáticos ⁹.

Esto también trasciende al campo de los peces para el consumo humano, ya que directamente afecta la salud humana. En este caso, se establecen unos límites máximos de residuos (MRL, por sus siglas en inglés *maximum residue limits*) de aquellos fármacos que entrañan riesgos conocidos. Esos MRL están entre 4 y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para antibióticos en peces de consumo humano de origen animal en las piscifactorías de acuerdo al reglamento de la comisión de la UE No 37/2010 ¹⁰⁸.

Uno de los primeros trabajos que reportó la detección de fármacos en peces procedentes de aguas superficiales fue realizado por Brooks et al. en el 2005, estudiando individuos expuestos a descargas de aguas residuales en Texas, Estados Unidos. En el estudio se determinó la presencia de antidepresivos como la fluoxetina y sertralina y algunos de sus metabolitos en concentraciones hasta los 10 ng/g ¹⁰⁹.

Poco a poco se ha detectado un aumento en los estudios acerca de la presencia de fármacos en peces, al igual que su metabolismo, bioacumulación y biomagnificación. Para evaluar la exposición de los peces a los fármacos, la bilis resulta ser muy adecuada siempre y cuando

los compuestos se metabolicen y secreten fácilmente en el hígado y la bilis y no se acumulen en el músculo u otros órganos ¹¹⁰.

En los peces, por ejemplo, la biotransformación de diclofenaco, el ibuprofeno y el naproxeno es muy eficiente y ya se han identificado varios metabolitos. En la bilis predominan los acilglucuronidos, pero también se encuentran conjugados de sulfato y metabolitos hidroxilados ^{43, 111-113}.

Por ejemplo, la *Figura 6* muestra identificación de metabolitos de fase I y fase II del ibuprofeno en peces inyectados de la especie *Solea senegalensis* desarrollado en nuestro grupo de investigación ⁴³. En este caso se trabajaron con dos fármacos que se detectan comunmente en las aguas superficiales: el ibuprofeno y la carbamazepina. En el caso de la *Figura 6*, se detectaron metabolitos de fase I provenientes de la hidroxilación del ibuprofeno (M222 y M238), metabolitos de fase II del ibuprofeno, producto de las reacciones con glucurónidos (M382, M398, M414), conjugaciones con taurina (M313, M329, M345) y también la mezcla de glucuronidos y taurina en la misma molécula (M505). Aunque no se presentan en esta memoria, en el mismo estudio también se detectaron otros metabolitos de la carbamazepina como los provenientes de la hidroxilación, epoxidación y la glucuronidación de los compuestos hidroxilados.

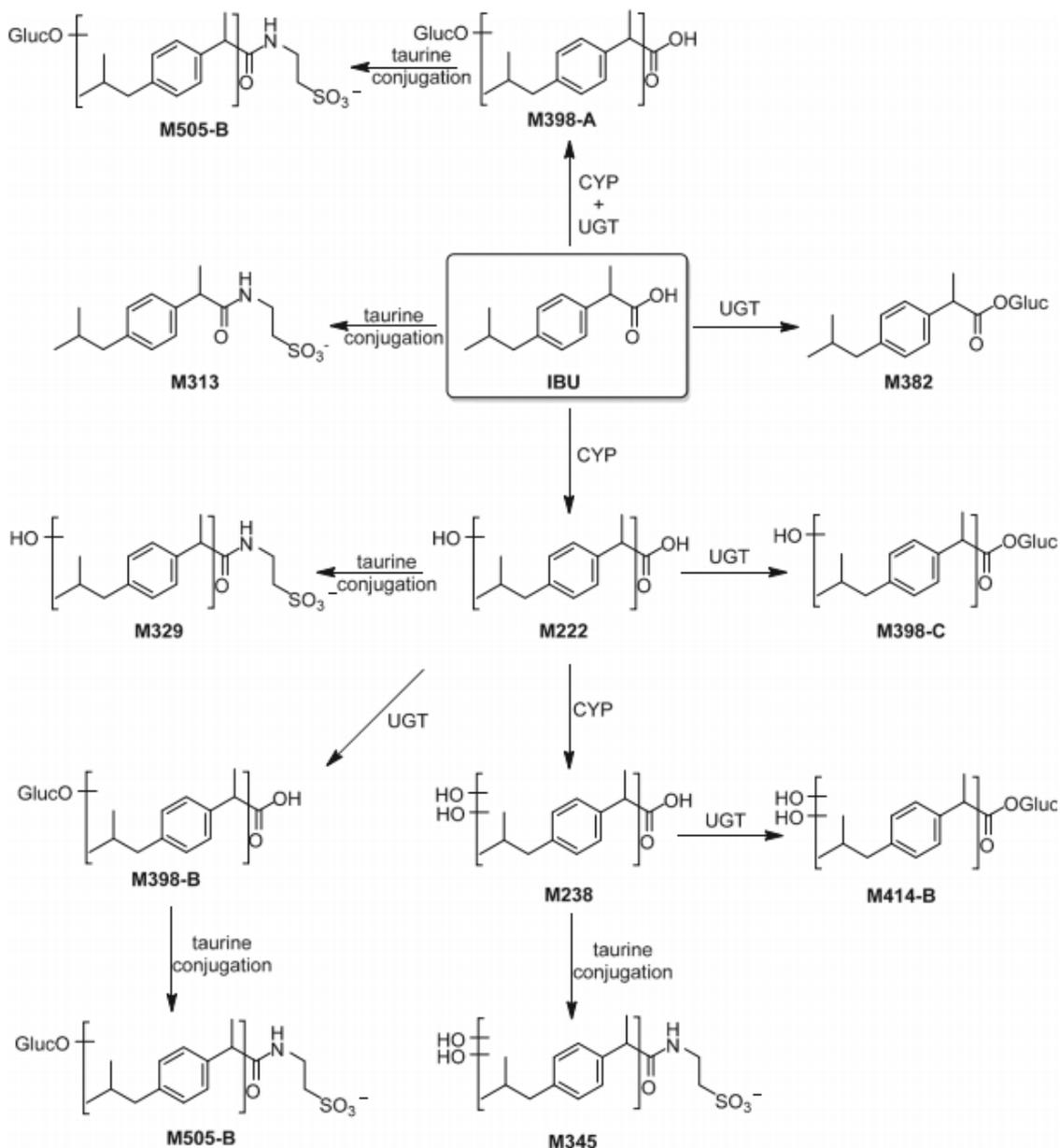


Figura 6. Ruta metabólica propuesta para el ibuprofeno en peces (especie *Solea senegalensis*). Reimpreso con permiso de fuente: 43.

Entre otros trabajos está el estudio de Kidd y sus colaboradores en el año 2007¹¹⁴ donde llevaron a cabo una investigación durante 7 años en un lago experimental, en Ontario, Canadá, exponiendo peces ciprínidos, *Pimephales promelas*, a un estrógeno utilizado como anticonceptivo: 17- α -etinilestradiol, en muy baja concentración (5-6 ng/L). Como resultado del estudio, se observó que esta hormona sintética lograba alterar el desarrollo genital de los peces machos y su comportamiento llevaba a tener relaciones sexuales entre peces del mismo sexo, al igual que se alteraba la ovogénesis en los peces hembras, lo que conllevará, en un futuro próximo, a la extinción de la especie en el lago y con lo que se demuestra la toxicidad de los fármacos en especies acuáticas salvajes. Un estudio similar con el mismo compuesto, pero variando la dosificación, fue realizado por Armstrong et al. en el año 2016

¹¹⁵, con conclusiones similares al estudio realizado en el 2007. Igual sucedió en el 2019, con el estudio realizado por Jackson y sus colaboradores con el mismo 17- α -etinilestradiol pero con exposición más prolongada ¹¹⁶. A similares conclusiones ya habían llegado Larsson y sus colaboradores en 1999, trabajando con efluentes donde ya se había detectado éste tipo de hormonas, trabajando experimentalmente con la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) ¹¹⁷.

La alteración del comportamiento sexual de los peces y el desarrollo de sus órganos sexuales por parte de compuestos diferentes a las hormonas, también fue estudiado por otros autores ¹¹⁸⁻¹²², donde sobresalen las investigaciones publicadas por Niemuth y sus colaboradores ¹²⁰, donde concluyó que la metformina, un fármaco antidiabético, actúa como disruptor endocrino y afecta la sexualidad de los peces, cuando se encuentra en concentraciones relevantes en el agua (40 μ g/L). A similares conclusiones llegaron Lee y sus colaboradores ¹²¹ demostrando que el gemfibrozil, un fármaco para tratar niveles de triglicéridos en sangre, afecta también el comportamiento sexual y la reproducción en los peces después de un largo tiempo de exposición. Pero en el caso del gemfibrozil, la repercusión no trasciende en la línea generacional ¹²². Una investigación más reciente fue realizada por McCallum et al. en 2017 ¹²³. En este caso se sometieron peces a efluentes de aguas residuales ya tratadas durante 28 días. Con esto se observó que la agresividad de los peces se reducía. Al parecer, alguno(s) de los once fármacos encontrados (de los 93 estudiados) en cerebro, plasma, gónadas, hígado y músculo afectaba el comportamiento de agresividad que es normal en los *Neogobius melanostomus* durante la adquisición de su propio terreno y durante los procedimientos de defensa. Más estudios sobre los efectos de los fármacos en peces se encuentran publicados en revistas científicas como por ejemplo ^{2, 124-129}.

Sin embargo, los efectos que provocan los fármacos individuales sobre los organismos acuáticos no siempre son fáciles de reconocer. Esto fue lo que sucedió con un experimento usando tramadol ¹³⁰, donde una vez expuestos los peces por 24 días, a 3 concentraciones distintas del analito de interés, los resultados no fueron concluyentes. Éste estudio contó incluso, con participación independiente de expertos de Reino Unido y Japón analizando los resultados de manera aislada. Las observaciones de los investigadores, no lleva a una conclusión clara, ya que algunos expertos dicen que las concentraciones bajas de tramadol afectan el comportamiento de los peces, pero que las concentraciones altas no lo afectan, y otro grupo de expertos piensan que no hay una afectación evidente. Resultados similares, donde no se evidencian claramente los efectos sobre peces, está reportado con el diclofenaco en agua a diferentes concentraciones ¹³¹. Es posible que a estas concentraciones se esté muy cerca del nivel de efectos adversos no observables, o nivel NOAEL (*No Observable Adverse Level Effects*), que son los niveles de exposición a los cuales no se observa un efecto o cambio

significativo a nivel estadístico o biológico. Sin embargo, para ampliar el estudio de los efectos de los fármacos en organismos acuáticos, hoy en día se está evaluando el efecto que tiene la mezcla de fármacos (*cocktail o mixture*) sobre los peces, como los trabajos reportados durante el año 2019 de Zhou et al, Bachour et al, y Godoy et al ¹³²⁻¹³⁴.

El estudio de los fármacos en los peces se puede evaluar desde dos perspectivas diferentes. La primera perspectiva, es el efecto y la toxicidad de los fármacos en los peces, como lo explicado anteriormente. Desde esta perspectiva, se analizan los niveles de toxicidad y los efectos que se producen a diferentes concentraciones del fármaco en agua. En la segunda perspectiva, se analiza internamente el individuo y se comparan los niveles de acumulación de los fármacos al interior del organismo.

En éste último caso, se pueden citar los trabajos realizados en Canadá, ¹³⁵ y Estados Unidos ¹³⁶. En el primer trabajo, se evalúan los factores de bioacumulación de los fármacos en peces después de 3 semanas de exposición en diferentes puntos de un humedal que recibe aguas residuales tratadas. Se determinaron hasta 15 fármacos en el plasma de los peces, de los 64 fármacos que se encontraron en el agua del humedal. En el segundo trabajo, se detalla un seguimiento de 20 fármacos en 25 puntos de muestreo en ríos de los Estados Unidos. Como resultado, de los 20 fármacos analizados, se encontraron 13 en el músculo de los peces, a concentraciones máximas de hasta 37,5 ng/g de pez del sotalol, y que no fue el producto farmacéutico más frecuentemente detectado, como si lo fue la venlafaxina, con una concentración máxima de 22,9 ng/g de pez.

Sin embargo, no todos los fármacos se acumulan en los peces. Por ejemplo, los trabajos realizados en los años 2012-2013 por los autores de los estudios ¹³⁷ y ¹³¹, comprueban que la carbamazepina y el diclofenaco se detectaron en los peces, pero no se bioacumulan en el organismo. Según la investigación realizada por Nallani y sus colaboradores ¹³⁸, al igual que en el caso anterior, la bioconcentración del ibuprofeno en peces después de exposición por 28 días (a 250 µg/L) seguido de 14 días de depuración parece ser muy baja e incluso ausente. Cuando se ha estudiado la bioacumulación de fármacos a través de la cadena trófica ¹³⁹ se concluye que la bioacumulación de algunos fármacos como diclofenaco y trimetoprima es prácticamente nula mientras que otros fármacos como oxazepam, difenhidramina e hidroxicina se detectaron en organismos como las larvas de invertebrados, pasando por crustáceos hasta llegar a los peces.

En la *Tabla 1* se presentan trabajos publicados, con más de 20 fármacos detectados en peces, ya sea en el músculo, o en el pez homogenizado. Se observa que ciertos fármacos son más frecuentemente detectados, como la carbamazepina, diclofenaco, difenhidramina y

norfluoxetina. Pero las concentraciones detectadas varían de acuerdo a la matriz (músculo o el pez homogenizado), varía en las regiones, o incluso dentro del mismo río varía de acuerdo al punto del muestreo. Otros fármacos se encuentran con menor frecuencia, o muchas veces no son contemplados para los estudios. Sin embargo, teniendo en cuenta que hoy en día existen más de 10000 diferentes prescripciones y fármacos de venta libre con más de 1300 ingredientes activos únicos registrados y aprobados por la administración de medicamentos y alimentos, FDA (por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) ¹⁴⁰, la probabilidad de que se acumulen muchos otros fármacos en los peces, es muy alta.

Tabla 1. Detección y cuantificación de fármacos músculos de peces o en peces homogenizados.

Fármaco	Concentración en peces (ng/g)	Matriz	Referencia
Acetaminofén	5,0-24,0 (a)	Homogenizado	⁸⁰
Atenolol	0,61 (a)	Músculo	141
Carazolol	0,21 (a)	Músculo	142
Carazolol	0,05-4,0 (a)	Músculo	141
Carbamazepina	1,0-1,4 (a)	Músculo	143
Carbamazepina	3,0-8,2 (b)	Músculo	136
Carbamazepina	65,0 (a)	Homogenizado	⁸⁰
Carbamazepina	0,6 (a)	Músculo	144
Carbamazepina	0,88 (a)	Músculo	141
Citalopram	0,8 (b)	Homogenizado	142
Citalopram	1,2-2,4 (b)	Músculo	136
Clopidogrel	7,4-8,0 (b)	Músculo	136
Clopidogrel	0,51 (a)	Músculo	141
Codeina	1,1 (a)	Músculo	141
Desmetilsertralina	1,6-4,7 (a)	Homogenizado	145
Diazepam	1,9 (b)	Músculo	136
Diazepam	0,19 (a)	Músculo	141
Diclofenaco	4,1-8,8 (b)	Homogenizado	142
Diclofenaco	4,1 (b)	Homogenizado	105
Diclofenaco	0,7 (b)	Músculo	136
Diclofenaco	22,0 (a)	Homogenizado	⁸⁰
Diltiazem	0,1-0,3 (a)	Músculo	143
Difenhidramina	0,6-1,3 (a)	Músculo	143
Difenhidramina	55-90 (a)	Homogenizado	⁸⁰
Difenhidramina	0,14-0,31 (a)	Músculo	144
Difenhidramina	50-436 (a)	Homogenizado	139
Difenhidramina	0,04-0,07 (a)	Homogenizado	145
Fluoxetina	nd-1,02 (a)	Homogenizado	146
Fluoxetina	0,1 (a)	Músculo	147
Gemfibrozil	15,0 (a)	Homogenizado	⁸⁰
Hidrolorotiazida	5,98	Músculo	141
Hidroxyzina	214-10485 (a)	Homogenizado	139
Ibuprofeno	3,0-40,0 (a)	Homogenizado	⁸⁰
Lorazepam	0,73 (a)	Músculo	141
Metoprolol	2,4 (a)	Músculo	141

Fármaco	Concentración en peces (ng/g)	Matriz	Referencia
Nadolol	1,9-2,3 (b)	Músculo	136
Nadolol	0,49 (a)	Músculo	141
NorFluoxetina	nd-1,08	Homogenizado	146
NorFluoxetina	3,5-5,1 (a)	Músculo	143
NorFluoxetina	1,1 (a)	Músculo	147
Oxazepam	8-45 (a)	Homogenizado	139
Oxazepam	0,4-13 (a)	Músculo	124
Paroxetina	nd-0,58 (a)	Homogenizado	146
Propranolol	4,2 (a)	Músculo	142
Propranolol	1,9 (a)	Músculo	141
Propranolol	0,4 (b)	Músculo	136
Salbutamol	0,6 (b)	Homogenizado	142
Salbutamol	3,4-6,7 (b)	Músculo	136
Salbutamol	0,28 (a)	Músculo	141
Sertralina	17,1 (b)	Músculo	136
Sertralina	0,3 (a)	Músculo	147
Sotalol	5,3-37,5 (b)	Músculo	136
Sotalol	0,15 (a)	Músculo	141
Venlafaxina	0,6 (b)	Homogenizado	142
Venlafaxina	4,6-22,9 (b)	Músculo	136
Venlafaxina	1,6 (a)	Músculo	141

a: Peso fresco; b: Peso seco.

En el caso de la *Tabla 1*, se presentan compuestos acumulados en el músculo del pez o en el pez homogenizado. Sin embargo, teniendo en cuenta que la mayoría de los fármacos están diseñados para actuar localmente en objetivos diana (órganos, tejidos, sistemas, etc.) y con una duración del efecto variable, se podría considerar que, en los peces, estos fármacos, pueden tener efecto sobre órganos, tejidos, y/o sistemas similares a los de los humanos. Esto conlleva a pensar en la acumulación de los fármacos, si la hay, puede estar localizada en los órganos puntuales para los cuales fueron diseñados. Por ello, para predecir la acumulación del fármaco en los peces se tendría que evaluar la distribución interna del fármaco dentro del pez; y el metabolismo de los compuestos farmacéuticos biotransformables en los peces, de los cuales existen pocos estudios ¹⁴⁸.

Por lo tanto, el desarrollo de trabajos alrededor de la acumulación de los fármacos en biota, y la búsqueda de metabolitos y productos desconocidos que se generen por efecto de metabolismo en los peces, está ganando terreno. Entre los objetivos de estos estudios, está el detectar nuevos metabolitos de fármacos producidos por los peces. Aunque algunos investigadores afirman que la farmacocinética y metabolismo de los fármacos por parte de los humanos se puede comparar con el de los peces, se desconoce si existen algunos otros metabolitos que se generen en los organismos acuáticos ¹⁴⁸.

En la literatura se encuentran algunos estudios acerca de la distribución de fármacos en los distintos órganos de los peces. Algunos trabajos se realizaron a escala laboratorio en condiciones controladas, mientras que en otros estudios se analizan fármacos en muestras de campo. Por ejemplo, se pueden referenciar los trabajos realizados en el grupo de Tanoue y sus colaboradores, donde analizaron tramadol para calcular la distribución en el cerebro y el plasma sanguíneo ¹⁴⁸, llegando a concluir que hay un alto transporte del tramadol del agua al plasma sanguíneo y mayor efecto de acumulación en el cerebro. Éste mismo grupo de investigación presenta en el 2015 un trabajo acerca de la distribución de fármacos en dos especies distintas de peces, *Carassius carassius* y *Cyprinus carpio*, que vivían en arroyos afectados por efluentes de aguas residuales ¹⁴⁹. Los resultados mostraron una mayor acumulación de los productos estudiados en el hígado y en los riñones y concluye que el diclofenaco, la indometacina y la carbamazepina tienen poca movilidad del plasma sanguíneo a los tejidos estudiados (cerebro, hígado, músculo y riñón), a diferencia de la sertralina, la nortsertralina, difenhidramina, el haloperidol y el diltiazem, que presentan una alta posibilidad de traspasar de la sangre a los tejidos. Otro trabajo referido a la distribución de fármacos en peces fué realizado por Margiotta-Casaluci y sus colaboradores ¹⁵⁰ trabajando con fluoxetina. Ellos observaron que la acumulación de éste fármaco en el plasma, aumentaba drásticamente cuando la concentración del fármaco en el agua sobrepasaba los 20 ng/mL. Esta acumulación se debe a que a partir de esta concentración se inhibe el metabolismo del fármaco, mientras que, a concentraciones inferiores, la metabolización de fluoxetina a norfluoxetina se mantiene constante, evitando la acumulación del mismo.

En 2017, McCallum et al. ¹²³ expusieron peces a agua residual durante 28 días, para estudiar los efectos y la concentración de compuestos en diferentes tejidos como el cerebro, plasma, gónadas, hígado y músculos. El estudio demostró acumulación en los tejidos para 11 fármacos (bupropión, carbamazepina, citalopram, clotrimazol, diltiazem, difenhidramina, donepezil, flecainida, oxazepam, risperidona, y venlafaxina) de los 93 estudiados y se observa una relación directamente proporcional entre la concentración de los fármacos en las aguas residuales, y el efecto de la acumulación de fármacos en los tejidos. Adicionalmente, se concluye que la concentración de los fármacos es mayor en el cerebro, seguido por plasma sanguíneo, luego en las gónadas, finalmente en el hígado y el músculo. A conclusiones muy similares han llegado Arnok y sus colaboradores con el estudio de fármacos antidepresivos (22 compuestos) en el río Niagara ¹⁵¹. Los autores del estudio concluyeron que, para el caso de los fármacos pertenecientes a la familia de antidepresivos, los mayores factores de bioacumulación están en el cerebro, seguido por el hígado, luego en músculo y finalmente las gónadas.

Por otro lado, Lahti y sus colaboradores ⁴¹ estudiaron a escala de laboratorio la absorción y metabolización de cinco diferentes fármacos en trucha (diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, bisoprolol, y carbamazepina) a dos distintos niveles de concentración. Para ello se hicieron estudios en plasma y en la bilis. El trabajo demostró la acumulación de todos los fármacos estudiados en el plasma de la sangre en concentraciones hasta de 210 ng de fármaco/mL de plasma. En el caso de la acumulación en bilis y metabolización, la respuesta fue mucho más evidente ya que se determinaron concentraciones hasta dos órdenes de magnitud superiores comparado con el plasma. La bioacumulación, bioconcentración y la distribución de la carbamazepina fue estudiado dentro del grupo de Valdés y sus colaboradores en el 2016 ¹⁵² en peces a escala de laboratorio. Se logró demostrar la presencia de la carbamazepina, y uno de sus principales metabolitos (2-hidroxicarbamazepina) en agallas, intestino, hígado, cerebro y músculo. Sin embargo, la presencia de otro metabolito común, la 10,11-epóxi-carbamazepina, solo fue evidente en las agallas y el músculo.

En el trabajo de Grabicova y sus colaboradores ¹⁵³ se hizo un estudio de peces expuestos por 13 días a aguas residuales de Suecia. Durante esta investigación se lograron encontrar productos farmacéuticos como citalopram, sertralina y venlafaxina en el cerebro e hígado de la mayoría de los peces estudiados, pero no en el plasma sanguíneo ni en músculo. Sin embargo, las concentraciones en el cerebro fueron mucho más bajas comparadas con la menor concentración detectada en el cerebro de algún mamífero tratado con dosis terapéuticas, lo cual no implica ningún riesgo para el pez.

Se pueden encontrar además, otros dos ejemplos de detección de fármacos en peces en Argentina ¹⁵⁴ y en República Checa ¹⁵⁵ con resultados similares a los ejemplos antes explicados; aunque en el caso de Argentina solo se estudian 3 órganos en los peces (músculo, hígado y agallas), mientras que en el caso de la República Checa, se estudian 5 órganos diferentes (músculo, hígado, riñón, cerebro y plasma).

Todos los trabajos mencionados anteriormente, incluyendo los que se presentan en la *Tabla 1*, reportan fármacos detectados en concentraciones muy bajas, a nivel de unos pocos ng/g de muestra. Para poder determinar valores tan bajos, se requiere de técnicas analíticas avanzadas, con buenos límites de detección y robustez, como sería el caso de la técnica de espectrometría de masas. Técnica de la cual se hace una introducción en la siguiente sección.

1.6 Análisis de fármacos en muestras de peces

La determinación de fármacos en muestras ambientales ha avanzado considerablemente gracias al desarrollado de las técnicas analíticas. Todo el proceso analítico involucra una serie de pasos como son los de extracción de los analitos, la purificación del extracto, la detección

por medio de equipos analíticos, y finalmente, el procesamiento de los resultados. Sin embargo, se considera que, a día de hoy, hay un número relativamente corto de estudios describiendo la presencia de fármacos en biota. Esto puede ser debido a dos factores fundamentales, el primero a la variabilidad biológica de las muestras. Se estima que hay descritas alrededor de 31000 especies de peces y 176000 especies de invertebrados. Segundo, las capacidades analíticas que se requieren. Realizar determinaciones tipo multiresiduales, incluyendo miles de compuestos farmacéuticos usados a nivel animal y humano, además de sus metabolitos, en matrices complejas como las de peces y a concentraciones tan bajas como las presentes en este tipo de muestras en ambientes naturales ¹⁵⁶, requiere equipos y métodos robustos y personal capacitado para llevar a cabo los análisis, e interpretar los resultados con fiabilidad ¹⁵⁷.

1.6.1 Tratamiento de la muestra

Para poder proceder a la extracción de los compuestos de interés, lo primero que se necesita es preparar la muestra de acuerdo al método a aplicar. La preparación puede incluir congelación, liofilización, homogenización, y limpieza de la muestra (en el caso de los peces, además se deben quitar las escamas, lavar, y separar órganos). También se debe utilizar un tratamiento especial, por ejemplo, el caso de muestras de sangre, plasma, bilis o algunas matrices líquidas, que pueden requerir filtración, precipitación proteica, y/o centrifugación ¹⁵⁷⁻¹⁵⁸.

En el caso de la extracción de los fármacos de la muestra, se tiene como objetivo principal el aislamiento y concentración de los analitos de interés de todos los otros componentes de la matriz, sea líquida o sólida. Este paso de preparación de la muestra es especialmente crítico debido a la complejidad de las matrices biológicas, que por lo general presentan concentraciones del contaminante a niveles muy bajos, entre los pg/g y µg/g. Esta complejidad se ve incrementada por la presencia de componentes extraíbles como lo son sulfatos, fosfatos, azúcares como la glucosa, aminoácidos, colesterol, glicéridos, vitaminas, componentes de la sangre, pigmentos y algunos otros componentes no deseados, presentes en la matriz que pueden interferir en el análisis ¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

Teniendo en cuenta los problemas antes mencionados, se deben desarrollar métodos apropiados para la obtención de una eficiente extracción de los compuestos de interés que por lo general requiere de una preparación de la muestra extensiva ¹⁶²⁻¹⁶⁴. Otro de los problemas que se tiene que afrontar, está relacionado con la especificidad de la extracción. En caso de los fármacos, las características de los mismos son muy variadas, como lo son la polaridad, la solubilidad, el pH, y la estabilidad térmica. De esta manera, desarrollar un único

método de extracción para todos los compuestos es una tarea muy compleja ¹⁶²⁻¹⁶³. Es por ello que, algunos estudios se centran en un solo tipo de compuestos, es decir una única familia de fármacos como por ejemplo antibióticos ¹⁶⁵⁻¹⁶⁶, o sulfonamidas ¹⁶⁷ o en un número muy reducido de compuestos en el desarrollo de métodos de análisis para fármacos en peces ¹⁶⁸.

Las extracciones de los compuestos de matrices biológicas sólidas requieren un número de procesos, en general, más extenso que para las matrices líquidas. Sin embargo, el mercado ofrece una buena cantidad de métodos para realizar extracciones. Entre los métodos de extracción más comunes de muestras sólidas, están la extracción asistida por microondas (MAE) ¹⁶⁹⁻¹⁷¹, extracción líquido/ sólido, o simplemente extracción líquida (*liquid extraction*) ^{144, 166, 172}, extracción por QuEChERS ^{168, 173-174}, nombre acrónimo del inglés “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*” ¹⁷⁵ que se traduce al castellano como rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro; extracción asistida o soportada por ultrasonido (USE) ^{149, 151, 176-177}, extracción acelerada con solventes (ASE) o extracción con líquidos presurizados (PLE) ^{145-146, 152}, la extracción rotativa ^{109, 143}, o la micro-extracción en fase sólida (SPME) ^{157, 178-180}. Esta última técnica se ha estado implementando para hacer estudios de contaminantes in vivo en peces, sin necesidad de sacrificar al individuo.

El resultado de cualquiera de las técnicas de extracción aquí nombradas, es un extracto líquido, que se debe purificar, con el objetivo de eliminar los compuestos que puedan afectar el análisis instrumental y además de pre-concentrar los analitos de interés.

1.6.2 Purificación del Extracto

Eliminar los coextractos es un proceso generalmente complejo, o que consume tiempo del análisis. Incluso el resultado puede llegar a ser negativo, ya que puede implicar pérdida de la muestra o pérdida del analito de interés ¹⁸¹. Sin embargo, muchas veces las ventajas se sobreponen a estas desventajas y se recomienda purificar el extracto. En algunos casos, se puede aplicar como técnica de purificación, la filtración para eliminar las partículas sólidas más grandes de los extractos sin posteriores tratamientos de muestra ¹⁵⁴. Sin embargo, la mayoría de los procesos de limpieza y purificación del extracto de peces, están basados en una técnica conocida como SPE por su nombre en inglés *Solid Phase Extraction* o extracción en fase sólida. Esta es una técnica de preparación de muestras con partículas sólidas, similares a las usadas para el empaquetamiento de columnas cromatográficas, pero empacadas en un cartucho o disco, con el objetivo de separar los diferentes componentes de la muestra, pasando el extracto líquido a través de la fase sólida ¹⁵⁸. Éste método requiere pequeñas cantidades del extracto, es relativamente rápido y puede separar diversos tipos de compuestos de acuerdo a las características del material sólido o fase estacionaria con la que

se esté trabajando. En el mercado actual se pueden encontrar diferentes tipos de fases estacionarias, por ejemplo: HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*, que traduce al castellano balance (o equilibrio) hidrófilico-lipofílico), alúmina, florisil, silica, etc. Uno de los problemas que más puede afectar el análisis de fármacos en los peces, es la presencia de compuestos como los lípidos y las grasas en las muestras, que en el caso de los peces puede ser hasta del 50 % de la muestra analizada ¹⁴² y que por lo general producen un efecto matriz importante ^{157, 182-183}.

Estos lípidos, generalmente se coextraen con el disolvente durante el proceso de extracción, sobre todo si el disolvente es un alcohol ¹⁸⁴. Este tipo de co-extractos o componentes de la matriz no deseados, pueden traer además otro tipo de problemas como obturación en las columnas cromatográficas, o incluso en los equipos de análisis. Para la purificación de muestras con alto contenido de grasas, se han desarrollado sorbentes específicos para la retención de grasas, aplicados al igual que la SPE, por ejemplo Oasis HLB-prime, un sorbente modificado con tecnología patentada para la remoción de fosfolípidos ¹⁸⁵, o algunos otros que son extracciones en fase sólida pero de manera dispersa, d-SPE y no de manera compactada en un cartucho. Algunos ejemplos de estos d-SPE son el EMR-lipid (*enhanced matrix removal of lipids*) ¹⁸⁶, o el Supel QuE que trabaja con sorbentes del tipo z-SEP, partículas de sílice recubiertas de óxido de zirconio ¹⁸⁷.

Otro método de limpieza de extractos es la cromatografía de exclusión molecular (*size exclusion chromatography* o *Gel-Permeation chromatography GPC*). Este método puede ser muy efectivo a la hora de realizar la purificación de las muestras, pero tiene la desventaja de requerir mucho volumen de solvente para limpiar el extracto, incluso hasta 200 mL de disolvente para limpiar 250 μ L de extracto, lo que encarece el método ¹⁴². Sin embargo, en algunos casos se han visto limpiezas de extracto mucho más sencillas y económicas, como simplemente el uso de la congelación del extracto para remover colesterol ¹⁷⁶.

Aunque los procedimientos de purificación pretenden eliminar la mayor cantidad de co-eluyentes de la matriz, también se podría dar el caso de perder algo del analito, como se comentó al inicio de esta sección. Es decir, se debe encontrar un balance entre la purificación y la co-extracción de los analitos que permita recuperaciones óptimas para poder analizar las muestras. Finalmente, después del proceso de purificación del extracto, se puede proceder a realizar el análisis de los compuestos. En la presente tesis, se realiza el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), técnica que se describe a continuación.

1.6.3 Análisis de fármacos por LC-MS

La LC-MS es una de las técnicas más utilizadas para el análisis de muestras ambientales y la identificación de los contaminantes como los fármacos, incluyendo sus metabolitos y sus productos de transformación ¹⁸⁸.

Debido a su gran versatilidad y aplicabilidad, la LC-MS ha ganado mucho terreno en el campo del análisis de contaminantes, y es hoy por hoy quizás una de las técnicas más empleadas al momento de analizar muestras, ya que dependiendo del tipo de adquisición que se haga, permite el monitoreo de sustancias de interés, denominado análisis dirigido (*target analysis*), pero incluso existe la posibilidad de realizar análisis de compuestos no contemplados inicialmente, por medio del análisis de compuestos sospechosos (*suspect screening*) o compuestos desconocidos gracias al análisis no dirigido (*non target analysis*).

En el caso de los fármacos, se prefiere usar la ionización por electro-espray (*Electrospray ionization*, ESI) que se usa muy frecuentemente para el análisis de moléculas con polaridad de intermedia a alta y es apta para analizar moléculas en un amplio rango de *m/z*. Adicionalmente, se complementa con la ionización química a presión atmosférica (APCI), o la foto-ionización a presión atmosférica (APPI) que son técnicas de ionización para moléculas de polaridad intermedia a baja ¹⁸⁹⁻¹⁹⁰. La ESI se considera una técnica de ionización suave en la cual las moléculas mantienen su información de composición elemental (ion cuasi-molecular o *quasimolecular ion*). Y es por esa misma razón, que este tipo de ionización es más sensible a los efectos de matriz, ya que se genera una competencia por las cargas disponibles en la superficie de las micro-gotas, con los co-extractos de la matriz.

1.6.4 Efecto matriz

En muchos casos, el extracto obtenido puede contener componentes de la matriz que no son de interés durante el análisis. Estos componentes no deseados, pueden producir interferencias que se ven reflejadas en un aumento de la señal en el instrumento de detección (*enhancement*) o reducción de la señal (*suppression*), y es lo que se conoce como efecto matriz.

A pesar de que muchos autores han tratado este punto del efecto matriz, y han publicado algunos trabajos sobre el tema ^{182-183, 191-193}, todo parece indicar que la reducción de la señal, en LC-MS, está fuertemente relacionada con la ionización de la muestra en estado líquido antes de pasar a estado gaseoso. Posiblemente durante la ionización, puede haber una competencia por las cargas disponibles, entre los analitos de interés y los coextractos que producen este efecto matriz, al igual que una competencia por tener acceso hacia la superficie

de la gota que pasará al estado gaseoso. Otra explicación de la reducción de la señal, está relacionada con la viscosidad del solvente que lleva la fase móvil. Una mayor cantidad de compuestos disueltos en la muestra, puede producir un incremento en la viscosidad del solvente que transporta la muestra, generando una mayor tensión superficial, lo que da como resultado una reducción en la eficiencia de la atomización y posterior evaporización del líquido, por lo tanto, habrá una menor cantidad de cargas disponibles. Esta misma viscosidad también puede ser afectada por la presencia de modificadores en los solventes que llevan la muestra, como el sulfato de amonio, o acetato de amonio. Incluso, se ha publicado que los modificadores del solvente y los co-extractos pueden reaccionar entre ellos formando complejos con el analito ¹⁹⁴⁻¹⁹⁵. Cabe destacar que el efecto matriz es independiente para cada analito, ya que depende de la polaridad de la molécula ¹⁹⁶.

A mayor cantidad de muestra introducida, se tiene más cantidad de matriz, por lo tanto el efecto matriz será mayor, lo que indirectamente va a afectar la precisión del método empleado ¹⁹⁷. Pero también se reporta que, a menor cantidad de muestra inyectada en el instrumento, mayor la variabilidad del método ^{157, 191}. Es decir, que durante la utilización o desarrollo de los métodos de extracción, el aumento o disminución de la señal de los analitos seleccionados, siempre va a estar afectada tanto por factores internos (co-extractos de la muestra), como por factores externos (cantidad de muestra) ^{191, 198}.

1.6.5 Analizadores MS

Una vez ionizados los compuestos de interés, en este caso los fármacos, se procederá a su respectiva separación por m/z , fragmentación y detección en los respectivos analizadores y detectores. La función de los analizadores de masas es separar los iones de acuerdo a la relación m/z de los iones formados, y con ello lograr identificar los precursores. Los analizadores de uso más común son los cuadrupolos (*Quadrupole, Q*), de sector magnético, trampa iones (*ion trap*), tiempo de vuelo (*time-of-flight, TOF*), y resonancia de ciclotrón de iones de transformada de Fourier (Fourier-transform ion cyclotron resonance, FT-ICR) ¹⁹⁹.

Los analizadores de MS pueden ser de baja resolución o de alta resolución, de acuerdo a la exactitud de la masa que sea determinada, los analizadores de baja resolución son capaces de identificar compuestos con precisión de una unidad de masa, mientras que los analizadores de alta resolución son capaces de identificar la masa exacta de un compuesto hasta con 4 decimales. Los analizadores de alta resolución (HR, *High Resolution, HRMS*), son menos comunes para análisis rutinario. Sin embargo, se está extendiendo su uso poco a poco en la industria y en los laboratorios de investigación. Una de las mayores ventajas de la HRMS, también llamada HRAMS (*High Resolution Accurate Mass Spectrometry* ²⁰⁰), como ya se

comentó, es la determinación de la masa exacta del compuesto, con un error de masa menor a 5 partes por millón (ppm), sin perder relativamente sensibilidad, si se compara con la adquisición del tipo de analizadores de baja resolución (triple cuadrupolo, QqQ)^{189, 201-205}. Es decir, que los equipos de alta resolución son capaces de distinguir entre dos compuestos que tienen la misma masa nominal, pero diferente masa exacta, lo que permite detectar compuestos con diferente composición elemental. Así lo reportan algunos trabajos publicados, como en el trabajo de Ferrer y sus colaboradores²⁰⁶. Los equipos de alta resolución, sin embargo, tienen menor sensibilidad que los equipos triple cuadrupolo^{204, 207}, aunque con un rango lineal de trabajo suficiente para el análisis de contaminantes en muestras ambientales²⁰⁸.

Con los equipos de HR-MS se pueden realizar análisis de Full-MS, para adquirir todas las especies que se ionizan en la fuente. También se tiene la posibilidad de combinar Full-MS con MS/MS, teniendo información adicional como los espectros de los iones producto. Este tipo de adquisiciones permiten el análisis de compuestos conocidos, y adicional a eso, debido a que se ha adquirido todo el espectro de iones que sale de la fuente de ionización, dichos datos pueden ser re-procesados posteriormente, sin necesidad de re-inyectar la muestra en cuestión, para análisis de compuestos no contemplados inicialmente, o desconocidos (tema que se tratará en las secciones posteriores *Análisis Cuantitativo y Análisis Cualitativo*).

Por todas las características antes nombradas, los equipos de LC acoplados a HR (ej. LC-TOF, LC-Orbitrap) han sido utilizados ampliamente para aplicaciones como la detección de fármacos y sus productos de transformación en muestras ambientales²⁰⁹. Entre los analizadores de HR se encuentran los FT-ICR-MS, TOF-MS, y el Orbitrap-MS (analizador de captura de iones orbitales, *orbital ion trapping analyzer*). El FT-ICR-MS, tiene mayor poder de resolución que el Orbitrap-MS o el TOF-MS^{204, 207} siendo utilizado en caracterizaciones de materia orgánica²¹⁰⁻²¹¹, petróleo^{204, 212}, y proteómica²⁰⁴ pero su costo, incluyendo el mantenimiento, es demasiado elevado^{190, 199, 204}.

El analizador Orbitrap-MS, es una modificación de una trampa de iones que usa la transformada de Fourier para producir el espectro m/z . El principio de funcionamiento se basa en la oscilación de los iones alrededor de un electrodo central por medio de un campo eléctrico en dirección hacia adelante y hacia atrás del electrodo. La idea es alinear los iones y separarlos gracias a la frecuencia de oscilación (que depende de la m/z) alrededor del electrodo central. Posteriormente, en el detector, por medio de la transformada de Fourier, se convertirá la señal en el correspondiente espectro m/z de cada ion^{202, 204, 213}.

El analizador de TOF-MS, mide el tiempo que necesita un ion para desplazarse desde la fuente de iones, hasta el detector en un espacio libre, impulsado por un pulsador y guiado por reflectrones, donde el tiempo en alcanzar el detector, depende de la velocidad del ion, que a su vez depende de la m/z ^{190, 199, 204, 214}.

Hoy día se han hecho avances en el desarrollo de equipos híbridos donde se acoplan analizadores de baja resolución (cuadropolos, Q) y de HR-MS. Hoy en día, ya se tienen equipos Q-TOF (desde 1996 ²¹⁴) y Q-Orbitrap (desde 2011 ²⁰²), donde el primer ion precursor, se selecciona en baja resolución, pero después de la fragmentación, se detectan los iones en alta resolución, mejorando los datos de adquisición y disminuyendo la posibilidad de falsos positivos.

Teniendo en cuenta que la tesis doctoral se realizó exclusivamente con un analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo, Q-TOF, a continuación se hace una descripción más amplia de este tipo de equipos.

1.6.6 Analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo, Q-TOF

El analizador TOF fue propuesto en 1946 y desarrollado en 1948. Posteriormente, se han mejorado sus versiones desde esa entonces ^{204, 214}. Entre las ventajas que encontraron cuando lo diseñaron, fue la de poder generar un espectro completo de todas las masas con una velocidad de análisis muy rápida. Estas características, junto con su alta sensibilidad, permitieron a los analizadores TOF establecer su importancia en el campo de la HRMS. Inicialmente, los iones generados eran movilizados a través del espacio tubular, de manera lineal, a través de un “pulsador” que generaba paquetes de iones y los proyectaba a lo largo del tubo. Sin embargo, este modelo de movimiento de los iones, fue mejorado en 1989 cuando se propuso proyectar los iones a través del tubo pero de manera ortogonal, perpendicular a la entrada de los iones ²¹⁵. Con este cambio se lograron adaptar las técnicas de ionización a presión atmosférica como ESI y ampliar las aplicaciones de los analizadores TOF en LC/MS ²¹⁴. Otro cambio importante que han recibido estos equipos, está relacionado con el procesamiento de la señal que generan los iones al llegar al detector. Anteriormente, los detectores eran analógicos usando un osciloscopio, y posteriormente evolucionaron para ser de tipo digital, ADC (convertidor digital-a-análogo *Analog-to-Digital Converter*). Esto permitió la revisión de las señales de los espectros de masas de manera electrónica y no fotográficamente. El detector se encarga básicamente de procesar el número de iones que logran llegar al final del tubo y de los tiempos de llegada de los iones (tiempo de vuelo de los iones). La velocidad es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo de vuelo, que a su vez es proporcional a la m/z ^{204, 214}.

Con los últimos desarrollos, los cuadrupolos y los TOF pudieron ser acoplados para desarrollar un analizador QTOFy con lo que se han alcanzado grandes avances en la espectrometría de HR, logrando resoluciones espectrales por encima de los 30000 FWHM (Anchura máxima a media altura, *Full Width Half Maximum*), medidas de exactitud por debajo de 1 ppm de error, un rango lineal de trabajo hasta de 4 órdenes de magnitud y una alta sensibilidad por debajo de las ppm de concentración ^{204, 216}. Estas son algunas de las características del equipo X500R de SCIEX (lanzado al mercado en 2015) con el cual se han desarrollado los análisis de LC-MS/MS durante los trabajos de esta tesis doctoral. Este equipo está diseñado para aplicaciones de rutina de análisis dirigido y no dirigido (*de allí la "R" del nombre; Routine*). Es un equipo que está construido con un diseño de paso óptico en *N*, y un tubo de vuelo termostataado que ayuda a mantener la robustez y la exactitud de la masa. Tiene un sistema de calibración integrado a través de lo que llaman *Tween spray*, que permite calibraciones a lo largo de la secuencia de adquisición, pero sin perturbar la adquisición, porque está dotado de una sonda dual, (una para las muestras provenientes de la LC, la segunda para las soluciones calibrantes). Este es un cambio importante en los equipos de QTOF de SCIEX, ya que en sus equipos QTOF anteriores se tenían dos sondas, una sonda APCI para la calibración, y la segunda que podía ser APCI o ESI según como el usuario quisiera analizar. Hoy en día con este equipo, se realiza la calibración y el análisis con el mismo tipo de ionización. Finalmente, es un equipo muy compacto y que tiene la capacidad de adquirir datos a muy alta velocidad en modo MS y MS/MS ²¹⁶, tanto así que en el *review* presentado por Kind y sus colaboradores ¹⁸⁹, donde presenta un comparativo de equipos para identificación de pequeñas moléculas usando MS/MS de alta resolución, dos de los equipos de SCIEX (TripleTOF 6600 y QTOF X500R) tienen velocidades de adquisición de MS/MS de 100 espectros por segundo; el doble del siguiente equipo más rápido presentado en el artículo.

Este equipo tiene diferentes modos de adquisición de datos:

A) En modo MS:

- *Full scan TOF-MS: En todos los tipos de adquisición, siempre hay un primer experimento en donde se detectan todos los iones en su forma de ión molecular con masa exacta. Mientras esto sucede, no habrá ningún tipo de fragmentación en los compuestos. Posteriormente, se realizan las adquisiciones, si las hubiera, en modo MS/MS. Este ciclo se repite a lo largo de toda la duración de la LC.*

B) En modo MS/MS: En este tipo de eventos, lo que se busca es llevar a cabo la fragmentación de las moléculas para generar los espectros MS/MS. Se tienen básicamente 3 tipos de adquisición MS/MS:

- *HR-MRM: (MRM con alta resolución): trabaja en el mismo modo que en el triple cuadrupolo, seleccionando un ion molecular específico y siguiendo los fragmentos que genera el rompimiento de ese ion molecular. Sin embargo, los fragmentos serán adquiridos en alta resolución.*
- *IDA (MS/MS) (Information Dependent Acquisition): Es un modo de adquisición en donde se adquieren espectros MS/MS de las moléculas, en orden descendente de acuerdo a su intensidad y que estén por encima de una intensidad determinada (umbral). Según la configuración del usuario, también se puede incluir una lista de analitos seleccionados, que se buscarán independientemente de la intensidad. Pero, si no se encuentran dichos analitos, se fragmentarán un número de moléculas determinadas, dependiendo de su intensidad; por ejemplo, se obtendrán MS/MS de las 10 ó 20 m/z más abundantes en cada momento. El proceso se repite durante todo el tiempo que dure la LC ²¹⁷. Este mismo modo de adquisición, en otros equipos, es denominado DDA (Data Dependent Acquisition) ^{189, 218}. Y aunque es un modo de adquisición altamente selectivo y que genera espectros de masas prácticamente libres de interferencias, en general, sólo puede generar un número limitado de espectros MS/MS que cumpla con los criterios configurados por el usuario (Figura 7, A).*
- *SWATH (Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion Spectra) ²¹⁹. Este tipo de adquisición es denominado también DIA (data-independent acquisition, Adquisición independiente de datos) y fue desarrollado con tres objetivos primordiales: eliminar la variabilidad de las modificaciones químicas durante el análisis, incrementar el rango dinámico de cuantificación, y maximizar la adquisición de todos los compuestos que pueda llegar a contener una muestra ²²⁰.*

El experimento SWATH MS/MS se lleva a cabo independientemente de la información adquirida en el primer experimento MS ^{218, 221}. Se caracteriza por fragmentar todos los iones que salen de la fuente de iones sin preselección de los iones precursores (FULL MS/MS, MS/MS-ALL o también llamado en otros equipos AIF, All Ion Fragmentation, fragmentación de todos los iones). Lo que diferencia el AIF del SWATH, es la manera de fragmentar y adquirir el MS/MS. En el modo AIF, todos los iones que salen de la fuente de ionización, pasan por el primer cuadrupolo, entran a las celda de colisión simultáneamente (en un rango de 600-2000 Da ¹⁸⁹), para luego detectarse todos los fragmentos de todos los iones en el analizador de alta resolución. Por el contrario, en la adquisición de modo SWATH, todos los iones que salen de la fuente de ionización, pasan por el primer cuadrupolo, y se separan secuencialmente de acuerdo a su m/z para ser fragmentados en pequeños grupos o ventanas, generalmente con variaciones inferiores a 20-100 Da ¹⁸⁹. De esta manera, se reduce la complejidad de los espectros MS/MS, ya que la cantidad de iones que entra en un segmento va a ser mucho

menor que si entran todos los iones simultáneamente ^{219,221}. Una vez se fragmentan los iones, se genera el respectivo espectro para cada grupo de iones (Figura 7, B). Estas ventanas (grupo de iones), es variable, pudiendo limitar en rangos muy pequeños donde hay mayor cantidad de iones, y dejar rangos más grandes en la ventana de m/z donde hay menor densidad de iones ²¹⁷. El éxito de este tipo de adquisición, radica en el desarrollo de potentes componentes electrónicos que permiten la variación de voltajes y la detección de iones a una alta velocidad ²¹⁷.

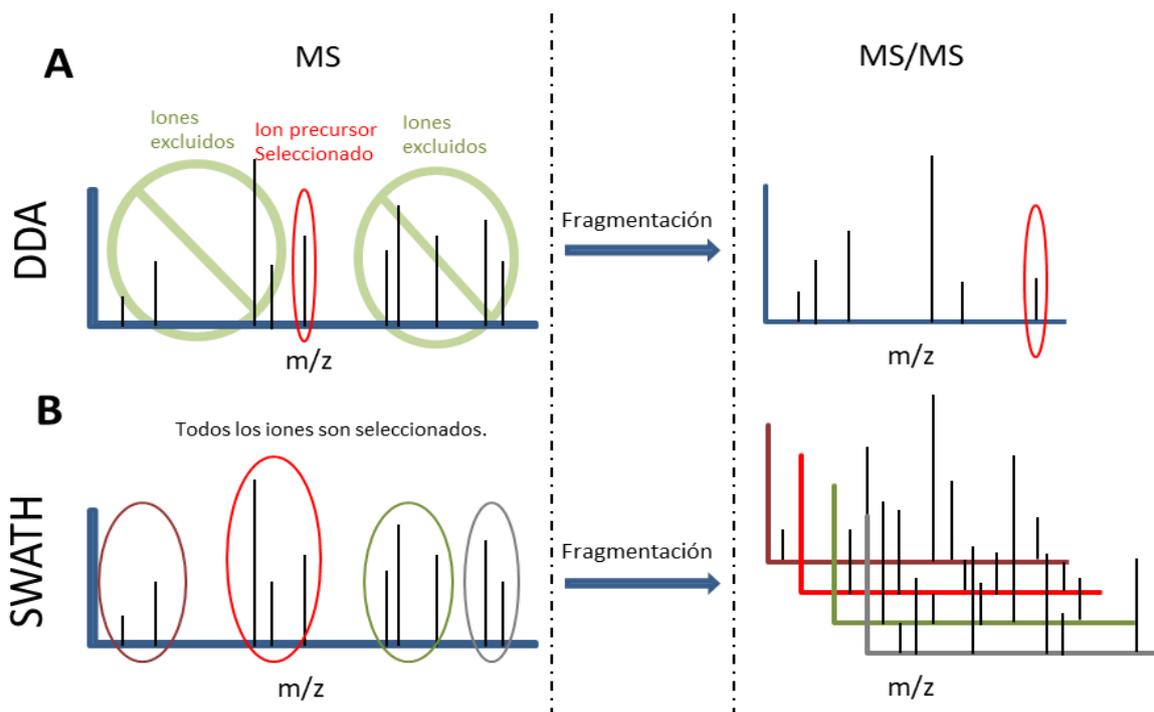


Figura 7. Esquema adquisición por Data Dependent, DDA y SWATH.

En la adquisición DDA (A) el primer cuadrupolo, MS, selecciona un ion (seleccionado en rojo) y excluye los demás iones. Posteriormente, ese ion pasa a la celda para ser fragmentado, y se genera el MS/MS del ion seleccionado con sus fragmentos.

En la adquisición en SWATH (B) se seleccionan todos los iones sin lista de inclusión ni dependencia de su intensidad. Los iones serán fragmentados de acuerdo a las ventanas de adquisición separadas por unos cuantos Da (menos de 50 Da), en este caso representados por los círculos de color, y cada grupo de iones se fragmentará. Cada grupo de iones generará un espectro MS/MS que en este caso se representan de tal manera que los ejes del MS/MS corresponden con el color del círculo (ventana). Adaptado de fuente: 189.

Hoy en día, este tipo de equipos, Q-TOF, junto con el Q-Orbitrap se están utilizando cada vez más, por las ventajas que presenta de poder realizar análisis de compuestos conocidos o compuestos diana al mismo tiempo que poder realizar un análisis de compuestos sospechosos o compuestos desconocidos. A pesar de que suelen ser equipos más costosos y menos sensibles, tienden a incrementarse en el mercado industrial y de la investigación. A continuación se explica con más detalle los tipos de análisis que se pueden realizar con los equipos de HRMS y que fueron implementados en esta tesis.

1.6.7 Análisis Cuantitativo

Este tipo de análisis se realiza cuando se quiere determinar la cantidad exacta de uno o más compuestos conocidos dentro de una muestra. Para ello lo que se busca es comparar el área obtenida en un cromatograma de un patrón estándar del compuesto objetivo (target), contra el área obtenida en el cromatograma de la muestra para el mismo compuesto (misma m/z) a través de una curva de calibración. Sin embargo, para proceder a la cuantificación, se requiere la optimización de los parámetros del instrumento de los analitos y tener información de los iones que se forman en el espectrometro de masas. Es decir, se requiere una inversión de tiempo, y conocer de antemano las condiciones con las que se debe configurar el equipo para tener una cuantificación exitosa.

En la literatura abundan trabajos de cuantificación de fármacos en peces usando cromatografía líquida con espectrometría de masas de baja resolución ^{41, 123, 137, 148-149, 151, 154, 166-168, 222-223}. Y los procedimientos que usan por lo general, son los expuestos en el trabajo de Krauss y sus colaboradores ²⁰⁷. Teniendo en cuenta que durante el desarrollo de esta tesis se trabajó exclusivamente con un equipo de HR, se recopilaron datos de estudios realizados en peces con HRMS, y se resumen en la *Tabla 2*; donde se incluyen los fármacos detectados en diferentes órganos de los peces (matriz), la concentración detectada, los métodos validados reportando sus límites de cuantificación (LOQ), el tipo de extracción, purificación e instrumento de LCHR-MS utilizado en el estudio. En la *Tabla 2* se observa que los trabajos reportados, se han desarrollado con los dos tipos de equipos de HRMS de uso más común en los laboratorios de análisis: el Q-Orbitrap y el Q-TOF, y los dos equipos reportan límites de cuantificación por debajo de 1 ng/g para la gran mayoría de los casos. De igual manera las detecciones de los fármacos reportados se encuentran desde valores por debajo de 0,1 ng/g hasta por encima de los 150 ng/g, como en el caso del citalopram detectado en riñón en el estudio de ⁸⁸ con 164 ng/g.

Tabla 2. Estudio de fármacos en peces por HRMS (validaciones + detección).

Fármaco/ Metabolito	Detección (ng/g)	Matriz	LOD / LOQ (ng/g)	1.Método extracción 2.Purificación 3. Análisis 4.Referencia
10,11-epoxicarbamazepina	0,06-0,4	Riñón	N.R. / 0,03-0,4	
Ácido metoprolóico	7,0-17,0	Hígado	N.R. / 0,03-0,04	
	0,06-0,2	Plasma	N.R. / 0,05-0,1	
Atenolol	0,2	Hígado	N.R. / 0,05-0,08	
Azitromicina	4,4	Hígado	N.R. / 2,1-3,1	
Bezafibrato	12,0	Riñón	N.R. / 7,3-14,0	
Biperideno	5,0-23,0	Riñón	N.R. / 6,9-9,8	
	3,3-3,5	Hígado	N.R. / 2,0-3,3	
Cafeína	3,6-6,8	Cerebro	N.R. / 1,1-2,2	
	1,6-2,8	Plasma	N.R. / 0,8-1,6	
Carbamazepina	0,7-1,2	Hígado	N.R. / 0,2-0,3	
	0,7	Riñón	N.R. / 0,4-0,8	
	0,2-6,0	Hígado	N.R. / 0,2-0,3	
Citalopram	2,2-8,4	Riñón	N.R. / 0,2-0,3	
	1,3±1,7	Músculo	N.R. / 0,2-0,4	
	1,8-7,4	Cerebro	N.R. / 0,8-1,4	
	0,2-0,2	Plasma	N.R. / 0,09-0,2	
Claritromicina	0,1-1,2	Riñón	N.R. / 0,07-0,1	
	0,09 -0,1	Músculo	N.R. / 0,04-0,07	
	0,06-0,1	Plasma	N.R. / 0,06-0,1	
	0,08-0,2	Hígado	N.R. / 0,04-0,1	
Clindamicina	0,5-0,7	Riñón	N.R. / 0,2-0,3	
	0,09-0,1	Plasma	N.R. / 0,05-0,1	
Clomipramina	0,2-0,3	Hígado	N.R. / 0,1-0,1	
	0,3-0,5	Riñón	N.R. / 0,2-0,3	
Cetirizina	0,06-0,1	Hígado	N.R. / 0,05-0,1	
Desvenlafaxina (O-desmetilvenlafaxina)	0,3-1,2	Hígado	N.R. / 0,1-0,2	
	0,3-2,7	Riñón	N.R. / 0,1-0,3	
	0,1-0,3	Plasma	N.R. / 0,1-0,1	
Diclofenaco	4,0-7,2	Riñón	N.R. / 1,9-3,7	
	1,1-2,3	Plasma	N.R. / 0,7-1,4	
Donepezilo	0,3	Riñón	N.R. / 0,1-0,2	
Haloperidol	2,3	Hígado	N.R. / 0,2-0,2	
Levamisol	0,03-0,4	Hígado	N.R. / 0,1-0,1	
Loperamida	5,0-17,0	Riñón	N.R. / 3,1-5,2	
	1,8 ± 3,0	Hígado	N.R. / 0,1-0,1	
Metoprolol	0,2-0,6	Hígado	N.R. / 0,03-0,04	
	0,3-0,6	Riñón	N.R. / 0,08-0,1	
Mianserina	0,06-0,2	Plasma	N.R. / 0,05-0,1	
	8,0-20,0	Riñón	N.R. / 0,23-0,45	
Mirtazapina	0,23-0,41	Hígado	N.R. / 0,15-0,25	
	0,30-0,38	Riñón	N.R. / 0,25-0,40	
	0,64-0,76	Cerebro	N.R. / 0,62-1,2	
N-desmethylcitalopram	1,2-4,0	Hígado	N.R. / 0,23-0,32	
	0,25-0,37	Músculo	N.R. / 0,15-0,25	
	1,0	Cerebro	N.R. / 0,59-1,0	
	0,15	Plasma	N.R. / 0,098-0,20	
Orfenadrina	0,27	Hígado	N.R. / 0,11-0,16	
Sertralina	0,7-1,7	Hígado	N.R. / 0,075-0,11	

1. Homogenización del solvente-matriz, centrifugación
2. Filtración sobre celulosa y congelamiento
3. Q-exactive-Thermo Fisher Scientific
4. Grabicova et al.¹⁵⁵

Fármaco/ Metabolito	Detección (ng/g)	Matriz	LOD / LOQ (ng/g)	1.Método extracción 2.Purificación 3. Análisis 4.Referencia
	0,2-1,8	Riñón	N.R. / 0,068-0,13	
	0,18-0,30	Músculo	N.R. / 0,094-0,15	
	1,0-9,0	Cerebro	N.R. / 0,11-0,33	
Sulfametazina (sulfadimidina)	0,09	Hígado	N.R. / 0,023-0,042	
Sulfametoxazol	0,40	Hígado	N.R. / 0,33-0,61	
Sulfoxido de clindamicina	0,25	Riñón	N.R. / 0,16-0,26	
	0,7-2,5	Hígado	N.R. / 0,28-0,39	
	0,11-0,15	Riñón	N.R. / 0,052-0,10	
Telmisartán	0,63	Plasma	N.R. / 0,23-0,46	
Terbinafina	0,17	Músculo	N.R. / 0,13-0,22	
	2,2-4,2	Hígado	N.R. / 0,33-0,54	
Tramadol	2,9-8,7	Riñón	N.R. / 1,2-2,0	
	6,2-11,6	Cerebro	N.R. / 0,54-1,1	
	0,52-1,42	Plasma	N.R. / 0,11-0,22	
Trimetoprima	0,40	Hígado	N.R. / 0,090-0,15	
	0,7-1,5	Hígado	N.R. / 0,18-0,26	
Venlafaxina	2,4-4,8	Riñón	N.R. / 0,20-0,36	
	0,20-0,24	Músculo	N.R. / 0,16-0,27	
	0,16-0,32	Plasma	N.R. / 0,10-0,19	
Verapamilo	0,10-0,38	Hígado	N.R. / 0,12-0,16	
	0,27-0,61	Riñón	N.R. / 0,15-0,26	
Acetaminofen	2,88	Homogenizado	N.R. / 4,3	1. QuEChERS 2. Filtración con cartuchos Captiva ND lipid
Cafeína	3,00-4,58	Homogenizado	N.R. / 1,3	3. QTOF Triple TOF 5600 Sciex 4. Baduel et al. ¹⁷³
Citalopram	8,6-31,0	Hígado	N.R. / 0,01-0,8	
	0,3-164	Riñón	N.R. / 0,1-0,8	
Clomipramina	0,7-1,2	Hígado	N.R. / 0,3-3,9	
	0,3-1,8	Riñón	N.R. / 0,1-0,8	
	0,5	Músculo	N.R. / 0,03-0,1	
Haloperidol	1,8-5,0	Hígado	N.R. / 0,6-5,3	
	0,3-9,5	Riñón	N.R. / 0,1-0,6	
Hidroxicina	0,7	Músculo	N.R. / 0,05-0,2	1. Homogenización del solvente-matriz, centrifugación
	0,3-1,2	Hígado	N.R. / 0,1-0,8	2. Filtración sobre celulosa y congelamiento
Levomepromazina (methotrimeprazina)	0,3-0,3	Riñón	N.R. / 0,1-0,8	
	11,0	Hígado	N.R. / 1,2-5,3	
Mianserina	1,2-8,1	Riñón	N.R. / 0,2-2,0	3. Q-exactive-Thermo Fisher Scientific
	0,06	Músculo	N.R. / 0,04-0,01	4. Grabicova et al. ⁸⁸
Mirtazapina	0,6-2,1	Riñón	N.R. / 0,08-0,67	
	0,6-4,7	Hígado	N.R. / 0,56-5,70	
	12,0-95,0	Riñón	N.R. / 0,07-0,43	
Paroxetina	0,1-0,3	Músculo	N.R. / 0,06-0,01	
	5,6	Plasma	N.R. / 0,28-0,45	
	0,56-2,90	Hígado	N.R. / 0,19-1,70	
Sertralina	1,60-9,50	Riñón	N.R. / 0,02-0,18	
	0,65	Plasma	N.R. / 0,28-1,40	
	2,70-15,00	Cerebro	N.R. / 0,80-2,30	

Fármaco/ Metabolito	Detección (ng/g)	Matriz	LOD / LOQ (ng/g)	1.Método extracción 2.Purificación 3. Análisis 4.Referencia
Tramadol	1,60-24,00	Hígado	N.R. / 0,02-0,18	1. 10 g homogenizado. Micro-extracción líquido-sólido por fibra hueca asistida por microondas usando ácido cloroacético. 2. N.A. 3. Q-exactive-Thermo Fisher Scientific 4. Fernandez-Torres et al. ¹⁶⁹
	11,00-48,00	Riñón	N.R. / 0,29-1,90	
	0,52-2,40	Músculo	N.R. / 0,32-1,20	
	0,77	Plasma	N.R. / 0,50-0,86	
	1,70-2,40	Hígado	N.R. / 0,78-2,50	
	0,42-21,00	Riñón	N.R. / 0,07-0,47	
	0,17	Músculo	N.R. / 0,08-0,14	
	1,00-3,50	Hígado	N.R. / 0,32-1,10	
Venlafaxina	0,56-16,00	Riñón	N.R. / 0,22-1,80	
	0,56	Músculo	N.R. / 0,40-1,50	
Carbamazepina	0,32-3,25	Homogenizado	0,01 / 0,05	
Amitriptilina	2,40-4,83	Homogenizado	0,05 / 0,2	
Bronfeniramina	2,15-4,91	Homogenizado	0,01 / 0,05	
Bumetanida	1,53-3,61	Homogenizado	0,05 / 0,20	
Clomipramina	2,18-7,81	Homogenizado	0,05 / 0,2	
Clopamida	1,87-3,01	Homogenizado	0,05 / 0,10	
Dicicloverina (dicloamina)	0,94-5,32	Homogenizado	0,01 / 0,05	
Fenacetina	2,04-4,11	Homogenizado	0,003 / 0,01	
Flumequina	2,27-4,52	Homogenizado	0,2 / 1,0	
Flumetasona	1,24-3,98	Homogenizado	0,02 / 0,10	
Indometacina	2,41-3,15	Homogenizado	0,2 / 1,0	
Lidocaína	1,08-4,98	Homogenizado	0,02 / 0,1	
Loperamida	1,27-2,30	Homogenizado	0,05 / 0,20	
Naproxeno	0,91-2,21	Homogenizado	0,03 / 0,010	
Ormetoprima	1,52-2,66	Homogenizado	0,05 / 0,20	
Paracetamol (Acetaminofen)	2,88	Homogenizado	N.R. / 4,30	
Paracetamol (Acetaminofen)	1,54-4,05	Homogenizado	0,01 / 0,2	
Pefloxacina	0,23-4,0	Homogenizado	0,01 / 0,05	
Sulfadimetoxina	2,42-3,93	Homogenizado	0,20 / 1,00	
Tadalafil (Cialis)	1,68-3,93	Homogenizado	0,02 / 0,10	
Tramadol	1,41-5,44	Homogenizado	0,05 / 0,20	
Trimetoprima	2,02-3,01	Homogenizado	0,01 / 0,05	
Tripolidina	0,32-2,51	Homogenizado	0,20 / 1,00	

Ahora bien, uno de los máximos beneficios que tiene el trabajar con LC-HRMS, además del análisis cuantitativo, es adquirir información suficiente de otros compuestos que se cree que podrían estar en la muestra, pero no fueron considerados inicialmente (análisis de sospechosos) o compuestos totalmente desconocidos (*análisis no dirigido*), pero su determinación no sería cuantificable hasta que no se realice una curva de calibración y se haga la comparación respectiva con el patrón analítico standard, por lo que se denomina análisis cualitativo.

1.6.8 Análisis Cualitativo

Una de las grandes ventajas que tienen los analizadores de HRMS, radica en la posibilidad de determinar la masa exacta de los analitos que salen de la fuente de iones en modo full-MS. Así se obtiene una gran cantidad de información, que permite la caracterización de compuestos tanto conocidos, como desconocidos en la muestra analizada, esto incluye (en el caso de los fármacos) todo lo relacionado con fármacos no estudiados anteriormente, los metabolitos de fase I, metabolitos de fase II, y todos los productos de transformación ya sea por biodegradación, fotólisis, o cualquier otro proceso. La interpretación de la información se realiza por técnicas que se denominan “*de barrido*” como son el análisis de sospechosos (*suspect screening*), o el análisis de compuestos no conocidos (*non-target analysis*)²²⁴⁻²²⁶.

Normalmente, durante las determinaciones de los nuevos compuestos con masa exacta, usando equipos con analizadores de HR, se tiene como criterio general que los compuestos propuestos o candidatos, no difieran en masa isotópica en más de 5 ppm con respecto a la masa isotópica teórica^{203, 224}. Adicional a eso, se estudia el perfil isotópico, iones moleculares, se puede comparar la fragmentación del compuesto de origen (padre) contra el patrón de fragmentación del nuevo compuesto (que por lo general coinciden en algunos fragmentos) y también tener en cuenta los tiempos de retención relativos del compuesto padre y del compuesto candidato. Sin embargo, se debe tener en cuenta, que ningún compuesto está confirmado al 100 % hasta que no se compare su tiempo de retención y el espectro de masas con su patrón de referencia, es decir, solo se va a tener un nivel de confirmación parcial. Schymansky y sus colaboradores²²⁵, proponen cinco niveles de confianza a la hora de reportar el modo de confirmación de moléculas desconocidas usando HRMS (*Figura 8*)

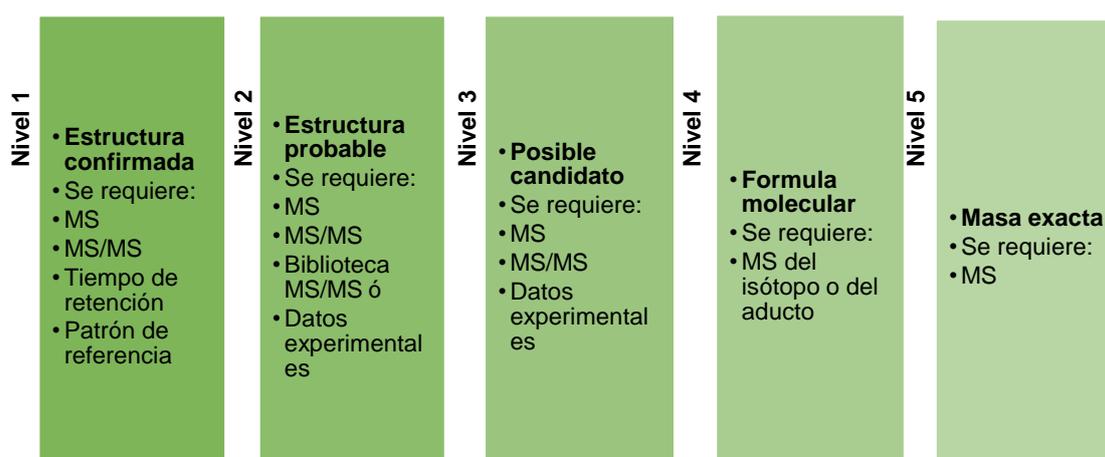


Figura 8. Niveles de confiabilidad durante la identificación de moléculas desconocidas. Adaptado de fuente: 225.

Análisis de compuestos sospechosos: En este caso se requiere una lista de compuestos que se sospechan que estén en la muestra, con lo que se procede a ser extraídos con masa exacta una vez adquiridos los datos. Luego se busca coincidencia entre el perfil isotópico de los compuestos teóricos y analizados. Posteriormente se debe buscar coincidencia entre los tiempos de retención teóricos (modelamientos o si se tienen datos antiguos) y el tiempo de retención de la muestra analizada. Finalmente, se debe buscar coincidencia entre los fragmentos en los espectros MS/MS teóricos (modelamientos o si se tienen datos antiguos) y el MS/MS de la muestra analizada. Después de eso, ya se puede presentar una lista de compuestos sospechosos presentes en la muestra ²⁰⁷. Es decir, para el análisis de compuestos sospechosos se debe tener información preliminar de lo que puede contener la muestra y se prepara una lista para extraer las masas de esos compuestos sospechosos.

En la *Tabla 3*, se presentan investigaciones publicadas en revistas científicas donde, por medio del análisis de sospechosos, se pudieron identificar metabolitos de fármacos en peces usando HRMS. Esos son casos publicados para la carbamazepina, el diclofenaco o el ibuprofeno, donde a través de inyecciones intraperitoneales del compuesto, se procedía a un seguimiento de los metabolitos formados en la bilis del pez ^{43, 111-112}. En el caso de la carbamazepina y el diclofenaco se lograron identificar 11 metabolitos, mientras que en el caso de el ibuprofeno, se identificaron 13 metabolitos. En otros estudios, se analizan los datos adquiridos, para buscar coincidencias en las bases de datos y de esta manera se han logrado identificar un número mucho más reducido de compuestos, que es lo que se denomina, análisis no dirigido (*non target analysis*) ^{172, 227}.

Tabla 3. Ejemplos de trabajos publicados en el análisis de metabolitos de fármacos en peces por medio del análisis de sospechosos con HRMS.

Fármaco	Fish especie	Matriz	Equipo de análisis	Metabolitos identificados	Ref.
Amoxicilina	<i>Ictalurus punctatus</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salmo salar</i>	Músculo	Q-Orbitrap-MS	Amoxicilina dicetona	172
Carbamazepina	<i>Solea senegalensis</i>	Bilis	Q-Orbitrap-MS	11 metabolitos	43
Diclofenaco	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Bilis	Q-TOF-MS	11 metabolitos	111
Diltiazem	European eel	Músculo	Q-Orbitrap-MS	Residuos de diltiazem	227
Enrofloxacin	European eel, Yellow croaker Tilapia	Músculo	Q-Orbitrap-MS	Desetilen- enrofloxacin	172
Etoxicina	European eel, Yellow croaker Tilapia	Músculo	Q-Orbitrap-MS	Dimero- Etoxicina	172
Ibuprofeno	<i>Solea senegalensis</i>	Bilis	Q-Orbitrap-MS	13 Metabolitos	43
Ibuprofeno	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Bilis	Q-TOF-MS	13 metabolitos	112
Mebendazol	European eel, Yellow croaker Tilapia	Músculo	Q-Orbitrap-MS	Amino mebendazol	172
Ofloxacin	European eel, Yellow croaker	Músculo	Q-Orbitrap-MS	Residuos de ofloxacin	172
Sulfametoxazol	European eel, Yellow croaker Tilapia	Músculo	Q-Orbitrap-MS	metabolito N ₄ acetyl	172

Durante el desarrollo de la tesis doctoral, se realizaron los trabajos de análisis por medio de las adquisiciones con SWATH. Como ya se explicó, la adquisición con SWATH, permite realizar cuantificaciones de compuestos conocidos (sin necesidad de optimización previa), permitiendo incluso, cuantificar usando el Full-scan, o con los fragmentos. Pero, además, el SWATH permite realizar análisis cualitativos, ya que como se graban todos los espectros MS/MS de todos los iones que salen de la fuente de ionización, (fragmentados en forma secuencial), se tiene toda la información de todos los compuestos extraídos de la muestra.

Una vez se tienen adquiridos los datos, el procesamiento de los mismos se realiza a través del software instrumental, en este caso el SCIEX OS. Este software contiene una biblioteca incluida con espectros MS y MS/MS en alta resolución para más de 17000 compuestos que incluye la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, NIST (*National Institute*

of Standards and Technology) del 2017, con espectros MS y MS/MS a diferentes energías de colisión, adquiridos con equipos de HRMS como el QTOF, el TripleTOF y el Orbitrap.

Para el análisis target, se importan las transiciones de los iones moleculares usando la base de datos de la librería. Los valores m/z de los iones moleculares del experimento de TOF-MS son usados como iones cualitativos y los valores m/z de los iones fragmentos de los experimentos de MS/MS son utilizados para los propósitos de cuantificación. Todo esto soportado por medio de una curva de calibración.

Debido a que también se realizaron trabajos de identificación de compuestos por medio del análisis retrospectivo usando *análisis de compuestos sospechosos*, se utilizaron herramientas extras para determinar la confirmación de los compuestos y poder llegar a niveles de confirmación 1 y 2 de acuerdo a lo explicado en la sección 1.6.5. Para complementar la confirmación con la biblioteca instrumental, se usó la base de datos de acceso libre *ChemSpider*, que se encuentra conectada con el software SCIEX OS y tiene datos para más de 77 millones de moléculas únicas, provenientes de más de 275 fuentes de datos²²⁸.

Finalmente, para concluir la introducción se presenta una síntesis gráfica, *Figura 9*, con los temas descritos en esta sección referido al análisis de fármacos en muestras de peces (y en general, en muestras ambientales).

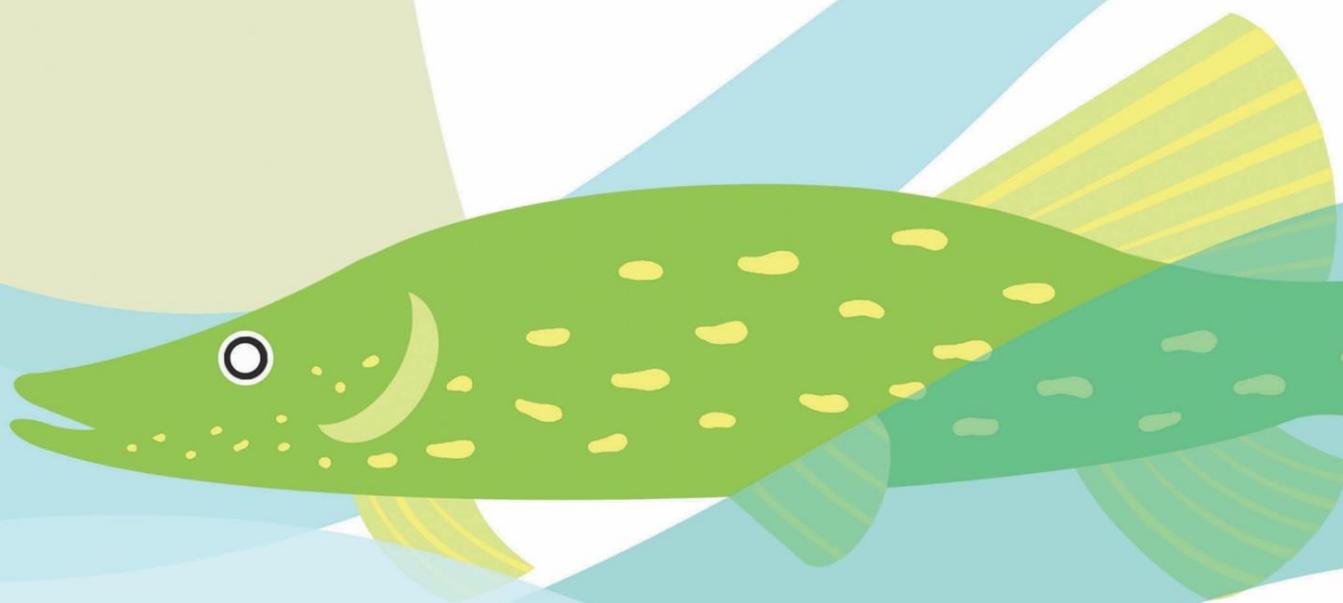


Figura 9. Diagrama de los pasos aplicados en el proceso de análisis de muestras
 MAE: Extracción asistida por microondas; USE: Extracción asistida o soportada por ultrasonido; SPME: Micro-extracción en fase sólida; ASE: Extracción acelerada con solventes; PLE: Extracción líquida presurizada; SPE: Extracción en fase Sólida; d-SPE: Extracción en fase sólida dispersa; GPC: Cromatografía de exclusión molecular; LC-MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas; LC-MS-MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Adaptado de fuente: 157.

Como resumen, se puede decir que los fármacos de uso humano y veterinario, están presentes en el medio ambiente en diversas matrices, y están llegando a la biota, tanto acuática como no acuática. Su bioacumulación está siendo estudiada primordialmente con técnicas avanzadas de análisis químico como la LC-HRMS, que permite hacer un seguimiento de compuestos conocidos, pero también de compuestos que se sospecha que están presentes en la biota acuática. Por ello, para profundizar en el tema de la contaminación ambiental en muestras de peces, se ha desarrollado esta tesis doctoral con los objetivos que se presentan en el capítulo 2.

CAPÍTULO 2

Justificación y objetivos de la tesis



2.1 Justificación

Como se ha presentado durante la introducción, los fármacos son productos químicos con actividad biológica; y sus metabolitos son productos de la reacción enzimática con el fármaco de origen los cuales, entran permanentemente en las aguas naturales y es un fenómeno estudiado en profundidad. A pesar de que los organismos de control y que las autoridades están avanzando con la regulación legislativa en la lucha contra la entrada de estos contaminantes en el medio ambiente, aún falta mucho trabajo por hacer. Sin embargo, ya se tiene una conciencia ambiental acerca de la contaminación que producen los fármacos en las aguas que conlleva a tratar de controlar con mayor medida, las entradas de estos contaminantes a los ambientes naturales.

Por otro lado, los estudios relacionados con la introducción de dichos fármacos en biota, son pocos. Se sabe que las muestras ambientales y sobre todo de origen biológico, son un tipo de muestras que conllevan muchos retos analíticos en el momento de su procesamiento. La extracción y purificación de los extractos presentan dificultades que tienen que ser superadas al mismo tiempo que permitir la conservación de los analitos de interés. El desarrollo de métodos más robustos, con mayor eficiencia, al mismo tiempo económicos y amigables con el medio ambiente, es un requerimiento científico en aras de realizar investigaciones más productivas. Es por ello que nace la necesidad de optimizar métodos aumentando la fiabilidad, sensibilidad, versatilidad, robustez, capacidad y rendimiento de los ya existentes. La fiabilidad, conocida como el método que inspira confianza y que es creíble al momento de la determinación y entrega de unos resultados verídicos. La sensibilidad en desarrollar métodos que puedan realizar determinaciones a niveles bajos de concentración, aprovechando la capacidad de los nuevos equipos. La versatilidad, para optimizar métodos que puedan ser aplicados en diversas matrices, sin afectar en gran medida los resultados por efectos de tipo matriz, gracias a la purificación que se aplica al extracto. La robustez al momento de hacer algún tipo de variaciones en el método, que no afecte su rendimiento. El rendimiento, en el sentido analítico, que permite analizar el mayor número de muestras, en el menor tiempo posible, con resultados reproducibles; y la capacidad, de poder analizar el mayor número de contaminantes, en este caso, número de fármacos y metabolitos por muestra, con el mínimo número de inyecciones. Para todo ello, se quieren aprovechar las capacidades que tiene los equipos analíticos de última tecnología, realizando análisis de tipo dirigido (análisis cuantitativos) y no dirigido (análisis cualitativos) en el estudio de muestras de peces. Toda esta optimización debe ir de la mano con los avances tecnológicos en materia de procesamiento de las muestras y de las técnicas analíticas.

Las tecnologías existentes permiten la determinación de análisis de compuestos a concentraciones muy bajas, a niveles de ng/g o incluso pg/g de matriz. Adicionalmente, las nuevas aproximaciones analíticas permiten la detección de nuevos compuestos, o hacer seguimientos de compuestos no seleccionados previamente durante el análisis inicial: análisis de compuestos sospechosos. Es por ello que con esta tesis se han propuesto varios objetivos para abordar temas relacionados con el análisis de los fármacos en peces, usando espectrometría de masas de alta resolución.

2.2 Objetivos

La presente tesis se desarrolla buscando nuevos métodos de análisis para la determinación de fármacos que no se han detectado anteriormente en peces. Haciendo uso de técnicas avanzadas de separación, como la cromatografía líquida de alta eficiencia y también de herramientas analíticas de última tecnología como la espectrometría de masas de alta resolución, se han planteado los siguientes objetivos:

- Desarrollar y validar métodos analíticos para la determinación de una larga lista fármacos en muestras de peces. Para ello, se pretenden optimizar métodos diferentes de extracción de los fármacos. Se pretende comparar una extracción por medio de la técnica QuEChERS, con otras técnicas. Los QuEChERS se basan en una extracción sólido-líquido y seguido de una partición líquido-líquido de los analitos en los disolventes, que generalmente son acetonitrilo y agua, y una purificación del extracto de tipo dispersivo. Otro método que se pretende optimizar y comparar con el primero, es una extracción miniaturizada y soportada con ultrasonido, para extraer más compuestos y validarlos. Cada uno de los métodos tiene diferentes características que serán presentadas en el Capítulo 3, y después serán discutidas y comparadas a lo largo del Capítulo 4. El fin último de estos desarrollos analíticos, es proponer métodos con alta fiabilidad, sensibilidad, versatilidad, robustez, y rendimiento para el análisis de fármacos en peces.

- Un segundo objetivo que se propone en la tesis, es la aplicación de los métodos analíticos desarrollados, para la determinación de fármacos en muestras de peces de diferentes ríos europeos, donde se busca recolectar información sobre la calidad del agua y los organismos. Los métodos desarrollados serán aplicados en muestras reales de peces provenientes de ríos de Grecia, el Evrotas; Italia, el Adige; España, el Llobregat; y un río que cruza varios países: el Sava, que cruza Eslovenia, Croacia, Bosnia y Herzegovina y Serbia.

- Un tercer objetivo planteado en la tesis, es estudiar la acumulación y distribución de los fármacos en los peces. Para ello, se pretende usar las técnicas validadas a lo largo del primer objetivo de esta tesis doctoral, y poder estudiar la distribución de fármacos en peces,

analizando diferentes órganos del mismo: agallas, bilis, cerebro, corazón, hígado, músculo, páncreas, piel, y riñón.

Con la siguiente representación visual se resume los objetivos propuestos de la presente tesis doctoral.

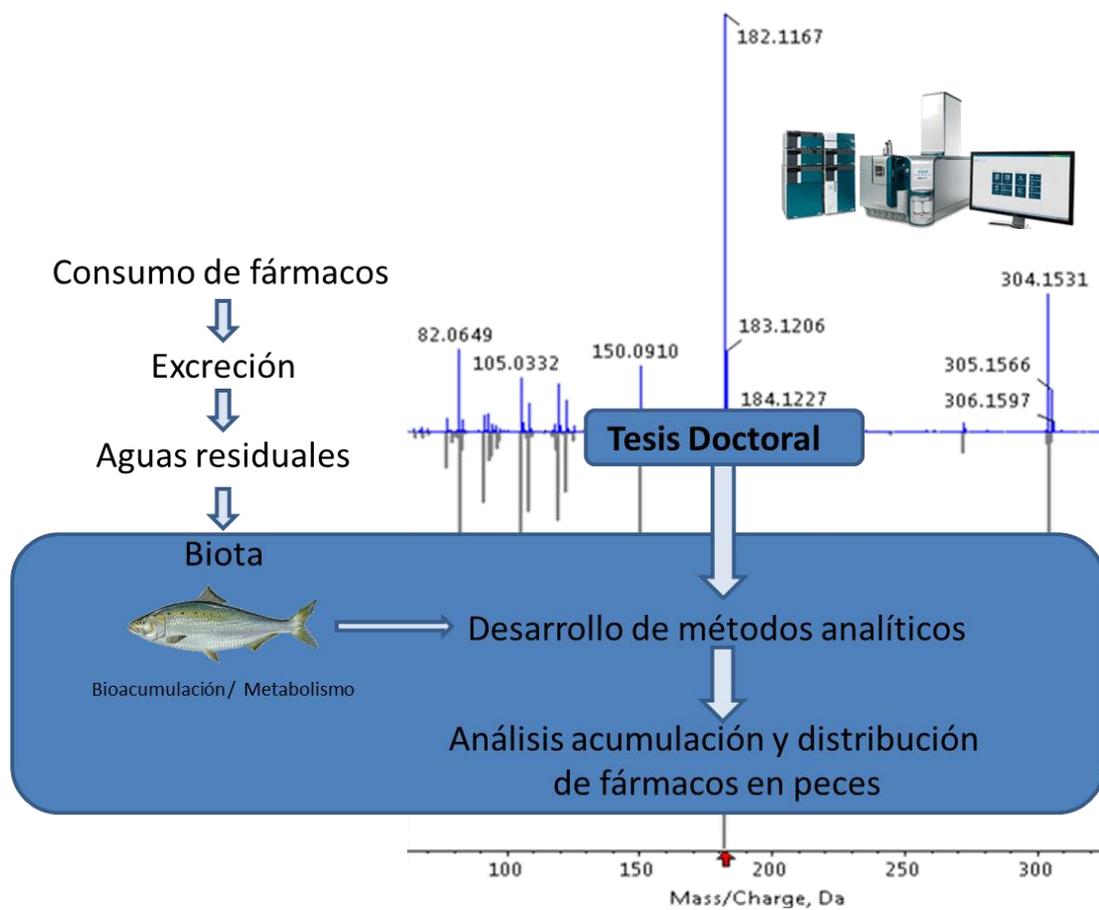
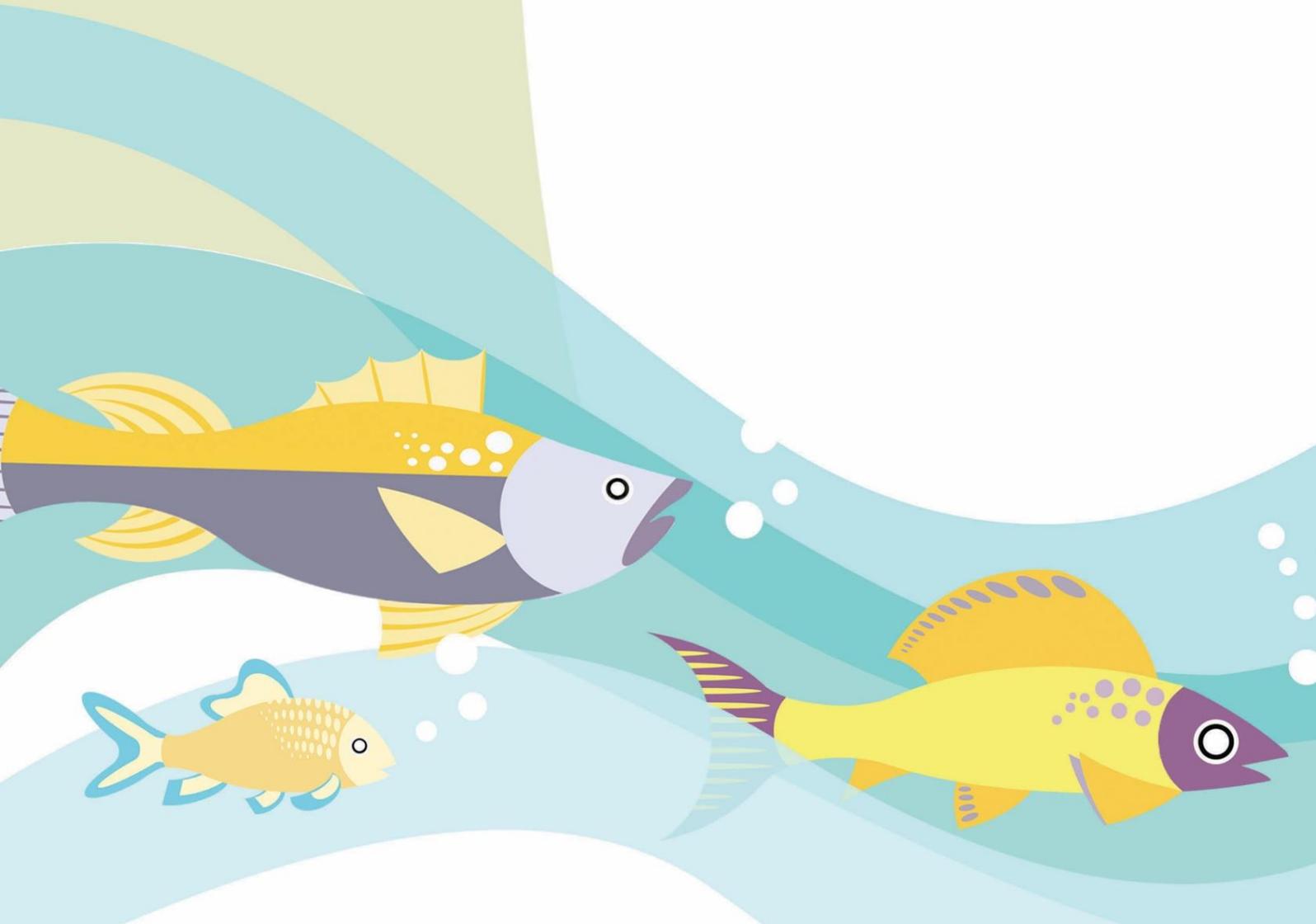


Figura 10. Esquema gráfico del trabajo desarrollado en esta tesis.

CAPÍTULO 3

Parte experimental



Durante este capítulo se presentan todos los reactivos, materiales, instrumentación y métodos utilizados durante la tesis doctoral.

3.1 Reactivos y disoluciones

➤ *Patrones*

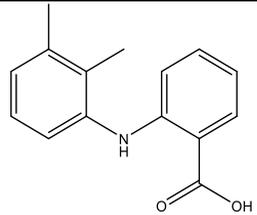
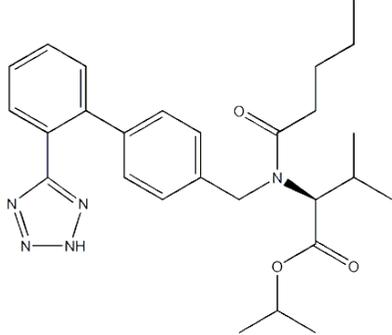
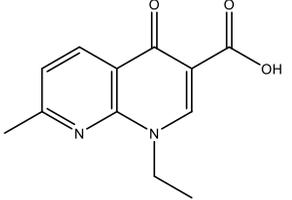
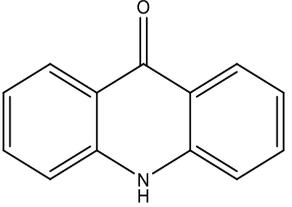
La mayoría de los patrones analíticos utilizados han sido suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Entre ellos: ácido mefenámico ($\geq 98,5\%$), ácido nalidíxico ($\geq 98\%$), acridona ($> 99\%$), amlodipina ($> 99\%$), atenolol ($> 99\%$), bezafibrato ($\geq 98\%$), bromazepam ($> 99\%$), cafeína ($\geq 99\%$), carazolol ($\geq 98,5\%$), carbamazepina ($\geq 99\%$), cefalexina ($\geq 99\%$), claritromicina ($\geq 98\%$), codeína ($\geq 98\%$), diclofenaco ($\geq 98\%$), diltiazem ($\geq 98\%$), eritromicina ($\geq 98\%$), fenofibrato ($\geq 99\%$), fluoxetina ($\geq 98\%$), furazolidona ($\geq 98\%$), indometacina ($\geq 98\%$), ketamina ($\geq 98\%$), ketoprofeno ($\geq 98\%$), lamotrigina ($\geq 98\%$), loratadina ($\geq 98\%$), lorazepam ($\geq 98\%$), mefedrona ($\geq 98\%$), metadona ($\geq 98\%$), metoprolol ($\geq 98\%$), metronidazol ($\geq 99\%$), midazolam ($\geq 98\%$), oxazepam ($\geq 98\%$), oxcarbazepina ($\geq 98\%$), paracetamol (acetaminofen) ($\geq 99\%$), propifenazona ($\geq 98\%$), propranolol ($\geq 98\%$), salbutamol (albuterol) ($\geq 98\%$), sertralina ($\geq 98\%$), sotalol ($\geq 98\%$), sulfadimetoxina ($\geq 98,5\%$), sulfametazina (sulfamididina) ($\geq 99\%$), sulfametoxazol ($\geq 98\%$), sulfapiridina ($\geq 99\%$), temazepam ($\geq 98\%$), trimethoprima ($\geq 98\%$), valsartan ($\geq 98\%$), venlafaxina ($\geq 98\%$), verapamilo ($\geq 99\%$), warfarina ($\geq 98\%$) y zolpidem ($\geq 98\%$).

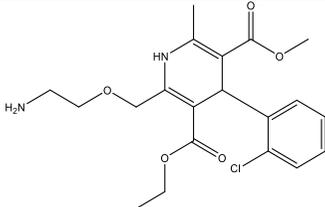
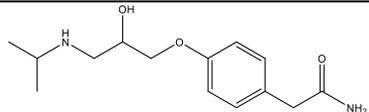
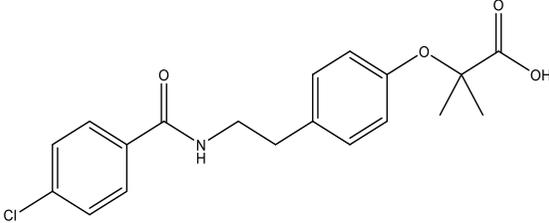
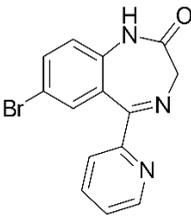
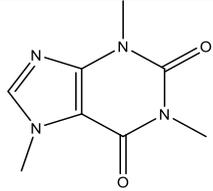
Los otros patrones analíticos han sido suministrados por otras casas comerciales. Entre ellos: ácido valsartánico ($\geq 98\%$, Toronto Research Chemicals, North York, Ontario, Canada), clorpromazina ($> 97\%$, Santa Cruz Biotechnology, Texas, Estados Unidos), diazepam ($\geq 98\%$, Cerilliant-Merck, Texas, Estados Unidos), flumequina ($\geq 98\%$, Honeywell Fluka, New Jersey, Estados Unidos), paroxetina ($\geq 98\%$, Santa Cruz Biotechnology, Texas, Estados Unidos).

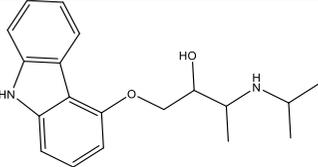
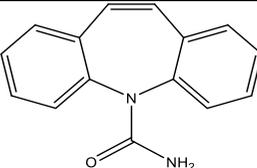
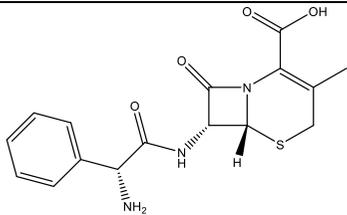
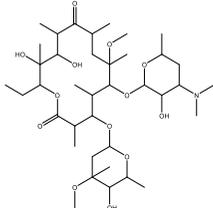
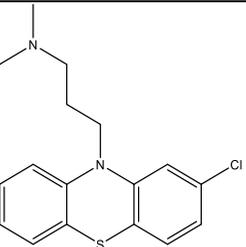
Más informaciones sobre los patrones analíticos usados para esta tesis se pueden encontrar en la Tabla 4.

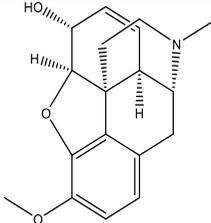
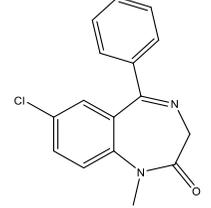
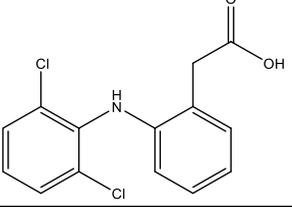
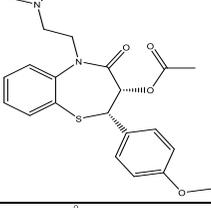
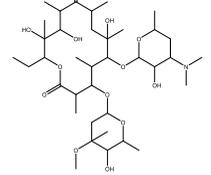
Los patrones internos marcados isotópicamente (ILIS) han sido suministrados por Santa Cruz Biotechnology (Texas, Estados Unidos): acetaminofén-d4 ($\geq 99\%$), bezafibrato-d4 ($\geq 99\%$), carbamazepina-d10 ($\geq 99\%$), codeína-d3 ($\geq 99\%$), diazepam-d5 ($\geq 99\%$), fenofibrato-d6 ($\geq 99\%$), lamotrigina-13C3 ($\geq 99\%$), lorazepam-d4 ($\geq 99\%$), metoprolol-d7 ($\geq 99\%$), sotalol-d6 ($\geq 99\%$), sulfametazina-d4 ($\geq 99\%$), trimetoprima-d3 ($\geq 99\%$), venlafaxina-d6 ($\geq 99\%$).

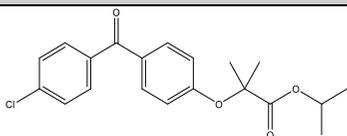
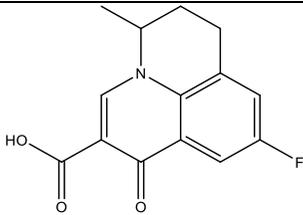
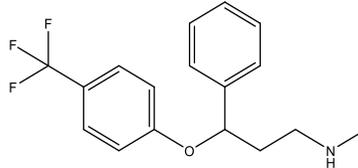
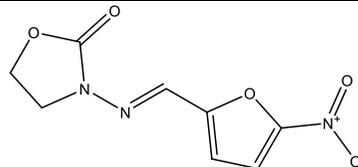
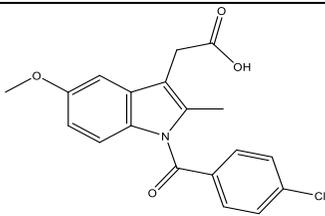
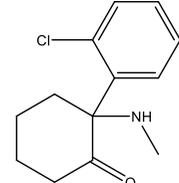
Tabla 4. Listado de patrones

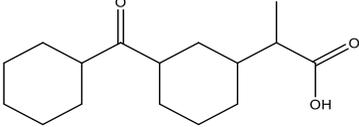
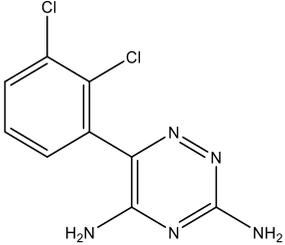
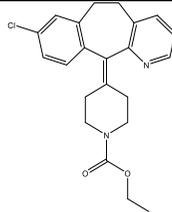
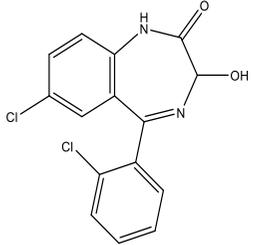
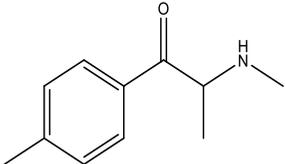
Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Ácido mefenámico	Antiinflamatorio	61-68-7	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	241,2857		Sigma-Aldrich
Ácido valsartánico	-	164265-78-5	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₂	266,2553		CRC Toronto
Ácido nalidíxico	Antibacterial	389-08-2	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	232,2357		Sigma-Aldrich
Acridona	-	578-95-0	C ₁₃ H ₉ NO	195,2171		Sigma-Aldrich

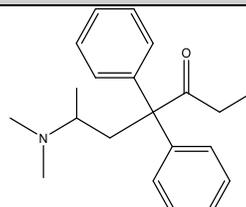
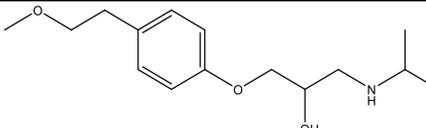
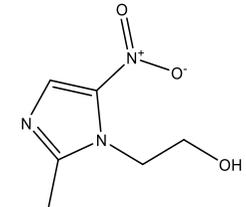
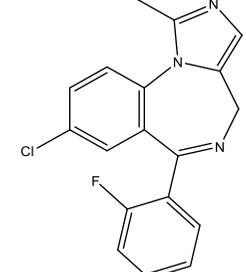
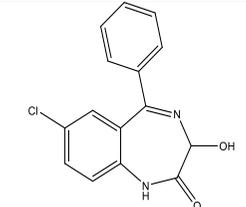
Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Amlodipine	Bloqueador de los canales de calcio	88150-42-9	$C_{20}H_{25}ClN_2O_5$	408,8766		Sigma-Aldrich
Atenolol	Agente β -bloqueante	29122-68-7	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	266,3366		Sigma-Aldrich
Bezafibrato	Regulador Lipídico	41859-67-0	$C_{19}H_{20}ClNO_4$	361,8200		Sigma-Aldrich
Bromazepam	Psicoléptico	1812-30-2	$C_{14}H_{10}BrN_3O$	316.1527		Sigma-Aldrich
Cafeína	Psicoanaléptico	58-08-2	$C_8H_{10}N_4O_2$	194,1909		Sigma-Aldrich

Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Carazolol	N.D. (Agente β -bloqueante)	57775-29-8	$C_{18}H_{22}N_2O_2$	298,3802		Sigma-Aldrich
Carbamazepina	Antiepiléptico	298-46-4	$C_{15}H_{12}N_2O$	236,2691		Sigma-Aldrich
Cefalexina	Antibacterial	15686-71-2	$C_{16}H_{17}N_3O_4S$	347,3893		Sigma-Aldrich
Claritromicina	Antibacterial	81103-11-9	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	747,9548		Sigma-Aldrich
Clorpromazina	Psicoléptico	50-53-3	$C_{17}H_{19}ClN_2S$	318,8645		Santa Cruz

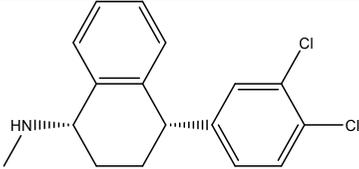
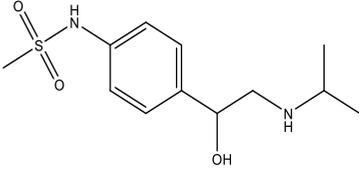
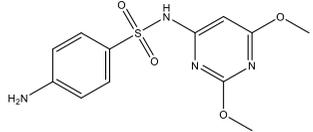
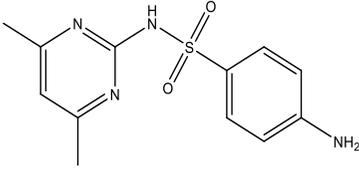
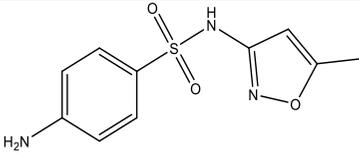
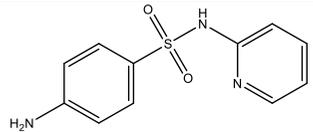
Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Codeína	Medicamento para la tos y escalofrios	76-57-3	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299,3649		Sigma-Aldrich
Diazepam (Valium)	Psicoléptico	439-14-5	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,7407		Cerilliant-Merck
Diclofenaco	Anti-inflamatorio	15307-86-5	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,1490		Sigma-Aldrich
Diltiazem	Bloqueador de los canales de calcio	42399-41-7	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	414,5185		Sigma-Aldrich
Eritromicina	Antibacterial	114-07-8	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,9282		Sigma-Aldrich

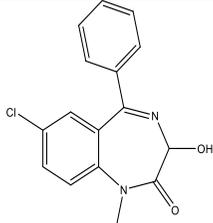
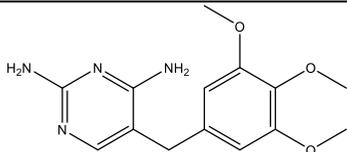
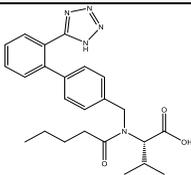
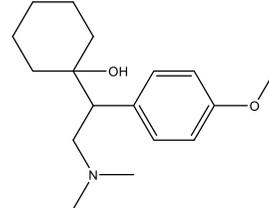
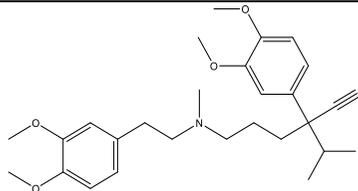
Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Fenofibrato	Regulador Lipídico	49562-28-9	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄	360,8320		Sigma-Aldrich
Flumequina	Antibacterial	42835-25-6	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	261,2489		Honeywell Fluka
Fluoxetina	Psicoanaléptico	54910-89-3	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	309,3268		Sigma-Aldrich
Furazolidona	Antiséptico ginecológico	67-45-8	C ₈ H ₇ N ₃ O ₅	225,1586		Sigma-Aldrich
Indometacina	Anti-inflamatorio	53-86-1	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,7883		Sigma-Aldrich
Ketamina	Anestésico	6740-88-1	C ₁₃ H ₁₆ NCIO	237,7257		Sigma-Aldrich

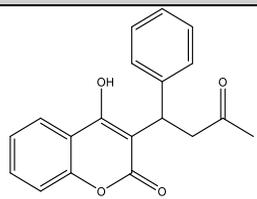
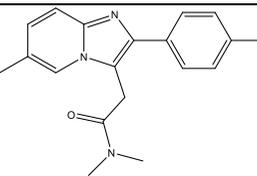
Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Ketoprofeno	Anti-inflamatorio	22071-15-4	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254,2812		Sigma-Aldrich
Lamotrigina	Psicoléptico	84057-84-1	C ₉ H ₇ Cl ₂ N ₅	256,0916		Sigma-Aldrich
Loratadina	Antihistamínico	79794-75-5	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₂	382,8840		Sigma-Aldrich
Lorazepam	Psicoléptico	846-49-1	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	321,1585		Sigma-Aldrich
Mefedrona	Psicoanaléptico	1189805-46-6	C ₁₁ H ₁₅ NO	177,2433		Sigma-Aldrich

Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Metadona	Analgésico opioide	76-99-3	C ₂₁ H ₂₇ NO	309,4460		Sigma-Aldrich
Metoprolol	Agente β-bloqueante	51384-51-1	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	267,3645		Sigma-Aldrich
Metronidazol	Antibacterial/antibiótico	443-48-1	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	171,1542		Sigma-Aldrich
Midazolam	Psicoleptico	59467-70-8	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	325,7679		Sigma-Aldrich
Oxazepam	Psicoléptico	604-75-1	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	286,7135		Sigma-Aldrich

Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Oxcarbazepina	Antiepiléptico	28721-07-5	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,2685		Sigma-Aldrich
Paracetamol (Acetaminofen)	Analgésico	103-90-2	C ₈ H ₉ NO ₂	151,1629		Sigma-Aldrich
Paroxetina	Psicoanaléptico	61869-08-7	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	329,3661		ChemCruz
Propifenazona	Analgésico	479-92-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O	230,3060		Sigma-Aldrich
Propranolol	Agente β-bloqueante	525-66-6	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259,3440		Sigma-Aldrich
Salbutamol (albuterol)	Enfermedades respiratorias	18559-94-9	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	239,3112		Sigma-Aldrich

Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Sertralina	Psicoanaléptico	79617-96-2	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	306,2301		Sigma-Aldrich
Sotalol	Agente β-bloqueante	3930-20-9	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	272,3640		Sigma-Aldrich
Sulfadimetoxina	Antibacterial	122-11-2	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310,3292		Sigma-Aldrich
Sulfametazina (sulfadimidina)	Antibacterial	57-68-1	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278,3304		Sigma-Aldrich
Sulfametoxazol	Antibacterial	723-46-6	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,2779		Sigma-Aldrich
Sulfapiridina	Antibiótico	144-83-2	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	249,2891		Sigma-Aldrich

Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Temazepam	Psicoléptico	846-50-4	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	300,7402		Sigma-Aldrich
Trimetoprima	Antibacteriana	738-70-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,3183		Sigma-Aldrich
Valsartan	Agente Cardiovascular	137862-53-4	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃	435,5197		Sigma-Aldrich
Venlafaxina	Psicoanaléptico	93413-69-5	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277,4024		Sigma-Aldrich
Verapamilo	Bloqueador de los canales de calcio	36622-29-4	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	454,6026		Sigma-Aldrich

Fármaco	Clasificación ATC ¹	CAS number ²	Fórmula	Peso molecular ³	Estructura	Proveedor
Warfarina	Agente antitrombótico	81-81-2	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308,3286		Sigma-Aldrich
Zolpidem	Psicoléptico	82626-48-0	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	307,3890		Sigma-Aldrich

1. Clasificación ATC: <https://www.whocc.no>; 2. Número CAS: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>; 3. Masa calculada <http://www.chemcalc.org/>;

➤ *Soluciones*

Las soluciones madre individuales para los analitos se prepararon en metanol a concentración de 1000 mg/L mientras que las soluciones madre de ILIS a 100 mg/L. Para propósitos de validación, calibración y enriquecimiento, se prepararon soluciones de trabajo que contenían todos los analitos y los ILIS en el metanol a 10 mg/L. Todas las soluciones se almacenaron en la oscuridad a -20°C.

➤ *Disolventes*

Los disolventes usados para la extracción de fármacos y separaciones cromatográficas de las muestras fueron los siguientes:

- agua HPLC gradient grade y grado optima LC/MS (J.T. Baker, Fisher scientific, Gliwice, Polonia);
- acetonitrilo (MeCN) grado ultra HPLC y grado optima LC/MS (J.T. Baker, Fisher scientific);
- isopropanol (iPrOH) grado HPLC (J.T. Baker, Fisher scientific);
- metanol (MeOH) grado ultra HPLC (J.T. Baker, Fisher scientific);
- hexano ($\geq 99,0$ %, Merck, Darmstadt, Alemania);
- acetona ($\geq 99,7$ % Merck, Darmstadt, Alemania);
- cloroformo ($\geq 99,9$ %, Carlo Erba, Barcelona, España);
- diclorometano (DCM) ($\geq 99,8$ %) Panreac Química SLU (Barcelona, España).

Otros reactivos utilizados durante el desarrollo experimental de la tesis:

- acetato de amonio (NH_4OAc) ($\geq 99,9$ %, Merck, Darmstadt, Alemania);
- ácido fórmico (HCOOH) reactivo purificado p.a. ACS (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos).

➤ *QuEChERS*

Para fines de extracción de los fármacos, se evaluaron las técnicas de ultrasonido y QUECHERS. En el caso de QuEChERS, se probaron tres sales de extracción:

- QuEChERS original compuesto de 4,0 g de sulfato de magnesio anhidro y 1,0 g de cloruro de sodio (BEKOLut GmbH & Co. KG. Hauptstuhl, Alemania);
- QuEChERS citrato-kit-01 tamponado con buffer citrato compuesto de 4,0 g de sulfato de magnesio anhidro, 1,0 g de cloruro de sodio, 1,0 g de citrato de sodio y 0,5 g de citrato disódico sesquihidratado (BEKOLut GmbH & Co. KG. Hauptstuhl, Alemania);
- QuEChERS formiato compuesto de 5,0 g de formiato de amonio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Se realizaron procesos de purificación de los extractos usando reactivos específicos y/o materiales:

- kit QuEChERS PSA-C18: (BEKOLut GmbH & Co. KG. Hauptstuhl, Alemania) compuesto por 150 mg de sorbentes de amina primaria y secundaria (PSA), 150 mg de sílice ligada a octadecilo (C18) y 900 mg de sulfato de magnesio anhidro;
- cartuchos SPE OASIS HLB Prime, específico para lípidos y clorofila (3 cc, 150 mg; Waters, Milford, MA);
- d-SPE Bond elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal (EMR) específica para la eliminación de lípidos (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) que consiste en 1,0 g de material de EMR lipid removal en un primer tubo de falcon, y un segundo falcon con la sal de limpieza y secado consistente en 400 mg de cloruro de sodio y 1600 mg de sulfato de magnesio anhidro;
- Z-Sep+ dSPE (óxido de zirconio y C18 dual bonded to silica; SupelTM QuE, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) que consiste en 50 mg de Discovery[®] DSC-18 y 20 mg de Z-Sep;
- filtros de polietilentereftalato (PTFE, Whatman Puradisc 25 TF 25 mm, 0,45 µm, Buckinghamshire, UK);
- viales con filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF 0,45µm Thomson, Restek Corporation, Bellefonte, Pensilvania, Estados Unidos);
- filtros de jeringa corning[®] de acetato de celulosa (0,45µm, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

- Alúmina neutra, óxido de aluminio para cromatografía, neutral, Brockmann I, 50-200 µm, 60A, (CAS 1344-28-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos)
- Alúmina activada óxido de aluminio 90 activo neutro (CAS 1344-28-1, Merck, Darmstadt, Alemania)
- Alúmina ácida, óxido de aluminio activated acidic, Brockmann I (CAS 1344-28-1, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)

3.2 Instrumentación

3.2.1 Cromatografía líquida y espectrometría de masas

- La separación cromatográfica de los compuestos se realizó en una columna cromatográfica empacada EVO C18 KINETEX de fase inversa (50 × 2,1 mm, 2,6 µm, Phenomenex, Torrance, California, Estados Unidos) con precolumna termostataada a 40°C.
- Se utilizó un sistema UHPLC Exion LC AD (SCIEX, Darmstadt, Alemania).
- El análisis por espectrometría de masas se realizó en un equipo X500R QTOF (SCIEX), dotado de una fuente de ionización de electrospray ESI TurboV™, con un analizador TOF configurado en modo *N* y con un poder de resolución de 33700 FWHM (*m/z* 185,1285).
- Para el procesamiento cualitativo y cuantitativo de datos adquiridos instrumentalmente se utilizó el software SciexOS V. 1.3 – V.1.5.

3.2.2 Otros instrumentos y equipos de laboratorio

- Balanza analítica AG135 METTLER TOLEDO, Columbus, Ohio, Estados Unidos.
- Agitador de mezclas Vortex Top (Heidolph™ 541-10000-00, Heidolph, Schwabach, Alemania) para homogenización de muestras y de extractos.
- Disruptor de muestra TissueLyzer LT (Quiagen, Hilden, Alemania) para homogenización de muestras.
- Liofilizadora LyoAlfa 6 system (Telstar Technologies, Terrassa, Spain) para liofilización de las muestras.
- Horno universal Memmert (modelo 100 – 800, Memmert GmbH + Co, Schwabach, Alemania) para secado completo de las muestras y extractos.

- Unidad de ultrasonido (Fisherbrand® FB15064, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para extracciones de fármacos y determinaciones de grasa.
- Centrífuga (5810 R Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) para centrifugación de extractos.
- Medidor multiparamétrico de pH y conductividad de sobremesa (Orion Star™ A215 Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para control de pH en soluciones.
- Turbovap con corriente de nitrógeno (TurboVap® LV, Biotage, Uppsala, Suecia) para evaporación de extractos.

3.3 Muestras

Los métodos fueron optimizados con salmón noruego de la especie *Salmo salar* adquirido en un supermercado local de Barcelona (España) y con muestras de río (*Leuciscus cephalus*). Posteriormente a las optimizaciones, los métodos fueron aplicados a especies de peces de 4 ríos europeos:

- Especies provenientes del río Sava (un río transfronterizo que cruza Eslovenia, Croacia, Bosnia-Herzegovina y Serbia): *Barbus barbus*, *Esocidae*, *Leuciscus cephalus*, *Onchorhynchus mykiss*, *Sander lucioperca*, y *Salmo trutta fario*;
- Especies provenientes del río Evrotas (Grecia): *Squalius keadicus*;
- Especies provenientes del río Adige (Italia): *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta marmoratus*, *Cottus gobio*, *Leuciscus cephalus*, y *Thymallus thymallus*;
- Especies provenientes del río Llobregat (España): *Anguilla anguilla*, *Chelon ramada*, *Cyprinus carpio*, y *Luciobarbus graellsii*.

Los peces muestreados en el río Llobregat se recolectaron en mayo del 2019 en la parte baja del río, más exactamente en Sant Joan Despí (*Figura 11*). Los peces fueron capturados por pesca eléctrica (200-350 V, 2-3 A, corriente continua trifásica rectificadora), y recogidos con redes. Todos los procedimientos relacionados con la pesca fueron autorizados por el servicio de protección animal y biodiversidad de la Generalitat de Cataluña y fueron realizados por personal experto, quien también identificó las especies capturadas (ejemplos *Figura 12*). Información acerca de los muestreos de los ríos Sava, Evrotas y Adige puede ser consultada en trabajos previos de nuestro grupo de investigación ²²⁹.

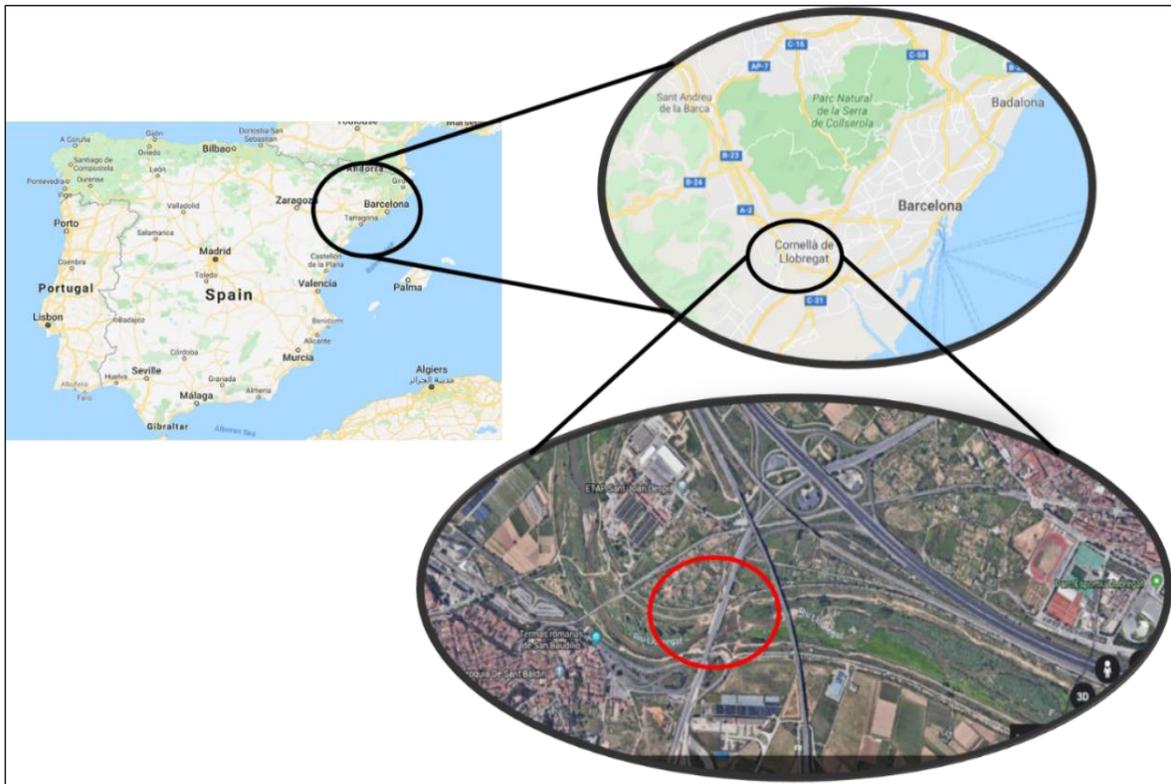


Figura 11. Localización punto de muestreo en el río Llobregat. Sant Joan Despí. UTM: 420218, 4577994

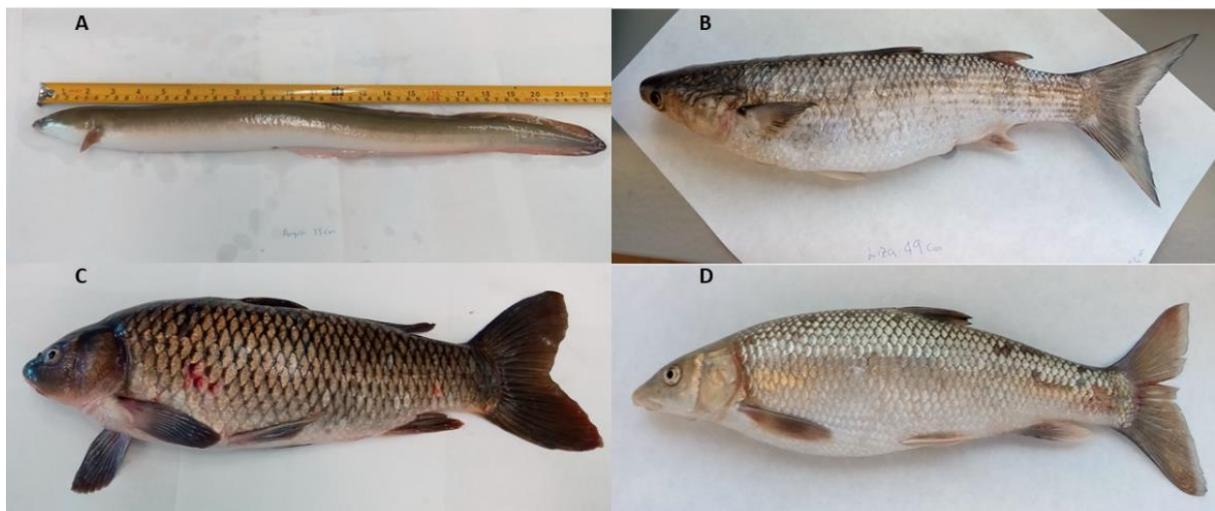


Figura 12. Ejemplos de especies muestreadas en el río Llobregat. A) *Anguilla anguilla* (anguila europea), B) *Chelon ramada* (*Liza*), C) *Cyprinus carpio* (carpa común) y D) *Luciobarbus graellsii* (Barbo del Ebro).

Los peces muestreados en el río Llobregat fueron tratados de manera especial para analizar la distribución de fármacos en los diferentes órganos y tejidos. Una vez capturados los peces, en el lugar de muestreo, se tomaron muestras de sangre de cada individuo (2mL) y se mantuvo líquida con 10 μ L de heparina para analizar el plasma. Los peces muestreados fueron transportados a 4°C hasta el laboratorio para procesamiento de las muestras. Una vez en el laboratorio, se diseccionaron los peces separando los órganos a analizar: agallas, bilis

(si estaba presente), cerebro, corazón, hígado, músculo, páncreas, piel, y riñón. Todos los órganos fueron almacenados a -25°C en la oscuridad hasta el análisis.

Adicionalmente a lo peces, se tomaron muestras de agua del río Llobregat (1000 mL) en botellas PET ambar previamente lavada con agua ultrapura, para complementar el análisis con los fármacos presentes en el agua.

3.4 Metodologías

3.4.1 Análisis de fármacos en músculo de pez liofilizado, método 1

➤ *Determinación del contenido de agua y grasa*

El contenido de agua de las muestras se determinó de acuerdo al procedimiento realizado en ²³⁰. Brevemente, diez gramos de muestra de pez fresco se liofilizaron por 10 días. Posteriormente, para asegurar secado completo, la muestra se calentó en el horno por 5 horas a 105 °C. Finalmente la muestra se colocó en el desecador hasta enfriamiento a temperatura ambiente.

En el caso del contenido de grasa, se realizó una extracción con ultrasonido con 5 diferentes mezclas de disolventes: DCM:hexano (1:1, v/v); MeOH:hexano (1:1, v/v); acetona:hexano (1:1, v/v); cloroformo:MeOH:water (5:10:4, v/v/v) y hexano 100 %. En resumen, 3,0 g peso seco (dw) de matriz se sonicaron con 15 mL de disolventes (5 mL x 3 veces). Se aplicó ultrasonido por 15 minutos en cada ocasión y se centrifugaron por 5 min a 4000 rpm. El sobrenadante se colectó en un solo extracto, que posteriormente fue evaporado con una corriente de nitrógeno hasta peso constante ²³⁰.

➤ *Extracción con QuEChERS y purificación EMR-lipid removal*

Para la extracción de fármacos, 1,0 g dw de músculo de *Salmo salar* se enriqueció con 100 ng de solución de fármacos y de ILIS preparados en MeOH. La lista de analitos e ILIS utilizados en este método se pueden observar en la *Tabla 5*. La muestra fue agitada en vortex por 1 min para asegurar una mejor interacción entre la matriz y la solución de los compuestos. Las muestras enriquecidas se dejaron en reposo en una cabina de extracción por 1 hora para permitir la evaporación de MeOH, y luego se dejaron en reposo toda la noche en el refrigerador a 4°C.

Tabla 5. Compuestos validados en el método 1.

Compuesto	Masa ión precursor [M-H] ⁺	Masa ión fragmento [M-H] ⁺	ILIS
Acetaminofén	152,0706	110,0598	Carbamazepina-d ₁₀
Amlodipina	409,1525	238,0626	N.V.
Atenolol	267,1703	145,0638	Bezafibrato-d ₄
Bezafibrato	362,1154	138,9944	Bezafibrato-d ₄
Bezafibrato-d ₄	366,1405	143,0195	-
Carazolol	299,1754	116,1071	Venlafaxina-d ₆
Carbamazepina	237,1022	194,0949	Carbamazepina-d ₁₀
Carbamazepina-d ₁₀	247,1650	204,1578	-
Cefalexina	348,1013	106,0658	N.V.
Claritromicina	748,4842	158,1174	Sotalol-d ₆
Codeína	300,1594	215,1067	Bezafibrato-d ₄
Diazepam	285,0789	154,0413	Sotalol-d ₆
Diclofenaco	296,0240	214,0419	Bezafibrato-d ₄
Diltiazem	415,1686	178,0305	Venlafaxina-d ₆
Fenofibrato	361,1201	233,0366	N.V.
Indometacín	358,0841	138,9939	Bezafibrato-d ₄
Ketoprofeno	255,1016	105,0328	Sotalol-d ₆
Loratadina	383,1521	337,1115	N.V.
Metoprolol	268,1907	74,0604	Metoprolol-d ₇
Metoprolol-d ₇	275,2347	123,1515	-
Metronidazol	172,0717	128,0449	Carbamazepina-d ₁₀
Paroxetina	330,1500	192,1187	N.V.
Propranolol	260,1645	155,0845	Sotalol-d ₆
Propifenazona	231,1492	189,1024	Metoprolol-d ₇
Salbutamol	240,1594	148,0752	Sotalol-d ₆
Sertralina	306,0811	158,9765	N.V.
Sotalol	273,1267	133,0760	Sotalol-d ₆
Sotalol-d ₆	279,1644	134,0817	-
Trimetoprima	291,1452	230,1160	Sotalol-d ₆
Venlafaxina	278,2116	58,0656	Venlafaxina-d ₆
Venlafaxina-d ₆	284,2491	64,1026	-
Verapamilo	455,2904	165,0906	Carbamazepina-d ₁₀

N.V.: Analito no validado. ILIS: Patrón interno marcado isotópicamente.

Dos técnicas de extracción se aplicaron en las muestras: ultrasonido y QuEChERS. En el caso de ultrasonido, 1 mL de agua se adicionó a la muestra y se agitó en vortex por 1 min. Luego se adicionaron 5 mL del disolvente (MeOH, MeCN, o mezcla MeOH:MeCN (1:1, v/v)), y se repitió la agitación en vortex por 1 min seguido de 20 min de ultrasonido. La muestra se centrifugó a 4000 rpm por 20 min y se extrajo el sobrenadante. Este proceso se repitió una segunda vez y los sobrenadantes se agruparon. Una alícuota de 6-mL del sobrenadante se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y luego se reconstituyó en 1,0 mL de H₂O/MeOH (90:10).

En el caso de los QuEChERS, 9,0 mL de agua se adicionaron a 1,0 g de muestra. Luego se agitó en vortex por 1,0 min, se adicionaron 10 mL de MeCN seguido de una agitación en vortex por 1,0 min nuevamente. Luego se adicionaron las sales extractoras (**original, buffered o formiato**) con una agitación manual inmediata, para evitar la formación de grumos, y luego una agitación en vortex por 1 min. Finalmente, la muestra se centrifugó a 4000 rpm por 5 min. Una alícuota de 6-mL del sobrenadante, se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y se reconstituyó con 1 mL of H₂O/MeOH (90:10). La muestra reconstituida se centrifugó a 14000 rpm por 10 min para precipitar lo máximo posible cualquier partícula suspendida que estuviera presente. Finalmente, como información adicional, se determinaron los pesos de los coextractos de cada uno de los métodos evaluados, evaporando 2,5 mL de cada uno de los extractos.

El método de extracción más adecuado se seleccionó después de una comparación de las áreas de los picos cromatográficos de los extractos y las soluciones estándar a la misma concentración y que será denominada como la eficiencia de extracción. Los resultados de las extracciones se discuten en capítulo de *Resultados y discusión*.

➤ *Optimización de la purificación del extracto*

Después de seleccionar el mejor método de extracción, 3 diferentes métodos de purificación de los extractos fueron evaluados: 1) Purificación tipo d-SPE compuesta por PSA y C18, 2) purificación con cartuchos de SPE HLB Prime, y 3) purificación tipo d-SPE EMR lipid Removal.

Para la purificación con PSA y C18 se tomaron 6 mL de alícuota del extracto y se mezclaron con las sales, con una agitación manual inmediata para evitar la formación de grumos. La muestra fue agitada en vortex por 1 min y centrifugada por 5 min a 4000 rpm. Finalmente, 1 mL del sobrenadante se evaporó bajo corriente de nitrógeno y reconstituido con 1 mL de H₂O/MeOH (90:10). Para la purificación con SPE HLB Prime, se tomó 6 mL de alícuota del extracto y se pasó a través del cartucho a una velocidad de 1 mL/min con aplicación de vacío. Los analitos se eluyeron con 2 mL de MeCN, y 1 mL se evaporó bajo corriente de nitrógeno y reconstituido con 1 mL de H₂O/MeOH (90:10). Para la purificación EMR lipid removal se hacía un procedimiento de activación inicial. Para activar la mezcla de purificación, se adicionan 5,0 mL de agua al tubo que contiene el agente purificante y se agita en vortex por un minuto. Luego, 5 mL del extracto se adicionan a la suspensión, se agitó vigorosamente a mano y luego en vortex por 1 min. Luego el tubo se centrifugó a 4000 rpm por 5 min, y 5 mL del sobrenadante fueron transferidos a un segundo tubo de limpieza que contenía sulfato de magnesio para remover el exceso de agua. Éste fue agitado en vortex por 1 min y centrifugado

a 4000 rpm por 5 min. Finalmente, 2 mL del sobrenadante fueron evaporados bajo corriente de nitrógeno y el residuo disuelto en 1 mL de H₂O/MeOH (90:10). Como parte del proceso de optimización de la purificación del extracto, se evaluó el uso de filtros de PTFE con 1 mL de solución estándar de 100 ng/mL.

➤ *Análisis por LC-HR-MS/MS*

La separación cromatográfica y el análisis por espectrometría de masas se realizó en el equipo X500R QTOF (ver sección 3.2) operado en modo de ionización positiva. La separación cromatográfica de los fármacos se hizo usando una columna C18 (ver sección 3.2), y como fases móviles formiato de amonio (5 mM, pH 3) y MeCN a un flujo de 0,4 mL/min. Se inyectaron 5 µL de muestra que se separaron con un gradiente en la composición de las fases móviles empezando con condiciones iniciales (5 % MeCN) que se mantuvo por 0,1 min, y luego se varió la fase orgánica hasta el 83 % en 5,9 min, para posteriormente incrementar el porcentaje al 98 % en el siguiente 0,1 min, para mantener esta composición por 1,4 min antes de volver a condiciones iniciales en 0,1 min y mantener dichas condiciones por 1,4 min. Con éste gradiente, se logró una separación cromatográfica de los fármacos en 9,0 min. Los datos de TOF-MS y TOF-MS/MS se adquirieron usando el modo de adquisición SWATH.

Para la adquisición SWATH, se ajustó un único experimento TOF-MS en un rango m/z de de 100 a 850 con un tiempo de acumulación de 0,1 s seguido por nueve experimentos MS/MS de ventanas de rangos m/z variables de Q1 de la siguiente manera: m/z 99,5-171,9, 170,9-206,3, 205,3-235,7, 234,7-275,6, 274,6-324,1, 323,1-391,6, 390,6-508,1, 507,1-545,1, 544,1-800. Se aplicó energía de colisión en modo rampa desde 20 a 50 eV (35±15 eV) en cada ventana con el fin de reproducir las mismas condiciones de la biblioteca instrumental. El tiempo de acumulación para cada experimento MS/MS (ventana) se ajustó a 30 ms para un ciclo de 0,45 s que incluye el escaneo MS (0,1 s) que se adquiere al principio de cada ciclo basado en un promedio del ancho del pico de 12 segundos para obtener por lo menos 20 puntos/pico. El número de ventanas variables, tiempo de acumulación y tiempo total del ciclo depende de la duración del gradiente y de la cromatografía (230). Adicionalmente, cualquier variación en la exactitud de de la masa del Q-ToF-MS y Q-TOF-MS/MS se corregía automáticamente y se mantenía a través del lote de adquisición usando el sistema de calibración *Calibrant Delivery System* infundiendo una solución estándar de de referencia del calibrante que contenía diez componentes en un rango de masas de m/z 132,90490 a 2034,62545, incluida la corrección para MS/MS con reserpina como estándar de referencia (C₃₃H₄₀N₂O₉, m/z 609,28066). Esta solución se inyecta al equipo a través del sistema de doble

infusionador, *TwinSprayer*, que contiene un canal independiente para la solución calibrante incluido o embebido en la fuente ionzante.

Finalmente, las condiciones de la fuente fueron optimizadas de la siguiente manera: Voltaje de ionización 5500 V, la temperatura de la fuente y flujo de nitrógeno (GS1 y GS2) se ajusto a 600°C y 60 psi respectivamente, y el gas cortina se ajusto a 35 psi. Para el procesamiento cualitativo y cuantitativo de las muestras, se utilizó el software SciexOS V. 1.3.

➤ *Validación del método*

El método analítico fue validado de acuerdo a los parámetros discutidos en ²³¹⁻²³² y también se tomaron como referencias métodos publicados en revistas científicas donde validan fármacos en peces ¹⁴², en matrices sólidas ¹⁵⁹, en vegetales ²³³, documentos de la comisión europea para el aseguramiento de la calidad en salud y alimentación ¹⁸¹, y del Consejo Internacional de Armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano ²³⁴:

- El método fue validado a 3 niveles de concentración: 25, 200 y 500 ng/g dw pez.
- La curva de calibración se preparó por medio del método de internal standard, enriqueciendo los extractos de músculos de peces con la cantidad adecuada de la mezcla de analitos en un rango de 0,5 a 500 ng/mL y ILIS a 20 ng/mL en cada punto de la curva.
- La recuperación absoluta refleja las pérdidas de analito durante la preparación de la muestra y fue calculada por comparación de las áreas de los picos cromatográficos de los extractos de los músculos de peces enriquecidos antes y después del proceso de extracción y purificación.
- La eficiencia de extracción se calculó comparando las áreas de los picos cromatográficos de los extractos de los músculos de peces enriquecidos antes del proceso de extracción y purificación y las áreas de los picos cromatográficos de las soluciones control en disolvente de reconstitución de las muestras.
- El efecto matriz refleja la supresión o mejora del analito mediante la matriz de coelución, y fue evaluado comparando las áreas de los picos cromatográficos de los extractos de los músculos de peces enriquecidos después del proceso de extracción y purificación y las áreas de los picos cromatográficos de las soluciones control en disolvente de reconstitución de las muestras

- La repetibilidad, fue evaluada como la desviación relativa estándar (RSD) de las recuperaciones absolutas analizadas por triplicado durante el mismo día y durante varios días en la semana.
- La sensibilidad del método fue evaluada por medio del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). El LOD y LOQ fue calculado como el promedio de tres y diez veces, respectivamente, la concentración de cada punto de la curva de calibración dividido por la relación señal/ruido (S/N) obtenido con el software de procesamiento de datos.

Una vez validado el método se aplicó a 16 peces de las especies *Squalius keadicus*, *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta marmoratus*, *Cottus gobio*, *Leuciscus cephalus* y *Thymallus thymallus* del río Evrotas (Grecia) y del río Adige (Italia). Durante el análisis se inyectaron controles de calidad, preparados extractos de la matriz de salmón enriquecido con los analitos a 50 ng/mL, el cual fue inyectado cada 5 muestras durante el análisis. Adicionalmente se inyectaron blancos de muestras que consistían en peces del estudio de validación enriquecido con ILIS después de confirmar la ausencia de los analitos objetivos del estudio en la matriz. De igual manera, MeOH se inyectó después de cada muestra de control de calidad con el objetivo de confirmar la ausencia de efecto memoria y arrastre de compuestos retenidos.

3.4.2 Análisis de fármacos en músculo de pez fresco, método 2

➤ *Extracción con ultrasonido y purificación Zsep-C18*

Para los estudios de recuperación, el músculo de los peces frescos se enriqueció con la mezcla de fármacos de la solución de trabajo en tres niveles de concentración 5, 25 y 50 ng/g de pez (*Tabla 6*). Quinientos mg de músculo de pescado fresco fueron pesados en un tubo Eppendorf de 2 mL que contenía dos perlas de acero inoxidable (4 mm Ø) y luego fueron homogeneizados con el TissueLyzer durante 90 s a 50Hz. Las muestras fueron agitadas en vortex y se dejaron reposar durante 15 min.

A continuación, se añadieron 1000 µl de disolvente de extracción (MeCN /iPrOH (3:1) + 0,1 %HCOOH) seguido de agitación en vortex por 1 min. Las muestras se colocaron en un baño de ultrasonido durante 10 min y luego se centrifugaron durante 12 min a 14000 rpm (-2°C). Para reducir la cantidad de componentes coextraídos y el efecto matriz, se incluyó un paso de purificación de la muestra utilizando Z-Sep+ dSPE. Para ello se transfirieron 750 µL de la muestra a un vial de 2 mL que contenía 50 mg de Discovery® DSC-18 y 20 mg de Z-Sep.

Tabla 6. Compuestos validados en el Método 2.

Compuesto	Fórmula Molecular	Masa ión molecular [M+H] ⁺	Masa ión fragmento [M+H] ⁺	ILIS
Acetaminofén	C ₈ H ₉ NO ₂	152,0706	110,0598	Acetaminofén-d4
Acridona	C ₁₃ H ₉ NO	196,0757	167,0734	Carbamazepina-d10
Atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	267,1703	145,0638	Codeína-d3
Bezafibrato	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄	362,1153	138,9944	Bezafibrato-d4
Bromazepam	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O	316,0080	182,0836	Carbamazepina-d10
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	195,0877	138,0655	Trimetoprima-d3
Carazolol	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂	299,1754	116,1078	Venlafaxina-d6
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	237,1022	194,0949	Carbamazepina-d10
Clopromazina	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ S	319,1030	86,0962	Lorazepam-d4
Claritromicina	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	748,4841	158,1174	Diazepam-d5
Codeína	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300,1594	215,1067	Codeína-d3
Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	285,0789	154,0413	Diazepam-d5
Diltiazem	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	415,1686	178,0305	Carbamazepina-d10
Erythromicina	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	734,4685	158,1176	Lorazepam-d4
Fenofibrato	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄	361,1201	138,9945	Fenofibrato-d6
Flumequina	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	262,0874	244,0775	Carbamazepina-d10
Fluoxetina†	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	310,1413	148,1118	Diazepam-d5
Furazolidona	C ₈ H ₇ N ₃ O ₅	226,0459	122,0106	Sulfametazina-d4
Ketamina	C ₁₃ H ₁₆ ClNO	238,0993	125,0149	Sulfametazina-d4
Ketoprofeno	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	255,1015	105,0328	Diazepam-d5
Lamotrigina	C ₉ H ₇ Cl ₂ N ₅	256,0152	210,9820	Lamotrigina- ¹³ C3
Loratadina	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₂	383,1521	337,1115	Bezafibrato-d4
Lorazepam	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	321,0183	275,0144	Lorazepam-d4
Ácido mefenámico	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	242,1176	224,1074	Bezafibrato-d4
Mefedrona	C ₁₁ H ₁₅ NO	178,1227	145,0887	Trimetoprima-d3
Metadona	C ₂₁ H ₂₇ NO	310,2166	105,0328	Lorazepam-d4
Metoprolol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	268,1907	133,0657	Metoprolol-d7
Midazolam	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	326,0855	291,1152	Carbamazepina-d10
Ácido nalidixico	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	233,0921	187,0504	Venlafaxina-d6
Oxazepam	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	287,0582	241,0528	Carbamazepina-d10
Oxcarbazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	253,0972	180,0810	Carbamazepina-d10
Propifenazona	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O	231,1492	189,1024	Carbamazepina-d10
Salbutamol	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	240,1594	148,0752	Codeína-d3
Sertralina	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	306,0810	158,9765	Diazepam-d5
Sotalol †	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	273,1267	133,0766	Codeína-d3
Sulfadimetoxina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311,0809	108,0443	Venlafaxina-d6
Sulfametazina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279,0910	92,0500	Sulfametazina-d4
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	254,0594	156,1260	Venlafaxina-d6
Sulfapiridina	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	250,0645	108,0441	Trimetoprima-d3
Temazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	301,0739	255,0679	Diazepam-d5
Trimetoprima	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	291,1451	230,1169	Trimetoprima-d3
Valsartan	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃	436,2343	235,0972	Bezafibrato-d4
Ácido valsartánico	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₂	267,0877	206,0602	Venlafaxina-d6
Venlafaxina	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	278,2114	58,0656	Venlafaxina-d6
Verapamilo	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	455,2904	165,0906	Diazepam-d5
Warfarina	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	309,1121	251,0695	Bezafibrato-d4
Zolpidem	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	308,1758	235,1232	Venlafaxina-d6

†: Compuesto validado siguiendo el ión molecular.

Esta suspensión se sometió a agitación en vortex durante 1 min y se centrifugó durante 6 min a 14000 rpm a baja temperatura (-4°C) para mejorar la separación de la grasa. Finalmente, se recogió una alícuota de 500 µL del sobrenadante, se transfirió a un vial de UPLC y el disolvente se evaporó bajo una corriente suave de nitrógeno. El residuo resultante se reconstituyó en 500 µL de 5 mM NH₄OH/MeCN (9:1) antes de la HPLC-ESI-HRMS.

➤ *Análisis por LC-HR-MS/MS*

La separación cromatográfica de los compuestos se realizó con los equipos descritos en la sección 3.2. Las fases móviles fueron (A) 5 mM NH₄OAc / 0,05 % HCOOH en agua y (B) 0,05 % HCOOH en MeCN. El flujo aplicado fue de 0,8 mL/min. El análisis cromatográfico se completó en 11 minutos. El volumen de inyección fue de 10 µL con la temperatura del automuestreador fijada en 8°C. La elución del gradiente fue la siguiente: 95 % A en 0,0 min, 75 % (5,9 min), 60 % (7,6 min), 2 % (8,9 min), 2 % (9,9 min), 95 % (10 min) y 95 % (11 min). El análisis de espectrometría de masas se llevó a cabo con el QTOF X500R de SCIEX (sección 3.2) en modo de ionización positiva.

Los datos experimentales se adquirieron utilizando el modo de adquisición SWATH y consistieron en un único experimento TOF-MS en un rango de masas de m/z 100 a 1000 con un tiempo de acumulación de 100 ms seguido de diez experimentos MS/MS con un ancho de ventana Q1 constante, cada uno de los cuales con un tiempo de acumulación de 40 ms dando como resultado un tiempo de ciclo total de 0,6 s. Las ventanas SWATH se distribuyeron en todo el rango de masas de la siguiente manera: m/z 100-190, 189-280, 279-370, 369-460, 459-550, 549-640, 639-730, 729-820, 819-910, 909-1000.

El potencial de desagregación se fijó en 80 V, y se aplicó una energía de colisión en modo de rampa de 20 a 50 eV (35±15 eV) en cada ventana de rango de masas. Se utilizó un sistema de transporte calibrado para mantener la precisión de la masa. Cualquier desviación en la precisión de la masa se corrigió automáticamente como se explica en el método 1 (sección 3.4.1).

La calibración se realizó cada cinco muestras durante la adquisición. El voltaje de atomización de la fuente se fijó en 5500 V, la temperatura de la fuente en 550° C, los flujos de gas (GS1 y GS2) en 50 psi, y el gas de cortina en 35 psi. Todos los datos adquiridos se procesaron con SCIEX OS V1.5.

➤ *Análisis de datos SWATH – Compuestos diana*

Para el análisis de compuestos diana, las transiciones de los fragmentos para análisis cualitativos y cuantitativos de iones monitoreados para cada analito fueron importadas de la base de datos de la biblioteca instrumental. Los valores m/z de los iones moleculares del experimento TOF-MS utilizados como iones cualitativos y los m/z de los iones de fragmentos de los experimentos MS/MS utilizados con fines de cuantificación se enumeran en el *Tabla 6*. Se aplicó el algoritmo de búsqueda de confirmación inteligente (*Smart Confirmation Search*) para procesar los datos. Este tipo de algoritmo realiza una primera comparación rápida para saber si algún compuesto de la biblioteca y los espectros adquiridos experimentalmente tienen el mismo nombre.

Si no hay una coincidencia adecuada, una búsqueda de candidatos comparará cualquier compuesto de la biblioteca para encontrar la mejor coincidencia espectral dentro de los criterios definidos. Entre los principales parámetros a considerar, están el escaneo completo de MS y la dependencia de MS/MS de los iones esperados, la determinación exacta de la masa de los iones del producto, la elucidación estructural y las herramientas de fragmentación predecible.

Después de procesar los datos, los criterios utilizados para un hallazgo positivo fueron un ancho de pico mínimo de 3 puntos, un umbral de exactitud de masa de ± 5 ppm en los picos monoisotópicos, la presencia de un buen patrón isotópico (Intensidad ≥ 1000 cps), una exactitud de masa del fragmento < 10 ppm, y una diferencia en el tiempo de retención inferior a 0,2 min en comparación con la curva de calibración. La identificación de la estructura más probable por la coincidencia del espectro de la biblioteca (*Formula Finder Score* > 50 %) se verificó utilizando la base de datos química online gratuita ChemSpider conectada con el software analítico SCIEX O.S. Esta puntuación se obtiene a partir del resultado del algoritmo de análisis y del perfil isotópico de la adquisición experimental de TOF-MS. En el caso de este método, la puntuación del buscador de fórmulas debe ser superior al 50 % para considerar un compuesto objetivo de forma positiva. Además, se consideraron dos parámetros adicionales para una mejor confianza de identificación. El valor de ajuste (*fit value*) y el valor de ajuste inverso (*reverse fit value*), ambos correlacionados entre sí y con los espectros MS/MS de la biblioteca instrumental y los espectros MS/MS adquiridos experimentalmente.

El valor de ajuste indica que todos los picos del espectro de la biblioteca coinciden con el espectro desconocido. Por otro lado, el ajuste inverso considera solamente los picos presentes en el espectro desconocido e implica que todos los picos del espectro desconocido

se encontraron en el espectro de la biblioteca. También en este caso, para un hallazgo positivo, el ajuste debe ser mayor del 50 % mientras que los valores de ajuste inverso deben presentar una puntuación cercana a 100.

➤ *Análisis de datos SWATH – Compuestos sospechosos*

Con el fin de ampliar el alcance más allá del análisis de compuestos dianas, los datos adquiridos también se analizaron retrospectivamente para detectar la presencia de compuestos adicionales mediante un enfoque de detección de sospechosos. Se recopiló una lista completa que contenía más de 500 de los compuestos más consumidos, detectados y/o prescritos, incluyendo fármacos, metabolitos, drogas de abuso y productos de transformación, mediante la revisión de la literatura ^{3, 75, 235-238}. La lista completa de compuestos propuestos para análisis de sospechosos se presenta en la *Tabla 7*. Como se puede observar, ésta tabla, presenta los valores de masa exacta de los precursores y de los fragmentos de los analitos propuestos para la búsqueda de compuestos por análisis de sospechosos. En los casos en los cuales no se presenta la masa exacta del fragmento, es debido a que no se encuentra presente en la base de datos instrumental, por lo que no se pudo importar la información relacionada con el espectro de masas de los fragmentos, y por lo tanto, se realiza su análisis por la adquisición del TOF-MS.

Tabla 7. Lista de fármacos, metabolitos, drogas de abuso y productos de transformación propuestos para análisis de sospechosos.

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
1-(2,6-Dichlorophenyl)-2-indolinone	C ₁₄ H ₉ Cl ₂ NO	278,0134	
1,2,3-Benzotriazole	C ₆ H ₅ N ₃	120,0556	65,0387
10,11-Dihydro-10-hydroxyCarbamazepina	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	255,1128	194,0965
10,11-Dihydroxy-Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃	271,1077	
10-BromoCarbamazepina	C ₁₅ H ₁₁ BrN ₂ O	315,0128	
10-MethoxyCarbamazepina	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	267,1128	
11-Keto Oxcarbazepine	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	267,0764	
17-beta-Carboxy-17-alpha-formyloxidexamethasone	C ₂₂ H ₂₇ FO ₆	407,1864	
17-Oxodexamethasone	C ₂₀ H ₂₅ FO ₃	333,1860	
1'-Hydroxymidazolam-beta-D-glucuronide	C ₂₄ H ₂₁ ClFN ₃ O ₇	518,1125	
2,3-DihydroxyCarbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₃	269,0921	
2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidine	C ₄ H ₆ N ₄ O	127,0614	68,0136
2-Hydroxyibuprofen	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	223,1324	
3-(Hydroxy-carboxymethyl)hydratopic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	225,0757	
3-(Keto-carboxymethyl)hydratopic acid	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	223,0601	
3,4,5-Trimethoxycinnamic acid	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	239,0914	221,0806
3',4',5'-Trimethoxycocaine	C ₂₀ H ₂₇ NO ₇	394,1860	
3',4',5'-Trimethoxytropacocaine	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	336,1805	

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
3-Cysteinylnacetaminofén	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	271,0747	
3-desmethyl-TMP	C ₁₃ H ₁₆ N ₄ O ₃	277,1295	
3-Hydroxyacetaminofén	C ₈ H ₉ NO ₃	168,0655	
3-Hydroxybromazepam	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O ₂	332,0029	286,9817
4-(Acetyloxy)omeprazole	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	374,1169	
4,6-Dimethyl-2-Hydroxypyrimidine	C ₆ H ₈ N ₂ O	125,0709	82,0677
4-Desmethoxy-4-chloromeprazole	C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ O ₂ S	350,0725	
4-Desmethoxy-4-nitromeprazole sulfone	C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₅ S	377,0914	
4-Ethylamphetamine	C ₁₁ H ₁₇ N	164,1434	91,0551
4-Fluoroamphetamine	C ₉ H ₁₂ FN	154,1027	109,0453
4-Fluoromethamphetamine	C ₁₀ H ₁₄ FN	168,1183	109,0447
4-Fluorotropacocaine	C ₁₅ H ₁₈ FNO ₂	264,1394	124,1118
4'-Hydroxydiclofenac	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃	312,0189	
4-Hydroxyomeprazole sulfide	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₂ S	316,1114	
4-Hydroxyvalsartan	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₄	452,2292	
4-MTA	C ₁₀ H ₁₅ NS	182,0998	117,0698
4-nitro-sulfamethoxazole	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₅ S	284,0336	
5-(2,4,5-Trimethoxy)-2,4-pyrimidinediamnine	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₄	305,1244	
5-Aminosalicilic_acid	C ₇ H ₇ NO ₃	154,0499	136,0387
5-desamino-5 oxo-2,5 dihydro lamotrigina	C ₉ H ₆ Cl ₂ N ₄ O	256,9991	
5-Hydroxydiclofenac	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃	312,0189	
5'-Hydroxyomeprazole	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	362,1169	
5-O-Desmethylomeprazole	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	332,1063	
5-O-Desmethylomeprazole sulfide	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₂ S	316,1114	
6-beta-Hydroxydexamethasone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₆	409,2021	
6-Monoacetylmorphine	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	328,1543	211,0756
6-Monocetylcodeine	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	342,1700	225,0918
7-Aminoflunitrazepam	C ₁₆ H ₁₄ FN ₃ O	284,1194	135,0916
9-carboxylic acid-acridine	C ₁₄ H ₉ NO ₂	224,0706	
9-Hydroxyrisperidone	C ₂₃ H ₂₇ FN ₄ O ₃	427,214	207,1121
Acetaminofén sulfate	C ₈ H ₉ NO ₅ S	232,0274	
Acetamiprid	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	223,0745	126,0092
Aciclovir	C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃	226,0935	152,0565
Acridine	C ₁₃ H ₉ N	180,0808	
α-Hydroxymetoprolol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄	284,1856	
α-hydroxymidazolam	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃ O	342,0804	324,0705
Alprazolam	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	309,0902	281,0698
Amantadine	C ₁₀ H ₁₇ N	152,1434	135,1168
Amicarbazone	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O ₂	242,1612	143,0921
Amiodarone	C ₂₅ H ₂₉ I ₂ NO ₃	646,031	100,1116
Amisulpride	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₄ S	370,1795	242,0477
Amitriptyline	C ₂₀ H ₂₃ N	278,1903	91,0545
Amlodipine	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₅	409,1525	238,0626
Amoxicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	366,1118	114,0018
Amphetamine	C ₉ H ₁₃ N	136,1121	91,0542
Ampicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	350,1169	106,0662
Aripiprazole	C ₂₃ H ₂₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	448,1553	285,0899
Aspirin	C ₉ H ₈ O ₄	181,0495	137,0245
Atenolol acid	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄	268,1543	

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
Atenolol-TP-117	C ₆ H ₁₅ NO	118,1226	
Atenolol-TP-167	C ₉ H ₁₃ NO ₂	168,1019	
Atomoxetine	C ₁₇ H ₂₁ NO	256,1696	117,0715
Atorvastatin	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	559,2603	440,2232
Azaperol	C ₁₉ H ₂₄ FN ₃ O	330,1976	121,0770
Azithromycin	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	749,5158	591,2718
Azithromycin-TP	C ₃₈ H ₇₃ N ₂ O ₁₅ P	829,4821	
Baclofen	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂	214,0629	77,0389
Benzoylecgonine	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	290,1387	168,1008
Benzoylmetronidazole	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₄	276,0979	
Betaine	C ₅ H ₁₂ NO ₂	119,0941	58,0650
Betamethasone-17-benzoate	C ₂₉ H ₃₃ FO ₆	497,2334	279,1739
Betamethasone-17-valerate	C ₂₇ H ₃₇ FO ₆	477,2647	279,1741
Betamethasone-21-phosphate	C ₂₂ H ₃₀ FO ₈ P	473,1735	319,1697
Bicalutamide	C ₁₈ H ₁₄ F ₄ N ₂ O ₄ S	431,0683	226,9513
Bis(trimethylsilyl) lorazepam	C ₂₁ H ₂₆ Cl ₂ N ₂ O ₂ Si ₂	465,0983	
Bis(trimethylsilyl) oxazepam	C ₂₁ H ₂₇ ClN ₂ O ₂ Si ₂	431,1372	
Bisoprolol	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	312,2322	98,0965
Brexiprazole	C ₂₅ H ₂₇ N ₃ O ₂ S	434,1897	
Bromazepam	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O	316,0080	182,0836
Bumetanide	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	326,2326	116,1068
Buprenorphine-glucuronide	C ₃₅ H ₄₉ NO ₁₀	644,3429	468,3097
Bupropion	C ₁₃ H ₁₈ ClNO	365,1166	240,138
Buspirone	C ₂₁ H ₃₁ N ₅ O ₂	240,115	131,0721
Carbamazepina benzoquinone	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₃	345,1234	
Carbamazepina glucuronide	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₇	413,1343	
Carbamazepina nicotinamide	C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	359,1503	
Carbamazepina_epoxide	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	386,2551	122,071
Carbamazepina-10,11-dibromo-	C ₁₅ H ₁₂ Br ₂ N ₂ O	394,9389	
Carbamazepina-10,11-epoxide	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	253,0972	180,0808
Carbamazepina-o-quinone	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	267,0764	
Carbendazim	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	192,0768	160,0496
Carboxybuprofen	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	237,1121	
cariprazine	C ₂₁ H ₃₂ Cl ₂ N ₄ O	427,2026	
Cathine	C ₉ H ₁₃ NO	152,107	115,0547
Celecoxib	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	382,0832	121,0647
Cephalexin	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	348,1013	140,0164
Cetirizine	C ₂₁ H ₂₅ ClN ₂ O ₃	389,1627	201,0467
Chloramphenicol	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	323,0196	152,0357
Chlordiazepoxide	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O	300,0898	227,0499
Chlortetracyclin	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	479,1216	462,095
Cimetidine	C ₁₀ H ₁₆ N ₆ S	253,123	95,0598
Ciprofloxacin	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	332,1405	314,1297
Ciprofloxacin Piperazinyl-N4-sulfate	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₆ S	412,0973	
cis-10,11-Dihydroxy-10,11-dihydroCarbamazepina	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃	271,1077	
Citalopram	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	325,1711	109,0453
Citalopram-TP-329	C ₁₉ H ₂₁ FN ₂ O ₂	329,1660	
Citalopram-TP-330	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	330,1500	
Citalopram-TP-339A	C ₂₀ H ₁₉ FN ₂ O ₂	339,1503	
Citalopram-TP-339B	C ₂₁ H ₂₃ FN ₂ O	339,1867	
Citalopram-TP-341	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O ₂	341,1660	

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
Citalopram-TP-343	C ₂₀ H ₂₃ FN ₂ O ₂	343,1816	
Citalopram-TP-344	C ₂₀ H ₂₂ FNO ₃	344,1656	
Citalopram-TP-355	C ₂₀ H ₁₉ FN ₂ O ₃	355,1452	
Citalopram-TP-357	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O ₃	357,1609	
Citalopram-TP-359A	C ₂₀ H ₂₃ FN ₂ O ₃	359,1765	
Citalopram-TP-360A	C ₂₀ H ₂₂ FNO ₄	360,1606	
Clemastine	C ₂₁ H ₂₆ ClNO	344,1776	215,0624
Climbazol	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₂ O ₂	293,1051	197,0732
Clindamycin	C ₁₈ H ₃₃ ClN ₂ O ₅ S	425,1872	126,128
Clobazam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	301,0738	259,063
Clofibric acid	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	215,0469	
Clofibric acid acyl-beta-D-glucuronide	C ₁₆ H ₁₉ ClO ₉	391,0790	
Clomipramine	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂	315,1623	86,0959
Clonazepam	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	316,0484	270,0562
Clonidine	C ₉ H ₉ Cl ₂ N ₃	230,0246	212,9972
Clopamide	C ₁₄ H ₂₀ ClN ₃ O ₃ S	346,0987	250,0048
Clopidogrel	C ₁₆ H ₁₆ ClNO ₂ S	322,0663	184,0527
Clotrimazole1	C ₂₂ H ₁₇ ClN ₂	345,1153	277,0774
Cloxiquine	C ₉ H ₆ ClNO	180,0211	145,0514
Clozapine	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄	327,1371	270,0794
Cocaethylene	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄	318,1700	196,1331
Cocaine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	304,1543	182,1153
Codeine glucuronide	C ₂₄ H ₂₉ NO ₉	476,1915	300,1564
codeine phosphate	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300,1594	215,1066
Cortisol	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	363,2166	331,1911
Cortisone	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	361,201	329,1766
Crotamiton	C ₁₃ H ₁₇ NO	204,1383	
Cyclobenzaprine	C ₂₀ H ₂₁ N	276,1747	215,0857
D,L-N,N-Didesmethyl-O-desmethylvenlafaxine	C ₁₄ H ₂₁ NO ₂	236,1645	
Danofloxacin	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	358,1562	340,1445
DCF-BA	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ NO ₂	282,0083	
DEET	C ₁₂ H ₁₇ NO	192,1383	119,0487
Defluoroparoxetine	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	312,1594	
Dehydronorketamine	C ₁₂ H ₁₂ ClNO	222,0680	
Delorazepam	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	305,0243	140,0264
Desacetyldiltiazem	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₃ S	373,1580	
Desaminosulfamethazine	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	264,0801	
Descarboethoxyloratadine	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₂	311,1310	
Desethyleneciprofloxacin	C ₁₅ H ₁₆ FN ₃ O ₃	306,1248	
Desmethyl Sildenafil	C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	461,1966	283,1187
Desmethylcitalopram	C ₁₉ H ₁₉ FN ₂ O	311,1554	109,0443
Desmethylclobazam	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	287,0582	245,0475
Desmethylclomipramine	C ₁₈ H ₂₁ ClN ₂	301,1466	72,0808
Desmethyleneparoxetine	C ₁₈ H ₂₀ FNO ₃	318,1500	
Desmethylfluoxetine	C ₁₆ H ₁₆ F ₃ NO	296,1257	134,0966
Desmethylverapamil	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₄	441,2748	
Dexamethasone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	393,2072	147,0808
Dexamethasone phosphate	C ₂₂ H ₃₀ FO ₈ P	473,1735	
Dexamethasone-3,20-bisethoximes	C ₂₆ H ₃₉ FN ₂ O ₅	479,2916	
Diclofenac	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,024	214,0416
Diclofenac	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,0240	214,0416

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
Diclofenac-S-acyl-glutathione	C ₂₄ H ₂₆ Cl ₂ N ₄ O ₇ S	585,0972	
Diclofenac-TP-225	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	226,0863	
Diclofenac-TP-243	C ₁₀ H ₇ Cl ₂ NO ₂	243,9927	
Diclofenac-TP-259	C ₁₄ H ₁₀ NO ₂ Cl	260,0473	
Diclofenac-TP-273	C ₁₁ H ₉ Cl ₂ NO ₃	274,0032	
Diclofenac-TP-275	C ₁₄ H ₁₀ ClNO ₃	276,0422	
Diclofenac-TP-285	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₃	286,0032	
Diclofenac-TP-287	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃	288,0189	
Diclofenac-TP-293a	C ₁₄ H ₉ Cl ₂ NO ₂	294,0083	
Diclofenac-TP-297	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ NO ₃	298,0032	
Diclofenac-TP-323	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₃	325,0141	
Diclofenac-TP-339	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₄	341,0090	
Diclofenac-TP-343a	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₅	344,0087	
Diclofenac-TP-391a	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₆ S	391,9757	
Dicyclomine	C ₁₉ H ₃₅ NO ₂	310,2741	109,1017
Didesmethylocitalopram	C ₁₈ H ₁₇ FN ₂ O	297,1398	109,0442
Difloxacin	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	400,1467	382,1366
Digoxin	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄	781,4369	649,3654
Dihydrocodeine	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	302,1751	199,0756
Dihydroketoprofen	C ₁₆ H ₁₆ O ₃	257,1172	
Diphenhydramine	C ₁₇ H ₂₁ NO	256,1696	167,084
DL-Ephedrine hydrochloride	C ₁₀ H ₁₅ NO	166,1226	148,1041
Donepezil	C ₂₄ H ₂₉ NO ₃	380,222	91,054
Doxepin	C ₁₉ H ₂₁ NO	280,1696	107,0483
Doxycycline	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445,1605	358,1292
Duloxetine	C ₁₈ H ₁₉ NOS	298,1260	185,1149
EMDP	C ₁₉ H ₂₁ N	264,1747	220,1117
Enalapril	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	377,2071	234,149
Enrofloxacin	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	360,1718	342,1613
Ephedrine	C ₁₀ H ₁₅ NO	166,1226	115,0537
Ephedrine hydrochloride	C ₁₀ H ₁₅ NO	166,1226	148,1117
Epinephrine	C ₉ H ₁₃ NO ₃	184,0968	166,0862
Epoxiconazole	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	330,0804	121,0441
Erythritol	C ₄ H ₁₀ O ₄	123,0652	71,0137
Erythromycin	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	734,4685	158,1176
Erythromycin-TP- 752	C ₃₇ H ₇₀ NO ₁₄	753,4869	
Erythromycin-TP-704	C ₃₆ H ₆₆ NO ₁₂	705,4658	
Erythromycin-TP-718	C ₃₇ H ₆₈ NO ₁₂	719,4814	
Erythromycin-TP-720	C ₃₆ H ₆₆ NO ₁₃	721,4607	
Erythromycin-TP-734	C ₃₇ H ₆₈ NO ₁₃	735,4763	
Erythromycin-TP-748	C ₃₇ H ₆₆ NO ₁₄	749,4556	
Erythromycin-TP-750	C ₃₇ H ₆₈ N O ₁₄	751,4713	
Estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	273,1849	145,066
Ethinylestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	297,1849	69,0363
Famotidine	C ₈ H ₁₅ N ₇ O ₂ S ₃	338,0522	189,0257
Fenbendazole	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	300,0801	268,0545
Fenofibric acid	C ₁₇ H ₁₅ ClO ₄	319,0732	233,0361
Fenoprofen	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	243,1016	
Fentanyl	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	337,2274	188,1426
Fexofenadine	C ₃₂ H ₃₉ NO ₄	502,2952	466,2742
Flecainide	C ₁₇ H ₂₀ F ₆ N ₂ O ₃	415,1451	270,0995
Florfenicol	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ FNO ₄ S	358,0077	185,0274

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
Flucloxacillin	C ₁₉ H ₁₇ ClFN ₃ O ₅ S	454,0634	195,9956
Fluconazole	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O	307,1113	220,0679
Flumethasone	C ₂₂ H ₂₈ F ₂ O ₅	411,1978	253,1215
Flunitrazepam	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	314,0936	268,0991
Flurazepam	C ₂₁ H ₂₃ ClFN ₃ O	388,1586	315,0672
Fluticasone_propionate	C ₂₅ H ₃₁ F ₃ O ₅ S	501,1917	293,1531
Fluvoxamine1	C ₁₅ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₂	319,1628	71,0509
Folic acid	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	442,147	311,0888
Furosemide	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	331,015	81,0194
Gabapentin	C ₉ H ₁₇ NO ₂	172,1332	95,085
Gemfibrozil	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	251,1642	129,0905
Glipizide	C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₄ S	446,1857	321,101
Haloperidol	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	376,1474	165,0697
Hydralazine	C ₈ H ₈ N ₄	161,0822	89,0385
Hydrochlorothiazide	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	297,9718	268,9463
Hydrocodone	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300,1594	199,0761
Hydromorphone glucuronide	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	462,1759	286,1446
Hydroxy-atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₄	283,1652	
Hydroxybupropion	C ₁₃ H ₁₈ ClNO ₂	256,1099	238,0984
Hydroxy-Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	253,0967	
Hydroxy-CBZ Glucuronide	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₈	429,1292	
Hydroxychloroquine	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O	336,1837	247,0985
Hydroxymethyloratadine	C ₂₃ H ₂₅ ClN ₂ O ₃	413,1626	
Hydroxymetronidazole	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄	188,0666	126,0305
Hydroxywarfarin	C ₁₉ H ₁₆ O ₅	325,1071	
Hydroxyzine	C ₂₁ H ₂₇ ClN ₂ O ₂	375,1834	201,0467
Ibuprofen	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	207,1380	161,1328
Ibuprofen-beta-D-glucuronide	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	383,1700	
Imipramine	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	281,2012	86,0959
Indapamide	C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S	366,0674	132,0807
Indomethacin	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	358,0841	138,9939
Indomethacin heptyl ester	C ₂₆ H ₃₀ ClNO ₄	456,1936	
Indomethacin morpholinylamide	C ₂₃ H ₂₃ ClN ₂ O ₄	427,1419	
Iopamidol	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈	777,8614	558,8848
Iopromide	C ₁₈ H ₂₄ I ₃ N ₃ O ₈	791,877	59,06
Iopromide	C ₁₈ H ₂₄ I ₃ N ₃ O ₈	791,8770	59,0600
Iopromide-TP-451	C ₁₄ H ₁₉ O ₆ N ₃ I	453,0391	
Iopromide-TP-465	C ₁₅ H ₂₁ O ₆ N ₃ I	467,0548	
Iopromide-TP-525A	C ₁₇ H ₂₅ O ₈ N ₃ I	527,0759	
Iopromide-TP-577	C ₁₄ H ₁₈ O ₆ N ₃ I ₂	578,9358	
Iopromide-TP-643	C ₁₂ H ₁₂ I ₃ N ₃ O ₄	643,8035	
Iopromide-TP-651	C ₁₇ H ₂₄ O ₈ N ₃ I ₂	652,9726	
Iopromide-TP-665	C ₁₈ H ₂₆ O ₈ N ₃ I ₂	666,9882	
Iopromide-TP-681	C ₁₈ H ₂₆ O ₉ N ₃ I ₂	682,9831	
Iopromide-TP-701	C ₁₄ H ₁₄ I ₃ N ₃ O ₆	701,8090	
Iopromide-TP-729A	C ₁₅ H ₁₄ I ₃ N ₃ O ₇	729,8039	
Iopromide-TP-731B	C ₁₅ H ₁₆ I ₃ N ₃ O ₇	731,8195	
Iopromide-TP-759	C ₁₆ H ₁₆ I ₃ N ₃ O ₈	759,8144	
Iopromide-TP-819	C ₁₈ H ₂₀ I ₃ N ₃ O ₁₀	819,8356	
Irbesartan	C ₂₅ H ₂₈ N ₆ O	429,2397	207,0921
Isopropylcocaine	C ₁₉ H ₂₅ NO ₄	332,1856	
Isoproturon	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	207,1492	72,0443

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
Itraconazole	C ₃₅ H ₃₈ Cl ₂ N ₈ O ₄	705,2466	392,208
Ketoconazole	C ₂₆ H ₂₈ Cl ₂ N ₄ O ₄	531,156	489,145
Ketoprofen-beta-D-glucuronide	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431,1337	
Lacosamide	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃	251,139	91,0558
Lamotrigine-N2-glucuronide	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₂ N ₅ O ₆	433,0550	
Lansoprazole	C ₁₆ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	370,0832	164,0055
Levamisole	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S	205,0794	178,0695
Levetiracetam	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂	171,1128	126,0914
Levofloxacin	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	362,1511	275,1078
Levomepromazine	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ OS	329,1682	100,1121
Lidocaine	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	235,1805	86,0965
Lincomycin	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	407,221	126,1268
Lisdexamphetamine	C ₁₅ H ₂₅ N ₃ O	264,207	84,0806
Loperamide	C ₂₉ H ₃₃ ClN ₂ O ₂	477,2303	266,1544
Lorazepam	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	321,0192	275,0144
Lorazepam glucuronide	C ₂₁ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₈	497,0513	321,0175
Lormetazepam	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₂	335,0349	289,0286
Losartan	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O	423,1695	207,0916
Lovastatin	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	405,2636	199,148
LSD	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	324,207	223,1227
lumateperone	C ₂₄ H ₂₈ FN ₃ O	394,2289	
Lurasidone	C ₂₈ H ₃₆ N ₄ O ₂ S	493,2632	166,0853
Maprotiline	C ₂₀ H ₂₃ N	278,1903	117,0691
Marbofloxacin	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	363,1463	345,136
MDEA	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	208,1332	105,0706
Mebendazol	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	296,103	264,0778
Mebeverine	C ₂₅ H ₃₅ NO ₅	430,2588	149,096
Meclizine	C ₂₅ H ₂₇ ClN ₂	391,1936	201,0484
Meloxicam	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂	352,042	115,0335
Memantine	C ₁₂ H ₂₁ N	180,1747	163,1483
Meprobamate	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₄	219,1339	55,0542
Metamitron	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O	203,0927	104,0489
Metazachlor	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O	278,1055	134,096
Methamphetamine	C ₁₀ H ₁₅ N	150,1277	91,0539
Methocarbamol	C ₁₁ H ₁₅ NO ₅	242,1023	118,05
Methyl Prednisolone	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	375,2166	161,0964
Methylcodeine	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	314,1751	
Methylphenidate	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	234,1489	84,0808
Metolachlor	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	284,1412	252,1143
Metoprolol acid	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄	268,1543	
Metronidazol	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	172,0717	128,0462
m-Hydroxycocaine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₅	320,1492	
Mianserin	C ₁₈ H ₂₀ N ₂	265,1699	208,1124
Miconazole	C ₁₈ H ₁₄ Cl ₄ N ₂ O	414,9933	158,976
Mirtazapine	C ₁₇ H ₁₉ N ₃	266,1652	195,0915
Monensin	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₁	671,4365	461,288
Morphine	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286,1438	201,091
Morphine-3-glucuronide	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	462,1759	286,1435
N-(2-Phenylethyl)indomethacinamide	C ₂₇ H ₂₅ ClN ₂ O ₃	461,1626	
N-(3-Pyridyl)indomethacinamide	C ₂₄ H ₂₀ ClN ₃ O ₃	434,1266	
N-(4-Acetamidophenyl)indomethacinamide	C ₂₇ H ₂₄ ClN ₃ O ₄	490,1523	

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
N,O-Didesmethylvenlafaxine	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	250,1802	
N4-Acetylsulfamethazine	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₃ S	321,1016	
N-Acetylsulfadiazine	C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	293,0703	
N-Acetylsulfamerazine	C ₁₃ H ₁₄ N ₄ O ₃ S	307,0859	
N-Acetylsulfamethoxazole	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	296,0700	
N-Acetylsulfapyridine	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	292,0750	
Nadolol	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	310,2013	
Ácido nalidíxico	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	233,0921	187,0504
Naproxen	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	231,1016	169,066
N-Desmethyl-cis-tramadol	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	250,1802	58,0682
N-Desmethyldiltiazem	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄ S	401,1530	
N-desmethyilmirtazapine	C ₁₆ H ₁₇ N ₃	252,1495	195,0920
N-Desmethylpropafenone	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300,1594	74,0601
N-Desmethyltramadol	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	250,1802	91,0551
N-Desmethylvenlafaxine	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	264,1958	
N-Ethylordiazepam	C ₁₇ H ₁₅ ClN ₂ O	299,0946	
N-formyl ciprofloxacin	C ₁₈ H ₁₈ FN ₃ O ₄	360,1354	
Nicotine	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	163,123	130,0644
Nifedipine	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	347,1238	122,0252
Nitrazepam	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	282,0873	236,0947
N-Methylparoxetine	C ₂₀ H ₂₂ FNO ₃	344,1656	
Norbuprenorphine	C ₂₅ H ₃₅ NO ₄	414,2639	396,2525
Norbuprenorphine glucuronide	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	590,2960	414,2628
Norcocaine	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	290,1387	136,0759
Norcodeine	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286,1438	268,1328
Nordiazepam	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	271,0633	140,0256
Norephedrine	C ₉ H ₁₃ NO	152,107	115,0542
Norfentanyl	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	233,1648	84,0805
Norfloxacin	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	320,1405	302,1298
Norfluoxetine	C ₁₆ H ₁₆ F ₃ NO	296,1257	134,0962
Norflurazon-desmethyl	C ₁₁ H ₇ ClF ₃ N ₃ O	290,0303	270,0240
Norgesterel	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	313,2162	109,0649
Norketamine	C ₁₂ H ₁₄ ClNO	224,0837	125,0149
nor-Mephedrone	C ₁₀ H ₁₃ NO	164,1070	
Norsertaline	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₂ N	292,0654	158,976
Norverapamil	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₄	441,2748	165,0880
N-propylamphetamine	C ₁₂ H ₁₉ N	178,1590	91,0546
O6, N-Diacetylnorcodeine	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370,1649	
O-Desacetyl-N-desmethyldiltiazem	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₃ S	359,1424	
O-Desmethyl-cis-tramadol	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	250,1802	58,0651
O-Desmethyl-naproxen	C ₁₃ H ₁₂ O ₃	217,0859	
O-Desmethylvenlafaxine	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	264,1958	58,0648
Ofloxacin	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	362,1511	318,1613
Olanzapine	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ S	313,1481	256,0893
Omeprazole	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	346,122	194,0160
Omeprazole N-oxide	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	362,1169	
Omeprazole sulfide	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₂ S	330,1271	
Omeprazole sulfone	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	362,1169	
Omeprazole sulfone N-oxide	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	378,1118	
Ondansetron	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O	294,1601	170,0962
Orphenadrine	C ₁₈ H ₂₃ NO	270,1852	181,1017
Oxazepam	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	287,0582	241,0528

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
Oxazepam glucuronide	C ₂₁ H ₁₉ ClN ₂ O ₈	463,0903	
Oxazepam-TP-271	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	271,0633	
Oxcarbazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	253,0972	180,0810
Oxolinic acid	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	262,071	244,0604
Oxybutynin	C ₂₂ H ₃₁ NO ₃	358,2377	142,1232
Oxycodone	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	316,1543	241,1062
Oxymorphone glucuronide	C ₂₃ H ₂₇ NO ₁₀	478,1708	284,1275
Oxytetracycline	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	461,1555	426,1157
Para-Methoxyamphetamine	C ₁₀ H ₁₅ NO	166,1226	115,0546
Paroxetina	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	330,1500	192,1187
p-Fluorococaine	C ₁₇ H ₂₀ FNO ₄	322,1449	
Phenobarbital	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	233,0921	188,0709
Phenoxymethylpenicillin	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	351,1009	229,0635
Phentermine	C ₁₀ H ₁₅ N	150,1277	91,0543
Phenytoin1	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	253,0972	182,0960
Piracetam	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	143,0815	98,0602
Pizotifen	C ₁₉ H ₂₁ NS	296,1468	96,0806
Pramiracetam	C ₁₄ H ₂₇ N ₃ O ₂	270,2176	98,0601
Prazepam	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O	325,1102	271,0633
Praziquantel	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂	313,1911	203,1185
Prednisolone	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	361,201	147,0802
Prednisone	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	359,1853	341,1734
Pregabalin	C ₈ H ₁₇ NO ₂	160,1332	55,0547
Primidone	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	219,1128	91,0553
Progesterone	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	315,2319	97,0647
Promethazine	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S	285,142	86,096
Propiconazole	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	342,0771	158,9743
Propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	260,1645	155,0845
Propifenazona	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O	231,1492	189,1024
Pseudoephedrine	C ₁₀ H ₁₅ NO	166,1226	115,0545
Pseudoephedrine Hydrochloride	C ₁₀ H ₁₅ NO	166,1226	148,1036
Quetiapine	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	384,174	253,0795
Quetiapine metabolite 2O, -2H	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₄ S	414,1482	221,1072
Quetiapine metabolite impurity -46	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ OS	338,1322	210,0361
Quetiapine metabolite impurity -88	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ S	296,1216	210,0352
rac-N,N-Didesmethyl-O-desmethyl-venlafaxine glucuronide	C ₂₀ H ₂₉ NO ₈	412,1966	
Remifentanil	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	377,2071	113,0603
Rifampicin	C ₄₃ H ₅₈ N ₄ O ₁₂	823,4124	791,3843
Risperidone	C ₂₃ H ₂₇ FN ₄ O ₂	411,2191	191,1174
Ronidazole	C ₆ H ₈ N ₄ O ₄	201,0618	140,0457
Ropinirol	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O	261,1961	114,1275
Roxithromycin	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	837,5319	679,4383
Salicylic Acid	C ₇ H ₆ O ₃	139,039	93,0342
Salmeterol	C ₂₅ H ₃₇ NO ₄	416,2795	232,1686
Sarafloxacin	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	386,1311	368,1212
S-Diclofenac	C ₂₃ H ₁₅ Cl ₂ NO ₂ S ₃	503,9715	
Sertraline carbamoyl glucuronide	C ₂₄ H ₂₅ Cl ₂ NO ₈	526,1030	
Sertraline carbamoyl glucuronide methyl ester triacetate	C ₃₁ H ₃₃ Cl ₂ NO ₁₁	666,1503	
Simvastatin	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	419,2792	199,1478
S-Methyl-3-thioacetaminofén	C ₉ H ₁₁ NO ₂ S	198,0583	

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
Spiroclufen	C ₂₁ H ₂₄ Cl ₂ O ₄	411,1124	313,0386
Sucralose	C ₁₂ H ₁₉ Cl ₃ O ₈	397,0218	359,0284
Sulfacetamide	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	215,0485	92,0515
Sulfachloropyridazine	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	285,0208	156,0123
Sulfadiazine	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	251,0597	156,0117
Sulfadoxine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311,0809	156,0119
Sulfaguanidina	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	215,0597	156,0113
Sulfamerazine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	265,0754	92,0517
Sulfamethizole	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	271,0318	156,0123
Sulfamethoxypyridazine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281,0703	156,0126
Sulfamoxole	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	268,075	156,011
Sulfanilamide	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂ S	173,0379	92,0507
Sulfanilic acid	C ₆ H ₇ NO ₃ S	174,0219	
Sulfaquinoxaline	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	301,0754	156,0113
Sulfathiazole	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	256,0209	156,011
Sulindac	C ₂₀ H ₁₇ FO ₃ S	357,0955	233,0761
Sulphasalazine	C ₁₈ H ₁₄ N ₄ O ₅ S	399,0758	381,0648
Sulpiride	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₄ S	342,1482	112,1116
Sumatriptan	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₂ S	296,1427	58,065
Tadalafil	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	390,1448	268,1082
Tebuconazole	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	308,1524	70,0402
Telmisartan	C ₃₃ H ₃₀ N ₄ O ₂	515,2442	497,2324
Temazepam glucuronide	C ₂₂ H ₂₁ ClN ₂ O ₈	477,1059	301,0707
Terazosin	C ₁₉ H ₂₅ N ₅ O ₄	388,1979	290,1613
Terbinafine	C ₂₁ H ₂₅ N	292,206	141,0699
Terbutaline	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	226,1438	152,0704
Terbuthylazine	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	230,1167	67,9802
Testosterone	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	289,2162	97,0646
Tetracycline	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445,1605	410,1223
Tetrazepam	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₂ O	289,1102	253,134
Theophylline	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	181,0720	124,051
Thiamphenicol	C ₁₂ H ₁₅ Cl ₂ NO ₅ S	356,0121	185,0275
Thiopental	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂ S	243,1162	57,9762
Tiagabine	C ₂₀ H ₂₅ NO ₂ S ₂	376,1400	247,0618
Tiamulin	C ₂₈ H ₄₇ NO ₄ S	494,3299	192,1052
Tilmicosin	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	869,5733	696,4662
Timolol	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	317,1642	74,0604
Topiramate	C ₁₂ H ₂₁ NO ₈ S	340,1061	77,9656
Torasemide	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	349,1329	264,0798
Tramadol	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	264,1958	58,0648
trans-3,4,5-Trimethoxycinnamoylcocaine	C ₂₂ H ₂₉ NO ₇	420,2017	
trans-Cinnamoylcocaine	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	330,1700	
Trazodone	C ₁₉ H ₂₂ ClN ₅ O	372,1586	176,0804
Triamcinolone	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆	395,1864	357,1686
Triamterene	C ₁₂ H ₁₁ N ₇	254,1149	210,0786
Triclocarban	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O	314,9853	127,0186
Trimethobenzamide	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₅	389,2071	72,0806
Trimethoprim-TP-306	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₄	307,1401	
Trimethoprim-TP-324	C ₁₄ H ₂₁ N ₄ O ₅	326,1585	
Trimethylsilyl lormetazepam	C ₁₉ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O ₂ Si	407,0744	
Trimethylsilyl temazepam	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ Si	373,1134	

Compuesto	Fórmula Molecular	Precursor (Q1) (Da)	Fragmento (Q3) (Da)
Tripolidine	C ₁₉ H ₂₂ N ₂	279,1856	208,1122
Tropacocaine	C ₁₅ H ₁₉ NO ₂	246,1489	
Tylosin A	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916,5264	174,1123
Valacyclovir	C ₁₃ H ₂₀ N ₆ O ₄	325,1619	152,0564
Valproic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	145,1223	
Valsartan-TP-252	C ₁₄ H ₁₃ N ₅	252,1244	
Valsartan-TP-336	C ₁₉ H ₂₁ N ₅ O	336,1819	
Venlafaxine-N-Oxide	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃	294,2064	
Venlafaxine-TP-V1	C ₁₆ H ₂₆ NO ₂	265,2036	
Venlafaxine-TP-V2	C ₁₇ H ₂₄ NO	259,1931	
Venlafaxine-TP-VB2	C ₁₇ H ₂₈ NO ₃	295,2142	
Venlafaxine-TP-VB3	C ₁₇ H ₂₆ NO ₃	293,1985	
Venlafaxine-TP-VB4	C ₁₇ H ₂₄ NO ₂	275,1880	
Vincristine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	825,4069	733,3686
Vortioxetine	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ S	299,1577	
Xipamide	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₄ S	355,0514	122,0961
Zolpidem 6-carboxylic acid	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃	338,1499	265,0950
Zolpidem-Phenyl-4-carboxylic acid	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃	338,1499	265,0982
Zopiclone	C ₁₇ H ₁₇ ClN ₆ O ₃	389,1123	245,0225

Según Bletso y colaboradores ²³⁹, se pueden utilizar diferentes flujos de trabajo para la identificación provisional de un producto predecible desconocido utilizando una lista de análisis de sospechosos. Para una identificación rápida y precisa, el software de procesamiento se configuró con el algoritmo de búsqueda de confirmación inteligente, con una tolerancia de masa de precursores de +/- 0,4 Da, y una pureza mínima del 2,0 %. Los picos seleccionados fueron confirmados manualmente sólo después de la coincidencia exacta de la masa monoisotópica del ión precursor, la fórmula molecular, y al menos un fragmento individual de HR (Nivel 2a para la identificación de estructuras probables por coincidencia de espectro de biblioteca según lo reportado por ²²⁵).

Los criterios adicionales utilizados para la evaluación manual fueron una intensidad de pico cromatográfico mínima de 1000 cps, una exactitud de masa de fragmento <10 ppm entre los *m/z* teóricos de la biblioteca instrumental y los espectros adquiridos experimentales; una puntuación *Formula Finder Score* >50 %, un valor *fit value* >50 % con un valor de ajuste inverso *reverse fit value* cercano a 100, y en caso de más de una muestra positiva para un compuesto específico, una similitud en RT.

➤ *Protocolo de optimización para la retención de grasa y lípidos con alúmina.*

A 1,0 g de pez fresco en falcón de 15 mL se le adicionan 2 mL de H₂O, 0,1 mL HCOOH y 8 mL de MeOH. Se agitan manualmente y luego en vórtex por 1 min. Se aplica ultrasonido por 15 min y se centrifuga a 4000 rpm, por 12 min a 4°C. Se extraen 6 mL de sobrenadante en

tubo de ensayo y se realiza la adición de alúmina (activada / neutra / ácida), para agitar manualmente y luego en vortex por 1 min. Se centrifuga a 4000 rpm por 6 min a 4°C. Luego se extraen 2,5 mL de sobrenadante y se evaporan a sequedad en tubo de ensayo previamente pesado. Calcular el % de grasa retenida en la alúmina.

➤ *Protocolo de retención de fármacos en filtros.*

Filtrar 0.5 mL de NH₄OAC: MeCN 90:10, enriquecimiento con 25 ng/mL de solución de compuestos de patrones analíticos de fármacos, y filtrar a través de cada uno de los diferentes tipo de filtro (filtros PTFE / filtros incluidos en viales de PVDF / filtros de acetato de celulosa). Determinar la retención o pérdida de los fármacos contra 0,5 mL en NH₄OAC 5mM: MeCN 90:10 que contiene 25 ng/mL de solución de compuestos de patrones analíticos de fármacos sin filtrar.

➤ *Validación del método compuestos diana.*

El método analítico fue validado de acuerdo a los mismos parámetros validados en el método 1. En este caso los tres niveles de concentración se ajustaron a valores más bajos: 5, 25, 50 ng/g de pez. Para fines de cuantificación, la curva de calibración se preparó como estándares de matriz emparejada (*matrix-matched standard*) utilizando el método del estándar interno¹⁶¹.¹⁸¹: se prepararon extractos de peces de un grupo homogéneo de muestras de músculo de *Leuciscus cephalus*, que previamente demostraron no contener cantidades medibles de fármacos, y se les agregó la cantidad apropiada de la mezcla de fármacos en el rango de 0,5 a 100 ng/mL para construir 7 puntos de la curva de calibración por medio de regresión lineal ponderada; los ILIS se agregaron en concentraciones constantes (12,5 ng/mL). En el caso de las muestras desconocidas, para fines de cuantificación, al músculo del pez se añadieron 12,5 ng (125 µL de 100 ng/mL) de la mezcla de ILIS utilizada como sustituto siguiendo el método del patrón interno. Para todos los demás parámetros se siguió el mismo protocolo realizado en el método 1.

3.4.3 Análisis de la distribución de fármacos en el organismo de los peces

Para el análisis de los fármacos en los diferentes tejidos sólidos, se aplicó el método descrito en la sección 3.4.2.

Para todas las muestras, se utilizaron ILIS como patrones de recuperación con fines de cuantificación. De igual manera, se realizaron las curvas de calibración en el disolvente en el cual todas las muestras fueron reconstituidas, con la adición de ILIS para llevar a cabo la

cuantificación. En los casos que se presentaban concentraciones que se salieran de la curva de calibración, se realizaban diluciones apropiadas y se reinyectaba la muestra.

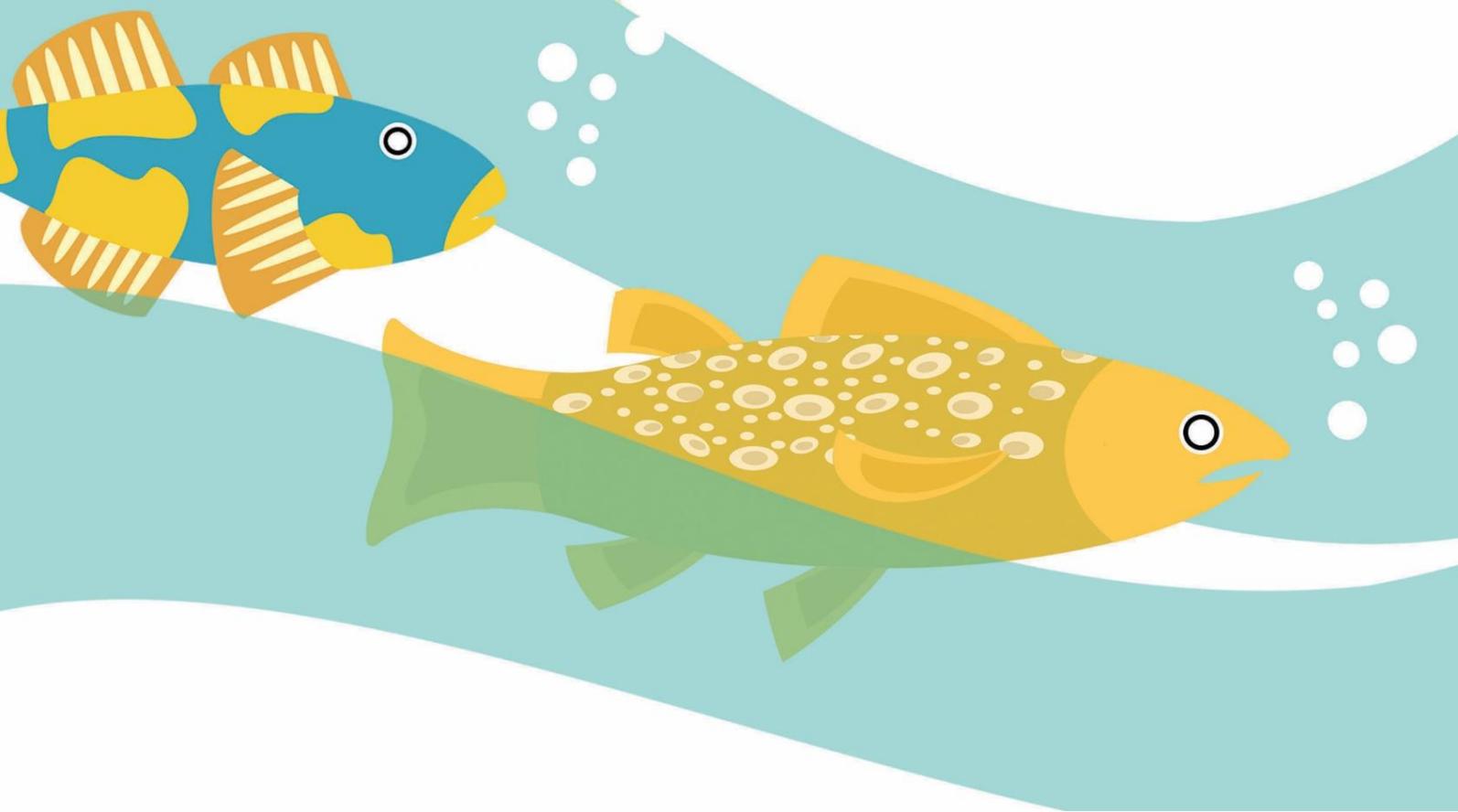
Para la extracción de la bilis se siguió el protocolo basado en previas publicaciones de nuestro grupo de investigación ⁴³ con ligeras variaciones. Se tomaron 50 μL de bilis, se pusieron en contacto con 325 μL de HCl 0,1 N, 112,5 μL de MeCN frío y 12,5 ng de ILIS. Se agitaron en el vortex, y centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a 4°C y se recuperaron 450 μL que fueron tratados en un paso de purificación con Zsep+ como se describe en la sección 3.4.2. Se agitó en vortex nuevamente, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 4°C y se recuperaron 350 μL que se analizaron directamente por HRMS.

Para la extracción de plasma se tomaron 100 μL de muestra y se le adicionaron 400 μL de MeCN frío que contenía 12,5 ng de ILIS. Posteriormente se agitó en vortex, se centrifugó a 8000 rpm por 10 min a 4°C y se recuperaron 450 μL , que se evaporaron casi a sequeda y se reconstituyeron a 500 μL para ser analizadas por HRMS.

Para la extracción de las muestras de agua, primero se midió el pH de las muestras. Posteriormente, se utilizó un método de extracción de fármacos previamente publicado en nuestro grupo de investigación ²⁴⁰. Este tratamiento básicamente consiste en una filtración, posterior extracción en cartucho SPE (HLB), elución con MeOH, evaporación, y reconstitución.

CAPÍTULO 4

Resultados y discusión



En el presente capítulo se discuten los resultados obtenidos de los estudios realizados en esta tesis, y se comparan con diferentes estudios y trabajos reportados en la literatura científica.

Ya se ha discutido ampliamente que los compuestos farmacéuticos entran en el interior de la biota acuática debido al permanente contacto de ésta con los compuestos farmacéuticos del agua. Ya se habló en la introducción general de la tesis, que una de las dificultades del análisis en muestras biológicas es la variabilidad de las especies, que, en el caso específico de los peces, es un número alrededor de 31000 especies conocidas. De igual manera, la determinación de productos farmacéuticos es un campo demasiado amplio por la cantidad de productos farmacéuticos que existen, se prescriben y se consumen a nivel mundial. Dos nuevas dificultades se suman al análisis de compuestos farmacéuticos en peces: la complejidad de las matrices *per se* (cada especie puede variar en tamaño, porcentaje de grasa, hábitos alimenticios, hábitat natural, etc); y la baja concentración a la que se pueden encontrar dichos fármacos en la muestra, a niveles de pg/g o ng/g de pez.

En la presente tesis, se desarrollaron y validaron dos métodos analíticos que van a ser discutidos a continuación de acuerdo a los resultados de la validación y posteriormente van a ser comparados advirtiendo las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. El primer método se basó en un método de extracción con QuEChERS, y se aplica un paso de purificación de tipo dispersivo con EMR lipid removal, mientras que el segundo método validado se basa en una extracción con ultrasonido, y se realiza una purificación de tipo dispersivo con Zsep/C18. Ambos métodos fueron aplicados a peces naturales de diversos ríos europeos. Finalmente se discutirá acerca de la aplicación del segundo método validado, en el análisis de la distribución de fármacos en el organismo de los peces, con muestras de peces del río Llobregat.

4.1 Análisis de fármacos en músculo de pez liofilizado, método 1

4.1.1 Optimización de las condiciones de análisis HPLC-MS/MS

Las fases móviles utilizadas durante la optimización de las condiciones de separación y análisis de los compuestos fueron agua HPLC acidificada a pH 3 y MeCN como fase orgánica. El MeCN también fue seleccionado para la extracción de los compuestos por su selectividad a los compuestos orgánicos y por la baja solubilidad que tienen los lípidos y las grasas en este disolvente ^{175, 241}.

Cuando se hace el análisis de las masas usando adquisición con SWATH, el aislamiento de ventanas del primer cuadrupolo, Q1, están segmentadas a lo largo de todo el rango de masas que se pretende analizar durante el tiempo que dure la separación cromatográfica. Es así como todos los espectros de los iones producto se adquieren y graban en cada una de las ventanas

del Q1, obteniendo un espectro completo MS/MS de cada ión detectable en cada ventana. De esta manera, dichos espectros obtenidos del MS/MS en SWATH pueden ser usados para la confirmación específica de compuestos, normalmente comparando los datos adquiridos en SWATH contra las bibliotecas espectrales de MS/MS preinstaladas en el equipo QTOF de la marca SCIEX. La amplitud de las ventanas de adquisición SWATH, se pueden considerar al equivalente a la adquisición del tipo de monitoreo de reacciones múltiple (*MRM, Multiple Reaction Monitoring*) donde se hace seguimiento a las moléculas de interés y a los iones característicos de cada molécula, con la ventaja de que en este caso no existe la necesidad de optimizar los compuestos individualmente ²⁴²⁻²⁴³.

De acuerdo a los lineamientos para el análisis de pesticidas formulado por la comisión de la unión europea, documento SANTE/11813 del 2017 ²⁴⁴, los requerimientos para la identificación de compuestos en alta resolución, consisten en dos iones con masa exacta (error inferior a 5 ppm), y confirmación del tiempo de retención. El hecho de tener la identificación con masa exacta se considera ya de por sí, un punto de confirmación más. La masa exacta de los iones precursores y fragmentos de los compuestos validados en el método 1 se presentaron en la *Tabla 5*.

4.1.2 Determinación de contenido de agua y grasa

El contenido de agua en la especie *Salmo salar* y *Squalius keadicus* fue 57 % y 77 %, respectivamente. La determinación del contenido de grasa fue evaluada haciendo la extracción con diferentes disolventes o mezcla de ellos, como se presenta en la *Tabla 8*: hexano, acetona/hexano (1:1) y DCM/hexano (1:1) que conllevaron a valores alrededor de 36 % dw en *Salmo salar* (aproximadamente 23 % fw, RSD 3,6–5,8 %). En caso de MeOH/hexano (1:1) y cloroformo/MeOH/agua (5:10:4), la fracción de contenido graso y lipídico fue mayor: 57,7 % y 45,8 % dw respectivamente (correspondiente a 36,8 % y 29,2 % en fw respectivamente). El aparente mayor contenido de grasa y lípidos en los extractos metanólicos se atribuye a la mayor eficiencia de co-extracción de otros componentes de la matriz. A pesar de estas consideraciones, el contenido de grasa reportado para *Salmo salar* es similar al publicado en otros estudios (9,0–23,2 %) ²⁴⁵⁻²⁴⁶. Dado el alto contenido de grasa, se ha considerado el uso de la especie *Salmo salar* para el desarrollo del método analítico y su optimización en la reducción de grasa y lípidos en los extractos.

Tabla 8. Determinación del contenido de grasa en *Salmo salar*

Disolventes	Promedio dw %	Promedio fw %	RSD %
DCM/hexano (1:1)	37,8	24,1	3,6
MeOH/hexano (1:1)	57,7	36,8	15,2
acetona/hexano (1:1)	36,2	23,1	4,0
chloroformo/MeOH/agua (5:10:4)	45,8	29,2	15,8
hexano	35,4	22,6	5,8

4.1.3 Optimización de la extracción de fármacos

Una vez realizadas las extracciones y debido a que los extractos tenían apariencia turbia después de la extracción de ultrasonido y QuEChERS, se consideró la filtración como una estrategia para la remoción de material particulado suspendido. El desempeño de este paso se evaluó filtrando 1 mL de soluciones estándar (100 ng/mL) a través de filtros PTFE. Mientras 19 de los fármacos se recuperaron en el filtrado con porcentajes superiores al 70 % de las concentraciones iniciales, amlodipina, claritromicina, diltiazem, fenofibrato, loratadina, paroxetina, sertralina, y verapamilo presentaron pérdidas superiores al 30 %. Por esta razón, el uso de los filtros fue descartado. El problema del material particulado suspendido se solucionó por medio de la centrifugación de los extractos reconstituidos.

En caso del ultrasonido tres diferentes disolventes se usaron durante la extracción: MeOH, MeCN, y mezcla MeOH:MeCN (1:1, v/v). En el caso de los QuEChERS, se probaron tres diferentes sales: **original**, **buffered**, o **formiato**. La comparación entre los diferentes métodos se evaluó de acuerdo a la eficiencia de extracción explicada en la *validación del método* en el *capítulo 3*. Los resultados de extracción para los dos métodos evaluados se presentan en la *Figura 13*.

Cómo tendencia general, usando QuEChERS (Parte "A" en *Figura 13*) la extracción presentó ligeras diferencias, sobretodo la extracción con formiato de amonio que presentó la variabilidad más alta (RSD) entre los métodos evaluados. Aunque para algunos compuestos, la extracción con formiato presentó mayor eficiencia durante la extracción, su alta variabilidad es un problema que tiene que ser superado. Por otro lado, las extracciones con ultrasonido (Parte "B" en *Figura 13*) fueron muy similares independientemente del disolvente usado, excepto por el bezafibrato, diclofenaco, diltiazem, y ketoprofeno. En el caso del diclofenaco, cada disolvente llevó a un resultado diferente en la eficiencia de extracción. En cada caso, dos de los tres ensayos evaluados tanto para QuEChERS como para ultrasonido, mostraron recuperaciones por encima del 30 %. El número de fármacos recuperados fueron 20 y 21 respectivamente. Sin embargo, algunos compuestos no pudieron ser extraídos por ninguno de los dos métodos evaluados como

son la amlodipina, fenofibrato, loratadina, paroxetina y sertralina. Esto probablemente es por su alto valor de pKa para la mayoría de ellos, o quizás por la alta afinidad a la parte lipídica de la matriz, que hace que se mantengan retenidos.

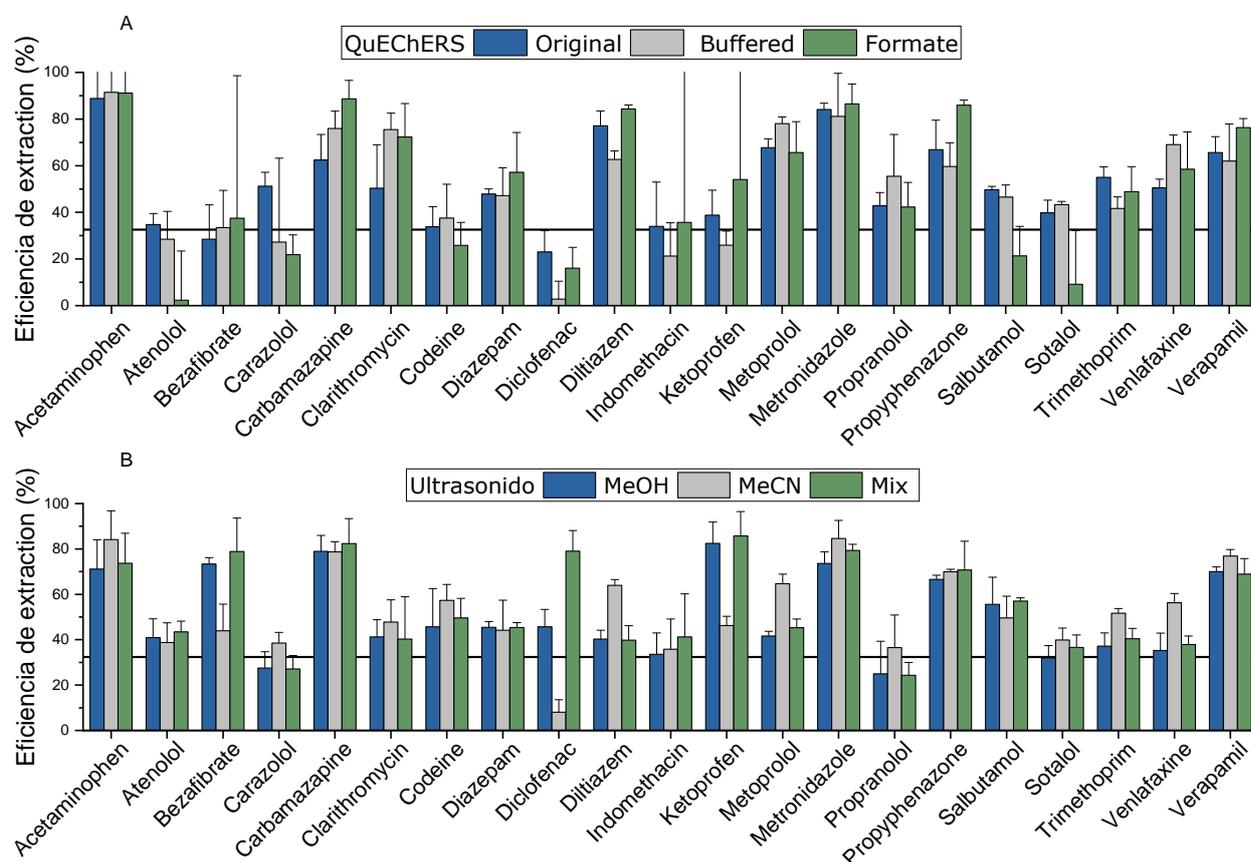


Figura 13. Comparación de la eficiencia de extracción para ultrasonido y QuEChERS. Eficiencia de extracción calculado según sección 3.4.1 Validación del método. Líneas en las barras indican el RSD.

Nueve fármacos presentaron extracción muy similar usando cualquiera de los dos métodos de extracción, QuEChERS y ultrasonido, cuyas diferencias de extracción son $\leq 10\%$, calculadas como el promedio de la técnica de extracción; entre ellos el carazolol, carbamazepina, indometacin, propifenazone, o verapamilo. A pesar de que algunos fármacos fueron extraídos en mayor proporción usando QuEChERS como claritromicina, diltiazem, propranolol o venlafaxina (23, 27, 18, 16 % más, respectivamente) otros fármacos presentaron mejores recuperaciones extraídos con ultrasonido como atenolol, bezafibrato, codeina o salbutamol (19, 32, 18, 15 % más, respectivamente). Variaciones en la eficiencia de extracción están conectadas con las diferencias en la polaridad, solubilidad, disociación octanol-agua y algunas otras propiedades que pueden afectar la adsorción y el proceso de solubilidad de cada familia de fármacos. Algunas de estas propiedades se presentan en la *Tabla 9* y la estructura molecular se presentó en la *Tabla 4*.

El peso de los coextractos extraídos también fue determinado tanto para la extracción con ultrasonido como para QuEChERS. Cuando MeOH fue usado para la extracción de los fármacos de las muestras de peces, se obtuvo mayor cantidad de masa coextraída. En caso de ultrasonido con MeOH, la cantidad de coextractos fue 10,11 mg/mL de extracto comparado con 3,96 mg/mL de extracto usando MeCN. Por otro lado, durante la extracción con QuEChERS usando MeCN como disolvente, el peso de los coextractos fue 5,59; 3,89; y 7,6 mg/mL para el *original*, *buffered*, y *formiato* respectivamente. Una serie de fotos de las extracciones con QuEChERS y de los extractos obtenidos con ultrasonido y con QuEChERS se presentan en la *Figura 14*.

Tabla 9 Propiedades fisicoquímicas de los fármacos objetivos método 1

Fármaco	Fórmula	Peso molecular (Da)	Log K _{ow}	pK _a	Solubilidad en agua (mg/L)
Acetaminofen	C ₈ H ₉ NO ₂	151,2	0,46	9,4	14000
Amlodipina	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₅	408,9	3,00	9,4	75,3
Atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	266,3	0,16	9,6	13300
Bezafibrato	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄	361,8	0,16	3,8	No Soluble
Carazolol	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂	298,4	-	9,5	-
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,7	2,45	13,9	17,7
Cefalexina	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	347,4	-	4,5	10000
Claritromicina	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	747,9	3,16	9,0	0,33
Codeina	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299,4	1,19	8,2	9000
Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,7	2,82	3,4	50
Diclofenac	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	295,0	4,51	4,1	2,37
Diltiazem	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	414,5	2,70	12,8	465
Fenofibrato	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄	360,8	5,19	-4,9	0,25
Indometacina	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,8	0,91	4,5	0,937
Ketoprofen	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254,3	3,00	4,4	51
Loratadina	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₂	382,9	5,20	4,3	0,11
Metoprolol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	267,4	1,88	9,7	16900
Metronidazol	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	171,1	-0,02	2,4	9500
Paroxetina	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	329,4	1,23	9,6	>1000
Propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259,4	3,48	9,4	61,7
Proiyfenazona	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O	230,3	1,73	4,2	2400
Salbutamol	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	239,3	0,64	10,3	14100
Sertralina	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	306,2	5,1	9,8	3,5
Sotalol	C ₁₂ H ₂₁ ClN ₂ O ₃ S	272,4	0,24	9,4	5510
Trimethoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,3	0,91	7,1	400
Venlafaxina	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277,4	3,20	10,1	267
Verapamil	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	454,6	2,15	8,9	4,47

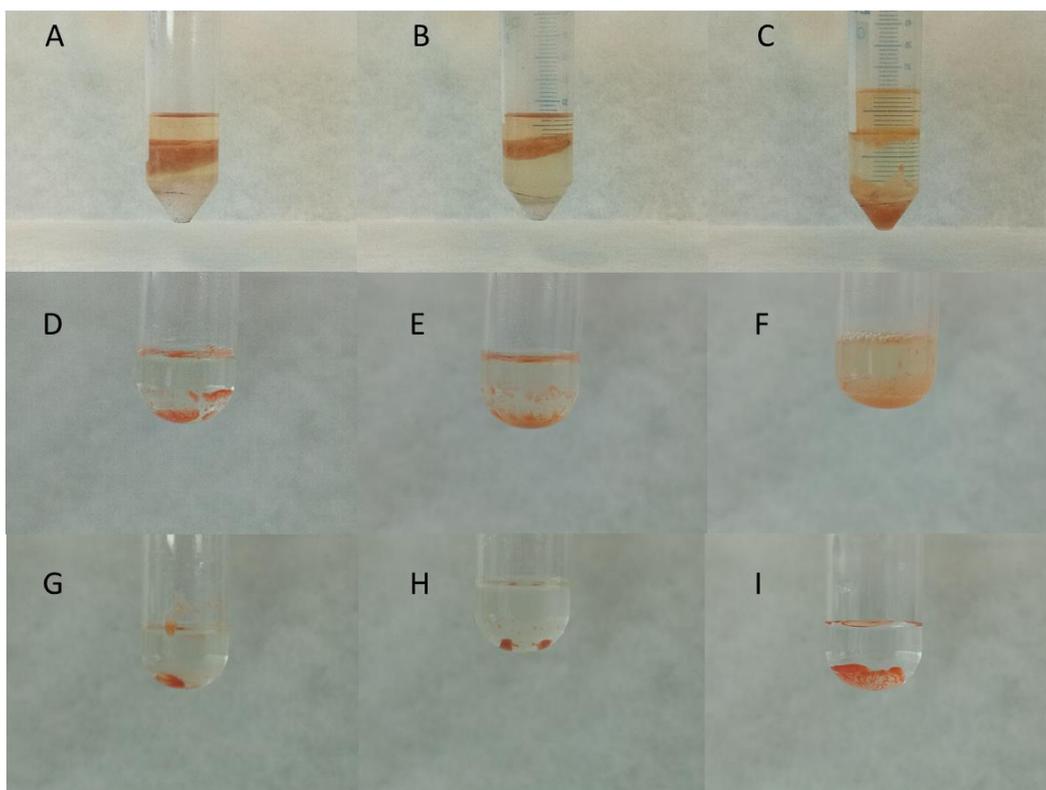


Figura 14. Fotos de los resultados de las extracciones con QuEChERS y coextractos obtenidos con QuEChERS y ultrasonido. A: Extracción QuEChERS Original. B: Extracción QuEChERS buffered. C: Extracción QuEChERS formiato de amonio. D: Extracto ultrasonido con MeCN. E: Extracto ultrasonido con MeCN:MeOH. F: Extracto ultrasonido con MeOH. G: Extracto QuEChERS Original. H: Extracto QuEChERS Buffered. I: Extracto QuEChERS Formiato de amonio.

El criterio inicial para la selección del mejor método de extracción fue la mejor eficiencia de extracción con la más baja variabilidad (RSD <20 %). Como los métodos de extracción fueron similares en eficiencia y RSD (excepto para formiato), se consideraron otros aspectos prácticos como la facilidad y la rapidez, menor cantidad de coextractos y factores de responsabilidad medio ambiental (por ejemplo, menor cantidad de disolvente utilizado). Por estas razones, QuEChERS original fue seleccionado como método de extracción.

4.1.4 Optimización de la purificación del extracto

Tres métodos de purificación fueron evaluados usando SPE y d-SPE: purificación con el kit de QuEChERS, con el cartucho HLB Prime y el adsorbente EMR-Lipid removal. Los análisis en la eficiencia de extracción y purificación de los fármacos, demostraron 3 posibles escenarios: i) la eficiencia de extracción de los fármacos puede ser prácticamente igual con o sin proceso de purificación, como es el caso para atenolol, codeína, o salbutamol cuyas diferencias de extracción y purificación son $\leq 10\%$ para los 3 tipos de purificación determinados; ii) una reducción en la eficiencia de extracción se puede observar para algunos compuestos haciendo uso de alguno de los métodos de purificación, como es el caso para acetaminofén, diltiazem o metronidazol con reducciones en la eficiencia de extracción en un rango entre 4,5-56,2 %

contemplando los 3 tipos de purificación evaluados. La reducción en la eficiencia de extracción con el paso de purificación puede ser explicado por una retención de los compuestos en los adsorbentes y adicionalmente está relacionado con el número de pasos durante el proceso. La inclusión de un paso de purificación, indica más pasos durante la manipulación de la muestra, que conlleva a mayor posibilidad de pérdidas de los analitos durante el análisis ²⁴⁷⁻²⁴⁸. Finalmente, de los resultados del desarrollo de éste método se puede concluir que (iii) el proceso de purificación puede mejorar la señal de los analitos en el extracto, como es el caso para diazepam, diclofenaco, o verapamilo con un incremento de la extracción hasta 25 % comparando los 3 procesos de purificación evaluados y sin purificación. Usando el criterio de mejoramiento de la eficiencia de extracción, reducción en el efecto matriz, y factores prácticos, se ha escogido la purificación con EMR lipid removal para el desarrollo del método. Con éste tipo de purificación, por lo menos siete fármacos presentaron mejores extracciones sin afectar características como el RSD y ninguno de los fármacos seleccionados presentó reducción >10 % en la extracción, como se observa en la *Figura 15* donde se comparan las extracciones con y sin purificación d-SPE-EMR lipid removal.

La selección de este tipo de purificación permite presentar un método completo basado en extracción con QuEChERS y purificación igualmente de tipo dispersivo, de fácil uso y bajo costo, que incluso puede llegar a ser más económico en un futuro próximo como ha sucedido con otros métodos de purificación ¹⁸⁶.

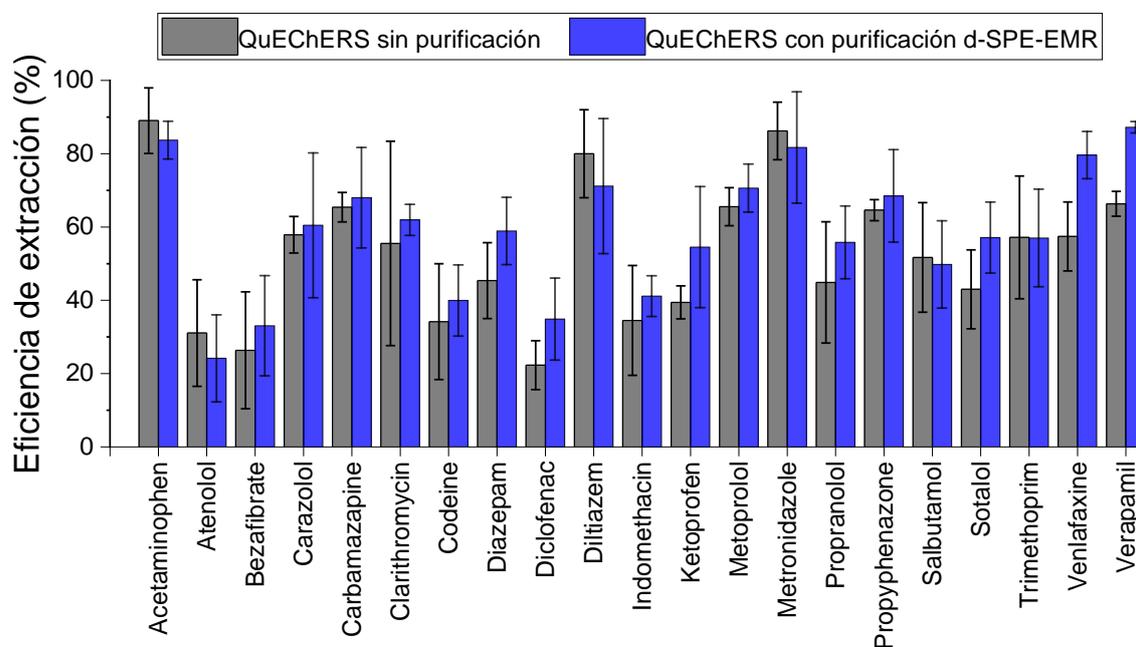


Figura 15. Comparación de la eficiencia de extracción con purificación y sin purificación. Extracto evaluado para QuEChERS original sin purificación del extracto y con purificación usando d-SPE-EMR lipid removal en matriz de Salmo salar. La eficiencia de extracción fue calculada según sección 3.4.1 validación del método. Líneas en las barras indican el RSD.

4.1.5 Validación del método

Después de la selección del mejor método de extracción y purificación, el método analítico fue evaluado con los parámetros descritos anteriormente para dos diferentes matrices: *Salmo salar* y *Leuciscus cephalus*. Cada validación fue preparada por quintuplicado a tres diferentes niveles de concentración. Debido a los bajos recoveries obtenidos durante la selección del método de extracción los fármacos amlodipina, cefalexina, fenofibrato, loratadina, paroxetina, y sertralina fueron excluidos de la validación. Para los estudios de recuperaciones de fármacos, blancos de las dos matrices fueron enriquecidas con la solución de los analitos después de la extracción. No se detectó ningún fármaco en los blancos por encima del LOD.

Los resultados para la validación del método de fármacos en *Salmo salar* y *Leuciscus cephalus* a los 3 niveles de concentración se presentan en las *Tablas 10-13*.

Tabla 10. Validación del método para fármacos en matriz de *Salmo salar* a 200 ng/g dw pez

200 ng/g pez	AR ^a	Repetibilidad		EE ^b	ME ^c	LOD ^d	LOQ ^d	Linealidad
Fármaco	(%)	RSD _{intra-día} (%)	RSD _{inter-día} (%)	(%)	(%)	ng/g dw	ng/g dw	r ²
Acetaminofén	80,8	6,3	7,7	86,5	7,1	25,43	84,79	0,99897
Atenolol	31,1	16,1	18,2	25,2	-18,9	2,41	8,04	0,99626
Bezafibrato	43,1	15,4	18,6	38,5	-10,7	5,52	18,38	0,99960
Bezafibrato-d4	42,3	14,5	16,7	37,4	-11,5	--	--	--
Carazolol	84,1	21,3	23,6	62,6	-25,6	3,79	12,63	0,99469
Carbamazepina	82,0	9,2	8,1	70,4	-14,2	0,59	1,97	0,99723
Carbamazepina-d ₁₀	89,8	5,7	7,9	79,1	-11,9	--	--	--
Claritromicina	75,1	7,3	8,2	58,4	-22,2	1,69	5,63	0,99928
Codeína	46,3	7,7	9,0	38,6	-16,7	4,52	15,06	0,99575
Diazepam	86,7	9,5	13,1	53,6	-38,2	1,33	4,42	0,99799
Diclofenaco	54,1	11,6	14,3	37,4	-30,8	23,74	79,14	0,99656
Diltiazem	99,4	19,2	21,9	73,5	-26,0	0,25	0,82	0,99580
Indometacin	66,8	4,8	6,0	41,2	-38,3	14,68	48,93	0,99893
Ketoprofeno	59,6	13,0	16,6	53,6	-10,1	4,27	14,22	0,99352
Metoprolol	84,2	5,6	6,7	70,9	-15,8	7,13	23,76	0,99651
Metoprolol-d ₇	83,0	12,6	16,5	70,0	-15,7	--	--	--
Metronidazol	85,0	15,6	17,8	83,0	-2,4	22,00	73,33	0,99812
Propranolol	85,2	9,1	11,7	59,6	-30,1	6,99	23,29	0,99076
Propifenazona	77,7	11,8	13,8	71,8	-7,6	0,90	3,00	0,99573
Salbutamol	54,4	11,5	15,9	47,7	-12,3	1,06	3,54	0,99966
Sotalol	72,0	9,3	11,2	59,6	-17,2	4,14	13,79	0,99797
Sotalol-d ₆	66,4	11,4	12,8	55,0	-17,2	--	--	--
Trimetoprima	74,6	13,7	15,8	58,7	-21,3	2,82	9,41	0,99923
Venlafaxina	95,5	6,4	7,2	81,9	-14,2	0,31	1,04	0,99556
Venlafaxina-d ₆	96,2	4,3	4,9	69,8	-27,4	--	--	--
Verapamilo	118,8	0,2	4,1	81,9	-31,0	0,45	1,49	0,99787

LOD: Límite de detección, **LOQ:** Límite de cuantificación.

- Recuperación absoluta: Calculada por comparación de las áreas de los picos cromatográficos de los extractos de los músculos del pez enriquecida antes y después del procesos de extracción y purificación. El enriquecimiento se hizo a 200 ng/g dw de pez.
- Eficiencia de extracción: Calculada por comparación de las áreas de los picos del extracto del pez enriquecida antes de la extracción y purificación y el área de los picos de las soluciones control en agua HPLC. El enriquecimiento se hizo a 200 ng/g dw de pez.
- Efecto matriz: Calculada por comparación de las áreas de los picos del extracto del pez enriquecida después de la extracción y purificación y el área de los picos de las soluciones control en agua HPLC. El enriquecimiento se hizo a 200 ng/g dw de pez.
- Calculada según sección 3.4.1 validación del método.

Tabla 11. Validación del método para fármacos en *Leuciscus cephalus* a 200 ng/g dw pez.

200 ng/g pez	AR ^a	Repetibilidad		EE ^b	ME ^c	LOD ^d	LOQ ^d	Lineal
Fármaco	(%)	RSD _{intra-día} (%)	RSD _{inter-día} (%)	(%)	(%)	ng/g dw	ng/g dw	r ²
Acetaminofén	58,4	22,1	29,4	41,2	-29,5	31,57	105,22	0,97468
Atenolol	32,3	18,3	22,3	20,9	-35,3	7,14	23,79	0,99288
Bezafibrato	64,9	6,7	9,8	48,1	-25,8	7,42	7,42	0,99879
Bezafibrato -d4	62,3	6,2	10,5	52,4	-15,8	--	--	--
Carazolol	N.V.	N.V.	N.V.	N.V.	N.V.	N.V.	N.V.	N.V.
Carbamazepina	86,2	2,1	3,6	48,1	-44,2	1,92	1,92	0,99478
Carbamazepina-d ₁₀	78,3	5,1	3,4	43,1	-44,9	--	--	--
Claritromicina	69,8	9,0	14,0	21,0	-70,0	4,79	15,95	0,99926
Codeína	40,3	15,1	18,9	22,9	-43,1	18,78	62,61	0,99429
Diazepam	81,5	12,0	17,3	15,1	-81,4	7,02	23,41	0,99000
Diclofenaco	96,6	10,8	19,3	12,2	-87,4	91,01	303,36	0,99421
Diltiazem	63,6	3,6	5,9	13,3	-79,1	53,72	179,06	0,99817
Indometacin	102,6	33,1	38,1	8,7	-91,5	7,77	25,89	0,99733
Ketoprofeno	85,9	8,0	12,1	53,1	-38,1	10,39	34,64	0,98188
Metoprolol	80,4	8,8	12,3	49,1	-38,9	7,56	26,19	0,99900
Metoprolol-d ₇	76,5	7,9	11,1	52,3	-31,7	--	--	--
Metronidazol	64,3	16,5	19,6	43,1	-33,0	25,61	85,37	0,99130
Propranolol	122,3	23,9	26,8	26,0	-78,8	26,82	89,41	0,99157
Propifenazona	99,5	2,9	4,0	63,5	-36,2	3,29	10,95	0,99734
Salbutamol	54,2	9,7	17,0	42,4	-21,8	1,46	4,86	0,99663
Sotalol	62,2	11,9	19,4	47,0	-24,4	3,34	11,12	0,99179
Sotalol-d ₆	59,6	7,0	10,9	42,4	-28,9	--	--	--
Trimetoprima	65,7	5,2	6,9	37,7	-42,6	8,49	28,30	0,99119
Venlafaxina	91,1	4,4	7,2	67,7	-25,7	0,55	1,82	0,99905
Venlafaxina-d ₆	74,8	4,7	6,4	41,4	-44,6	--	--	--
Verapamilo	88,8	8,4	13,4	11,7	-86,9	7,26	24,19	0,99287

LOD: Límite de detección, **LOQ:** Límite de cuantificación. N.V.: No validado

- Recuperación absoluta: Calculada por comparación de las áreas de los picos cromatográficos de los extractos de los músculos del pez enriquecida antes y después del proceso de extracción y purificación. El enriquecimiento se hizo a 200 ng/g dw de pez.
- Eficiencia de extracción: Calculada por comparación de las áreas de los picos del extracto del pez enriquecida antes de la extracción y purificación y el área de los picos de las soluciones control en agua HPLC. El enriquecimiento se hizo a 200 ng/g dw de pez.
- Efecto matriz: Calculada por comparación de las áreas de los picos del extracto del pez enriquecida después de la extracción y purificación y el área de los picos de las soluciones control en agua HPLC. El enriquecimiento se hizo a 200 ng/g dw de pez.
- Calculada según sección 3.4.1 validación del método

Tabla 12. Validación del método para fármacos en *Salmo salar* y *Leuciscus cephalus* a 5 ng/g dw pez.

5 ng/g pez	AR ^a		Repetibilidad				EE ^b		ME ^c	
	SS	LC	SS	LC	SS	LC	SS	LC	SS	LC
Fármaco	(%)	(%)	RSD _{intr} a-día (%)	RSD _{inter-día} (%)	RSD _{intra-día} (%)	RSD _{inter-día} (%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Acetaminofén	13,9	40,2	16,8	19,0	28,8	30,5	20,7	162,4	49,6	--
Atenolol	34,7	25,8	22,0	27,1	30,9	34,9	25,9	16,6	-25,2	-35,6
Bezafibrato	54,5	10,2	5,5	6,5	31,0	41,5	41,0	8,5	-24,8	-17,1
Carazolol	69,3	N.V.	22,4	25,5	N.V.	N.V.	44,8	N.V.	-35,4	N.V.
Carbamazepina	74,9	66,1	4,0	5,5	9,9	12,2	54,8	36,2	-26,8	-45,3
Claritromicina	77,3	78,7	15,4	20,2	18,0	21,1	46,4	28,0	-40,1	-64,4
Codeína	47,6	39,9	15,6	19,0	16,4	25,4	36,0	21,8	-24,4	-45,4
Diazepam	75,3	67,5	2,5	3,7	14,2	17,0	44,5	13,2	-40,9	-80,5
Diclofenaco	64,0	--	12,5	15,1	--	--	47,1	--	-26,3	-54,6
Diltiazem	78,5	53,2	14,4	20,3	26,1	29,2	49,2	12,8	-37,2	-76,0
Indometacin	72,0	17,7	14,7	19,8	17,0	25,3	47,8	9,7	-33,6	-88,0
Ketoprofeno	62,4	89,2	11,3	15,0	11,0	12,7	53,0	57,6	-15,0	-35,4
Metoprolol	71,5	78,0	14,9	18,2	15,3	22,6	59,6	1,8	-16,7	-36,3
Metronidazol	117,8	23,8	19,7	16,4	29,9	35,9	99,5	47,0	-15,6	--
Propranolol	95,3	69,3	3,7	5,1	13,6	23,8	66,7	73,8	-30,0	31,2
Propifenazona	--	20,3	--	--	14,3	17,0	--	90,9	18,4	113,0
Salbutamol	37,3	32,1	14,1	16,4	15,8	21,0	30,7	43,1	-17,7	-15,2
Sotalol	48,9	53,6	22,7	26,8	18,6	28,6	37,6	27,2	-23,1	-27,4
Trimetoprima	56,5	61,7	15,9	17,5	9,3	15,5	46,0	40,2	-18,6	-41,4
Venlafaxina	94,8	80,7	8,8	9,5	16,7	20,2	56,9	36,2	-40,0	-48,4
Verapamilo	95,3	75,0	17,4	18,8	21,0	23,5	48,3	41,1	-49,3	-71,7

SS: *Salmo salar* **LC:** *Leuciscus cephalus* **N.V.:** No validado

- Recuperación absoluta: Calculada por comparación de las áreas de los picos cromatográficos de los extractos de los músculos del pez enriquecida antes y después del procesos de extracción y purificación. El enriquecimiento se hizo a 5 ng/g dw de pez.
- Eficiencia de extracción: Calculada por comparación de las áreas de los picos del extracto del pez enriquecida antes de la extracción y purificación y el área de los picos de las soluciones control en agua HPLC. El enriquecimiento se hizo a 5 ng/g dw de pez.
- Efecto matriz: Calculada por comparación de las áreas de los picos del extracto del pez enriquecida después de la extracción y purificación y el área de los picos de las soluciones control en agua HPLC. El enriquecimiento se hizo a 5 ng/g dw de pez.
- Calculada según sección 3.4.1 validación del método

Tabla 13. Validación del método para fármacos en *Salmo salar* y *Leuciscus cephalus* a 500 ng/g dw pez.

500 ng/g pez	AR ^a		Repetibilidad				EE ^b		ME ^c	
	SS	LC	SS	LC	SS	LC	SS	LC	SS	LC
Fármaco	(%)	(%)	RSD _{intra} día (%)	RSD _{inter} día (%)	RSD _{intra} día (%)	RSD _{inter} día (%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Acetaminofén	78,4	44,1	14,4	16,8	12,0	13,0	79,4	32,6	1,2	-26,2
Atenolol	30,5	96,9	27,5	29,7	19,6	23,3	25,3	23,9	-17,1	-75,3
Bezafibrato	39,0	59,5	18,2	20,7	2,9	5,2	35,1	43,9	-10,0	-26,3
Carazolol	70,4	N.V.	13,7	15,5	N.V.	N.V.	52,3	N.V.	-25,7	N.V.
Carbamazepina	88,1	101,6	10,5	12,3	9,3	12,1	80,4	66,0	-8,7	-35,0
Claritromicina	92,2	84,4	14,9	16,7	13,5	16,9	75,6	35,2	-18,0	-58,4
Codeína	47,1	48,9	16,6	19,4	18,3	20,7	36,6	27,7	-22,3	-43,5
Diazepam	81,0	76,3	15,1	16,6	17,2	19,1	58,8	18,0	-27,4	-76,4
Diclofenaco	56,4	86,8	19,3	22,6	20,0	27,0	37,7	9,9	-33,1	-88,6
Diltiazem	87,0	60,2	20,3	24,4	22,1	24,8	53,7	25,2	-38,3	-58,2
Indometacin	59,9	42,8	15,0	18,6	25,0	29,5	36,7	4,7	-38,7	-89,0
Ketoprofeno	53,2	73,6	14,4	15,4	12,7	19,6	46,3	43,0	-12,9	-41,6
Metoprolol	81,1	87,9	6,5	7,9	13,5	19,7	73,8	62,8	-9,0	-28,5
Metronidazol	65,2	66,6	12,1	13,1	11,9	13,7	58,7	46,7	-9,9	-29,8
Propranolol	70,4	71,5	12,4	15,0	18,3	21,8	53,7	14,5	-23,7	-79,7
Propifenazona	139,9	103,4	6,6	8,0	12,3	21,0	68,5	72,5	-51,0	-29,9
Salbutamol	67,2	73,2	12,0	13,9	14,5	17,5	57,2	57,7	-14,9	-21,1
Sotalol	70,7	78,4	9,4	11,4	12,6	13,9	59,9	61,0	-15,3	-22,2
Trimetoprima	85,3	75,4	10,1	11,6	7,8	13,4	69,2	47,1	-18,9	-37,5
Venlafaxina	78,3	86,6	8,6	10,2	18,0	19,4	70,7	40,0	-9,6	-18,3
Verapamilo	84,7	95,2	13,2	14,1	15,7	20,1	70,6	17,7	-16,7	-81,4

SS: *Salmo salar* **LC:** *Leuciscus cephalus* **N.V.:** No validado

- Recuperación absoluta: Calculada por comparación de las áreas de los picos cromatográficos de los extractos de los músculos del pez enriquecida antes y después del procesos de extracción y purificación. El enriquecimiento se hizo a 500 ng/g dw de pez.
- Eficiencia de extracción: Calculada por comparación de las áreas de los picos del extracto del pez enriquecida antes de la extracción y purificación y el área de los picos de las soluciones control en agua HPLC. El enriquecimiento se hizo a 500 ng/g dw de pez.
- Efecto matriz: Calculada por comparación de las áreas de los picos del extracto del pez enriquecida después de la extracción y purificación y el área de los picos de las soluciones control en agua HPLC. El enriquecimiento se hizo a 500 ng/g dw de pez.
- Calculada como se explica en Validación del método capítulo 3.

Las curvas de calibración se elaboraron mediante una regresión lineal de mínimos cuadrados ponderados con un factor de $1/x$ y que incluía al menos 5 puntos de concentración, cuya concentración calculada no difería en más de un 20 % de la concentración teórica. En el caso de *Salmo salar*, la linealidad fue $r^2 > 0,99$ para todos los fármacos. Además, las recuperaciones absolutas fueron inferiores al 50 % para el atenolol (31 %), bezafibrato (43 %), y codeína (46 %), debido a la baja eficiencia de la extracción y también al efecto de la matriz. Sin embargo, estos valores se corrigen utilizando bezafibrato-d4 como ILIS durante la cuantificación. De hecho, el bezafibrato-d4 se ve afectado de manera similar en recuperación absoluta, eficiencia de extracción y efecto matriz (Tabla 10) y puede minimizar esta reducción durante el análisis y la cuantificación¹⁶⁰. El efecto de supresión de la ionización estuvo presente en todos los casos, excepto en el acetaminofén que presentó una mejora de la señal. Los componentes coextraídos de las matrices biológicas como las sales (por ejemplo, sulfatos y fosfatos), los carbohidratos (por ejemplo, glucosa y azúcares nucleótidos), las aminas (por ejemplo, aminoácidos y urea), los lípidos (por ejemplo colesterol y triglicéridos), entre otros (vitaminas, y bilirrubina, insulina y contaminantes no deseados) aumenta el efecto de la matriz durante el análisis de compuestos orgánicos en matrices biológicas^{159, 249}. Este efecto se debe a la posible competencia con los analitos objetivo por las cargas disponibles en la fuente de MS. El resultado es una supresión iónica que es bastante conocida en el modo de ionización positiva usando ESI²⁴⁹⁻²⁵⁰.

La repetibilidad del método fue satisfactoria para todos los compuestos estudiados, por debajo del 20 % en todos los casos excepto en el carazolol (21,3 %). En cuanto a la sensibilidad, el método desarrollado permite detectar cinco compuestos entre 0,25 ng/g a 1,0 ng/g dw de salmón (carbamazepina, diltiazem, propifenazona, venlafaxina y verapamilo). El LOD para la mayoría de los fármacos se encuentra en el rango de 1,0 a 10,0 ng/g dw de salmón, y cuatro compuestos presentaban valores cercanos a los 20 ng/g dw: acetaminofén (25,43 ng/g dw), diclofenaco (23,74 ng/g dw), indometacin (14,68 ng/g dw) y metronidazol (22 ng/g dw).

En comparación con el salmón, *Leuciscus cephalus* presentó algunas diferencias significativas en términos de recuperación absoluta, eficiencia de extracción y efecto matriz. Las recuperaciones de atenolol y codeína fueron inferiores al 50 % (32 % y 40 %, respectivamente). Todos los demás compuestos presentaron buenas recuperaciones absolutas, entre 52-122 %. Excepto en algunos casos, la eficiencia de extracción fue menor en comparación con la matriz de salmón. En particular, 8 compuestos (atenolol, claritromicina, codeína, diazepam, diclofenaco, diltiazem, indometacin, y propranolol) presentaron eficiencia de extracción inferior al 30 %. A pesar de la cantidad reducida en el contenido de grasa en comparación con el salmón, *Leuciscus cephalus* presentó una mayor supresión de la señal de los analitos. *Leuciscus cephalus*, como miembro de los Cypriniformes, es más tolerante a la falta de oxígeno en el agua y, en

consecuencia, a la contaminación. Esto significa que algunos compuestos adicionales presentes en el agua y en los sedimentos (moléculas orgánicas e inorgánicas) podrían acumularse en los peces y posteriormente ser co-extraídos de la matriz, interfiriendo durante el análisis de los fármacos. De hecho, el río Sava, de donde proceden las muestras de peces, es un río significativamente impactado por los contaminantes de las aguas residuales^{229, 251-252} que pueden acumularse en los peces e interferir con la extracción y detección de los analito^{143, 253-255}. Además, hay algunos estudios con la misma especie (*Leuciscus cephalus*) en el mismo río (Sava) que detectaron acumulación de metales en diferentes partes de los peces²⁵² que pueden interactuar con los fármacos y afectar la extracción, debido a la posibilidad de tener conjugados o quelatos de los fármacos¹⁶¹. De todas formas, la respuesta lineal para 18 fármacos presentó r^2 superior a 0,99 en las curvas de calibración que fueron construidas con las mismas condiciones de la matriz anterior, pero se obtuvieron respuestas lineales diferentes para acetaminofén, ($r^2 = 0,97$), ketoprofeno ($r^2 = 0,98$), y carazolol que no fue posible validar en esta matriz.

En cuanto a la sensibilidad del método, *Leuciscus cephalus* presentó límites de detección y cuantificación más altos en comparación con *Salmo Salar* (Tabla 10-11). La mayoría de los fármacos presentaron LOD entre 1,0 y 10 ng/g dw, mientras que la venlafaxina presentó el menor LOD con esta matriz (0,55 ng/g dw). Siete compuestos (acetaminofén, codeína, diclofenaco, diltiazem, ketoprofeno, metronidazol, propranolol) presentaron LOD superiores a 10 ng/g dw. En el caso del diclofenaco, los LOD y los LOQ son considerablemente altos, 91,01 y 303,36 ng/g dw, respectivamente. Por esta razón, aunque se muestran en la Tabla 11, se ha decidido excluirlo de la validación del *Leuciscus cephalus*. La repetibilidad del método en esta matriz tiene una buena reproducibilidad excepto para acetaminofén, indometacin y propranolol que presentaron RSD superior al 20 %.

4.1.6 Aplicación al análisis en muestras ambientales.

Para probar el método validado, se analizaron fármacos en las especies: *Squalius keadicus*, *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta marmoratus*, *Cottus gobio*, *Leuciscus cephalus* y *Thymallus thymallus* del río Evrotas (Grecia) y del río Adige (Italia). En total, se analizaron 16 muestras de once puntos de muestreo diferentes. La curva de calibración se realizó con la matriz de *Salmón salar* debido a que la mayoría de las muestras pertenecían a la misma especie, *Salmo trutta fario* y *Salmo trutta marmoratus*. Cuando las muestras no provienen de la misma matriz, se recomienda hacer una mezcla de todas las matrices para simplificar el procedimiento de cuantificación²⁵⁶. Debido a la falta de matrices libres de contaminantes para preparar este conjunto de matrices, se eligió la especie del salmón por la similitud de especies.

De acuerdo con los resultados, la presencia de fármacos estaba por debajo del LOD para las muestras del río Evrotas. En el caso del río Adige, se detectó acetaminofén en concentración de 24 ng/g dw y propranolol en la concentración de 80 ng/g dw en muestras de dos puntos de muestreo diferentes. Adicionalmente, se detectó acetaminofén, propranolol y venlafaxina en el músculo de los peces de los tres últimos puntos de muestreo a lo largo del río por debajo del LOQ. La determinación de fármacos en las aguas de los ríos de estudio se presentan más adelante (después de la discusión de resultados de la validación del método 2). Todos los resultados y trabajos desarrollados en éste método 1 de análisis, fueron publicados en la revista científica *Talanta* ²⁵⁷.

4.2 Análisis de fármacos en músculo de pez fresco, método 2

4.2.1 Análisis UPLC-MS/MS

En este caso, las fases móviles utilizadas durante la optimización de las condiciones de separación y análisis de los compuestos fueron de tipo acidificado y con modificadores, (A) 5 mM NH₄OAc/0,05 % HCOOH en agua y (B) 0,05 % HCOOH en MeCN.

La separación cromatográfica se optimizó para una composición de fase móvil constante variando el gradiente de elución con el objetivo de evitar la coelución de los analitos objetivo. El gradiente cromatográfico seleccionado ofreció una separación satisfactoria de los fármacos en 11 minutos, a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. La tecnología de adquisición de ventanas variables SWATH permitió analizar los datos exitosamente. Como ya se explicó anteriormente, la tecnología SWATH es una adquisición del tipo DIA, diseñada para generar la mayor cantidad de contenido de información estructural posible, con un alto nivel de selectividad. Como resultado, todos los iones detectados en el Q1 (precursores) son fragmentados generando su respectiva MS/MS. El primer experimento de escaneo completo, detecta todos los iones precursores simultáneamente y después se realizan nuevos experimentos de adquisición. Durante los nuevos experimentos, los iones precursores se separan secuencialmente en un pequeño rango de masas para generar sus respectivos MS/MS hasta cubrir el rango completo de masas configurado en el análisis. Como consecuencia, los datos de adquisición de SWATH, presentan una mejor reproducibilidad y espectros MS/MS más limpios ²⁵⁸. Finalmente, para la identificación de los analitos en la adquisición de SWATH, los picos de los cromatogramas son agrupados, puntuados y evaluados estadísticamente utilizando la deconvolución matemática, con una técnica de agrupación denominada Agrupación de Variables de Componentes Principales (PCVG)^{200, 259-260}. Como la adquisición de SWATH genera un MS/MS completo para todos los iones que entran en el sistema, la oportunidad de realizar un análisis desconocido de forma retrospectiva, sin la reinyección de la muestra, es posible.

La confirmación de los compuestos diana se realiza con las librerías espectrales instrumentales pre-ensambladas en el equipo. La confirmación tuvo en cuenta la coincidencia de por lo menos dos iones (precursor y fragmento; presentados en la *Tabla 6*) con una diferencia de precisión de masa <10 ppm¹⁸¹. La energía de colisión en modo creciente y el potencial de descomposición ajustado para la adquisición del SWATH fueron seleccionados para reproducir las mismas condiciones de la biblioteca instrumental de MS/MS. Los parámetros seleccionados presentan una calidad elevada para el análisis de MS y MS/MS para un amplio número de compuestos y, además, son los valores utilizados en la mayoría de los espectros de las bases de datos²⁰⁰.

4.2.2 Protocolo de extracción y purificación

En este estudio, se evaluaron diferentes protocolos de extracción, disolventes, filtración de muestras y pasos de purificación para la extracción de fármacos. Esto incluyó QuEChERS citrato, extracción sólido-líquido usando una mezcla de disolventes (MeCN/iPrOH y H₂O/iPrOH), extracción en ultrasonido con/sin congelamiento de los extractos durante la noche. Adicionalmente, se probaron varios protocolos de limpieza para su conveniencia en relación al contenido de grasa y lípidos de los extractos. Esto incluyó alúmina neutra / ácida / activada para la retención de grasa y lípidos, limpieza con paso de congelación de los extractos durante la noche, limpieza dispersiva utilizando extracción en fase sólida (dSPE) con una combinación de absorbentes PSA, C18 y MgSO₄, y el seleccionado Z-Sep/C18. Los resultados de esos experimentos previos se presentan en las tablas 14-17.

En la *Tabla 14* se presenta la retención de grasa usando alúminas neutra, ácida, y activada. En este caso los resultados fueron muy bajos en cuanto a la retención de grasa: 1,0% con la alúmina neutra. Por el contrario, con la alúmina ácida parece que algún compuesto o material particulado se desprende de la alúmina, porque presenta aumento de masa al final del proceso. En el caso de la alúmina activada, no fue posible dispersarla en el extracto ya que se precipitaba inmediatamente al fondo del tubo de ensayo y no se mantenía en suspensión, por lo tanto no se determinó la retención de grasa con éste tipo de alúmina.

Tabla 14. Protocolos de optimización para la retención de grasa y lípidos

Protocolo	Alúmina	Cantidad de alúmina (mg)	Retención de grasa (%)
1	neutra	600	0,1
2	neutra	1000	1,0
3	neutra	1500	1,1
4	ácida	600	-1,3
5	ácida	1000	-2,6
6	ácida	1500	-3,0
7	activada	600	N.D.*
8	activada	1500	N.D.*

*N.D.: no determinado

La evaluación del uso de diferentes tipos de filtros, como son los de PTFE, PVDF y acetato de celulosa, como un posible paso adicional en la purificación del extracto, permitió determinar que por lo menos 10 % de los compuestos estudiados presentaban afectación por aumento de las señales haciendo uso de cualquiera de los tres tipos de filtros que se presentan en la *Tabla 15*. Así que igualmente que en el método 1, para evitar variaciones que puedan afectar el análisis de los fármacos, se evitó el uso de filtros en el desarrollo de la metodología y se procedió solamente con las centrifugaciones para precipitar cualquier material particulado en el extracto.

Tabla 15. Protocolos de retención de fármacos en filtros.

Fármaco	Filtros de jeringa PTFE ^a (% recuperación)	Filtros de un solo paso ^b (% recuperación)	Filtros de jeringa corning ^c (% recuperación)
1,2,3-Benzotriazole	89.8	115.0	109.6
Acridona	98.8	100.1	110.0
Amlodipine	127.3	112.7	176.1
Atenolol	98.6	84.2	98.4
Bezafibrato	83.6	91.2	89.5
Bromazepam	77.6	88.0	91.5
Cafeína	115.8	110.3	102.6
Carazolol	105.4	127.5	120.7
Carbamazepina	90.2	92.9	95.0
Clorpromazina	160.9	193.3	183.5
Citalopram	119.9	151.4	116.4
Claritromicina	103.9	100.3	139.7
Codeína	111.2	118.4	108.5
Dexamethasone	88.4	90.8	97.1
Diazepam	95.8	98.6	106.0
Diclofenac	113.3	104.7	106.1
Diltiazem	101.7	120.9	125.7
Enrofloxacin	89.7	105.8	98.5
Erithromicina	100.6	101.0	111.1
Fenofibrato	156.9	189.7	151.9
Flumequina	92.1	101.6	90.8
Indomethacin	104.7	112.3	103.7
Ketamina	97.1	115.4	99.2
Ketoprofeno	91.1	83.8	74.2
Lamotrigina	82.3	99.8	93.7
Loratadina	118.6	138.3	141.0
Lormetazepam	92.6	103.8	100.4

Fármaco	Filtros de jeringa PTFE ^a (% recuperación)	Filtros de un solo paso ^b (% recuperación)	Filtros de jeringa corning ^c (% recuperación)
Ácido Meclofenámico	114.9	121.8	107.6
Ácido Mefenámico	103.8	98.4	103.9
Mefedrona	104.6	117.5	99.3
Metadona	137.8	189.1	130.8
Metoprolol	96.0	101.0	95.1
Metronidazol	82.4	75.8	84.0
Midazolam	101.2	121.4	100.6
Ácido nalidíxico	99.1	106.1	106.1
Naproxeno	104.5	102.0	109.2
Nicotina	99.0	112.2	106.3
Ofloxacina	88.8	94.9	95.9
Oxazepam	101.1	98.4	102.1
Oxcarbazepina	84.0	98.9	99.8
Paroxetina	142.5	158.5	173.0
Ácido pipemídico	87.8	88.2	91.9
Propranolol	105.5	127.8	118.6
Propifenazona	96.1	98.8	94.9
Salbutamol	93.2	109.0	103.0
Sertralina	156.5	176.4	191.4
Sotalol	112.2	103.6	104.2
Sulfadimetoxina	88.1	101.3	83.7
Sulfaguanidina	101.2	110.5	114.6
Sulfametazina	104.1	98.7	101.9
Sulfametoxazol	101.1	105.5	99.7
Sulfapiridina	107.8	111.4	106.3
Temazepam	102.2	103.7	103.5
Triclocarban	100.0	100.0	100.0
Triclosan	100.0	100.0	100.0
Trimetoprima	99.8	99.5	97.4
Valsartan	86.2	89.3	87.5
Ácido valsartánico	96.2	90.2	95.6
Venlafaxina	110.3	113.8	112.0
Verapamilo	130.1	176.8	126.8
Warfarina	70.9	82.7	89.6
Zolpidem	88.5	110.4	92.5

^a Syringe filters PTFE 0,45 µm Whatman WHA69722504.

^b Filter single step standard filter vial PVDF 0,45µm Thomson cat # 25896

^c Filter coming syringe filters cellulose acetate 0,45µm CLS43122

Como parte del proceso de la optimización de la extracción de los fármacos, se realizaron extracciones a diferentes niveles de enriquecimiento, con diferentes disolventes, diferentes tipos de extracciones, y diferentes tipos de purificación de los extracto. En la *Tabla 16* se presentan algunos protocolos aplicados como ensayos para la optimización del método. En este caso se presentan 5 protocolos diferentes para la extracción de los compuestos, haciendo uso de extracción tipo QuEChERS y extracción soportada por ultrasonido. Se realizaron variaciones de la masa inicial de la matriz (0,5 y 1,0 g), variaciones en los valores de enriquecimiento de los compuestos (25, 50 y 100 ng de compuestos), variaciones en los disolventes empleados

(mezclas de agua acidificada con MeCN y/o iPrOH), y variaciones en la purificación del extracto (QuEChERS, con/sin congelamiento, centrifugación, reconstitución), entre otros. Los resultados de estas pruebas se presentan en la *Tabla 17*.

Tabla 16. Protocolos aplicados para la optimización de la extracción de fármacos en músculos de peces.

Protocolo	1	2	3	4	5
Peso de muestra (g)	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0
Enriquecimiento (ng de compuesto)	100	25	25	50	50
Disolventes (mL)	H ₂ O:MeCN (9:1) HCOOH 0,1%	MeCN:iPrOH (3:1) HCOOH 0,1%	MeCN:iPrOH (3:1) HCOOH 0,1%	MeCN:iPrOH (3:1) HCOOH 0,1%	0,05% HCOOH:MeCN (90:10)
Método de extracción	QuEChERS citrato-kit-01	10 min ultrasonido	10 min ultrasonido	10 min ultrasonido	10 min ultrasonido
Purificación	6 mL sobrenadante. Purificación: kit QuEChERS PSA-C18	Congelado toda la noche. Centrifugación 14000 rpm, 10 min, 0°C. Extracción sobrenadante	Congelado toda la noche. Centrifugación 14000 rpm, 10 min, 0°C. Extracción sobrenadante	Congelado toda la noche. Centrifugación 14000 rpm, 10 min, 0°C. Extracción sobrenadante	Centrifugación 14000 rpm, 10 min, 0°C. Extracción 1,0 mL sobrenadante
Comentarios	Extracto final: 5 mL. Congelado toda la noche. Extracción de 1 mL. Evaporación a sequedad y reconstitución a 1mL NH ₄ OH 5mM:MeCN 90:10.	Extracto final: 0,5 mL. 2 esferas de vidrio (0,4 mm Ø) para mayor interacción matriz disolvente. Inyección en HPLC-HRMS sin reconstitución.	Extracto final: 0,8 mL. 2 esferas de vidrio (0,4 mm Ø) para mayor interacción matriz disolvente. Evaporación a sequedad y reconstitución a 0,8mL NH ₄ OH 5mM: MeCN 90:10.	Extracto final: 2,5 mL. 2 esferas de vidrio (0,4 mm Ø) para mayor interacción matriz disolvente. Evaporación a sequedad y reconstitución a 1,0 mL NH ₄ OH 5mM: MeCN 90:10.	Extracto final: 1,0 mL.

Se realizaron varios protocolos de optimización de la extracción de los fármacos en músculos de pez fresco. Para evaluar la recuperación se compara el área del pico cromatográfico enriquecido antes y después de la extracción.

En la *Tabla 17* se observa que algunos compuestos no logran recuperarse por ninguna de los protocolos propuestos en la *Tabla 16*, e.g. dexametasona, o los antibióticos de tipos sulfas. Sin embargo, hay compuestos que se recuperan de manera muy similar con cada uno de los protocolos aplicados, como es el caso de la ofloxacina. Pero entre los protocolos presentados en la *Tabla 16* no hay uno que se destaque por ser muy superior a los otros métodos aplicados. Como ya se ha explicado anteriormente, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, y el número de pasos a los cuales es sometida la muestra, puede afectar el rendimiento del proceso, lo que hace que varíen las recuperaciones de los compuestos diana.

Tabla 17. Recuperaciones de fármacos durante las optimizaciones de las extracciones de fármacos con los protocolos presentados en la Tabla 16

Fármaco	Protocolo 1 (%)	Protocolo 2 (%)	Protocolo 3 (%)	Protocolo 4 (%)	Protocolo 5 (%)
1,2,3-Benzotriazol	0,0	0,0	0,0	100,6	0,0
Acridona	84,9	90,7	61,8	71,3	28,0
Amlodipina	0,0	53,7	0,0	0,0	0,0
Atenolol	57,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bezafibrato	87,4	0,0	54,7	43,2	56,1
Bromazepam	61,6	0,0	82,7	125,7	66,9
Cafeína	92,1	0,0	69,8	49,8	54,8
Carazolol	35,6	54,2	58,5	47,0	7,1
Carbamazepina	83,3	0,0	58,0	56,5	33,6
Chlorpromazina	9,3	41,2	61,8	0,0	0,0
Citalopram	43,0	74,3	55,7	38,2	18,2
Claritromicina	47,5	60,0	60,9	34,7	31,4
Codeína	84,8	0,0	36,6	72,8	29,8
Dexametasona	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Diazepam	48,1	73,2	60,9	41,4	4,7
Diclofenaco	63,3	76,8	66,3	26,1	7,8
Diltiazem	42,5	71,4	62,9	44,9	18,6
Enrofloxacina	65,8	59,3	60,4	58,7	36,6
Erythromicina	0,0	64,0	48,1	50,1	52,1
Fenofibrato	20,9	83,3	62,4	24,0	6,9
Flumequina	87,8	0,0	62,2	58,9	42,9
Indometacina	67,9	63,9	69,0	39,1	12,9
Ketamina	79,4	51,2	48,6	63,6	55,5
Ketoprofeno	100,9	69,5	47,1	88,5	0,0
Lamotrigina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Loratadina	17,7	91,0	52,7	33,5	0,0
Lormetazepam	76,3	79,2	67,0	46,4	12,5
Ácido Meclofenámico	27,9	88,1	34,7	9,9	4,3
Ácido mefenámico	42,1	87,1	48,8	17,2	3,2
Mefedrona	67,3	48,3	50,2	55,2	31,2
Metaadona	29,8	67,9	63,8	38,8	0,0
Metoprolol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Metronidazol	80,5	0,0	98,2	103,1	148,5
Midazolam	34,5	0,0	52,5	45,5	0,0
Ácido nalidixico	93,3	0,0	57,1	62,9	54,3
Naproxeno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Nicotina	0,0	0,0	117,1	119,8	108,1
Ofloxacina	48,4	54,0	42,3	54,9	48,0
Oxazepam	74,2	41,5	59,5	51,6	0,0
Oxcarbazepina	50,5	45,7	45,9	40,7	25,5
Paroxetina	58,8	34,0	0,0	0,0	0,0
Ácido pipemidico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Propranolol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Propifenazona	94,0	0,0	53,0	56,6	45,2
Salbutamol	66,4	0,0	0,0	53,5	86,1
Sertralina	11,6	82,6	41,7	0,0	0,0
Sotalol	79,7	0,0	0,0	0,0	63,9
Sulfadimetoxina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sulfaguanidina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fármaco	Protocolo 1 (%)	Protocolo 2 (%)	Protocolo 3 (%)	Protocolo 4 (%)	Protocolo 5 (%)
Sulfamethazina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sulfametoxazol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sulfapyridina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Temazepam	82,9	0,0	60,6	50,4	16,2
Triclocarban	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Triclosan	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Trimetoprima	60,1	86,0	57,5	55,2	61,3
Valsartan	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ácido valsartánico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Venlafaxina	91,0	30,1	60,5	57,1	77,9
Verapamilo	24,3	107,0	82,1	0,0	0,0
Warfarina	75,2	84,0	63,0	39,3	41,5
Zolpidem	59,7	75,4	62,9	53,7	33,9

Finalmente, entre todos los protocolos ensayados, los mejores resultados se obtuvieron con las siguientes condiciones: disolventes de extracción MeCN/iPrOH (3:1) + 0,1 % F.A y un paso de purificación de d-SPE: Z-Sep+. La eficacia de la eliminación de los lípidos, con éste tipo de purificación, depende de la interacción entre el grupo polar del lípido y el grupo de la zircona ligada del sorbente, y también entre las cadenas hidrofóbicas del lípido y la funcionalidad hidrofóbica de los sorbentes ^{187, 261}. Tras la selección del protocolo de extracción y limpieza, el método fue validado a tres niveles de concentración (5, 25 y 50 ng/g) de la manera que fue explicado en la sección 3.4.2.

4.2.3 Validación del método

Para la validación del método se hizo el seguimiento de los iones más abundantes de cada fármaco (Tabla 6) utilizando *Leuciscus cephalus* libre de fármacos como pool de matrices. Esta especie fue seleccionada porque fue la especie que predominó en la campaña de muestreo. Los resultados de los experimentos de recuperación, demostraron valores satisfactorios de más del 60 % para la mayoría de los fármacos (Tabla 18, Figura 16).

Tabla 18. Recuperaciones de fármacos en peces a los 3 niveles de validación.

Compuesto	Recuperación* (RSD) (%)		
	5 ng/ g pez	25 ng/ g pez	50 ng/ g pez
Acetaminofén ^a	77 (13)	48 (6)	82 (2)
Acridona ^b	78 (5)	91 (3)	79 (7)
Atenolol ^c	87 (10)	90 (7)	84 (6)
Bezafibrato ^d	75 (9)	85 (10)	82 (7)
Bromazepam ^b	92 (10)	77 (5)	72 (10)
Cafeína ^e	139 (4)	99 (6)	103 (8)
Carazolol ^f	100 (15)	97 (3)	85 (20)
Carbamazepina ^b	101 (5)	85 (4)	84 (5)
Clorpromazina ^g	100 (3)	97 (2)	81 (4)
Claritromicina ^h	75 (8)	81 (5)	79 (19)
Codeína ^c	131 (5)	86 (7)	104 (10)
Diazepam ^h	82 (6)	94 (2)	85 (11)

Compuesto	Recuperación* (RSD) (%)		
	5 ng/ g pez	25 ng/ g pez	50 ng/ g pez
Diltiazem ^b	120 (6)	100 (3)	81 (23)
Erythromicina ^g	130 (3)	152 (8)	123 (13)
Fenofibrato ⁱ	159 (19)	153 (8)	196 (8)
Flumequina ^b	52 (5)	57 (4)	50 (12)
Fluoxetina ^h	109 (7)	113 (9)	81 (15)
Furazolidona ^d	88 (2)	102 (9)	86 (9)
Ketamina ^d	88 (8)	80 (1)	63 (10)
Ketoprofeno ^h	79 (15)	92 (4)	80 (2)
Lamotrigina ^k	89 (21)	77 (19)	61 (18)
Loratadina ^d	100 (14)	113 (12)	99 (19)
Lorazepam ^g	99 (11)	101 (3)	82 (3)
Ácido Mefenámico ^d	96 (16)	111 (4)	95 (12)
Mefedrona ^e	71 (14)	79 (3)	57 (17)
Metadona ^g	92 (7)	104 (14)	82 (20)
Metoprolol ^l	40 (48)	89 (11)	82 (10)
Midazolam ^b	90 (8)	94 (3)	72 (15)
Ácido nalidíxico ^f	49 (2)	51 (7)	44 (12)
Oxazepam ^b	89 (8)	98 (3)	82 (3)
Oxcarbazepina ^b	93 (8)	117 (6)	95 (3)
Propifenazona ^b	120 (5)	94 (3)	84 (10)
Salbutamol ^c	98 (3)	50 (1)	51 (21)
Sertralina ^h	82 (4)	78 (3)	70 (4)
Sotalol ^c	79 (2)	65 (6)	62 (7)
Sulfadimetoxina ^f	108 (18)	125 (4)	94 (6)
Sulfametazina ^d	135 (4)	172 (4)	107 (1)
Sulfametoxazol ^f	106 (2)	101 (8)	101 (9)
Sulfapiridina ^e	99 (7)	104 (5)	91 (2)
Temazepam ^h	89 (5)	100 (4)	87 (5)
Trimetoprima ^e	113 (15)	76 (2)	62 (14)
Ácido valsartánico ^f	63 (10)	62 (21)	41 (4)
Valsartan ^d	74 (18)	79 (14)	86 (3)
Venlafaxina ^f	63 (17)	93 (5)	76 (3)
Verapamilo ^h	60 (4)	86 (4)	80 (9)
Warfarina ^d	113 (6)	104 (1)	93 (12)
Zolpidem ^f	122 (6)	107 (5)	84 (12)

* Recuperación calculada por comparación de las áreas de los picos cromatográficos de los extractos de los músculos del pez enriquecida antes y después del proceso de extracción y purificación.

ILIS para efectos de cuantificación ^a = Acetaminofén-d4, ^b = Carbamazepina-d10, ^c = Codeína-d3, ^d = Bezafibrato-d4, ^e = Trimetoprima-d3, ^f = Venlafaxina-d6, ^g = Lorazepam-d4, ^h = Diazepam-d5, ⁱ = Fenofibrato-d6, ^j = Sulfametazina-d4, ^k = Lamotrigina-¹³C3, ^l = Metoprolol-d7

Solamente la flumequina y el ácido nalidíxico presentaron recuperaciones entre 40-60 % en los tres niveles de concentración validados. En el caso del acetaminofén, la mefedrona, el metoprolol, el salbutamol y el ácido valsartánico, las recuperaciones en los tres niveles estuvieron entre alguna de estas dos categorías descritas anteriormente, dependiendo del nivel de enriquecimiento.

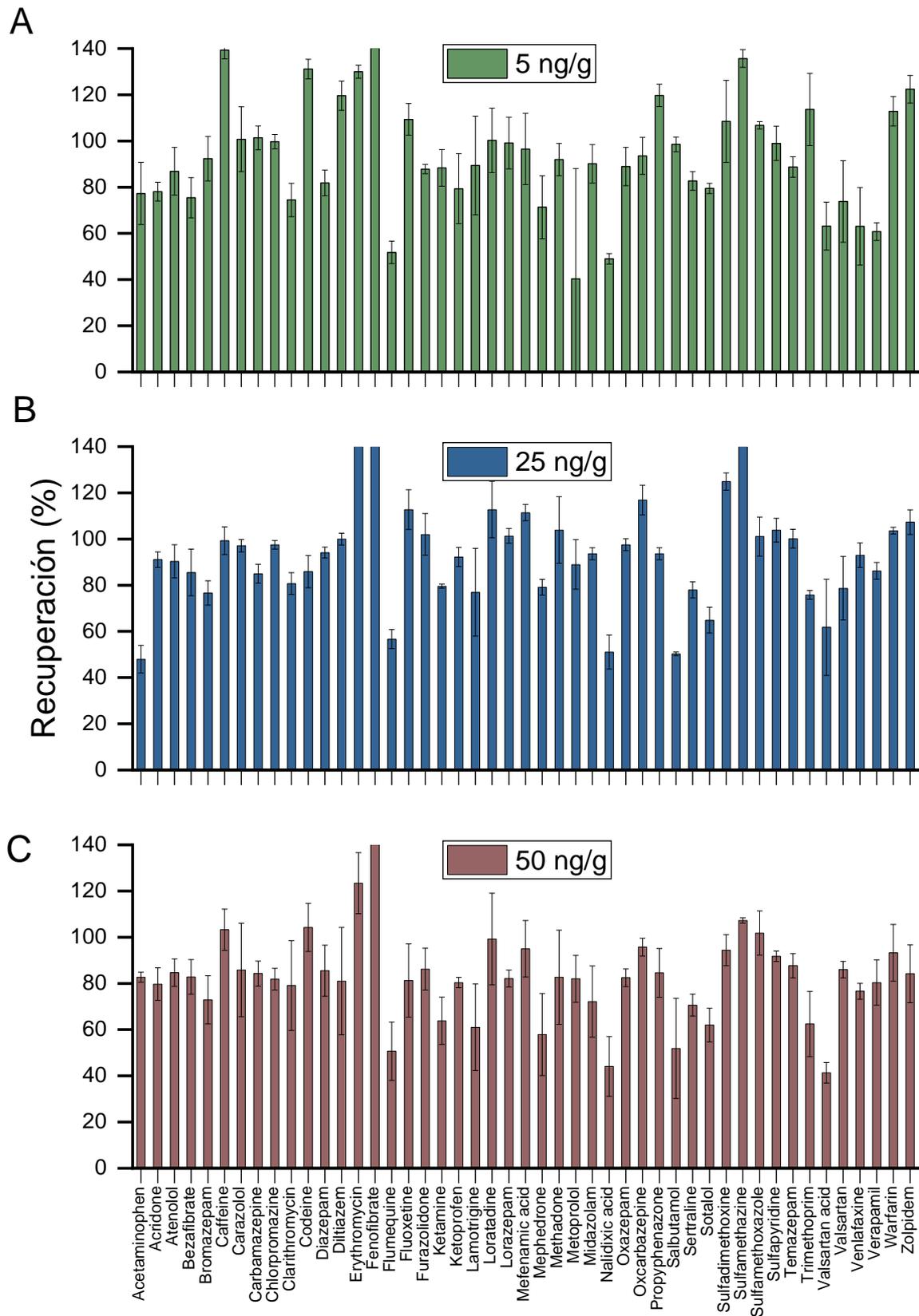


Figura 16. Recuperaciones de fármacos en muestras de peces.
 A) 5 ng/g pez. B) 25 ng/g pez. C) 50 ng/g pez.

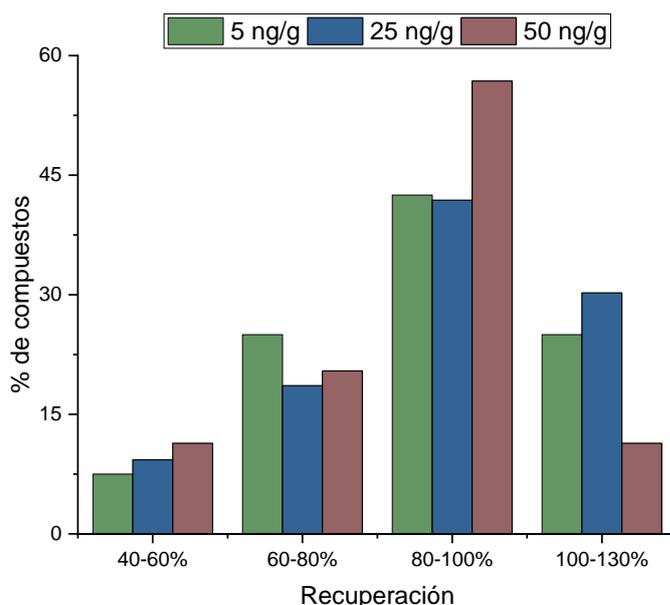


Figura 17. Número de compuestos agrupados por porcentaje de recuperación.

En la *Figura 17* se representa el porcentaje de recuperaciones agrupadas por números de compuestos. Esta última muestra que entre el 42 y el 57 % de los analitos tienen una recuperación de entre el 80 y el 100 %, seguidos por los rangos del 60 al 80 % (19 - 25 % de compuestos) y del 100 al 130 % (11 - 30 % de compuestos).

La precisión de estas mediciones se indica en la *Tabla 19*, junto con el efecto de la matriz, la linealidad de la curva de calibración, el LOD y el LOQ. La precisión presentó un valor de RSD inferior al 25 % independientemente del nivel de validación (*Tabla 19*). En cuanto a los efectos de matriz, se observa una supresión de la ionización para la mayoría de los compuestos, que como se explicó anteriormente, ya es conocido y estudiado durante los procesos de ionización por ESI en modo positivo²⁴⁹⁻²⁵⁰. También se ha demostrado que el alcance del efecto de la matriz es altamente variable y por lo tanto es difícil de predecir²⁶². Sin embargo, hay casos en los que predomina el aumento de la señal: sotalol, metoprolol, ácido valsartánico, eritromicina, sulfametazina, ketoprofeno, sulfapiridina, cafeína, valsartán y acetaminofén, con un aumento de la señal entre el 13 y el 65 % (*Tabla 19*).

Tabla 19. Validación del método 2 en precisión, efecto matriz, linealidad y sensibilidad.

Compuesto	RSD % intra (%) / RSD % inter. (%) ^A			Efecto matriz (RSD) (%) ^B			Linealidad	LOD ^C	LOQ ^C
	5 ng/g pez	25 ng/g pez	50 ng/g pez	5 ng/g pez	25 ng/g pez	50 ng/g pez	r ²	(ng/g pez)	(ng/g pez)
Acetaminofén ^a	6 / 10	7 / 20	4 / 10	26 (10)	21 (15)	17 (11)	0,99540	0,5	2,0
Acridona ^b	4 / 13	7 / 10	2 / 5	-34 (7)	-33 (9)	-29 (10)	0,99747	0,07	0,2
Atenolol ^c	6 / 10	7 / 8	3 / 6	-9 (3)	-35 (13)	-20 (14)	0,99922	0,3	1,0
Bezafibrato ^d	10 / 15	11 / 21	7 / 10	-32 (11)	-25 (20)	-21 (7)	0,99737	0,06	0,2
Bromazepam ^b	5 / 9	11 / 17	8 / 7	13 (5)	-4 (43)	-19 (34)	0,99448	0,3	1,0
Cafeína ^e	5 / 11	9 / 8	7 / 10	45 (4)	53 (10)	35 (9)	0,99189	0,3	0,8
Carazolol ^f	2 / 11	11 / 16	8 / 13	-20 (14)	-22 (18)	-28 (0)	0,99675	0,08	0,3
Carbamazepina ^b	2 / 3	8 / 10	2 / 12	-13 (12)	-18 (5)	-21 (8)	0,99832	0,02	0,07
Clorpromazina ^g	2 / 26	17 / 21	8 / 21	-10 (21)	-15 (31)	-26 (21)	0,99261	0,4	1,0
Claritromicina ^h	6 / 18	1 / 5	4 / 8	-48 (7)	-6 (4)	-37 (7)	0,99719	0,02	0,08
Codeína ^c	7 / 13	12 / 17	2 / 8	17 (10)	25 (37)	8 (7)	0,99865	0,2	0,8
Diazepam ^h	15 / 10	12 / 13	15 / 14	-49 (15)	-55 (10)	-66 (7)	0,99620	0,08	0,3
Diltiazem ^b	20 / 3	6 / 16	10 / 10	-66 (10)	-70 (2)	-64 (6)	0,99717	0,01	0,04
Erythromicina ^g	0 / 9	17 / 21	5 / 14	68 (3)	64 (22)	60 (2)	0,99518	0,06	0,2
Fenofibrato ⁱ	20 / 22	6 / 11	4 / 16	-84 (16)	-83 (2)	-86 (0)	0,99339	0,2	0,8
Flumequina ^b	16 / 13	10 / 20	1 / 11	-75 (0)	-87 (2)	-64 (1)	0,99447	0,02	0,07
Fluoxetina ^h	9 / 14	8 / 24	14 / 21	-73 (4)	-78 (2)	-83 (3)	0,99608	0,1	0,3
Furazolidona ⁱ	4 / 13	14 / 20	2 / 4	-5 (12)	-23 (4)	-1 (42)	0,99796	0,04	0,1
Ketamina ^j	14 / 10	15 / 12	4 / 4	-32 (6)	-24 (13)	-14 (6)	0,99675	0,02	0,06
Ketoprofeno ^h	4 / 14	4 / 15	1 / 6	8 (59)	29 (2)	25 (6)	0,99695	0,1	0,3
Lamotrigina ^k	8 / 20	13 / 19	8 / 12	-30 (18)	-45 (7)	-20 (19)	0,99273	0,05	0,2
Loratadina ^d	14 / 12	17 / 18	12 / 13	-62 (8)	-69 (8)	-83 (16)	0,99168	0,07	0,2
Lorazepam ^g	13 / 11	7 / 8	4 / 7	-48 (14)	-25 (22)	-33 (18)	0,99814	0,01	0,05
Ácido Mefenámico ^d	22 / 17	16 / 22	21 / 19	-49 (4)	-43 (2)	-47 (13)	0,98672	0,2	0,7
Mefedrona ^e	16 / 10	6 / 12	1 / 8	-41 (7)	-45 (17)	-29 (3)	0,99803	0,04	0,1
Metadona ^g	22 / 20	5 / 13	19 / 12	-74 (5)	-74 (5)	-69 (5)	0,99587	0,1	0,4
Metoprolol ^l	5 / 25	8 / 9	1 / 6	75 (22)	14 (21)	23 (7)	0,99414	0,4	1,0
Midazolam ^b	9 / 6	15 / 21	14 / 18	-21 (7)	-41 (21)	-46 (11)	0,99312	0,07	0,2
Ácido nalidíxico ^f	14 / 11	14 / 15	2 / 9	-37 (13)	-39 (7)	-31 (4)	0,99780	0,02	0,05
Oxazepam ^b	14 / 16	13 / 9	2 / 7	-31 (16)	-37 (2)	-28 (6)	0,99628	0,07	0,2
Oxcarbazepina ^b	18 / 6	16 / 12	1 / 10	-19 (7)	-14 (6)	-3 (22)	0,99743	0,06	0,2

	RSD % intra (%) / RSD % inter. (%) ^A			Efecto matriz (RSD) (%) ^B			Linealidad	LOD ^C	LOQ ^C
Propifenazona ^b	2 / 8	8 / 10	3 / 4	-24 (19)	-26 (4)	-16 (15)	0,99810	0,08	0,3
Salbutamol ^c	13 / 9	9 / 10	5 / 7	0 (3)	-35 (13)	0 (0)	0,99775	0,08	0,3
Sertralina ^h	16 / 21	20 / 24	18 / 22	-76 (5)	-67 (9)	-80 (7)	0,99255	0,02	0,06
Sotalol ^e	5 / 5	13 / 16	6 / 7	84 (2)	64 (5)	58 (6)	0,99762	0,1	0,4
Sulfadimetoxina ^f	16 / 18	7 / 20	2 / 18	-26 (36)	-45 (8)	-35 (5)	0,98608	0,5	2,0
Sulfametazina ⁱ	7 / 19	14 / 9	4 / 11	24 (12)	19 (16)	40 (37)	0,99632	1,0	3,0
Sulfametoxazol ^f	1 / 25	9 / 22	6 / 7	-12 (32)	-26 (33)	8 (77)	0,99312	0,1	0,5
Sulfapiridina ^e	12 / 6	15 / 18	7 / 11	16 (24)	28 (24)	61 (19)	0,99101	0,07	0,2
Temazepam ^h	4 / 11	7 / 9	5 / 4	-15 (24)	-20 (14)	-9 (5)	0,99793	0,02	0,08
Trimetoprima ^e	10 / 18	13 / 12	3 / 7	-21 (11)	-46 (5)	-14 (19)	0,99773	0,08	0,2
Ácido valsartánico ^f	5 / 17	5 / 19	4 / 9	52 (15)	42 (13)	36 (18)	0,99530	0,06	0,2
Valsartan ^d	11 / 7	3 / 12	1 / 21	24 (14)	48 (14)	28 (20)	0,99697	0,4	1,0
Venlafaxina ^f	11 / 17	8 / 8	2 / 8	-21 (20)	-53 (7)	-39 (3)	0,99604	0,2	0,8
Verapamilo ^h	2 / 10	5 / 6	14 / 18	-77 (6)	-52 (10)	-55 (2)	0,99214	0,1	0,4
Warfarina ^d	5 / 11	6 / 10	0 / 10	-49 (9)	-65 (5)	-40 (7)	0,99605	0,06	0,2
Zolpidem ^f	15 / 13	6 / 7	1 / 5	-43 (9)	-45 (8)	-30 (5)	0,99251	0,06	0,2

A. RSD % intra. = RSD intra-día; RSD % inter. = RSD inter-día

B. Efecto matriz calculado como el porcentaje de la relación entre el área del pico del fármaco enriquecido en el extracto de la matriz y el área del pico del fármaco enriquecido en disolvente.

C. LOD = Limite de detección, LOQ = Limite de cuantificación.

ILIS para propósitos de cuantificación ^a = Acetaminofén-d4, ^b = Carbamazepina-d10, ^c = Codeína-d3, ^d = Bezafibrato-d4, ^e = Trimetoprima-d3, ^f = Venlafaxina-d6, ^g = Lorazepam-d4, ^h = Diazepam-d5, ⁱ = Fenofibrato-d6, ^j = Sulfametazina-d4, ^k = Lamotrigina-13C3, ^l = Metoprolol-d7.

La inclusión de un paso de limpieza promueve la eliminación de los componentes no deseados en los extractos. En el caso del Z-Sep, los extractos finales son más limpios de los componentes de lípidos y grasas de la muestra y más susceptibles de ser analizados por LC-MS. Los efectos de la matriz se compensaron con una curva de calibración de ajuste de la matriz, y se añadieron doce ILIS a las curvas de calibración y a las muestras (véase la *Tabla 18* y la *Tabla 19*). La sensibilidad del método se evaluó calculando el LOD y el LOQ como se explicó en la sección 3.4.1. Las curvas de calibración proporcionaron una respuesta lineal en el rango de concentración con un coeficiente de correlación de r^2 superior a 0,99; excepto para el ácido mefenámico (0,98672) y la sulfadimetoxina (0,98608). Los LOD fueron en su mayoría inferiores a 0,3 ng/g de pez, salvo unos pocos compuestos que presentaron LOD en el rango de 0,3-1,0 ng/g de pez (acetaminofén, clorpromazina, metoprolol, sulfadimetoxina, sulfametazina y valsartán).

Este estudio es comparable con otros estudios publicados anteriormente sobre métodos de cuantificación de fármacos validados en matrices de músculos o plasma de peces, como los que se muestran en la *Tabla 20* ^{142, 151, 257, 263-264}. Como se puede observar, la cantidad de matriz utilizada es similar. Pero se encuentran mejoras en los volúmenes de disolvente utilizados, incluyendo los pasos de extracción y purificación, donde se observan casos de consumo de disolvente de hasta 200 mL por muestra, como en el caso de la cromatografía de permeación en gel, GPC.

El presente método desarrollado, puede caracterizarse por el bajo consumo de disolventes, siendo un método muy ecológico y de bajo costo. Otra diferencia significativa con los métodos comparados, es el número de fármacos validados. Vale la pena aclarar que los datos presentados en la *Tabla 20* se refieren exclusivamente a fármacos, ya que en el caso de ²⁶⁴ el número de analitos objetivo es mayor debido a la inclusión de plaguicidas, metabolitos y otros contaminantes. Igualmente, los datos presentados en la *Tabla 20* se refieren a matrices similares a la del método validado, ya que se encuentran casos en los que se ha validado más de una matriz ^{142, 151, 264}.

Tabla 20. Comparación características método 2 con otros métodos reportados en la literatura para la determinación de fármacos en peces.

Autores	Poirier Larabie et al. ²⁶³	Mijangos et al. ²⁶⁴	Arnnok et al. ¹⁵¹	Huerta et al. ¹⁴²	Peña-Herrera et al. ²⁶⁵
Muestra de pez	0,1 μ L	0,5 (dw)	0,5 (dw)	1,0	1,0 (dw)
Matriz	plasma	Músculo	Músculo	Pez homogenizado	Músculo
Método de extracción	SPE	Ultrasonido focalizado	ultrasonido	PLE	QuEChERS
Vol disolvente (mL)	5*	7	10	4 cycles 5 min	9**
Purificación	N.R.	SPE	2 g alúmina + SPE	GPC	EMR lipid removal
# fármacos Validados	7	22	24	20	21
Niveles validacion ng/g	3, 30 y 60 ng/mL	25, 100	10, 100 (dw)	20, 100	25, 200, 500 (dw)
LOD ng/g	N.R.	0,4-16	0,01-19 (dw)	0,01-0,4	0,5- 91 (dw)
LOQ ng/g	1-2 ng/mL	N.R.	0,04-61 (dw)	0,04- 1,4	1,8-303 (dw)
Recuperación %	94 a 111 %	80-118 (Ap.R.)	33-114	28-126	10-139 (Ab.R.)
MS	QqQ	QqQ	QqQ	QqQ	Q-TOF
Efecto matriz (%)	15-73	N.R.	N.R.	4-(-86)	113-(-89)

Ab.R.: Recuperación absoluta; Ap.R.: Recuperación aparente; dw: peso seco. GPC: cromatografía de permeación en gel ó cromatografía de exclusión molecular. N.R.: no reportado; PLE: Extracción con líquidos presurizados; SPE: Extracción en fase sólida;. *Volumen incluye acondicionamiento del cartucho y elución; **Volumen incluye hidratación de la muestra (9 mL H₂O) y extracción (10 mL MeCN).

Los métodos reportados en la *Tabla 20* se validaron hasta 24 fármacos, mientras que en el presente estudio fueron validados el doble de compuestos (47) a tres niveles diferentes de concentración. Los valores de LOD, LOQ y efecto de la matriz son comparables a los rangos reportados en otros estudios. Sin embargo, es importante observar que la mayoría de las validaciones presentadas en la *tabla 20* son analizadas por instrumentos de baja resolución (QqQ), que presentan mayor sensibilidad y reproducibilidad.

Como ventaja, éste método también se desarrolló pensando en la posibilidad de realizar un análisis retrospectivo, debido a la adquisición de toda la información posible de los compuestos ionizables, como se explicó en la sección 3.4.2.

4.2.4 Análisis de compuestos diana en muestras de peces

El método validado se aplicó para el análisis de fármacos en 32 muestras de peces de 25 puntos de muestreo. Los compuestos objetivo trimetoprima, ketoprofeno, bezafibrato y claritromicina se detectaron en 1, 1, 3 y 9 muestras respectivamente, pero a niveles inferiores a su LOQ.

La mayoría de estas muestras procedían de los ríos Adige y Sava, mientras que una muestra del río Llobregat dio positivo para claritromicina. Además, se detectaron sulfapiridina y furazolidona en muestras del río Adige en concentraciones de hasta 10 y 49 ng/g de pez, respectivamente. Los fármacos detectados con mayor frecuencia fueron carbamazepina, diltiazem, verapamilo y cafeína, con concentraciones de hasta 13, 34, 35 y 69 ng/g de pez, respectivamente. En la *Tabla 21* se presenta un resumen de la detección positiva de fármacos en muestras de los peces de ríos analizados, agrupados de acuerdo a su origen.

Tabla 21. Concentraciones de fármacos detectados en muestras de peces.

Río	Muestra*	BEZ	CAF	CBZ	CLA	DTZ	FUR	KTP	SFP	TMP	VPM
	<i>C. g.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ	11	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ
	<i>L.c.</i>	<LOQ	15	<i>n.d.</i>	<LOQ	12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ
Adige	<i>S. t. f.</i>	<i>n.d.</i>	7,8– 19	<i>n.d.</i>	<LOQ	<LOQ– 7,2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	6,0– 9,7	<LOQ	<LOQ
	<i>S. t. m.</i>	<i>n.d.</i>	25	<i>n.d.</i>	<LOQ	3,0– 7,2	49	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ
	<i>T. t.</i>	<i>n.d.</i>	4,6	<i>n.d.</i>	<LOQ	3,2– 6,9	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ
Evrotas	<i>S. k.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ– 5,1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ
Llobregat	<i>B. b.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ
	<i>B. b.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,0– 5,3	<LOQ	<LOQ– 17	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	<i>E.</i>	<LOQ	<i>n.d.</i>	1,83	<i>n.d.</i>	10	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ
Sava	<i>L.c.</i>	<LOQ	32	<LOQ– 13	<LOQ	<LOQ– 34	<i>n.d.</i>	<LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ– 35
	<i>O. m.</i>	<i>n.d.</i>	69	1,7	<i>n.d.</i>	5,7	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ
	<i>S. l.</i>	<i>n.d.</i>	1,31	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ
	<i>S. t. f.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ	<i>n.d.</i>	<LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<LOQ

*Muestra: *B. b.*: *Barbus barbus*; *C. g.*: *Cottus gobio*; *E.*: *Esocidae*; *L.c.*: *Leuciscus cephalus*; *O. m.*: *Onchorhynchus mykiss*; *S. k.*: *Squalius keadicus*; *S. l.*: *Sander lucioperca*; *S. t. f.*: *Salmo trutta fario*; *S. t. m.*: *Salmo trutta marmoratus*; *T. t.*: *Thymallus thymallus*. BEZ: Bezafibrato; CAF: Cafeína; CBZ: Carbamazepina; CLA: Claritromicina; DTZ: Diltiazem; FUR: Furazolidona; KTP: Ketoprofeno; SFP: Sulfapiridina; TMP: Trimetoprima; VPM: Verapamilo; <LOQ: Debajo del límite de cuantificación; *n.d.*: no detectado.

A fin de aumentar el número de detecciones de analitos en muestras de peces, en la siguiente sección se presenta un análisis retrospectivo que se hizo con los datos adquiridos en las muestras de peces, mediante el análisis de compuestos sospechosos con la lista presentada en la *Tabla 7*.

4.2.5 Análisis de compuestos sospechosos en muestras de peces

Los datos del SWATH fueron analizados más a fondo de forma retrospectiva para ampliar la detección de nuevos compuestos no incluidos en el análisis de los compuestos diana. Para la identificación primaria, se seleccionaron de la base de datos instrumental, el ión precursor y los fragmentos más abundantes. Tras una cuidadosa evaluación de los picos seleccionados, fue posible alcanzar uno de los cinco niveles diferentes de identificación según los niveles propuestos por Schymanski y colaboradores ²²⁵ y que se explicaron en la introducción de esta tesis, *sección 1.6.8*

En la mayoría de los compuestos provisionales detectados por el análisis de sospechosos del presente estudio, se pudo alcanzar el nivel de confirmación 1, que consiste en la confirmación de la estructura propuesta utilizando el patrón de referencia con MS, MS/MS y la correspondiente información sobre el tiempo de retención. La secuencia completa de los pasos utilizados para la correcta identificación se informa en la *sección 3.4.2*. Los resultados de las detecciones de compuestos sospechosos encontrados en las muestras analizadas se presentan en la *Tabla 22*.

Tabla 22. Compuestos detectados por análisis de sospechosos en muestras de peces estudiadas

Compuesto detectado	Río	Muestra	Error masa (ppm)	Error masa fragmento (ppm)	Library Score	Formula Finder Score	RT	
Benzoylecgonina	Adige	C. g.	0,1	6,9	71,7	95,5	1,67	
		L.c.	0,4	3,2	60,1	92,8	1,67	
		S. t. f.	0,8	5,7	61,2	90,1	1,69	
		S. t. f.	-0,2	7,0	56,7	96,9	1,67	
		S. t. f.	0,6	3,4	74,8	92,6	1,68	
		S. t. m.	0,8	5,5	73,7	92,0	1,67	
	Sava	B. b.	0,9	7,3	62,2	91,3	1,67	
		L.c.	0,3	7,4	64,5	91,4	1,67	
		L.c.	0,3	4,9	61,1	96,3	1,67	
		O. m.	0,5	7,1	59,4	93,8	1,66	
Cocaína	Adige	S. t. m.	-0,3	7,9	96,1	91,1	2,56	
	Evrotas	S. k.	-0,3	9,3	93,2	91,8	2,57	
	Sava	B. b.	-0,7	9,9	95,9	89,8	2,55	
		L.c.	-0,3	10,0	96,0	92,1	2,56	
	Lovastatina	Adige	C. g.	-0,4	-4,6	94,7	85,2	8,74
S. t. m.			0,7	-1,7	94,6	85,6	8,73	
Evrotas		S. k.	-0,5	-0,6	68,5	91,7	8,74	
		L.c.	-1,5	-3,0	97,3	83,4	8,74	
		L.c.	1,0	-0,4	61,3	86,7	8,74	
		L.c.	-4,3	0,2	97,0	64,0	8,74	
		Sava	L.c.	-3,2	-0,6	93,5	72,6	8,74
			L.c.	-1,3	-2,1	61,7	83,8	8,73
		E.	-2,5	-1,5	88,0	79,8	8,74	
		S. l.	-0,7	-4,4	90,3	88,9	8,75	
Nicotina	Sava	E.	-0,1	-4,2	73,7	93,8	2,28	
Ofloxacina	Adige	L.c.	0,6	-1,0	98,3	89,8	1,99	
		S. t. f.	0,6	-0,5	86,0	93,3	2,00	
		S. t. f.	-0,8	-0,2	96,2	90,5	1,99	
		S. t. f.	0,2	1,9	89,4	95,7	1,98	
		S. t. m.	0,3	3,9	97,1	95,9	1,99	
		S. t. m.	1,0	-0,4	98,6	91,3	1,98	
	Sava	T. t.	-0,6	7,2	95,8	88,1	1,99	
		E.	0,4	0,6	96,9	92,5	1,99	
		L.c.	0,7	0,5	99,0	91,2	1,97	
		L.c.	-0,2	8,7	83,3	94,5	1,99	
L.c.	-0,4	-0,4	98,2	95,2	1,99			
S. t. f.	0,9	5,1	94,4	88,5	2,00			
Simvastatina	Adige	L.c.	-1,8	0,0	78,1	78,9	8,75	
		S. t. f.	-0,1	-1,6	95,5	89,1	8,74	
		S. t. f.	-1,0	-3,9	87,3	81,8	8,75	
		S. t. f.	-2,1	-2,9	98,6	74,9	8,75	
		S. t. f.	-4,1	0,4	88,6	64,7	8,74	
		S. t. m.	-2,7	-2,3	89,5	73,7	8,75	
		T. t.	-2,7	-1,7	93,5	68,5	8,75	
	Evrotas	S. k.	-0,1	0,4	69,5	94,7	8,74	
	Sava	B. b.	1,8	1,0	74,3	84,4	8,73	
		E.	-2,5	-0,5	88,4	80,0	8,74	
L.c.		-0,2	-0,4	85,8	92,8	8,74		
L.c.	-0,4	-0,3	88,9	91,4	8,73			

L.c.	-2,8	0,6	63,3	74,9	8,74
L.c.	-0,1	1,2	96,8	92,6	8,74
L.c.	-0,9	0,4	92,2	88,0	8,74
L.c.	-1,5	-1,1	77,9	80,3	8,73
O. m.	0,0	0,9	88,3	97,3	8,73
S. t. f	-0,3	-1,0	92,1	86,0	8,74

*Muestra: B. b.: *Barbus barbus*; C. g.: *Cottus gobio*; E.: *Esocidae*; L.c.: *Leuciscus cephalus*; O. m.: *Onchorhynchus mykiss*; S. k.: *Squalius keadicus*; S. l.: *Sander lucioperca*; S. t. f.: *Salmo trutta fario*; S. t. m.: *Salmo trutta marmoratus*; T. t.: *Thymallus thymallus*.

Tras el análisis retrospectivo, se identificaron provisionalmente seis sustancias con una coincidencia positiva en la biblioteca MS/MS, una similitud cromatográfica entre las muestras, así como un RT razonable: cocaína (droga estimulante ilícita), benzoilecgonina (principal metabolito de la cocaína), nicotina (estimulante), ofloxacina (antibiótico), lovastatina y simvastatina (agentes modificadores de los lípidos). El error de masa de los compuestos anteriores fue ≤ 1 ppm en la adquisición completa de TOF-MS, excepto para la lovastatina y la simvastatina que presentaron un error de masa ≤ 5 ppm. Sin embargo, tras un análisis cuidadoso de cada espectro, la lovastatina y la simvastatina fueron rechazadas sobre la base de que el RT o la MS/MS no coincidían o simplemente debido a la ausencia de pruebas que apoyaran su presencia, como se discute a continuación.

➤ *Identificación de cocaína*

La identificación de la cocaína se confirmó en cuatro muestras de los ríos Adige, Evrotas y Sava. La masa exacta encajó con la distribución isotópica teórica generando la fórmula $C_{17}H_{21}NO_4$ con una puntuación asociada de 91,1 % y un error de masa de 0,3 ppm (*Figura 18*). El valor de ajuste (*fit value*) presentó valores por encima del 96 %. El TOF-MS y el TOF-MS/MS resultaron muy intensos y libres de interferencias de coelución, permitiendo la identificación de los principales iones de la cocaína (304,1542; 82,0649 y 182,1167). El RT de la cocaína se confirmó utilizando un estándar analítico para una comprobación positiva de este compuesto hasta el nivel 1 de confianza ²²⁵. En la *Figura 18* se presenta un ejemplo de los cromatogramas y los espectros de masas en una de las muestras detectadas.

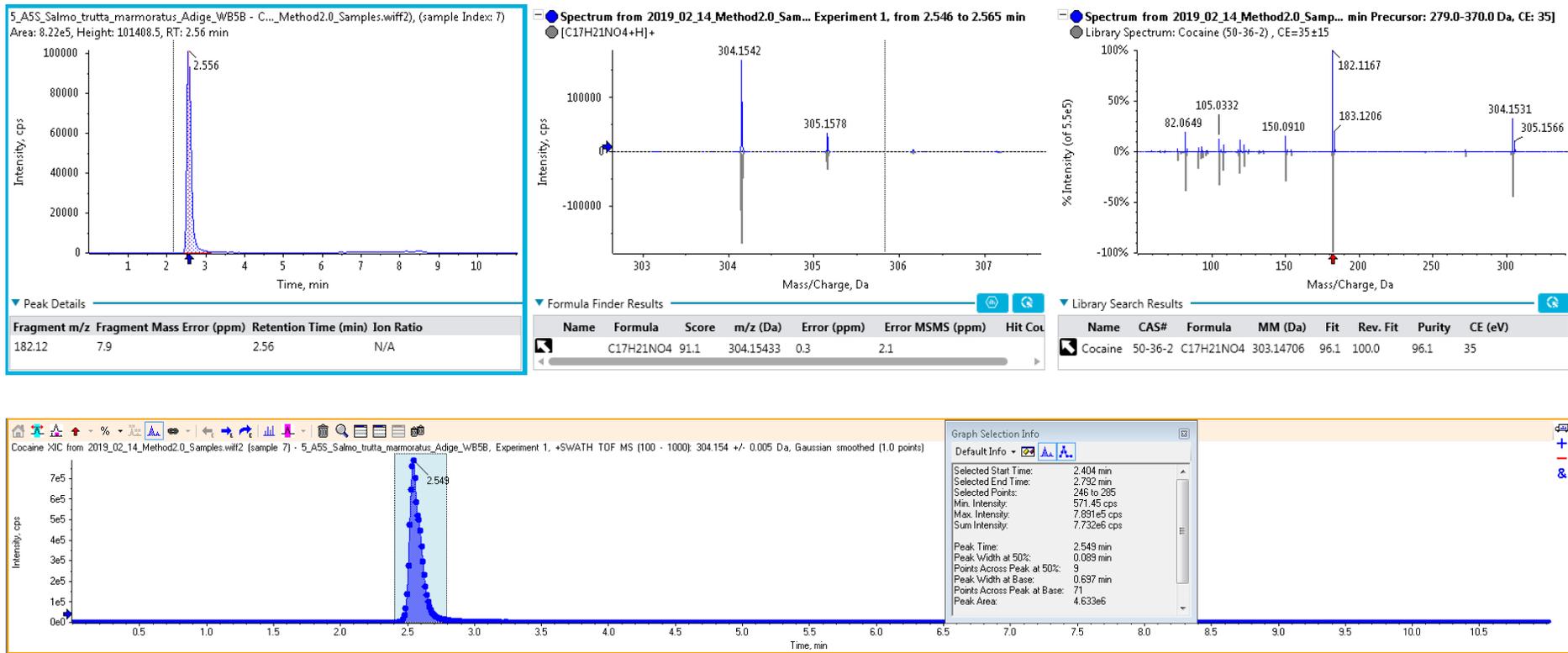


Figura 18. Ejemplo de cromatograma, TOF-MS y TOF-MS/MS para la determinación de cocaína por análisis de sospechosos.

➤ *Identificación de benzoilecgonina*

La identificación de la benzoilecgonina, el principal metabolito de la cocaína, se confirmó con una puntuación del buscador de fórmulas >90 % en las muestras positivas, así como la predicción de la fragmentación, los picos explicados y la similitud espectral exacta (*Figura 19*). Posteriormente, la puntuación de la biblioteca presentó variaciones entre el 59 y el 75 %. Los principales iones m/z confirmados para este metabolito fueron 105,0336; 168,1020 y el ión precursor 290,1389. Según el análisis retrospectivo, este metabolito estaba presente en diez muestras del río Adige y Sava. De manera similar a la cocaína, la RT se confirmó con un estándar analítico que alcanzó el nivel 1 de confirmación ²²⁵. En la *Figura 19* se presenta un ejemplo de los cromatogramas y los espectros de masas de éste compuesto.

➤ *Identificación de nicotina*

La nicotina es un compuesto perteneciente a la familia de los estimulantes y es muy común en el medio ambiente. Sólo una muestra del río Sava dio positivo a esta sustancia. Su identificación coincidió con una puntuación y un resultado del formula finder score del 73 % y el 94 %, respectivamente. La nicotina se identificó y confirmó en el nivel 1 de confianza utilizando el patrón de referencia para RT ²²⁵, con la masa del precursor 163,1229 y los principales iones de masa de fragmentos 117,0578 y 163,1230.

➤ *Identificación de ofloxacina*

La ofloxacina pertenece a la familia de las fluoroquinolonas utilizadas como medicamentos. Este antibiótico se determinó en 12 muestras diferentes de los ríos Adige y Sava, presentando valores muy altos de puntuación en el library score (>83 %) y formula finder score (>88 %), en todas las muestras positivas. Para la identificación de la ofloxacina, se siguió el ión precursor 362,1512 y tres iones fragmentos principales 261,1033, 318,1613 y 344,1420. El RT de este fármaco también se confirmó positivamente con el patrón de referencia analítico.

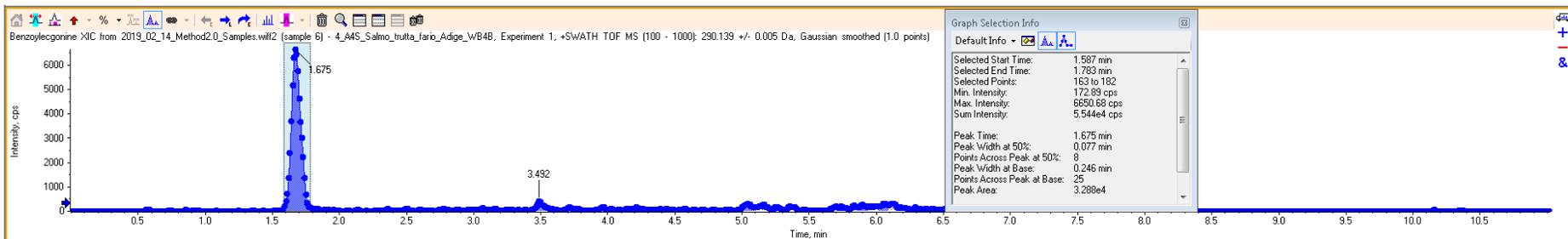
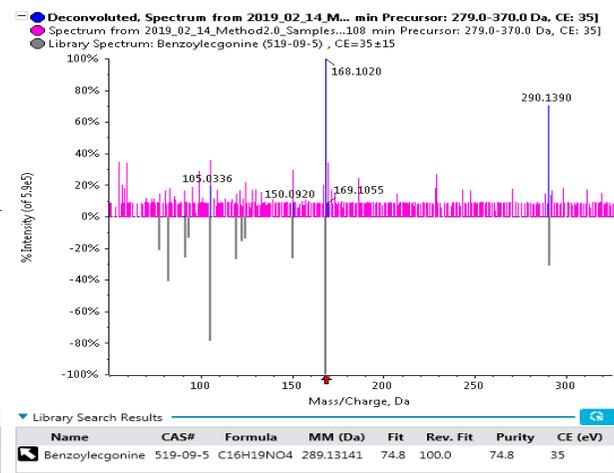
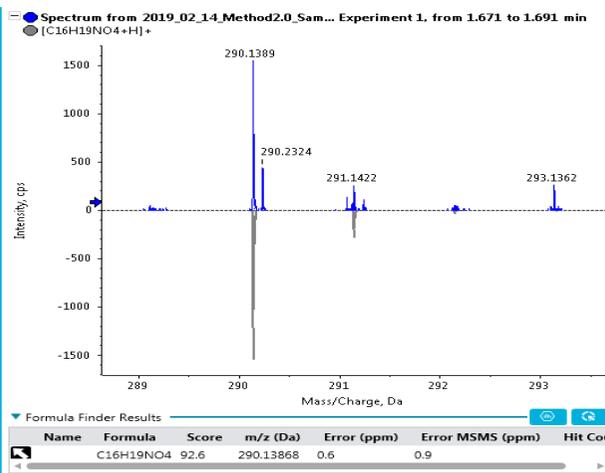
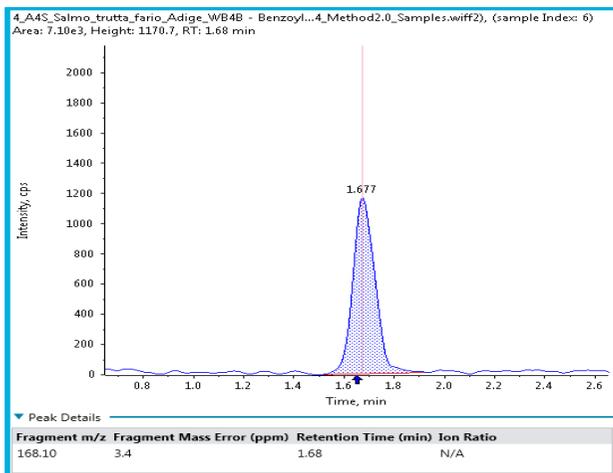


Figura 19. Ejemplo de cromatograma, TOF-MS y TOF-MS/MS para la determinación de benzoilecgonina por análisis de sospechosos.

➤ *Identificación falso-positiva de lovastatina y simvastatina*

Estos dos compuestos presentan una estructura muy similar que sólo se diferencia por un grupo metilo. Como resultado, el patrón de fragmentación es muy similar en ambos casos y los iones resultantes son los mismos (199,148; 285,204 y 225,1634). Esta fué la razón por la que se identificaron ambos compuestos simultáneamente y, como primera aproximación, estos dos agentes modificadores de los lípidos se detectaron inicialmente de manera positiva en 11 y 18 muestras para la lovastatina y la simvastatina, respectivamente. Los iones precursores fueron 405,2635 y 419,2792 para lovastatina y simvastatina, respectivamente y la intensidad fue de alrededor de 10000 cps. Los valores de la biblioteca y la puntuación de la fórmula fueron superiores al 63 % en el peor de los casos. Sin embargo, una cuidadosa inspección manual de los espectros demostró que el perfil de las moléculas detectadas por la análisis de sospechosos no coincide con el perfil mostrado en la biblioteca.

Sin embargo, ambos compuestos detectados presentaban un valor de ajuste (o library score value) superior a 50, pero en ningún caso el valor de ajuste inverso (reverse fit value) era superior a 50. Además, cuando se abrió la sesión de ChemSpider, se mostró una lista de más de 300 compuestos sugeridos con el mismo m/z que coinciden con la fórmula seleccionada, de acuerdo con el número de citas proporcionadas por PubMed.

Sin embargo, el perfil de MS/MS obtenido es más similar a un compuesto lineal típico, en lugar de las estructuras de los fármacos propuestos. En este caso, aunque todos los parámetros de la configuración superan el valor mínimo (excepto el valor de ajuste inverso), las estructuras parecen no ser las propuestas en la lista de selección de sospechosos. En este caso, evaluamos esos compuestos como una detección de falso positivo. Algunas imágenes de los espectros de la lovastatina y la simvastatina están presentes en las *Figuras 20 y 21*.

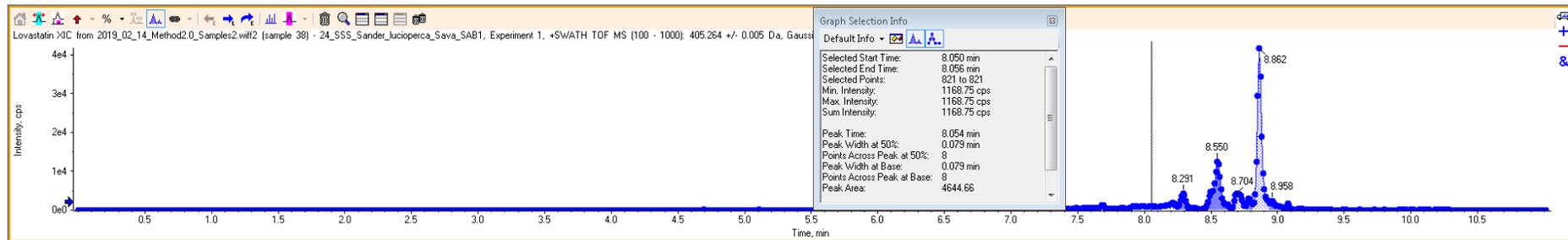
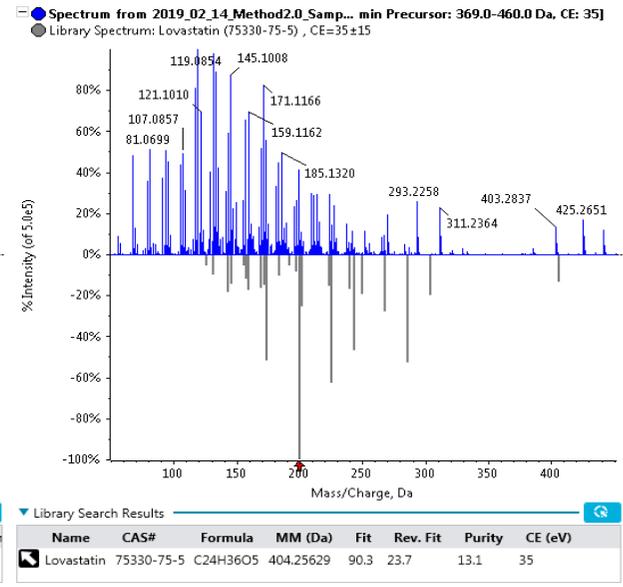
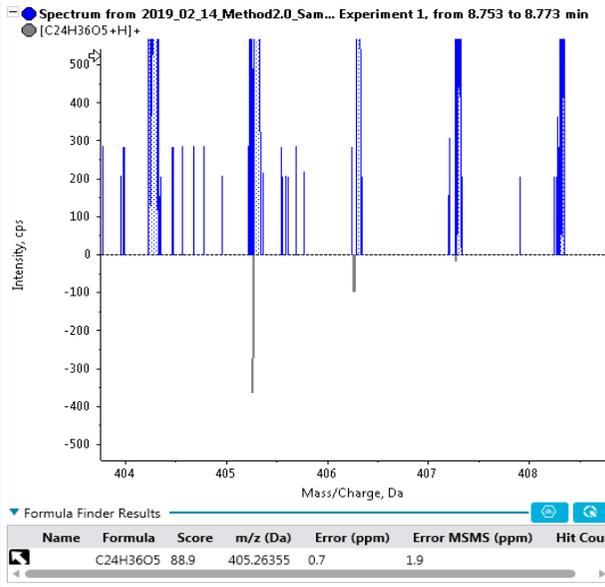
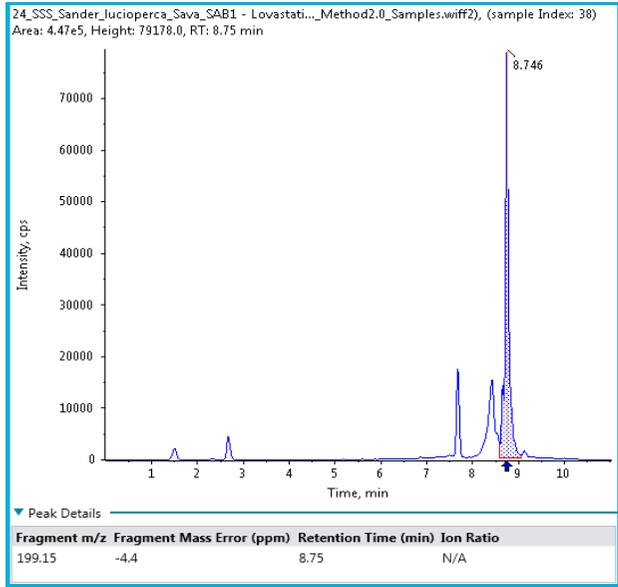


Figura 20. Ejemplo de cromatograma, TOF-MS y TOF-MS/MS para la determinación de falso positivo de lovastatina por análisis de sospechosos.

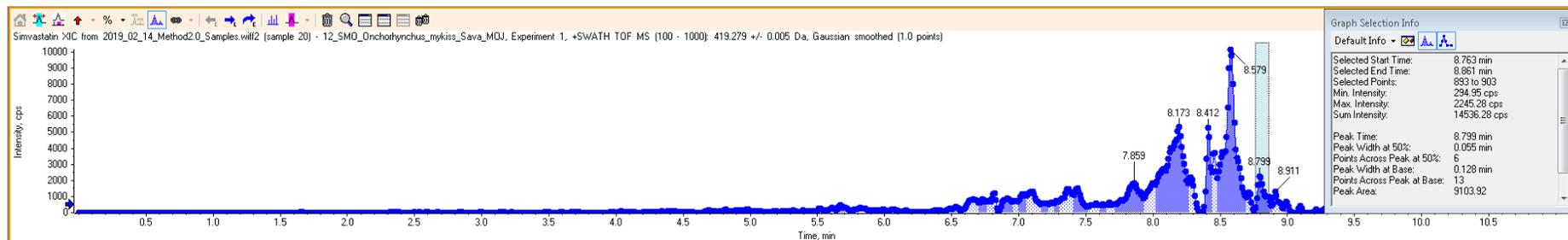
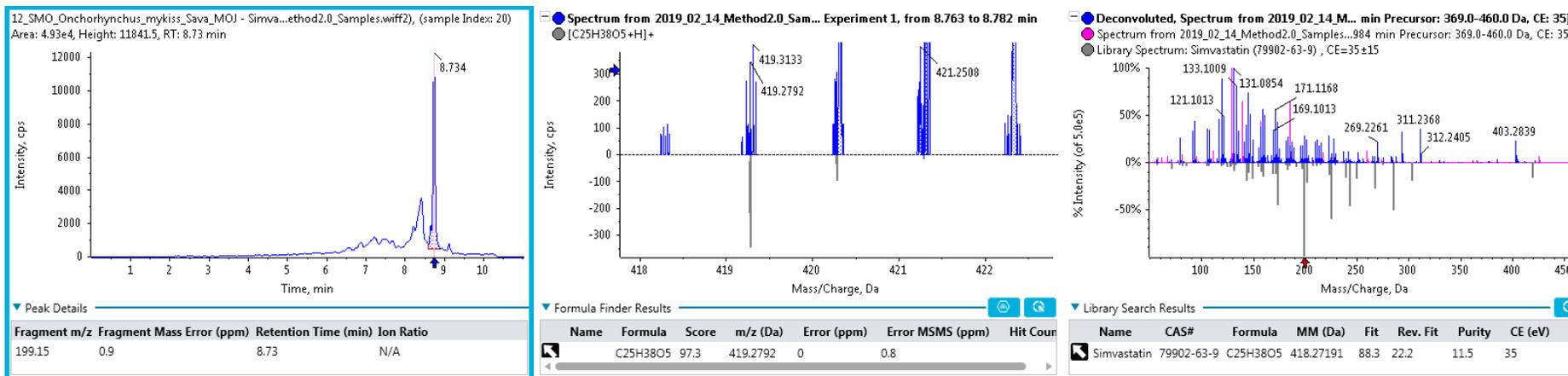


Figura 21. Ejemplo de cromatograma, TOF-MS y TOF-MS/MS para la determinación de falso positivo de simvastatina por análisis de sospechosos.

En resumen, el análisis de fármacos en muestras de peces es muy útil para comprender la transferencia de masa y las diferentes implicaciones consiguientes que pueden tener como resultado del contacto prolongado de los peces con los contaminantes de los ríos afectados. Por ejemplo, en el río Adige, En el caso del río Adige, las principales actividades contaminantes están relacionadas con los efectos de los hidrocarburos, las actividades agrícolas y los contaminantes acumulados en los glaciares ²²⁹. En el caso del río Evrotas. es importante destacar que el principal impacto de la contaminación en el río, son las actividades agrícolas incluyendo los residuos agrícolas e industriales y la sobreexplotación del agua para el riego ²²⁹. De hecho, estudios sobre el mismo río reportaron la presencia de 11 de los 62 fármacos investigados en muestras de agua de los mismos puntos de muestreo de los peces del presente estudio. En particular, los valores más altos se encontraron para sotalol, carbamazepina y trimetoprima, respectivamente por debajo de 10 ng/L, y ketoprofeno alrededor de 40 ng/L en el punto de muestreo de la WWTP (cerca de un vertedero de aguas residuales) ²⁵⁶. De la misma manera, en el río Llobregat se ha notificado la presencia de al menos 63 compuestos farmacéuticos. Las concentraciones más altas fueron para el diclofenaco, el acetaminofén, el lorazepam y el sulfametoxazol en concentraciones de hasta 250 ng/L ⁸⁹. Por último, en el río Sava se han notificado fármacos como el ibuprofeno, el naproxeno, el ketoprofeno, el diclofenaco y la carbamazepina en las proximidades de las descargas de efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales ³.

4.3 Comparación entre los dos métodos analíticos desarrollados para el análisis de fármacos en muestras de peces

Se desarrollaron dos métodos analíticos que se presentaron anteriormente y que van a ser discutidos y comparados a lo largo de esta sección. El primer método analítico buscaba la incursión de la tecnología QuEChERS al análisis de fármacos en muestras de peces. Inicialmente, este tipo de extracción se desarrolló para el análisis de pesticidas en diferentes matrices como frutas y vegetales, que posteriormente se fue ampliando a otras familias de compuestos como los fármacos ²³³ y otras matrices como las lombrices de tierra ²⁶⁶, y los bivalvos ²⁶⁷.

Esta técnica se desarrolló hace aproximadamente 15 años y se ha venido popularizando cada vez más a medida que pasa el tiempo. Para algunos investigadores, este tipo de extracción no es algo novedoso y simplemente es una extracción o partición sólido/líquido y con una limpieza usando sorbentes que anteriormente ya se habían utilizado, pero la mayoría de veces en formato de cartucho (SPE). Sin embargo, el éxito de esta metodología, radicó en varios puntos: (i) en la aplicación de las dos técnicas combinadas con un resultado en la extracción de analitos muy alta a bajos niveles de concentración, muy útil y revolucionario para el análisis

de contaminantes (ii) el bajo costo del proceso y (iii) la rapidez para poder hacer la extracción sin equipos especializados²⁶⁸. A partir de las primeras publicaciones del uso de éste método, se han publicado varios métodos modificados en revistas científicas, hasta el punto que dos de las versiones de QuEChERS son hoy en día, métodos oficiales de organizaciones internacionales de análisis de estándares para la determinación de residuos de pesticidas en frutas y vegetales²⁶⁹⁻²⁷⁰

El interés de implementar esta técnica en el análisis de fármacos, se basa en buscar un método que sea rápido, eficiente, de alguna manera flexible por la variabilidad de especies de peces que se pretendían estudiar, y que no requiriera de equipos adicionales costosos. La extracción por QuEChERS, también es flexible por el amplio rango de pH a los que se puede trabajar para favorecer la extracción de algunos compuestos, por las diferentes matrices con las que se ha implementado, y porque no suele ser una técnica muy agresiva durante el proceso de extracción, es decir, que no involucra técnicas como el ultrasonido, o alta presión y/o alta temperatura. Las técnicas más fuertes o agresivas, pueden realizar extracciones de más componentes de la matriz que en último término afectan el análisis final. Es por eso que, durante el desarrollo de la primera técnica analítica validada, se compararon dos técnicas de extracción: Ultrasonidos, y QuEChERS. Adicionalmente, con cada una de estas técnicas, se evaluaron diferentes parámetros como por ejemplo los disolventes (para el caso de ultrasonido) y las sales extractoras (para el caso de los QuEChERS). Entre los disolventes evaluados se encuentran MeOH; MeCN y una mezcla 1:1 MeOH:MeCN. En el caso de los QuEChERS, disolvente de extracción más utilizado es MeCN de acuerdo a la metodología estandarizada, aunque en sus inicios, también se evaluó la posibilidad de extracción con acetona y acetato de etilo, ya que eran los disolventes más usados durante el análisis multiresiduo de pesticidas^{248, 268}. El MeCN presenta ventajas durante el proceso de extracción, como por ejemplo la capacidad de extraer compuestos con un amplio rango de polaridades por encima de los otros dos disolventes evaluados, también la alta miscibilidad con el agua, lo que le permite una alta compatibilidad y penetración con y en la fase acuosa, y eso también permite una fácil separación de las fases por el efecto de *salting-out*. Un punto importante y que también repercute en el hecho de porqué se ha escogido este método de extracción, está en la extracción de material lipofílico, como las grasas y fosfolípidos. Usando MeCN, la extracción de este tipo de material es inferior comparado con otros evaluados (ej. MeOH). Por otro lado, el MeCN presenta algunas desventajas cuando es usado como solvente de extracción, por ejemplo el costo, y la toxicidad^{248, 268}.

Otro de los parámetros que se evaluó durante el desarrollo del método, fue el proceso de purificación del extracto. Una vez escogido cual era la mejor técnica de extracción, se procedió

a escoger el mejor método de purificación de muestra, sobretodo enfocado a la reducción de material lipídico y grasas. Para ello, durante el desarrollo de los métodos se utilizó una matriz de *Salmo Salar* (salmón), matriz conocida por contener un alto porcentaje de grasa, determinado experimentalmente en 36 % ²⁶⁵.

La validación de los métodos analíticos desarrollados se basó en los parámetros aplicados en la literatura científica al momento de reportar validaciones de métodos: recuperación de analitos, efecto matriz, LOD, LOQ, repetibilidad y linealidad de la respuesta. Estos parámetros son los que se han tenido en cuenta para las validaciones de métodos en matrices sólidas, vegetales, peces y en general usando determinaciones por LCMS ^{142, 159, 191-192, 231-233}.

Como se observa en la *Tabla 23*, el primer método analítico contó con la validación de 21 fármacos en matrices de dos especies diferentes de peces. La validación de dos tipos de matrices estaba relacionada con la variabilidad de especímenes a la que se ha hecho referencia en ocasiones anteriores. Aunque la purificación de los extractos busca eliminar la mayor cantidad de componentes extraídos de la matriz y dejar el extracto con los analitos de interés, siempre quedan sustancias disueltas que pueden interferir en los análisis. Además de la purificación del extracto, otra de las maneras en que se puede reducir el efecto matriz, es realizando una curva de calibración sobre la misma matriz de interés a analizar, procedimiento conocido como *matrix matched standard* (estándar compatible o ajustado a la matriz) usando el método de estándar interno ¹⁸¹. Para ello se hicieron curvas de calibración y validaciones completas en los dos tipos de matrices trabajadas: *Salmo Salar* y *Squalius keadicus*. Este método permitió recuperaciones absolutas por encima del 50 % para la mayoría de los compuestos validados con dispersiones de repetibilidades por debajo del 20 %. Es un método que en general es muy rápido, en su mayoría económico, con requerimiento de material muy simple y disponible en cada laboratorio.

Tabla 23. Resumen de características principales de los métodos analíticos validados

	QuEChERS + EMR	ultrasonido + ZSep/C18
Cantidad de muestra (g)	1,0 - seco-liofilizado	0,5 - fresco
Volumen de solvente (mL)	19,0	1,0
Solvente de extracción	9,0 mL de agua 10,0 mL MeCN	1,0 mL MeCN / iPrOH (3:1) + 0,1 % HCOOH
Adición de surrogates	5	12
Extracción	QuEChERS	ultrasonido
Purificación	EMR	ZSep/C18
Volumen extracto a purificar (mL)	Paso 1: 5,0 de agua + 5,0 de extracto Paso 2: 5,0 del paso 1	0,75
Volumen extraído de la purificación (mL)	2,0	0,5
Volumen reconstitución (mL)	1,0	0,5
Tiempo cromatografía (min)	9,0	11,0
Flujo cromatográfico (mL/min)	0,4	0,8
Compuestos validados	21	47
Niveles de Validación (ng/g pez)	25, 200, 500	5, 25, 50
Análisis de sospechosos	No	Si. Lista 253 fármacos extras
Matrices Validadas	2	1
Tiempo preparación 1 muestra (aprox en min)	30	35
Eficiencia LC-MS/MS análisis (compuestos/hora)	140	256

Usando QuEChERS, la extracción de grasas fue inferior (13-18 % en peso fresco) comparada con la técnica de ultrasonido (29-36 % peso fresco), sobretodo porque la técnica de ultrasonido, tenía variación de solventes (MeOH y MeCN). Como se explicó en la discusión de resultados del método 1, los solventes alcohólicos son más eficientes a la hora de la extracción de grasa, comparada con la extracción en MeCN. Es por ello, por ejemplo, que algunos procedimientos para realizar purificación de extractos, como los cartuchos HLB prime, no cumplen su función, si el extracto se encuentra con 30 % o más de contenido alcohólico.

Adicional al proceso de extracción, en el primer método, se realizó la purificación del extracto por medio del adsorbente de EMR lipid removal, comercializado por Agilent. Este tipo de

purificación en formato d-SPE actúa bajo el principio de exclusión por tamaño e interacciones hidrofóbicas para interactuar con las sustancias que tienen largas cadenas lipofílicas ²⁷¹.

Sin embargo, este primer método desarrollado posteriormente fue re-evaluado debido al interés de realizar análisis de la distribución de los fármacos órganos de los peces. Teniendo en cuenta que los órganos internos de los peces pueden no alcanzar 1,0 g de matriz en peso seco, se trabajó en el desarrollo de un método con menor cantidad inicial de matriz. Adicional a eso, se buscaron mejorar las características del método incluyendo más compuestos para el análisis direccionado y aprovechar las características de la espectrometría de masas de alta resolución para realizar análisis cualitativo con una lista de fármacos de los que no se tenía patrón de referencia comercial.

Es por ello que en este segundo trabajo se validaron 47 fármacos (más del doble del primer trabajo), donde también se duplicó el número ILIS (5 ILIS en el primer método, Vs. 12 en el segundo). La inclusión de ILIS en los métodos de validación van a corregir las deficiencias o errores que se puedan dar a lo largo del desarrollo del método durante el análisis. En la validación del método se escogió cuantificar cada compuesto con un ILIS de características similares al fármaco en cuestión. Esto no descarta la posibilidad de ir incluyendo nuevos ILIS al método de cuantificación sin tener que modificar las condiciones del mismo. El uso de ILIS tiene ventajas en el momento del análisis, ya que se tiene la certeza de que estos compuestos no se encuentran en las muestras a analizar, y que además van a tener tiempos de retención muy similares al compuesto patrón, sin embargo, su utilización dentro de un método de análisis también indica un aumento considerable en el costo del método, ya los patrones isotópicamente marcados se caracterizan por su alto costo.

En cuanto a los niveles de validación trabajados en el segundo método, se escogieron niveles de concentración más reales a los encontrados ambientalmente (5, 25 y 50 ng de fármaco/g de pez), e igualmente se hicieron optimizaciones para las mejoras de las determinaciones. En la *Tabla 1* y *Tabla 2* que se presentan en la introducción de la tesis, se observan que las concentraciones que se han detectado en los peces son más bajas de los niveles validados en el primer método de análisis, es por ello que, durante el desarrollo del segundo método, este fue un parámetro que se tuvo en cuenta y se establecieron concentraciones más bajas para la validación. Sin embargo, no se descarta que, a futuro, los niveles de concentración que se puedan detectar en la biota aumenten y sobrepasen el máximo nivel validado en el método dos, lo que repercutiría en realizar modificaciones durante la extracción o una dilución del extracto final.

En el segundo método desarrollado, también se varió la cantidad de matriz utilizada para las determinaciones y, por ende, el tipo de extracción. Se modificó el volumen de extracción, y con la experiencia adquirida durante el desarrollo del primer trabajo, se requería probar otros tipos de sustancias para realizar la purificación del extracto y mejorar las determinaciones a los nuevos niveles de trabajo. Finalmente se hizo una lista de más de 250 compuestos sospechosos para ser incluida en el método y ser analizada por *suspect screening*.

Como se observa en la sección 4.2 y en la *Tabla 23*, éste segundo método de determinación de fármacos permite el análisis de los compuestos validados con menos de la mitad de muestra pesada en el análisis realizado en el primer trabajo desarrollado (1,0 g peso seco en el primer trabajo Vs. 0,5 g peso fresco en el segundo trabajo) y con un volumen de solventes mucho menor (19 mL en el primer trabajo Vs. 1 mL en el segundo trabajo). Los parámetros validados fueron exactamente los mismos en los dos trabajos desarrollados de acuerdo a la literatura reportada anteriormente. En el segundo trabajo publicado, se realizó la extracción con ultrasonido. Este tipo de extracciones se caracteriza también por ser una extracción amigable con el medio ambiente, tiene poco consumo de energía, es versátil (se puede combinar con otras técnicas de extracción) y se usa también para procesos de limpieza y homogenización²⁷². La purificación del extracto se realizó usando adsorbentes de sales de dióxido de zirconio y C18 que trabajan bajo interacciones tipo ácido/base de Lewis. Este tipo de limpieza de extracto, comercializado por Sigma Aldrich, también viene en formato d-SPE pero solo consiste en un único paso, y se recomienda para matrices con porcentaje de grasa superior al 15 %²⁷³.

En el caso del segundo método desarrollado, solo se realizó la validación con una matriz, pero se obtuvieron recuperaciones entre el 60 y 130 % para la mayoría de los compuestos, con valores de reproducibilidad por debajo del 20 %, con excelente respuesta lineal, y buenos LOD entre 0,4 y 3,3 ng de compuesto / g de pez. Otra característica que se puede comparar entre los dos métodos es el tiempo empleado a la hora de preparar las muestras, en promedio 30 minutos para una muestra. Cabe destacar que, durante un análisis, normalmente no se prepara una sola muestra, por lo que los tiempos se pueden optimizar mucho más, y el preparar 10 muestras puede ser reducido a una hora (60 minutos) y no a 300 minutos (30 minutos x 10 muestras), ya que los tiempos de ultrasonido, de centrifugación, y evaporización pueden ser compartidos. De la misma manera, los tiempos de la separación cromatográfica también están muy similares. Ya para terminar las comparaciones se puede decir que la eficiencia de los métodos son muy diferentes, de acuerdo al número de compuestos que se podrían analizar por hora, ya que a pesar de que el primer método tiene

una preparación de muestra más rápida, y una cromatografía más corta, el número de compuestos analizados por muestra y por hora es muy inferior al segundo método validado.

La separación cromatográfica con la que se llevaron a cabo los análisis en la presente tesis doctoral, fue por medio de un equipo UPLC ExionLC™ AD system de SCIEX, que soporta presiones hasta 18000 psi (libras por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés; *pounds-force per square inch*). Durante el desarrollo de los métodos, también se hicieron optimizaciones de la parte instrumental. Se hicieron variaciones en gradientes, en flujos de trabajo y en tiempos totales de cromatografía para tratar de obtener una separación cromatográfica adecuada y tener al mismo tiempo, suficientes puntos por picos haciendo uso de una columna kinetex EVO-C18 comercializada por Phenomenex. En la *Figura 28*, se presentan algunos resultados de las variaciones en los gradientes cromatográficos durante la optimización de los parámetros de análisis del equipo que se hicieron para el segundo método validado.

Como se puede observar en la *Figura 22* la variación del porcentaje de solvente orgánico va afectando la separación de los fármacos en la columna cromatográfica. Se realizaron diferentes pruebas para poder obtener una separación adecuada de los compuestos en un tiempo reducido. La cromatografía final escogida es la realizada con el perfil F en la *Figura 22* (*encerrada en el recuadro rojo oscuro*), ya que permite una buena separación de los compuestos, distribuido a lo largo del tiempo de análisis y con menor superposición de compuestos eluidos.

El análisis de espectrometría de masas fue realizado con el equipo QTOF X500R de SCIEX. En la introducción de la tesis, *sección 1.6.6*, se presentaron las características de este equipo siendo su velocidad de adquisición de datos, una de las características más relevantes y que puede ser usada favorablemente al momento de hacer adquisiciones con SWATH. Éste método de adquisición presentó algunas ventajas en el momento de la realización de los métodos validados, por ejemplo, el ahorro de tiempo, ya que no se requirió optimizar cada uno de los compuestos para poder hacer un seguimiento de los iones, como se debe hacer al momento de realizar el análisis con equipos de baja resolución. Aprovechando las ventajas de la alta resolución, y la adquisición de full scan, seguido de las ventanas de adquisición de fragmentación secuencial, se podrían realizar trabajos de cuantificación tanto con los iones moleculares, como con los iones fragmentos. Esta es una característica que se puede aprovechar de acuerdo a la intensidad que tengan los respectivos iones. De esta manera se pueden tener rangos lineales más amplios y alcanzar mejores sensibilidades, de acuerdo a la intensidad de cada ión.

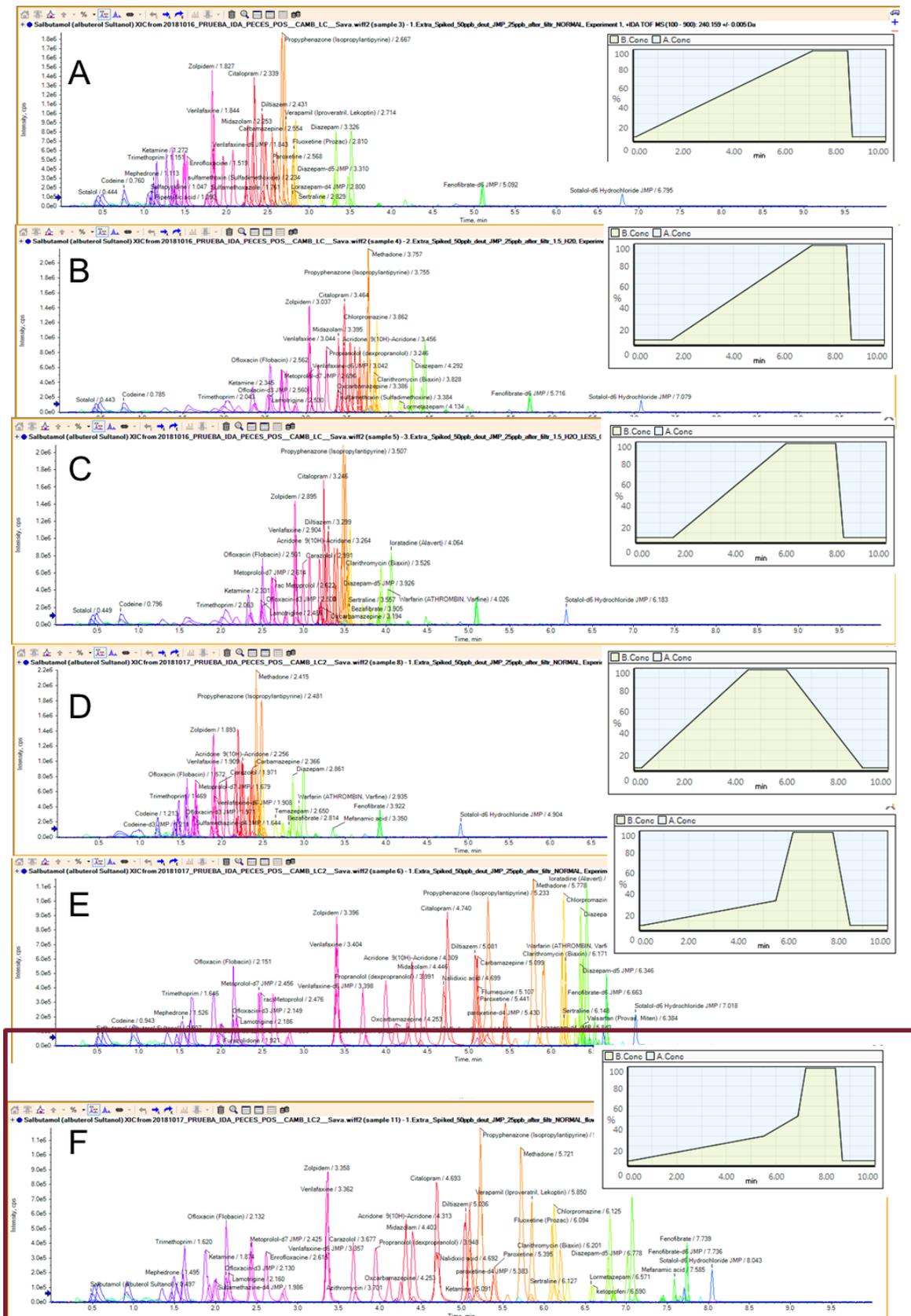


Figura 22. Resultados de optimizaciones durante separación cromatográfica
 La separación cromatográfica de los fármacos se ve afectada según cambian las condiciones de elución de los solventes. En el recuadro de la parte derecha se presenta el perfil de elución. Sobre la línea en color azul claro, % de agua + 0,1 % HCOOH; debajo de la línea en color amarillo claro, % de MeCN 0,1 % HCOOH.

Otra de las ventajas de la adquisición con SWATH está en la adquisición permanente de todas las especies que se ionizan en la muestra, y que como ya se ha explicado anteriormente, esto permitió hacer análisis retrospectivo de las muestras mediante *suspect screening*. La lista que se genera para hacer este tipo de análisis, es flexible. Se puede aumentar cuanto se quiera y permite hacer análisis futuros en busca de contaminantes que hoy en día no se tienen en cuenta, y que posiblemente ya se encuentren afectando la biota, o para buscar otro tipo de compuestos, no precisamente contaminantes, pero por ejemplo metabolitos, proteínas o péptidos. Sin embargo, para poder llevar a cabo análisis del nivel de metabolómica o proteómica también se requiere el soporte de otro tipo de herramientas que ayuden a confirmar los compuestos, incluso más allá de las que se han nombrado en esta memoria: la base de datos instrumental, la conexión con la base de datos ChemSpider, y la biblioteca NIST ²²⁰.

Debido a que los dos métodos desarrollados fueron probados con muestras naturales, tomadas de diferentes ríos y con determinación de fármacos a distintos niveles, en la *Tabla 24* se presenta una comparación con algunos métodos publicados en la literatura científica y que se presentaron en la sección 1.6.7 (*Tabla 2*) donde también se hicieron detecciones de fármacos en peces por HRMS. En la *Tabla 24*, se comparan cuáles de los fármacos detectados en dichos estudios, fueron tenidos en cuenta en el desarrollo de los trabajos que se publicaron durante el desarrollo de ésta tesis doctoral. Se observa que con el desarrollo del primer método, entran 9 de los 32 fármacos detectados en los estudios anteriores (28 %), mientras que el segundo método desarrollado cubre 28 de los 32 compuestos detectados (87,5 %) en todos los estudios presentados, juntando detección por análisis cuantitativo y cualitativo.

Esto permite demostrar que el segundo método desarrollado puede cubrir un amplio rango de compuestos que se han reportado anteriormente en la literatura, adicionalmente, la inclusión de la lista de compuestos sospechosos, con su flexibilidad, permite la adición de compuesto a futuro sin afectar los parámetros ya validados para el componente de cuantificación.

Tabla 24. Detección de fármacos en peces homogenizado o músculo de pez por HRMS (complemento Tabla 2). Validaciones y detecciones hechas en diferentes estudios y comparación de validación con los trabajos realizados en esta tesis doctoral.

Fármaco detectado	Matriz	Ref.	Estudios Peña-Herrera et al.		
			QuEChERS ²⁶⁵		ultrasonido
			Target	Target	Suspect
Amitriptilina	H	169			X
Bumetanida	H	169			X
Cafeína	H	173		X	
Carbamazepina	H	169	X	X	
Citalopram	M	155			X
Claritromicina	M	155	X	X	

Fármaco detectado	Matriz	Ref.	Estudios Peña-Herrera et al.		
			QuEChERS ²⁶⁵		ultrasonido
			Target	Target	Suspect
Clomipramina	M	88			X
Clomipramina	H	169			X
Clopamida	H	169			X
Diclocloverina (diciclomina)	H	169			X
Flumequina	H	169		X	
Haloperidol	M	88			X
Indometacina	H	169	X		X
Levomepromazina (metotrimeprazina)	M	88			X
Lidocaina	H	169			X
Loperamida	H	169			X
Mirtazapina	M	88			X
Naproxeno	H	169			X
N-desmetil-citalopram	M	155			X
(Acetaminofen)	H	173	X	X	
(Acetaminofen)	H	169	X	X	
Pefloxacina	H	169			
Sertralina	M	155	X	X	
Sulfadimetoxina	H	169		X	
Terbinafina	M	155			X
Tramadol	M	88			X
Tramadol	H	169			X
Trimetoprima	H	169	X	X	
Tripolidina	H	169			X
Venlafaxina	M	155	X	X	
Venlafaxina	M	88	X	X	

H: homogenizado; M: Músculo

Un análisis más detallado de los compuestos con los que se trabajaron durante el desarrollo de los métodos puede indicar el amplio rango de masas que se han validado, desde compuestos muy ligeros como el acetaminofén con masa molecular alrededor de 150 Da hasta compuestos grandes y voluminosos como la claritromicina con masa molecular alrededor de 750 Da.

Otro aspecto que también habla de la versatilidad de los métodos desarrollados se refiere al amplio número de familias que se han tenido en cuenta durante el desarrollo de los métodos. Como ya se había explicado durante la introducción general (sección 1.6.1), hay estudios que se enfocan exclusivamente a una sola familia de compuestos. En este caso, se trabajaron 9 familias en el primer método y 13 familias de compuestos en el segundo método. Esta diversidad de familias, permitiría la inclusión de nuevos compuestos en el método multiresiduo para complementarlo, como puede ser en el caso de los compuestos que se detecten con más frecuencia por análisis cualitativo, se podrían validar y de una vez ser incluirlos en el método de cuantificación. Si el compuesto es detectado por medio del análisis cualitativo, ya se tiene la seguridad de que el compuesto es extraído, y es detectado por el método validado.

Solo se requeriría controlar sus niveles de recuperación, reproducibilidad, linealidad y efecto matriz.

Una vez realizada la validación de los dos métodos y la comparación entre los mismos, se ha procedido a aplicar el segundo método validado en el análisis de la distribución de fármacos en el interior del organismo de los peces.

4.4 Estudio de la distribución de fármacos en el organismo de los peces

A lo largo de esta tesis doctoral ya se han descrito ampliamente algunos casos de acumulación de los productos farmacéuticos en peces, y los efectos que se producen en dichos organismos. También se ha hablado acerca de estudios de la distribución de los fármacos en el interior de los peces, sin embargo, el estudio de la presencia y efectos de los fármacos en la biota tiene que profundizarse. Por ejemplo, aún no se han evaluado los efectos de los fármacos en peces de manera independiente, o ante la presencia de un *cocktail* de fármacos que pueden entrar al pez, debido a que la interacción entre sustancias químicas, en muchos casos, son impredecibles ^{22, 107, 132-134, 274}.

Debido a los pocos estudios que hay en torno a la distribución de fármacos en peces, capturados en ríos europeos, se optó en esta tesis por la realización de un estudio extensivo de la evaluación de la distribución de fármacos en el interior de los peces del río Llobregat (Cataluña, España). Para ello, se realizó un muestreo a principios de mayo del año 2019 en este río, donde se colectaron peces de 4 especies diferentes presentes en la parte baja del río: *Anguilla anguilla*, *Chelon ramada*, *Cyprinus carpio* y *Luciobarbus graellsii* y también se colectó agua para el análisis de los fármacos en agua. Se escogió la parte baja del río Llobregat porque presenta una alta actividad antropogénica con sus más de tres millones de habitantes viviendo en las cercanías del Llobregat. Además, las plantas de tratamiento de las aguas residuales de los alrededores de Barcelona, descargan sus efluentes sobre esta zona del río (92 % de los 137 Hm³/año) ⁸⁹, es por ello que ya se han reportado una gran cantidad de contaminantes de interés en el mismo. En nuestro grupo de investigación se han realizado múltiples estudios en el río Llobregat y su relación con los compuestos farmacéuticos con trabajos de proyectos tanto a nivel nacional como internacional ^{26-27, 89-90, 105, 275-279}.

En las siguientes secciones, se hace el análisis y estudio de la distribución de los fármacos en el agua del río Llobregat y en los órganos, tejidos y fluidos de los peces que fueron diseccionados en el laboratorio: agallas, bilis (si estaba presente), cerebro, corazón, hígado, músculo, páncreas, piel, y riñón. El tratamiento de las muestras ya fue explicado en ella sección 4.2.5.

Inicialmente se presentarán todos los resultados obtenidos de este estudio, tanto en agua como en cada uno de los órganos, tejidos y fluidos de cada una de las especies de peces, durante el análisis cuantitativo y cualitativo, y posteriormente se hace una discusión amplia acerca de los resultados obtenidos.

➤ *Resultados del análisis cuantitativo de fármacos en muestras agua*

Los resultados del análisis de fármacos en dirigido en las muestras de agua, se presentan en la *Figura 23*. En total se detectaron 27 de los 47 fármacos estudiados en un rango entre 4 y 2500 ng/L. Entre los fármacos que se encuentran en mayor concentración están la cafeína, metoprolol, sotalol y valsartan con concentraciones entre los 1500 y 2500 ng/L. Mientras que compuestos como el midazolam, propifenazona, y la sertralina, fueron detectados con concentraciones por debajo de los 10 ng/L.

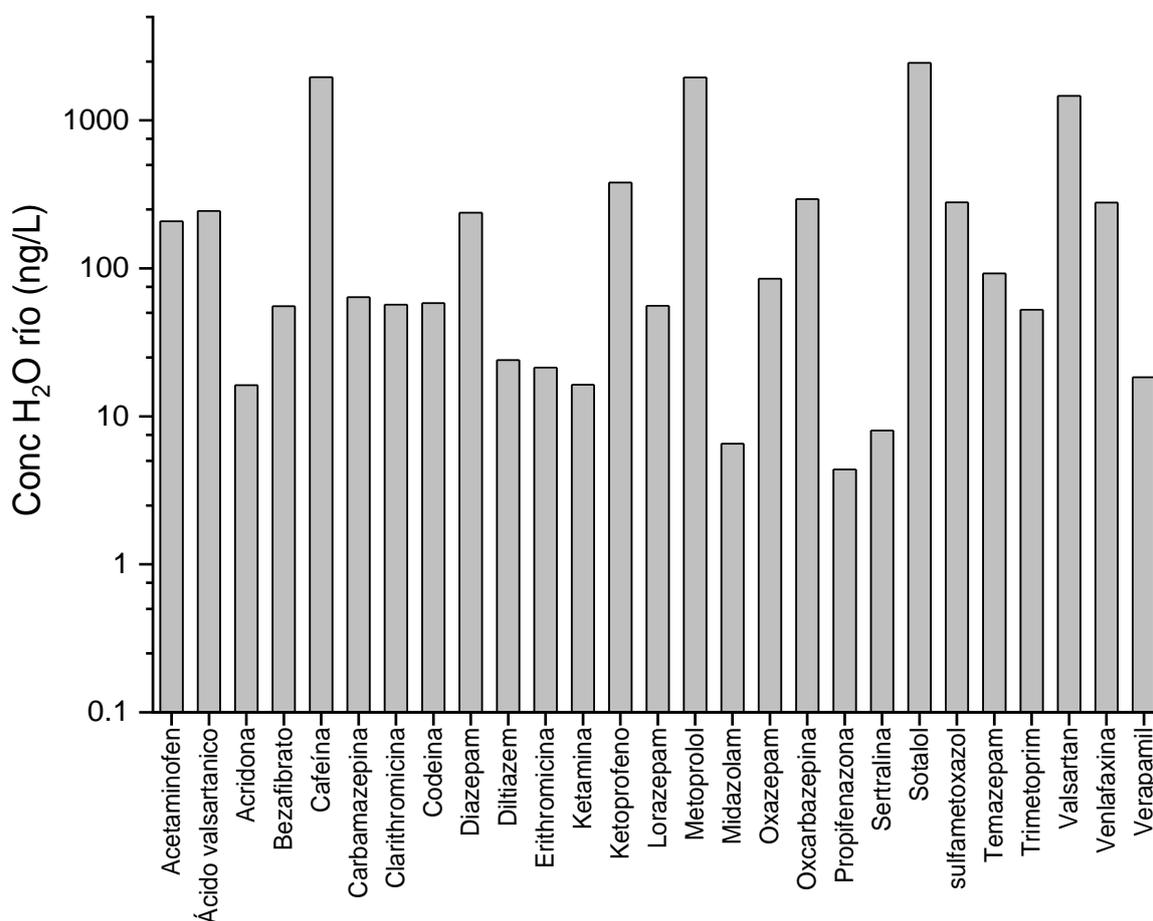


Figura 23. Concentración fármacos en agua del río Llobregat.

➤ *Resultados del análisis cuantitativo de fármacos en los órganos, tejidos y fluidos de los peces*

En las *Figuras 24-27* muestran los promedios de las concentraciones de los fármacos para cada una de las especies de peces analizadas. Como información complementaria, las *Tablas 25-28* describen el rango de concentración de cada uno de los fármacos detectados en cada órgano de los peces y la frecuencia de detección.

En la especie *Anguilla anguilla* (*Figura 24, Tabla 25*) se detectaron 9 fármacos. La máxima concentración fue calculada para la acridona en bilis (432 ng/mL). Éste fue el único producto de transformación que se encontró en la bilis de cualquiera de las especies analizadas, estando presente en la bilis de las 3 muestras analizadas de la *Anguilla anguilla*. De manera similar, en el corazón y el músculo, se encontró solamente un fármaco durante la cuantificación. Contrariamente, la sertralina se encontró con mayor frecuencia entre los tejidos analizados (esto fué una constante para todas las especies), aunque no se detectó ni en el plasma sanguíneo, ni en la bilis. La sertralina fue el fármaco que se encontró más concentrado en los riñones (hasta 144 ng/g de riñón) estando presente en los 3 individuos analizados. En el caso del plasma de la *Anguilla anguilla*, no se detectó ninguno de los fármacos analizados de manera direccionada.

En la especie *Chelon ramada* fué donde más compuestos se han detectado (*Figura 25, Tabla 26*) con un total de 11 fármacos, entre los que sobresalen el diltiazem, la sertralina y la venlafaxina, por estar presente en mayor cantidad de tejidos (6, 9, y 9 respectivamente). Además, la sertralina fue el compuesto que se detectó con mayor concentración (1604 ng/g) en el páncreas, seguido por el hígado (1236 ng/g). En el caso de esta especie, en todos los tejidos analizados (excepto en la bilis) se detectan por lo menos dos fármacos diferentes.

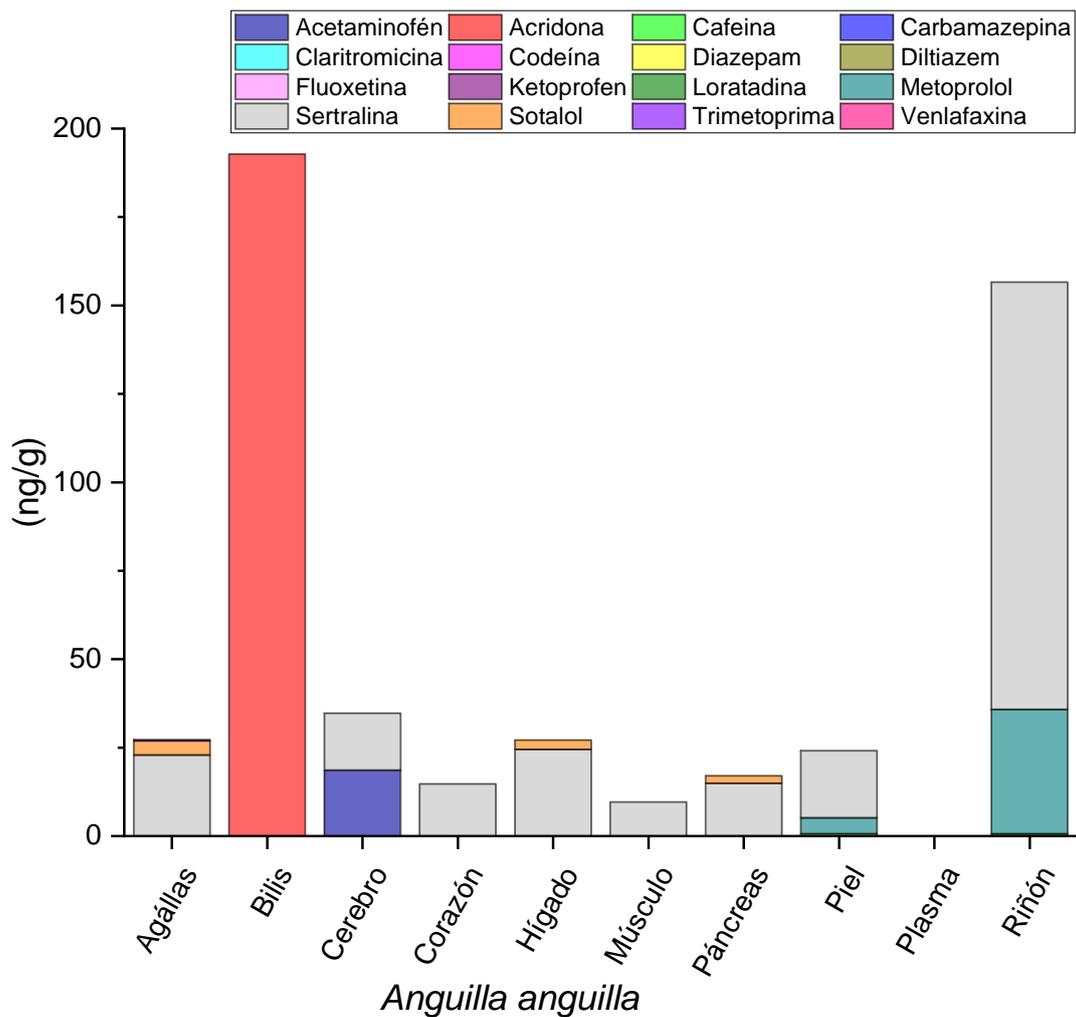


Figura 24. Concentración promedio de los fármacos detectados en órganos de la especie *Anguilla anguilla* del río Llobregat.

Tabla 25. Cuantificación de fármacos en órganos *Anguilla anguilla*.

Concentración en ng /g (frecuencia de detección).											
Fármaco	Log K _{ow}	Agallas	Bilis*	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Páncreas	Piel	Plasma*	Riñón
Acetaminofén	0,46	ND	ND	55,7 (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acridona		ND	64-432 (3/3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diazepam	2,82	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2 (1/3)	ND	ND
Diltiazem	2,70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2 (1/3)
Metoprolol	1,88	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14 (1/3)	ND	105 (1/3)
Sertralina	5,29	69 (1/3)	ND	13-35 (2/3)	3-26 (3/3)	6-63 (3/3)	11-18 (2/3)	8-24 (3/3)	9-24 (3/3)	ND	94-144 (3/3)
Sotalol		3-9 (2/3)	ND	ND	ND	8 (2/3)	ND	3 (2/3)	<LOQ (1/3)	ND	ND
Trimetoprima	0,91	1 (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Venlafaxina	3,20	<LOQ (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* concentración en ng/mL.

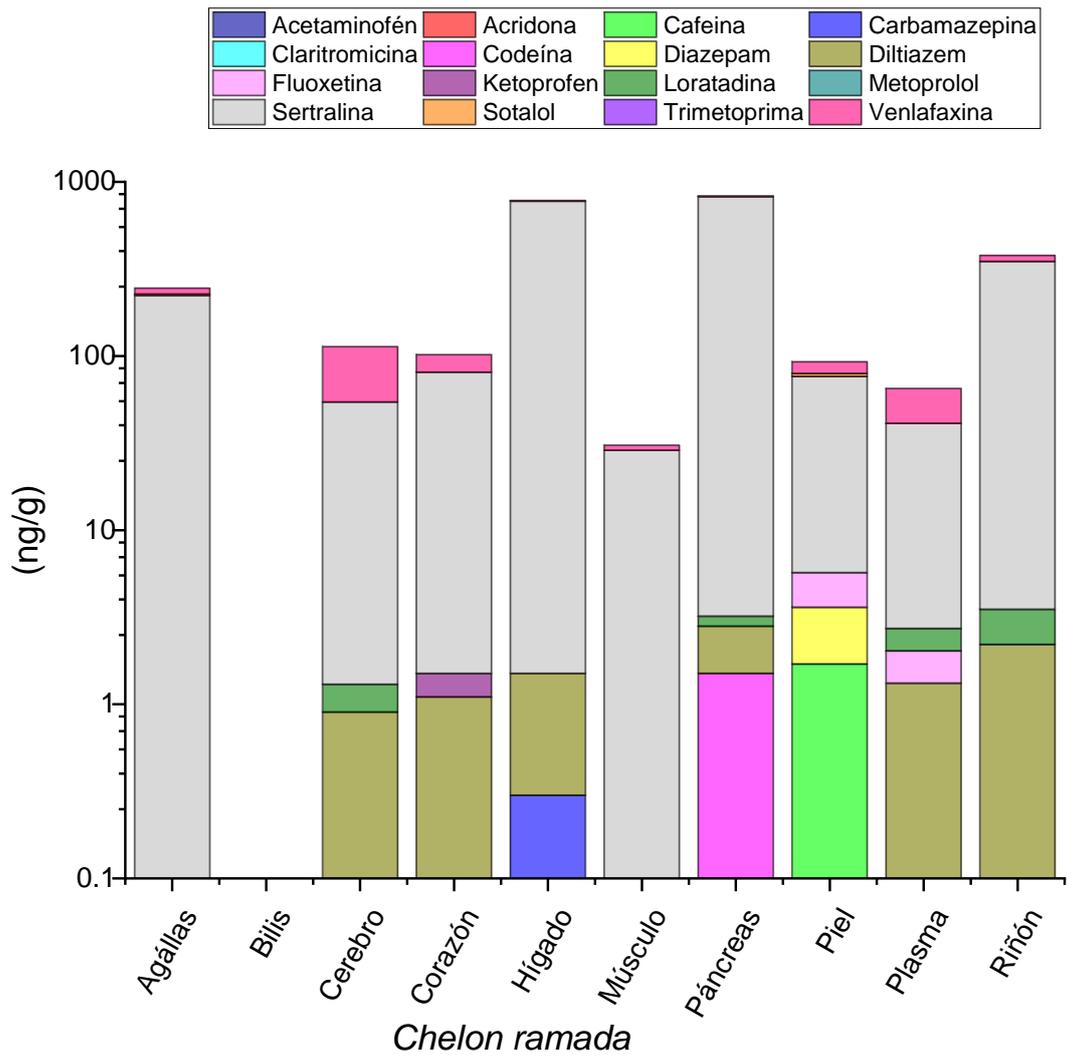


Figura 25. Concentración promedio de los fármacos detectados en órganos de la especie *Chelon ramada* del río Llobregat.

Tabla 26. Cuantificación de fármacos en órganos *Chelon ramada*.

Fármaco	Log K _{ow}	Concentración en ng /g (frecuencia de detección)									
		Agallas	Bilis*	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Páncreas	Piel	Plasma*	Riñón
Cafeína	0,07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5 (1/3)	ND	ND
Carbamazepina	2,45	ND	ND	ND	ND	1 (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND
Clartitromicina	3,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LOQ (1/3)	ND	ND	ND
Codeína	1,19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2 (2/3)	ND	<LOQ (2/3)	ND
Diazepam	2,82	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3 (2/3)	ND	ND
Diltiazem	2,70	ND	ND	1 (2/3)	1-2 (2/3)	3 (1/3)	ND	4 (1/3)	ND	1 (3/3)	3 (2/3)
Fluoxetina	1,22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6 (1/3)	2 (1/3)	ND
Loratadina		ND	ND	1 (1/3)	1 (1/3)	ND	ND	1 (1/3)	ND	1 (3/3)	1-3 (2/3)
Sertralina	5,29	220-447 (2/3)	ND	2-135 (3/3)	21-143 (3/3)	348-1236 (3/3)	35-51 (2/3)	24-1604 (3/3)	8-106 (3/3)	4-72 (3/3)	44-598 (3/3)
Sotalol		13 (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4-5 (2/3)	<LOQ (2/3)	ND
Venlafaxina	3,20	56 (1/3)	ND	23-153 (2/3)	15-49 (2/3)	21 (1/3)	6 (1/3)	33 (1/3)	13-27 (2/3)	28-44 (2/3)	33-54 (2/3)

* concentración en ng/mL.

De la especie *Cyprinus carpio* (Figura 26, Tabla 27) se detectaron en total 10 fármacos, siendo la segunda especie con mayor detección de fármacos dentro del estudio. Y al igual que en todas las especies estudiadas, la sertralina fue el compuesto más detectado presente en todos los tejidos, excepto en la bilis. También es el compuesto que se detecta en mayor concentración, en éste caso en el páncreas (igual que en el *Chelon ramada*) con 1165 ng/g de tejido. También se debe tener en cuenta, que la sertralina es el único compuesto que se encuentra en el músculo y en el plasma sanguíneo con concentraciones hasta de 87 ng/g y 33 ng/mL respectivamente. Por el contrario, en la bilis no se detecta ningún compuesto farmacéutico.

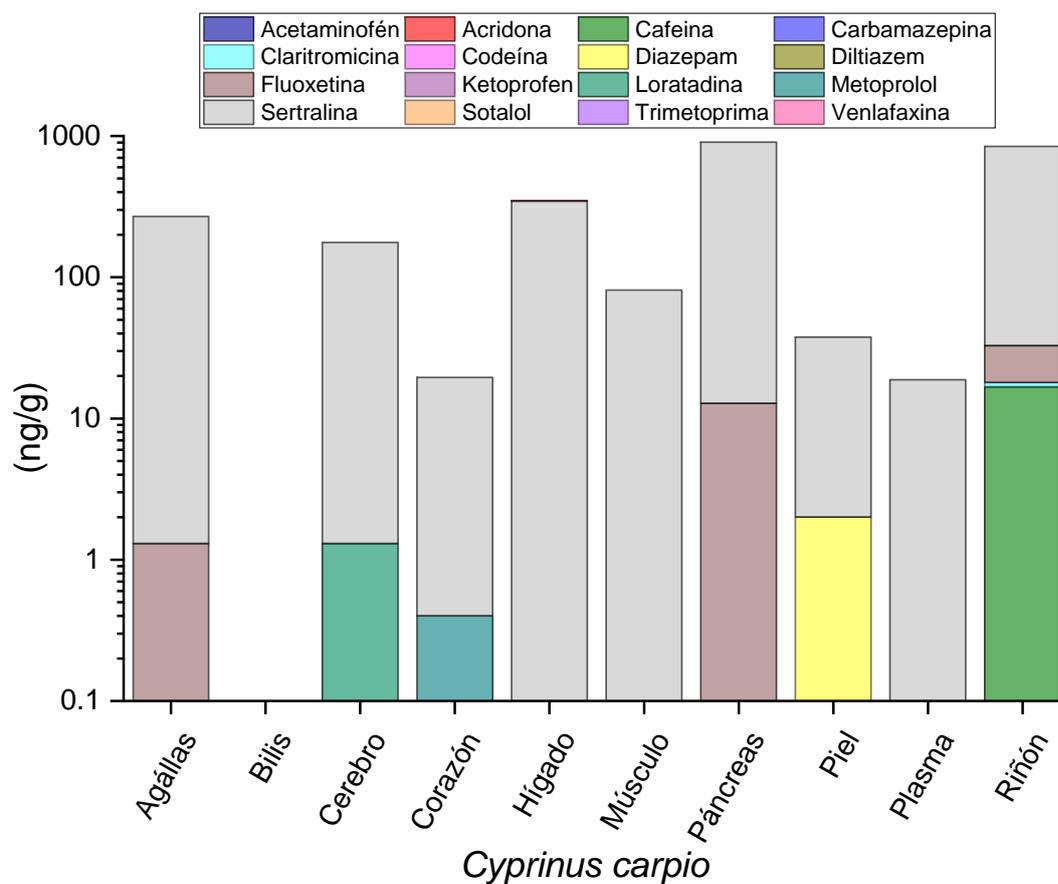


Figura 26. Concentración promedio de los fármacos detectados en órganos de la especie *Cyprinus carpio* del río Llobregat.

Tabla 27. Cuantificación de fármacos en órganos *Cyprinus carpio*.

Concentración en ng/g (frecuencia de detección)											
Fármaco	Log K _{ow}	Agallas	Bilis*	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Páncreas	Piel	Plasma*	Riñón
Cafeína	0,07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50 (1/3)
Clartitromicina	3,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4 (1/3)
Diazepam	2,82	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2-4 (2/3)	ND	ND
Fluoxetina	1,22	4 (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND	38 (1/3)	ND	ND	21-23 (2/3)
Loratadina		ND	ND	1-3 (2/3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metoprolol		ND	ND	ND	1 (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sertralina	5,29	257-289 (3/3)	ND	54-385 (3/3)	6-27 (3/3)	75-655 (3/3)	78-87 (3/3)	498-1165 (3/3)	12-64 (3/3)	23-33 (2/3)	606-957 (3/3)
Sotalol		ND	ND	ND	ND	5 (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND
Trimetoprima	0,91	ND	ND	ND	<LOQ (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Venlafaxina	3,20	ND	ND	ND	ND	3 (1/3)	ND	ND	ND	ND	ND

* concentración en ng/mL

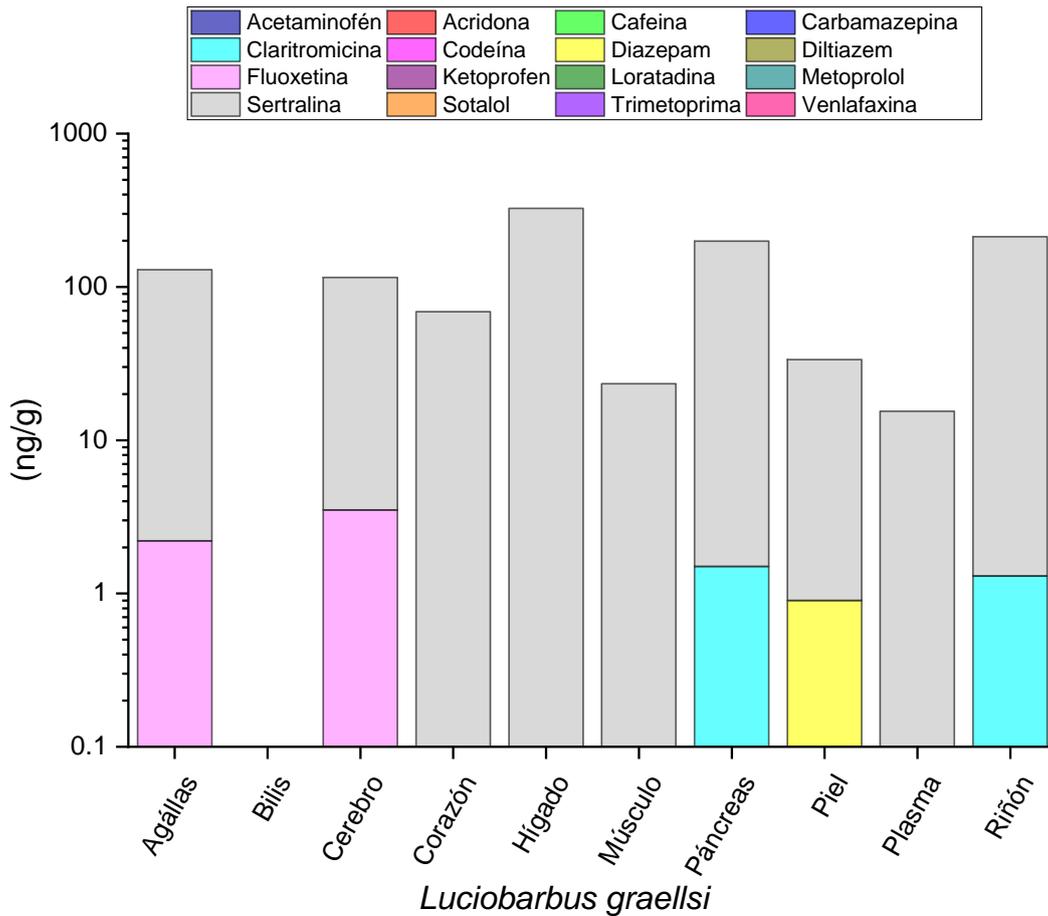


Figura 27. Concentración promedio de los fármacos detectados en órganos de la especie *Luciobarbus graellsii* del río Llobregat

Finalmente, la última especie analizada fué la *Luciobarbus graellsii*. En esta especie fue donde menos fármacos se detectaron al interior de los peces (Figura 27, Tabla 28). Igual que en la mayoría de los casos anteriores, la sertralina fué encontrada en todos los órganos menos en la bilis. En este caso, la sertralina se acumula más en los riñones, hasta en 428 ng/g del tejido. Para el *Luciobarbus graellsii* solo se encontró detección de sertralina en corazón, hígado, músculo, y plasma.

En total, contando con las 4 especies analizados, se detectaron y cuantificaron 15 fármacos de los 47 validados en peces, siendo únicamente el diazepam y la sertralina, los compuestos comunes encontrados en todas las especies de peces e incluso en el agua. Adicionalmente, la fluoxetina y la loratadina, solo se encontraron en los peces y no en el agua.

Tabla 28. Cuantificación de fármacos en órganos *Luciobarbus graellsii*.

Concentración en ng /g. (frecuencia de detección)											
Fármaco	Log K _{ow}	Agallas	Bilis*	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Páncreas	Piel	Plasma*	Riñón
Claritromicina	3,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4 (1/3)	ND	ND	1-2 (2/3)
Diazepam	2,82	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3 (1/3)	ND	ND
Fluoxetina	1,22	7 (1/3)	ND	5 (2/3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Loratadina		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LOQ (1/3)
Sertralina	5,29	169-213 (2/3)	ND	7-180 (3/3)	45-80 (3/3)	246-428 (3/3)	8-34 (3/3)	121-317 (3/3)	27-43 (3/3)	14-17 (3/3)	90-371 (3/3)

* concentración en ng/mL

➤ *Resultados del análisis cualitativo de fármacos y metabolitos en los órganos, tejidos y fluidos de los peces*

Al igual que en el caso de análisis dirigido, acá solo se presentan los resultados obtenidos que se discutiran posteriormente. Como se comentó anteriormente, para la detección de los fármacos por medio de *suspect screening*, la lista propuesta incluye compuestos relacionados con los metabolitos de diferentes fármacos, sobretodo los relacionados con compuestos antidepresivos. Sin embargo, tambien se incluyeron muchos otros compuestos y metabolitos detectados anteriormente y que han sido reportados en la literatura científica. Sin embargo, no todos, pero sí la mayoría de los compuestos propuestos en la lista están reportados en la biblioteca que se encuentra incluida dentro del software instrumental suministrada por SCIEX. Las detecciones positivas de estos compuestos fueron evaluadas de la misma manera que para el método validado 2.

Los resultados que se presentan en la *Tabla 29* son los compuestos detectados por el análisis de cualitativo, donde se incluye el porcentaje de frecuencia de detección de cada uno de los fármacos tanto en el agua, como para cada una de las especies de peces. En total, se detectaron 34 compuestos entre el agua y todas las especies de peces analizadas que incluyen todos los tejidos. En la tabla que se presenta en la discusión de resultados (*Tabla 30*), se incluye tambien el *library score* presentado por el *software* de análisis con el que se procesaron las muestras, y el error en masa exacta en ppm.

De todos los compuestos detectados cualitativamente, 15 de ellos se detectaron exclusivamente en el agua. Algunos de los compuestos son metabolitos como la 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina, la epoxicarbamazepina, y la benzoilecgonina; otros compuestos antihistamínicos como la cetirizina y fexofenadina; compuestos antibacteriales, antifúngicos y antiparasitarios: fluconazol, lincomicina, metronidazol, ofloxacina y sulfatiazol; y los demás de familias de fármacos independientes: diclofenaco (anti-inflamatorio), gemfibrozil (agente antilipídico), irbesartan (agente antihipertensivo), sulpirida (psicoléptico), y la teofilina (tratamiento de las vias respiratorias).

Por otro lado, hay compuestos que se detectaron exclusivamente en los tejidos de peces, como en el caso de la anfetamina y trazodona (psicoanalépticos), detectado unicamente en muestras de *Anguilla anguilla*; la fentermina (supresor del apetito) tiamulina (antibiótico veterinario) y el tramadol (analgésico) detectados únicamente en la especie *Chelon Ramada*; el terazosin (hipertensivo / prostático) detectado exclusivamente en la especie *Cyprinus carpio*; y finalmente el ondansetrón (antiemético) detectado en más de una especie.

Finalmente, tanto en el agua superficial del río Llobregat, como en los tejidos de los peces que habitan en dicho río, se detectaron algunos compuestos comunes entre los que se encuentran psicodélicos como la amisulprida, clozapina y quetiapina; psicoanalépticos como el citalopram, metanfetamina y metilfenidato; algunos metabolitos de fármacos como la desmetilcitalopram y la o-desmetilvenlafaxina u otros de familias de fármacos independientes como la amantadina (tratamiento parkinson); bisoprolol (agente B-bloqueante) y el telmisartan (agente hipertensivo).

Si se revisan los resultados por la frecuencia con la que se detectan fármacos en cada una de las especies, se contempla que la especie *Chelon ramada*, fue en la que se detectaron más cantidad de fármacos entre sus tejidos (16), seguida por la *Anguilla anguilla* y el *Cyprinus carpio*, cada especie con 10 compuestos detectados, y la especie con menor cantidad de compuestos, fue el *Luciobarbus graellsii* donde se detectaron únicamente 4 compuestos. Haciendo una revisión de cada uno de los tejidos individualmente, se observa que en el riñón, fue el tejido con mayor cantidad de compuestos detectados (11 compuestos), seguido por la piel (10); siendo el plasma y la bilis los líquidos con menor cantidad de compuestos detectados durante el análisis (3 y 1 respectivamente).

Tabla 29. Detección de fármacos y metabolitos en agua y órganos de peces río Llobregat

Compuesto	Grupo terapéutico	H ₂ O	Órgano	<i>Anguilla anguilla</i> (% frec.)	<i>Chelon ramada</i> (% frec.)	<i>Cyprinus carpio</i> (% frec.)	<i>Luciobarbus graellsii</i> (% frec.)
10,11-Dihidro-10-hidroxicarbamazepina	Metabolito Carbamazepina	100,0		-	-	-	-
			Cerebro	-	66,6	33,3	33,3
			Riñón	100,0	66,6	66,6	100,0
			Piel	33,3	100,0	66,6	100,0
			Hígado	33,3	100,0	66,6	100,0
Amantadina	Tratamiento Parkinson	100,0	Pancreas	-	100,0	100,0	100,0
			Corazón	-	100,0	66,6	-
			Agallas	66,6	66,6	100,0	66,6
			Músculo	66,6	33,3	66,6	-
			Plasma	-	33,3	-	-
Amisulprida	Psicoléptico	100,0	Riñón	-	-	33,3	-
			Agallas	-	33,3	-	-
Anfetamina	Psicoanaléptico	-	Riñón	33,3	-	-	-
			Hígado	66,6	-	-	-
			Agallas	33,3	-	-	-
Benzoilecgonina	Metabolito cocaína	100,0		-	-	-	-
			Cerebro	-	33,3	33,3	-
			Riñón	100,0	100,0	100,0	66,6
			Piel	66,6	100,0	66,6	33,3
			Hígado	33,3	100,0	100,0	33,3
Bisoprolol	Agente beta bloqueante	100,0	Pancreas	100,0	100,0	66,6	100,0
			Corazón	33,3	100,0	100,0	66,6
			Agallas	100,0	66,6	66,6	66,6
			Músculo	66,6	66,6	66,6	-
			Plasma	-	66,6	33,3	-
Cetirizina	Antihistaminico	100,0		-	-	-	-
Citalopram	Psicoanaléptico	100,0	Piel	33,3	66,6	-	-

Compuesto	Grupo terapéutico	H ₂ O	Órgano	<i>Anguilla anguilla</i> (% frec.)	<i>Chelon ramada</i> (% frec.)	<i>Cyprinus carpio</i> (% frec.)	<i>Luciobarbus graellsii</i> (% frec.)
			Páncreas	66,6	66,6	33,3	-
			Músculo	-	66,6	-	-
			Cerebro	-	-	-	33,3
			Riñón	33,3	33,3	33,3	33,3
			Hígado	33,3	66,6	-	-
Clozapina	Psicoléptico	100,0	Pancreas	-	66,6	33,3	-
			Corazón	-	33,3	-	-
			Agallas	-	33,3	33,3	-
			Riñón	33,3	33,3	33,3	-
			Piel	66,6	33,3	-	-
			Hígado	-	33,3	-	-
			Pancreas	-	66,6	-	-
10,11-Dihidro-10- hidroxicarbamazepina	Metabolito Carbamazepina	100,0		-	-	-	-
Diclofenaco	Anti-inflamatorio	100,0		-	-	-	-
Epoxicarbamazepina	Metabolito Carbamazepina	100,0		-	-	-	-
Fentermina	Supresor apetito	-	Piel	-	33,3	-	-
Fexofenadina	Antihistaminico	100,0		-	-	-	-
Fluconazol	Antifungico dermatológico	100,0		-	-	-	-
Gemfibrozil	Agente anti-lipídico	100,0		-	-	-	-
Irbesartan	Agente antihipertensivo	100,0		-	-	-	-
Lincomicina	Antibacterial	100,0		-	-	-	-
Metanfetamina	Psicoanaléptico	100,0	Piel	-	33,3	-	-
Metronidazol	Antibacterial antiparasitario	100,0		-	-	-	-
Metilfenidato	Psicoanaléptico	-	Bilis	-	-	33,3	-
O-Desmetilvenlafaxina	Metabolito Venlafaxina	100,0	Plasma	-	33,3	-	-

Compuesto	Grupo terapéutico	H ₂ O	Órgano	<i>Anguilla anguilla</i> (% frec.)	<i>Chelon ramada</i> (% frec.)	<i>Cyprinus carpio</i> (% frec.)	<i>Luciobarbus graellsii</i> (% frec.)
Ofloxacina	Antibacterial	100,0		-	-	-	-
Ondansetrón	Antiemético	-	Riñón	33,3	100,0	-	-
			Piel	66,6	100,0	-	-
			Hígado	-	66,6	-	-
			Pancreas	-	66,6	-	-
Quetiapina	Psicoléptico	100,0	Cerebro	-	33,3	33,3	33,3
			Riñón	66,6	33,3	33,3	33,3
			Piel	66,6	-	-	-
			Hígado	-	66,6	-	-
			Pancreas	66,6	66,6	-	66,6
			Corazón	33,3	33,3	-	-
			Agallas	33,3	-	-	-
Sulfatiazol	Antibiótico	100,0		-	-	-	-
Sulpirida	Psicoléptico ansiolítico	100,0		-	-	-	-
Telmisartán	Agente antihipertensivo	100,0	Riñón	-	66,6	-	-
			Hígado	66,6	33,3	-	-
Terazosin	Hipertensivo y prostático	-	Riñón	-	-	33,3	-
Teofilina	Obstrucción de vías respiratorias	100,0		-	-	-	-
Tiamulina	Antibiótico de uso veterinario	-	Cerebro	-	33,3	-	-
			Piel	-	66,6	-	-
			Músculo	-	33,3	-	-
Tramadol	Analgesico	-	Riñón	-	33,3	-	-
Trazodona	Psicoanaléptico	-	Riñón	100,0	-	-	-

➤ *Discusión de resultados de la distribución de fármacos en el organismo de los peces*

El efecto y la acumulación de los fármacos en los peces, solo se produce si el fármaco es capaz de atravesar la membrana biológica; es decir, si el fármaco se absorbe en el organismo, por ejemplo, por las branquias, el intestino o la piel. Después de la absorción, el fármaco llegará al órgano objetivo a través de la circulación de la sangre²⁸⁰⁻²⁸¹. En algunos casos, el fármaco se metabolizará en el hígado (u otros órganos) generando metabolitos de fase I y fase II. Después de la metabolización, los compuestos formados son excretados al intestino delgado a través de la bilis y tal vez de las branquias y el intestino^{104, 106, 280-281}. Es por ello que, de cierta manera, la exposición de la biota acuática a los fármacos se puede demostrar y evaluar a través de la medición de la concentración interna de los fármacos en el organismo, por ejemplo, en la sangre, músculo, o tejido adiposo. Como ya se comentó antes en la introducción (*sección 1.5*), los fármacos y sus metabolitos pueden ser secretados en la bilis, lo que resulta en concentraciones más altas que las encontradas en el agua circundante^{117, 282}. Sin embargo, es importante tener conocimiento previo de los metabolitos que se forman, para poder seguirlos.

Es importante determinar la distribución de los fármacos en el interior de los peces con el objetivo de entender el potencial toxicológico de los fármacos y la capacidad que tiene el organismo de los peces para contrarrestar dicha toxicidad, ya sea por medio del metabolismo, o la acumulación directa del fármaco al interior del pez. Ya se han comentado algunos estudios realizados anteriormente, en los cuales las hormonas afectan el comportamiento sexual y el desarrollo evolutivo de los individuos. Aunque también se encuentra afectación de otros órganos, como el cerebro y que por lo tanto requiere atención al momento de analizarse; ya que los compuestos de la familia de antidepresivos actúan directamente en el cerebro afectando el comportamiento de los mismos. El estudio del hígado de los peces es de alta importancia sobre todo al momento de buscar compuestos nuevos o metabolitos, como órgano de acción detoxificante de los peces; y finalmente el músculo, sobretodo por el consumo humano¹⁵¹.

Los resultados de análisis del agua del río Llobregat, demuestran una alta carga de fármacos que afectan a las especies que habitan en él. Teniendo en cuenta que el pH analizado fue de 8,2, se sabe que hay fármacos que tienen mayor efecto de acuerdo a su modo ionizado o neutro, y que en la mayoría de los de los casos, las formas ionizadas o neutras son dependientes del pH. Haciendo referencia a algunos fármacos encontrados en el río, se ha estudiado la sertralina (el fármaco que más frecuentemente se detectó en los tejidos de los peces). Éste antidepresivo afecta la tasa de supervivencia, crecimiento y alimentación de los

peces (*Pimephales promelas*, para el caso del estudio) en un factor más alto cuando el pH del agua es 8,5 (similar a la del río Llobregat), comparado con pH 7,5 y 6,5 ²⁸³. Ésta afectación está directamente relacionada con las disociaciones de ácidos y bases débiles, como los son muchos fármacos, cuya actividad biológica se ve influenciada por el estado de ionización del compuesto, que está controlado por el pKa y el pH de la solución. Con otro de los fármacos hallados en el agua del río Llobregat, la venlafaxina, también se ha demostrado que presenta efectos sobre el comportamiento de los peces, a baja concentración, dificultando la velocidad de caza de sus presas ²⁸⁴. De hecho, sí este compuesto se mezcla con la fluoxetina, se presenta un efecto aditivo de los compuestos, como lo demostró Bisesi et al. ²⁷⁴. También se ha reportado el efecto que tiene el citalopram, (de igual manera hallado en las aguas del río Llobregat), sobre el comportamiento de los peces ²⁸⁵. En general, los estudios demuestran que las aguas cargadas de fármacos afectan el comportamiento de los peces como lo publicó McCallum et al; ¹²³, quienes en su estudio con aguas residuales analizando el comportamiento de los peces, también detectaron varios de los fármacos que se encontraron en el presente estudio sobre el río Llobregat, como son carbamezapina, citalopram, diltiazem, oxazepam y venlafaxina.

Por medio del análisis cuantitativo, se detectaron 27 fármacos en el agua, de los cuales 13 son comunes con fármacos encontrados en los tejidos de los peces, y solamente dos compuestos fueron hallados en los peces que no fueron hallados en el agua del río. De los compuestos con mayor concentración en el agua, la cafeína, el metoprolol y el sotalol también fueron hallados en los peces pero con concentraciones relativamente bajas (hasta 50 ng/g de riñón, 150 ng /g de riñón, y 13 ng/g de agallas respectivamente).

En general, la detección de los fármacos en cada una de las especies, no parece tener una frecuencia de acumulación alta. De los 95 detecciones positivas de modo cuantitativo (*Tablas 25-28*), el 37 % de ellas fue detectado solo en uno de los individuos analizados. También se encuentran casos en que los fármacos solo se encuentran en un solo tejido, por ejemplo: en la *Anguilla anguilla*, 7 de los 9 fármacos detectados, solo se encuentra en uno o dos tejidos (y 6 de ellos en solo un individuo); en el caso de la especie *Chelon ramada*, 5 de los 11 fármacos se encuentran en uno o dos tejidos (y 3 de ellos en un solo individuo); en el caso de la especie *Cyprinus carpio* 8 de los 10 fármacos detectados se encontraron únicamente en un tejido (y 6 de ellos en un solo individuo), y finalmente en el caso de la especie *Luciobarbus graellsii* 4 de los 5 fármacos detectados se encontraron en uno o dos tejidos (y con 4 casos en un solo individuo).

Desde este punto de vista, se podría pensar que de los fármacos que se detectaron en los peces del río Llobregat, y que parecen acumularse son aquellos fármacos que se encontraron

solo en un tejido, pero en más de un individuo, o los fármacos que se encontraron en más de un tejido. Los fármacos que cumplen con esos requisitos son la acridona, codeína, diltiazem, fluoxetina, loratadina, sertralina, sotalol, y venlafaxina.

En el caso de la distribución de los fármacos entre los diferentes tejidos, llama la atención las altas concentraciones de acridona en bilis de la *Anguilla anguilla* (Figura 24, Tabla 25); y que se encontró en la bilis de los 3 individuos. Siendo además el único fármaco detectado en cualquiera de las muestras de bilis analizadas. Otro caso particular de analizar son las muestras de peces de *Chelon ramada* (Figura 25, Tabla 26). Esta especie presentó alta frecuencia de acumulación de fármacos en sus tejidos, donde a excepción de la bilis, en cada tejido se detectaron por lo menos dos fármacos diferentes, pero en algunos casos solo fueron detectados en un solo individuo. Sin embargo, sí pareciera haber acumulación en órganos como el cerebro, el corazón, el páncreas, la piel, el plasma y el riñón.

En el caso de *Cyprinus carpio*, Figura 26, Tabla 27, también hay una concordancia en la acumulación de más de un fármaco en el cerebro, la piel, y los riñones, que fueron los tejidos donde se detectaron más fármacos y en más de un individuo. A pesar de ser los peces de mayor tamaño capturados (51-53 cm de largo) y mayor peso (2420-3260 g), no parece haber una gran cantidad de fármacos en su interior. Quizás se puede notar un mayor efecto de dilución en el cuerpo. Finalmente, en la especie *Luciobarbus graellsii*, Figura 27, Tabla 28, también se podría hablar de la acumulación de fármacos en el cerebro y en el riñón, donde se detectaron más de un fármaco, en más de un individuo analizado.

La sertralina fue detectada y cuantificada en la mayoría de los órganos analizados de los peces en todas las especies (excepto en la bilis) y con alta frecuencia. Este hecho podría estar directamente conectado con hallazgos anteriores en nuestro grupo de investigación, en donde Aceña et al.²⁸⁶ realizando un análisis de agua a lo largo del río Llobregat, en varios puntos de muestreo, únicamente encontró sertralina en la última zona, (la misma zona donde se ha llevado a cabo este estudio) y con una frecuencia de detección del 87 % en las muestras analizadas.

Por otro lado, como se describió en la presentación de los resultados, se realizaron análisis adicionales por medio de análisis cualitativo, con una lista de compuestos sospechosos que se presentó en el Capítulo 3, parte experimental, sección 3.4.2 donde se incluyeron compuestos relacionados con los metabolitos de diferentes fármacos, sobretodo los relacionados con los antidepresivos. La búsqueda de antidepresivos está relacionada con varios factores: i) como se observó en la introducción de esta tesis, los antidepresivos han sufrido un notorio aumento en el consumo entre los países de la OECD (Figura 1), y eso

también incluye el consumo en España (*Figura 2*); ii) adicionalmente, por la alta frecuencia de la detección de la sertralina en la mayoría de los órganos de los peces, hace pensar que otros antidepresivos (y sus metabolitos) no tenidos en cuenta para el estudio por *target screening*, pueden estar presentes en las muestras de los peces.

Los resultados obtenidos por análisis cualitativo, se acercan mucho a lo hipotetizado con respecto a la presencia de compuestos que actúan sobre el cerebro para el manejo de estados anímico, ansiedad y depresión, en general que actúan sobre el sistema nervioso central y la actividad psíquica. Entre los compuestos que se hallaron por este análisis tanto en el agua como en los órganos de los peces, que entran dentro de ésta categoría son la amisulprida, citalopram, clozapina, desmetilcitalopram, metanfetamina, o-desmetilvenlafaxina, y la quetiapina. Adicionalmente se encontraron sustancias de la misma familia de fármacos únicamente en peces como son la trazodona, la anfetamina y el metilfenidato. Finalmente, la sulpirida, también de la misma familia de compuestos antidepresivos, se encontró en el agua, pero no en los peces.

En los resultados de la *Tabla 29* se observa que el 45,5 % de los compuestos detectados aplicando análisis cualitativo, solo se encontraron en el agua, y el 21 % únicamente en los peces. En la misma *Tabla 29* también se confirma que hay muchos fármacos que son detectados con mayor frecuencia en diferentes órganos e incluso a través de las diferentes especies, como son la amantadina, el bisoprolol, la clozapina y el desmetilcitalopram. Utilizando el mismo criterio que se usó con los fármacos detectados de forma cuantitativa; (encontrarse solo en un tejido pero en más de un individuo, o encontrarse en más de un tejido), los compuestos detectados de manera sospechosa que puede tener un tipo de acumulación en los peces son la amantadina, la anfetamina (solo en la especie *Anguilla anguilla*), el bisoprolol, el citalopram y su metabolito la desmetilcitalopram, la clozapina, el ondasetrón, la quetiapina, el telmisartan, la tiamulina (solo en la especie *Chelon ramada*) y la trazodona (solo en la especie *Anguilla anguilla*).

Analizando la acumulación en los diferentes órganos que se detectaron los fármacos, se puede decir que el riñón, la piel, el hígado y el páncreas son los tejidos donde hay más probabilidad de encontrar diferentes compuestos acumulados, ya que estuvieron presentes en la detección de mayor cantidad de fármacos durante el análisis de sospechosos (*Tabla 29*).

Los resultados antes mencionados se pueden comparar con la captación de fármacos en los distintos tejidos de los peces reportados en la literatura científica, como se muestra a continuación en la *Tabla 30*. En esta tabla, se hace una comparación de los compuestos

distribuidos en diferentes órganos que se han reportado en publicaciones, y en comparación con el estudio realizado durante esta tesis doctoral. Adicional a eso, como punto de confirmación, se adiciona en cada compuesto, el valor de *Library score* generado por el *software* durante el procesamiento, y el error de masa en ppm. Igualmente, en la tabla se hacen comparaciones de las cuantificaciones tanto en agua como en cada uno de los tejidos de los peces. Para el caso de las detecciones, se simboliza cada especie con un color diferente (ver al final de la tabla 30). Como se observa en la *Tabla 30* hay varias coincidencia en fármacos reportados como carbamezapina, citalopram, diltiazem, metoprolol, sertralina, telmisartan, tramadol, y venlafaxina.

Tabla 30. Comparación de la distribución de fármacos en diferentes órganos de los peces reportados en la literatura, con el estudio en el río Llobregat desarrollado en esta tesis.

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
10,11-Dihidro-10-hidroxicarbamazepina					✓	100 / 0,7		
2-Hidroxicarbamazepina	Agallas (f)	NR	57	152				
2-Hidroxicarbamazepina	Agallas (s)	NR	243	152				
2-Hidroxicarbamazepina	Cerebro (f)	NR	48	152				
2-Hidroxicarbamazepina	Cerebro (s)	NR	218	152				
2-Hidroxicarbamazepina	Higado (f)	NR	107	152				
2-Hidroxicarbamazepina	Higado (s)	NR	335	152				
2-Hidroxicarbamazepina	Intestino (f)	NR	50	152				
2-Hidroxicarbamazepina	Intestino (s)	NR	221	152				
2-Hidroxicarbamazepina	Músculo (f)	NR	69	152				
2-Hidroxicarbamazepina	Músculo (s)	NR	283	152				
Acetaminofen	Gonadas (s)	<LOD	5	151	208	99 / 0,5		
Acetaminofen	Cerebro (f)				208	99 / 0,5	56	64 / -1,6
Ácido mefenámico	Agallas (f)	39	1	149				
Ácido mefenámico	Cerebro (f)	39	1	149				
Ácido mefenámico	Higado (f)	39	20	149				
Ácido mefenámico	Músculo (f)	39	0,1	149				

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
Ácido mefenámico	Plasma	39	1	149				
Ácido mefenámico	Riñón (f)	39	7	149				
Ácido metoprolóico	Hígado (f)	NR	12	155				
Ácido metoprolóico	Plasma	NR	0,1	155				
Ácido Valsartánico					245	95 / -0,3		
Acridona	Bilis				16	79 / -0,7	432	98 / 0,7
Amantadine	Agallas (f)				✓	90 / 0,5	✓✓✓✓	98 / -0,2
Amantadine	Cerebro (f)				✓	90 / 0,5	✓✓✓	95 / -0,6
Amantadine	Hígado (f)				✓	90 / 0,5	✓✓✓✓	99 / -0,1
Amantadine	Músculo (f)				✓	90 / 0,5	✓✓✓	99 / 0,9
Amantadine	Plasma				✓	90 / 0,5	✓	87 / -0,6
Amantadine	Riñón (f)				✓	90 / 0,5	✓✓✓✓	98 / -0,9
Amantadine	Piel (f)				✓	90 / 0,5	✓✓✓✓	95 / -0,2
Amantadine	Corazón (f)				✓	90 / 0,5	✓✓	98 / -0,4
Amantadine	Páncreas (f)				✓	90 / 0,5	✓✓✓✓	99 / -0,5
Amilsuprida	Agallas (f)				✓	100 / 0,9	✓	97 / 0,5
Amilsuprida	Riñón (f)				✓	100 / 0,9	✓	98 / -0,9
Anfetamina	Agallas (f)						✓	98 / 2
Anfetamina	Hígado (f)						✓	98 / -1,2
Anfetamina	Riñón (f)						✓	100 / 0,1
Atenolol	Hígado (f)	NR	0,2	155				
Azitromicina	Hígado (f)	NR	4	155				
Benzolecgonina	Agallas (f)	NR	2	154	✓	93 / 0,8		
Benzolecgonina	Hígado (f)	NR	1	154	✓	93 / 0,8		
Benzolecgonina	Músculo (f)	NR	1	154	✓	93 / 0,8		
Bezafibrato	Agallas (f)	5	0,2	149	55	94 / 0,1		
Bezafibrato	Riñón (f)	NR	12	155	55	94 / 0,1		
Bisoprolol	Riñón (f)	NR	14	155	✓	100 / 0,3	✓✓✓✓	100 / -0,1
Bisoprolol	Agallas (f)				✓	100 / 0,3	✓✓✓✓	100 / -0,3
Bisoprolol	Cerebro (f)				✓	100 / 0,3	✓✓	100 / 0,9
Bisoprolol	Hígado (f)				✓	100 / 0,3	✓✓✓✓	100 / 0,1
Bisoprolol	Músculo (f)				✓	100 / 0,3	✓✓✓	99 / 0
Bisoprolol	Plasma				✓	100 / 0,3	✓✓	100 / -0,9
Bisoprolol	Piel (f)				✓	100 / 0,3	✓✓✓✓	100 / 0,1
Bisoprolol	Corazón (f)				✓	100 / 0,3	✓✓✓✓	100 / -0,4
Bisoprolol	Páncreas (f)				✓	100 / 0,3	✓✓✓✓	100 / -0,2
Bupropion	Cerebro (f)	NR	22	123				
Bupropion	Cerebro (s)	3	2	151				
Bupropion	Gonadas (f)	NR	1	123				
Bupropion	Gonadas (s)	3	13	151				

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
Bupropion	Hígado (f)	NR	0,2	123				
Bupropion	Hígado (s)	3	1	151				
Bupropion	Músculo (f)	NR	0,2	123				
Bupropion	Músculo (s)	3	<LOQ	151				
Bupropion	Plasma	NR	4	123				
Cafeina	Agallas (f)	NR	7	154	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Cerebro (f)	NR	5	155	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Cerebro (s)	1	279	151	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Gonadas (s)	1	140	151	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Hígado (f)	NR	3	155	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Hígado (f)	NR	13	154	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Hígado (s)	1	870	151	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Músculo (f)	NR	6	154	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Músculo (s)	1	61	151	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Plasma	NR	2	155	1960	98 / 0,9		
Cafeina	Riñón				1960	98 / 0,9	50	86 / -0,6
Cafeina	Piel				1960	98 / 0,9	5	96 / 0
Carbamazepina	Agallas (f)	0,05	407	152	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Agallas (f)	43	0,1	149	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Agallas (s)	0,05	1731	152	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Cerebro (f)	NR	2	155	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Cerebro (f)	0,05	701	152	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Cerebro (f)	43	0,1	149	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Cerebro (f)	NR	1	123	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Cerebro (s)	0,05	3182	152	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Cerebro (s)	0,1	2	151	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Gonadas (f)	NR	1	123	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Gonadas (s)	0,1	7	151	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Hígado (f)	0,05	688	152	64	95 / 0,4	1	51 / 0,4
Carbamazepina	Hígado (f)	43	0,2	149	64	95 / 0,4	1	51 / 0,4
Carbamazepina	Hígado (f)	NR	1	155	64	95 / 0,4	1	51 / 0,4
Carbamazepina	Hígado (s)	0,05	2154	152	64	95 / 0,4	1	51 / 0,4
Carbamazepina	Intestino (f)	0,05	372	152	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Intestino (s)	0,05	1655	152	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Músculo (f)	0,05	430	152	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Músculo (f)	43	0,1	149	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Músculo (s)	0,05	1775	152	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Músculo (s)	0,1	4	151	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Plasma	NR	0,3	155	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Plasma	43	0,1	149	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Riñón (f)	NR	1	155	64	95 / 0,4		
Carbamazepina	Riñón (f)	43	0,2	149	64	95 / 0,4		
Cetirizina	Hígado (f)	NR	0,1	155	✓	98 / 0,7		
Ciprofloxacina	Cerebro (s)	NR	36	151				
Citalopram	Cerebro (f)	260	2	153	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Cerebro (f)	NR	5	155	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Cerebro (s)	3	3	151	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Gonadas (s)	3	2	151	✓	100 / 0,9		

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
Citalopram	Hígado (f)	0,1	31	⁸⁸	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Hígado (f)	260	12	153	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Hígado (f)	NR	3	155	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Hígado (s)	3	4	151	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Músculo (f)	NR	1	155	✓	100 / 0,9	✓	91 / 0,5
Citalopram	Músculo (s)	3	0,4	151	✓	100 / 0,9	✓	91 / 0,5
Citalopram	Plasma	NR	0,2	155	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Plasma	NR	8	123	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Riñón (f)	0,1	110	⁸⁸	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Riñón (f)	NR	5	155	✓	100 / 0,9		
Citalopram	Piel (f)				✓	100 / 0,9	✓✓	100 / 0,3
Citalopram	Pancreas (f)				✓	100 / 0,9	✓✓✓	100 / 0
Claritromicina	Músculo (f)	NR	0,1	155	57	99 / 0,6		
Claritromicina	Plasma	NR	0,1	155	57	99 / 0,6		
Claritromicina	Riñón (f)	NR	0,6	155	57	99 / 0,6	4	94 / -1,2
Claritromicina	Pancreas (f)				57	99 / 0,6	4	94 / -0,1
Clindamicina	Hígado (f)	NR	0,1	155				
Clindamicina	Plasma	NR	0,1	155				
Clindamicina	Riñón (f)	NR	0,6	155				
Clomipramina	Hígado (f)	<LOQ	1	⁸⁸				
Clomipramina	Hígado (f)	NR	0,2	155				
Clomipramina	Riñón (f)	<LOQ	2	⁸⁸				
Clomipramina	Riñón (f)	NR	0,4	155				
Clotrimazol	Cerebro (f)	NR	7	123				
Clotrimazol	Hígado (f)	NR	1	123				
Clozapina	Agallas (f)				✓	91 / -0,9	✓✓	83 / -1
Clozapina	Cerebro (f)				✓	91 / -0,9	✓	89 / -0,2
Clozapina	Hígado (f)				✓	91 / -0,9	✓✓	95 / 0,1
Clozapina	Riñón (f)				✓	91 / -0,9	✓✓✓✓	99 / 1
Clozapina	Corazón (f)				✓	91 / -0,9	✓	91 / -0,6
Clozapina	Páncreas (f)				✓	91 / -0,9	✓✓	100 / 0,2
Codeina	Pancreas (f)				58	100 / 1	2	99 / 0,8
Codeina	Plasma				58	100 / 1	<LOQ	70 / -0,5
Crotamiton	Agallas (f)	641	2	149				
Crotamiton	Hígado (f)	641	4	149				
Crotamiton	Plasma	641	2	149				
Crotamiton	Riñón (f)	641	3	149				
Desmetil-citalopram	Hígado (f)	NR	3	155	✓	94 / -1,3	✓	98 / -0,9
Desmetil-citalopram	Riñón (f)				✓	94 / -1,3	✓✓✓	98 / -0,1
Desmetil-citalopram	Piel (f)				✓	94 / -1,3	✓✓	93 / 3,2
Desmetil-citalopram	Páncreas (f)				✓	94 / -1,3	✓	98 / -0,8
Diazepam	Piel (f)				238	100 / -0,6	3	57 / -1,5

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
Diclofenaco	Agallas (f)	132	5	149	✓	100 / -1		
Diclofenaco	Cerebro (f)	132	1	149	✓	100 / -1		
Diclofenaco	Hígado (f)	132	3	149	✓	100 / -1		
Diclofenaco	Músculo (f)	132	0,5	149	✓	100 / -1		
Diclofenaco	Plasma	NR	2	155	✓	100 / -1		
Diclofenaco	Plasma	132	2	149	✓	100 / -1		
Diclofenaco	Riñón (f)	NR	6	155	✓	100 / -1		
Diclofenaco	Riñón (f)	132	2	149	✓	100 / -1		
Difenhidramina	Agallas (f)	670	3	149				
Difenhidramina	Cerebro (f)	670	8	149				
Difenhidramina	Cerebro (f)	NR	26	123				
Difenhidramina	Cerebro (s)	12	7	151				
Difenhidramina	Gonadas (f)	NR	8	123				
Difenhidramina	Gonadas (s)	12	2	151				
Difenhidramina	Hígado (f)	670	20	149				
Difenhidramina	Hígado (f)	NR	2	123				
Difenhidramina	Hígado (s)	12	4	151				
Difenhidramina	Músculo (f)	670	0,7	149				
Difenhidramina	Músculo (f)	NR	1	123				
Difenhidramina	Músculo (s)	12	0,5	151				
Difenhidramina	Plasma	670	2	149				
Difenhidramina	Plasma	NR	15	123				
Difenhidramina	Riñón (f)	670	59	149				
Diltiazem	Agallas (f)	38	0,1	149	24	95 / 0,9		
Diltiazem	Cerebro (f)	38	0,2	149	24	95 / 0,9	1	84 / -0,3
Diltiazem	Cerebro (f)	NR	1	123	24	95 / 0,9	1	84 / -0,3
Diltiazem	Corazon (f)				24	95 / 0,9	2	91 / 0,1
Diltiazem	Gonadas (f)	NR	1	123	24	95 / 0,9		
Diltiazem	Hígado (f)	38	0,5	149	24	95 / 0,9	4	98 / 0,2
Diltiazem	Hígado (f)	NR	1	123	24	95 / 0,9	4	98 / 0,2
Diltiazem	Músculo (f)	38	0,1	149	24	95 / 0,9		
Diltiazem	Músculo (f)	NR	0,7	123	24	95 / 0,9		
Diltiazem	Pancreas (f)				24	95 / 0,9	4	95 / 0,6
Diltiazem	Plasma	38	0,1	149	24	95 / 0,9	1	94 / 0,8
Diltiazem	Plasma	NR	1	123	24	95 / 0,9	1	94 / 0,8
Diltiazem	Riñón (f)	38	2	149	24	95 / 0,9	3	96 / 0,7
Donepezil	Gonadas (f)	NR	0,5	123				
Donepezil	Plasma	NR	4	123				
Donepezil	Riñón (f)	NR	0,3	155				
Epoxi-carbamazepina	Agallas (f)	NR	41	152	✓	99 / 0,9		
Epoxi-carbamazepina	Agallas (s)	NR	175	152	✓	99 / 0,9		
Epoxi-carbamazepina	Músculo (f)	NR	60	152	✓	99 / 0,9		
Epoxi-carbamazepina	Músculo (s)	NR	246	152	✓	99 / 0,9		

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
Epoxi-carbamazepina	Riñón (f)	NR	0,2	155	✓	99 / 0,9		
Eritromicina	Agallas (f)	NR	2	154	21	99 / 0,7		
Eritromicina	Gonadas (s)	0,1	29	151	21	99 / 0,7		
Eritromicina	Hígado (f)	NR	6	154	21	99 / 0,7		
Eritromicina	Hígado (s)	0,1	47	151	21	99 / 0,7		
Eritromicina	Músculo (f)	NR	2	154	21	99 / 0,7		
Eritromicina	Músculo (s)	0,1	3	151	21	99 / 0,7		
Fenitoina (dilantin)	Cerebro (s)	0,1	17	151				
Fenitoina (dilantin)	Gonadas (s)	0,1	0,4	151				
Fenitoina (dilantin)	Músculo (s)	0,1	1	151				
Fentermina	Piel (f)						✓	99 / -0,3
Fexofenadina					✓	98 / 0		
Flecainida	Gonadas (f)	NR	0,2	123				
Flecainida	Músculo (f)	NR	0,2	123				
Flecainida	Plasma	NR	0,2	123				
Fluconazole					✓	100 / 1,1		
Fluoxetina	Plasma						2	95 / 0,4
Fluoxetina	Cerebro (f)						5	96 / 0,3
Fluoxetina	Riñón (f)						23	95 / -0,8
Fluoxetina	Piel (f)						6	99 / 0
Fluoxetina	Pancreas (f)						38	90 / -1
Fluoxetina	Agallas (f)						7	95 / 0,9
Gemfibrozil					✓	82 / -0,5		
Haloperidol	Agallas (f)	2	0,3	149				
Haloperidol	Cerebro (f)	2	0,3	149				
Haloperidol	Hígado (f)	2	7	149				
Haloperidol	Hígado (f)	<LOQ	5	⁸⁸				
Haloperidol	Hígado (f)	NR	2	155				
Haloperidol	Músculo (f)	2	0,1	149				
Haloperidol	Plasma	2	0,04	149				
Haloperidol	Riñón (f)	<LOQ	9	⁸⁸				
Haloperidol	Riñón (f)	2	1	149				
Hidroxicina	Hígado (f)	<LOQ	1	⁸⁸				
Hidroxicina	Riñón (f)	<LOQ	0,3	⁸⁸				
Ibuprofeno	Agallas (f)	250	101	138				
Ibuprofeno	Hígado (f)	250	114	138				
Ibuprofeno	Musculo (f)	250	21	138				
Ibuprofeno	Plasma (f)	250	315	138				
Ibuprofeno	Riñón (f)	250	142	138				
Indometacina	Agallas (f)	154	21	149				
Indometacina	Cerebro (f)	154	2	149				
Indometacina	Hígado (f)	154	5	149				
Indometacina	Músculo (f)	154	1	149				
Indometacina	Plasma	154	5	149				

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
Indometacina	Riñón (f)	154	11	149				
lopamidol	Cerebro (s)	2	1058	151				
lopamidol	Gonadas (s)	2	750	151				
Irbesartan					✓	88 / -0,2		
Ketamina					16	87 / 0,4		
Ketoprofeno	Corazon (f)				380	99 / 0,5		
Levamisol	Hígado (f)	NR	0,2	155				
Levamisol	Riñón (f)	NR	11	155				
Levomepromazina	Hígado (f)	<LOQ	11	⁸⁸				
Levomepromazina	Riñon (f)	<LOQ	8	⁸⁸				
Lincomicina					✓	95 / 1		
Loperamida	Hígado (f)	NR	2	155				
Loratadina	Cerebro (f)						3	88 / 0,9
Loratadina	Riñon (f)						3	78 / 0,7
Loratadina	Corazón (f)						1	76 / -0,5
Loratadina	Plasma						1	89 / -2,9
Loratadina	Pancreas (f)						1	70 / 5,6
Lorazepam					56	99 / 0,6		
Metanfetamina	Piel (f)				✓	100 / 0,4	✓	97 / -0,3
Metilfenidato	Bilis						✓	97 / -1,9
Metformina	Hígado (s)	6	1,5	151				
Metoprolol	Hígado (f)	NR	0,4	155	1949	100 / 0,7		
Metoprolol	Corazón (f)				1949	100 / 0,7	1	89 / -5,2
Metoprolol	Plasma	NR	0,1	155	1949	100 / 0,7		
Metoprolol	Riñón (f)	NR	0,5	155	1949	100 / 0,7	105	99 / -0,5
Metoprolol	Piel (f)				1949	100 / 0,7	14	75 / 0
Metronidazol					✓	100 / 0,8		
Mianserina	Riñon (f)	0,01	4	⁸⁸				
Mianserina	Riñón (f)	NR	14	155				
Midazolam					6	81 / 0		
Mirtazapina	Cerebro (f)	NR	1	155				
Mirtazapina	Hígado (f)	0,03	5	⁸⁸				
Mirtazapina	Hígado (f)	NR	0,3	155				
Mirtazapina	Riñon (f)	0,03	95	⁸⁸				
Mirtazapina	Riñón (f)	NR	0,3	155				
N-Desmetilcitalopram	Cerebro (f)	NR	1	155				
N-Desmetilcitalopram	Músculo (f)	NR	0,3	155				
N-Desmetilcitalopram	Plasma	NR	0,1	155				
Norfluoxetina	Agallas (f)	NR	3	154				
Norfluoxetina	Cerebro (s)	0,3	34	151				
Norfluoxetina	Gonadas (s)	0,3	13	151				
Norfluoxetina	Hígado (f)	NR	9	154				

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
Norfluoxetina	Músculo (f)	NR	4	154				
Norfluoxetina	Músculo (s)	0,3	2	151				
Norsertalina	Cerebro (f)	NR	25	155				
Norsertalina	Cerebro (f)	Bld	45	149				
Norsertalina	Cerebro (s)	0,4	400	151				
Norsertalina	Gonadas (s)	0,4	42	151				
Norsertalina	Hígado (f)	Bld	54	149				
Norsertalina	Hígado (s)	0,4	647	151				
Norsertalina	Músculo (f)	<LOD	12	149				
Norsertalina	Músculo (s)	0,4	66	151				
Norsertalina	Plasma	Bld	3	149				
Norsertalina	Riñón (f)	Bld	62	149				
O-desmetilvenlafaxina	Hígado (f)	NR	0,7	155	✓	96 / 0,9		
O-desmetilvenlafaxina	Plasma	NR	0,2	155	✓	96 / 0,9	✓	96 / -0,3
O-desmetilvenlafaxina	Riñón (f)	NR	2	155	✓	96 / 0,9		
Ofloxacina					✓	98 / 0,5		
Ondansetrón	Riñón (f)						✓✓	97 / 0
Ondansetrón	Piel (f)						✓✓	97 / 0,1
Ondansetrón	Hígado (f)						✓	97 / 0,1
Ondansetrón	Páncreas (f)						✓	97 / 0,9
Orfenadrina	Hígado (f)	NR	0,3	155				
Oxazepam					85	99 / 0,7		
Oxcarbazepina					293	100 / 0,5		
Paroxetina	Hígado (f)	<LOQ	3	⁸⁸				
Paroxetina	Riñón (f)	<LOQ	10	⁸⁸				
Propifenazona					4	88 / -0,5		
Quetiapina	Agallas (f)				✓	98 / 1	✓	78 / 0,7
Quetiapina	Cerebro (f)				✓	98 / 1	✓✓✓	98 / -0,3
Quetiapina	Hígado (f)				✓	98 / 1	✓	97 / 0,3
Quetiapina	Riñón (f)				✓	98 / 1	✓✓✓✓	100 / 0,5
Quetiapina	Piel (f)				✓	98 / 1	✓	60 / 2,6
Quetiapina	Corazón (f)				✓	98 / 1	✓✓	94 / -1,3
Quetiapina	Páncreas (f)				✓	98 / 1	✓✓✓	100 / -0,4
Sertralina	Cerebro (s)	1	17	151	8	97 / 0,4	385	100 / -0,5
Sertralina	Corazón (f)				8	97 / 0,4	143	100 / 0,1
Sertralina	Gónadas (s)	1	7	151	8	97 / 0,4		
Sertralina	Hígado (f)	17	8	149	8	97 / 0,4	1236	98 / 2,4
Sertralina	Hígado (f)	0,01	24	⁸⁸	8	97 / 0,4	1236	98 / 2,4
Sertralina	Hígado (f)	53	4	153	8	97 / 0,4	1236	98 / 2,4
Sertralina	Hígado (f)	NR	1	155	8	97 / 0,4	1236	98 / 2,4
Sertralina	Músculo (f)	NR	0,2	155	8	97 / 0,4	87	100 / -0,8

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
Sertralina	Músculo (f)	17	1	149	8	97 / 0,4	87	100 / -0,8
Sertralina	Páncreas (f)				8	97 / 0,4	1604	100 / -0,9
Sertralina	Plasma	17	0,5	149	8	97 / 0,4	72	100 / 0,9
Sertralina	Riñon (f)	0,01	44	⁸⁸	8	97 / 0,4	957	100 / -0,6
Sertralina	Riñón (f)	NR	1	155	8	97 / 0,4	957	100 / -0,6
Sertralina	Riñón (f)	17	24	149	8	97 / 0,4	957	100 / -0,6
Sertralina	Agallas (f)				8	97 / 0,4	448	100 / -0,5
Sertralina	Piel (f)				8	97 / 0,4	106	100 / 0,3
Sotalol	Piel (f)				2447	99 / 0,8	5	95 / -2,6
Sotalol	Hígado (f)				2447	99 / 0,8	8	98 / -0,2
Sotalol	Pancreas (f)				2447	99 / 0,8	3	94 / -0,5
Sotalol	Agallas (f)				2447	99 / 0,8	13	78 / 0,2
Sotalol	Plasma)				2447	99 / 0,8	< LOQ	65 / -5,8
Sulfametazina	Hígado (f)	NR	0,1	155				
Sulfametoxazol	Agallas (f)	NR	2	154	279	80 / 0,5		
Sulfametoxazol	Hígado (f)	NR	0,4	155	279	80 / 0,5		
Sulfametoxazol	Hígado (f)	NR	2	154	279	80 / 0,5		
Sulfametoxazol	Músculo (f)	NR	2	154	279	80 / 0,5		
Sulfatiazole	Agallas (f)	NR	2	154	✓	96 / 1		
Sulfatiazole	Hígado (f)	NR	2	154	✓	96 / 1		
Sulfatiazole	Músculo (f)	NR	2	154	✓	96 / 1		
Sulpirida					✓	100 / 1,3		
Telmisartan	Hígado (f)	NR	2	155	✓	100 / -0,8	✓✓	100 / -0,1
Telmisartan	Plasma	NR	0,6	155	✓	100 / -0,8		
Telmisartan	Riñón (f)	NR	0,1	155	✓	100 / -0,8	✓	100 / 0
Telmisartan	Piel (f)				✓	100 / -0,8		
Temazepam					92,5	100 / 0,1		
Teofilina					✓	87 / 0,9		
Terazosin	Riñón (f)						✓	100 / 0,2
Terbinafina	Músculo (f)	NR	0,1	155				
Tiamulin	Músculo (f)						✓	97 / -0,7
Tiamulin	Piel (f)						✓	100 / 0,3
Tiamulin	Cerebro (f)						✓	93 / 0
Tramadol	Cerebro (100	200	148				
Tramadol	Cerebro (f)	NR	9	155				
Tramadol	Hígado (f)	1,4	3	⁸⁸				
Tramadol	Hígado (f)	NR	3	155				
Tramadol	Plasma	NR	1	155				
Tramadol	Plasma	100	46	148				
Tramadol	Riñon (f)	1,4	6	⁸⁸			✓	100 / -0,3
Tramadol	Riñón (f)	NR	6	155			✓	100 / -0,3
Trazodona	Riñón (f)						✓	100 / 0,1
Trimetoprima	Agallas (f)	NR	5	154	52	95 / 0,8	1	77 / -0,7
Trimetoprima	Corazón (f)				52	95 / 0,8	<LOQ	91 / 5,1
Trimetoprima	Hígado (f)	NR	0,4	155	52	95 / 0,8		
Trimetoprima	Hígado (f)	NR	3	154	52	95 / 0,8		

Fármaco	Matriz	Conc. agua* ng/mL	Conc. matriz* (ng/mL o ng/g)	Ref.	Agua río Llobregat		Peces río Llobregat	
					Presencia / Conc. (ng/L)	Library score / Error (ppm)	Presencia / Conc. (f) (ng/L)	Library score / Error (ppm)
Trimetoprima	Músculo (f)	NR	9	154	52	95 / 0,8		
Trimetoprima	Músculo (s)	0,7	0,7	151	52	95 / 0,8		
Valsartan					1461	96 / -0,6		
Venlafaxina	Agallas (f)				278	92 / 0,4	56	100 / 1,5
Venlafaxina	Cerebro (f)	330	3	153	278	92 / 0,4	153	97 / 0,5
Venlafaxina	Cerebro (f)	NR	11	123	278	92 / 0,4	153	97 / 0,5
Venlafaxina	Gonadas (f)	NR	2	123	278	92 / 0,4		
Venlafaxina	Gonadas (s)	1	5	151	278	92 / 0,4		
Venlafaxina	Hígado (f)	NR	1	123	278	92 / 0,4	21	99 / -0,9
Venlafaxina	Hígado (f)	0,2	2	⁸⁸	278	92 / 0,4	21	99 / -0,9
Venlafaxina	Hígado (f)	330	21	153	278	92 / 0,4	21	99 / -0,9
Venlafaxina	Hígado (f)	NR	1	155	278	92 / 0,4	21	99 / -0,9
Venlafaxina	Hígado (s)	0,9	57	151	278	92 / 0,4	21	99 / -0,9
Venlafaxina	Músculo (f)	NR	0,1	155	278	92 / 0,4	6	53 / -0,7
Venlafaxina	Músculo (f)	NR	1	123	278	92 / 0,4	6	53 / -0,7
Venlafaxina	Músculo (s)	0,9	0,4	151	278	92 / 0,4	6	53 / -0,7
Venlafaxina	Plasma	330	3	153	278	92 / 0,4	44	97 / 0,4
Venlafaxina	Plasma	NR	0,2	155	278	92 / 0,4	44	97 / 0,4
Venlafaxina	Plasma	NR	3	123	278	92 / 0,4	44	97 / 0,4
Venlafaxina	Riñon (f)	0,2	5	⁸⁸	278	92 / 0,4	44	90 / -0,5
Venlafaxina	Riñón (f)	NR	4	155	278	92 / 0,4	44	90 / -0,5
Venlafaxina	Piel (f)				278	92 / 0,4	27	86 / -0,2
Venlafaxina	Páncreas (f)				278	92 / 0,4	33	92 / -0,2
Venlafaxina	Corazón (f)				278	92 / 0,4	49	92 / -0,4
Verapamilo	Hígado (f)	NR	0,2	155	18	99 / 0,9		

NR. No reportado. LOD: Límite de detección. LOQ: Límite de cuantificación. *Se toma el valor máximo reportado en el estudio. (f): concentración determinada en peso fresco. (s): concentración determinada en peso seco.

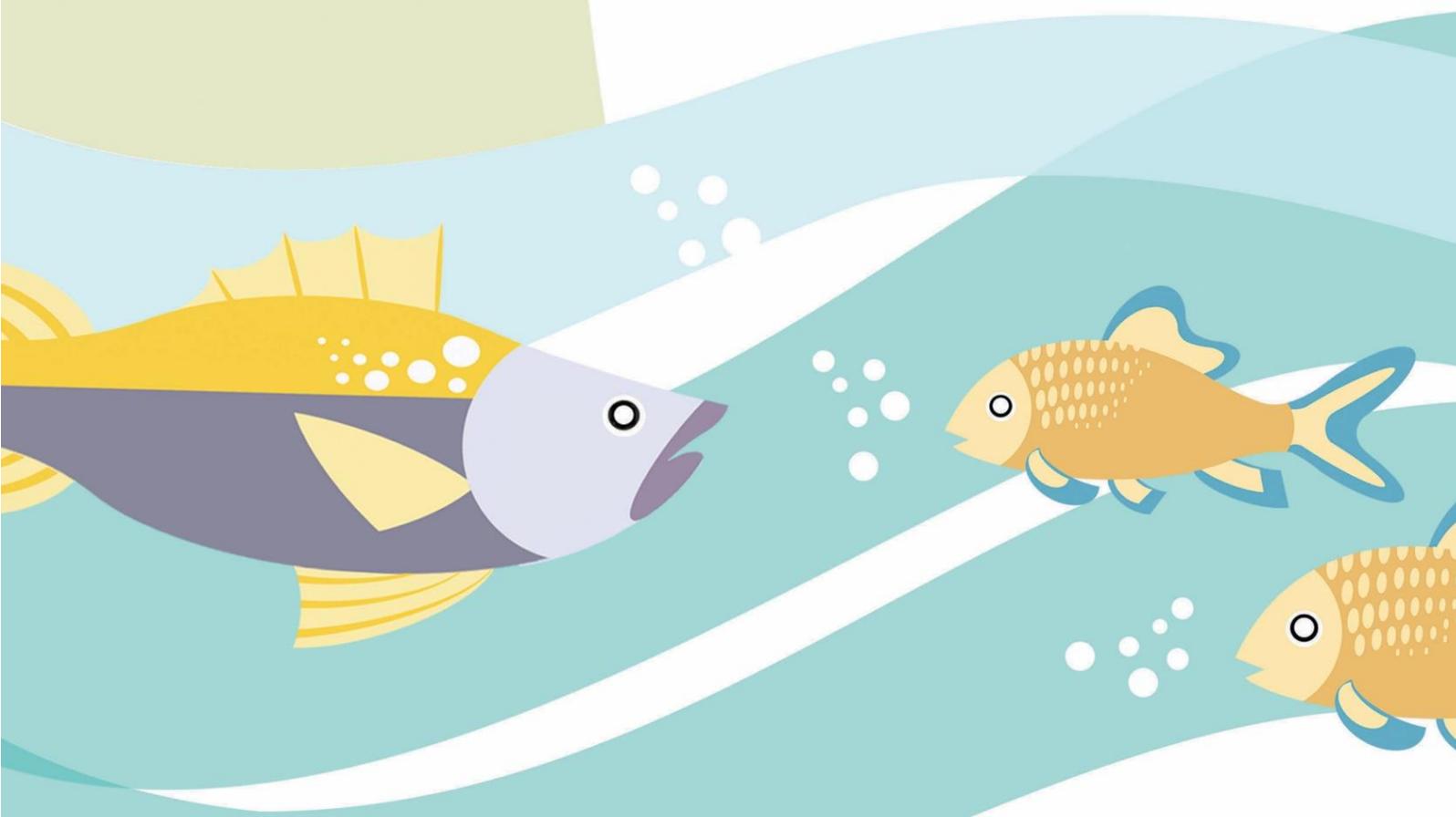
✓ : Detectado en agua; ✓ Detectado en la especie *Anguilla anguilla*; ✓ : Detectado en la especie *Chelon ramada*; ✓ : Detectado en la especie *Cyprinus carpio*; ✓ : Detectado en la especie *Luciobarbus graellsii*.

Entre los resultados obtenidos, se puede decir la captación por parte de los órganos que se han referenciado como los más probables a la acumulación, concuerdan con algunas otras publicaciones científicas como los trabajos de Tanoue et al. ¹⁴⁹, McCallum et al. ¹²³, Arnok et al. ¹⁵¹, Grabicova et al., ¹⁵⁵, y Ondarza et al. ¹⁵⁴ donde se reportan uno o más de los mismos órganos con mayor captación de fármacos. Sin embargo, cabe resaltar que la bioacumulación específica de los fármacos en cada uno de los órganos puede variar por razones como la velocidad de difusión del fármaco a través del órgano, el área de la superficie de intercambio y la biotransformación o metabolismo del compuesto farmacéutico ²⁸⁷⁻²⁸⁹. Finalmente, se debe recordar que la transferencia de fármacos hacia el interior del pez, se da por varias vías: a través de la piel, la agallas, y la dieta. Por eso se encuentran notables variaciones en la acumulación de los fármacos a través de las especies: variabilidad en la dieta, edad, tamaño ¹⁵¹ y también el agua que los rodea, ya que se encuentran especies, como la *Anguilla anguilla* que es una especie que mantiene en constante movimiento entre el agua del río y el agua del mar ²⁹⁰.

Los resultados que presenta este estudio remarcan también la importancia del aporte de fármacos por parte de las aguas residuales que llegan al río Llobregat y que afectan directamente la calidad de las aguas y del hábitat de las especies de plantas y animales que en él habitan. La presencia de un alto número de fármacos de uso humano en las aguas residuales y en el interior de los peces, resalta la necesidad de trabajar fuertemente en políticas públicas en torno a la descontaminación de aguas con dichos fármacos, al igual que trabajar en la investigación de los efectos de dichos fármacos en la biota que puedan alterar el comportamiento de la especie y la biodiversidad, o generar problemas crónicos que puedan trascender a través de las generaciones.

CAPÍTULO 5

Conclusiones



A través de la presente tesis doctoral, se han realizado diversos estudios de análisis cualitativos y cuantitativos de fármacos en muestras biológicas de peces, que incluyeron la validación de métodos de extracción, y el uso de un novedoso método de adquisición de datos por medio de espectrometría de masas de alta resolución, con el método SWATH.

En el primer capítulo de la presente memoria, se realizó una introducción amplia, donde se expone un estado del arte acerca de la presencia ambiental de los fármacos de uso humano y veterinario. Dicha revisión bibliográfica incluyó una discusión en torno a la evolución y transformación que sufren los fármacos en las EDARs como son la remoción de las aguas, (bio)transformación, degradación y/o su posible resistencia a cualquiera de los métodos aplicados en las plantas de tratamiento. Aunque por el momento, las tecnologías aplicadas en los procesos de tratamientos de aguas residuales no permiten la reducción completa de las cargas de fármacos en las aguas, ya sea por mineralización, sorción sobre lodos o degradación microbiológica; la inclusión de nuevas tecnologías y tratamientos especializados en dichos procesos reduciría sustancialmente el ingreso de contaminantes orgánicos de tipo farmacéutico en las aguas receptoras de efluentes. Por ello, se debe mejorar la eliminación y (bio)transformación de los compuestos en función del amplio rango de propiedades fisicoquímicas de los fármacos y sus metabolitos, al igual que intensificar los trabajos y esfuerzos para la implementación de los procesos desde la escala de laboratorio a escala real, para la reducción de costos de las nuevas tecnologías.

Adicionalmente, en el primer capítulo se revisaron trabajos que se han venido realizando en torno a la afectación que esta sufriendo la biota acuática por presencia de residuos farmacéuticos en las aguas naturales. Se hace un resumen de los procesos para el análisis de muestras de peces haciendo énfasis en la purificación de los extractos y se incluye un apartado importante de la técnica analítica de espectrometría de masas. A partir de esto, se plantean diversos objetivos en la tesis. Entre los que sobresalen la validación de métodos analíticos para la determinación de fármacos en peces, y su respectiva aplicación en diversos tipos de muestras.

En el Capítulo 3, se presenta toda la parte experimental desarrollada en la tesis, y en el Capítulo 4 se presentan todos los resultados desarrollados en la tesis y sus respectivas discusiones. De los trabajos realizados, se destacan las siguientes conclusiones generales:

- La determinación de contenido lipídico en matrices de peces realizada con diferentes solventes, o mezclas de solventes, soportada con ultrasonido, puede llegar a tener variaciones significativas. El uso de solventes de tipo alcohólico como el metanol, puede aumentar el

contenido de material extraído, por presencia de coextractos de la matriz diferentes a los lípidos.

- La extracción de materiales componentes de la matriz, diferentes a los analitos varía en función de la técnica de extracción y de la naturaleza del solvente que se utilice. El uso de técnicas de extracción menos agresivas como los QuEChERS extrae menos coextractos, comparado con la técnica de ultrasonido. Adicional a eso, el metanol como solvente, resulta ser mejor agente extractor de materia, comparada con el acetonitrilo.

- La recuperación y la variabilidad de los analitos por las técnicas de extracción de ultrasonido y QuEChERS son comparables, según el primer trabajo validado. Sin embargo, la técnica de QuEChERS presenta ventajas en el menor uso de solventes que repercute en una técnica más ecológica y económica. La velocidad en la preparación de muestras y menor contenido de material coextraído también fueron beneficios al momento de seleccionar dicha técnica de extracción.

- El uso de filtros para separar el material particulado no siempre es aconsejable. El realizar más pasos en el proceso de extracción de la muestra, conlleva a tener más variabilidad en el resultado final. Uno de los posibles motivos de la variabilidad está en la pérdida de analitos durante el proceso. Se recomiendan otras maneras de subsanar la presencia de turbiedad o color en el extracto final, sobretodo aquellas que no tengan interacción directa con el analito como por ejemplo la centrifugación, sedimentación o el descenso de la temperatura. En el caso de esta tesis, se hizo uso de la centrifugación para eliminar material particulado en el extracto final, evitando el uso de filtros de PTFE que experimentalmente se comprobó que podían retener algunos fármacos de interés en más de un 30 %.

- La aplicación de un método de purificación de extractos en formato cartucho, como el HLB Prime, o en formato de tipo dispersivo como PSA/C18, el EMR lipid removal, o el Zsep+ puede llevar a tres diferentes escenarios cuando se analizan sus respectivos extractos por HRMS como son: (i) no tener efecto en la mejora de la señal del analito; (ii) mejorar la señal del analito como resultado de reducción de coextractos presentes en el extracto de análisis; o (iii) tener una señal más reducida como resultado de la pérdida de los analitos (como sucede con los filtros antes mencionados). Los tres escenarios son comunes cuando se desarrollan métodos de análisis multiresiduos que involucran diversidad de compuestos y con variables características fisicoquímicas.

- Sorbentes de tipo dispersivo (d-SPE) usados durante la purificación del extracto parecen resultar más eficientes. De acuerdo a la bibliografía consultada, su efectividad está relacionada con el área de contacto entre el material adsorbente y el extracto. Adicionalmente,

de acuerdo a los trabajos realizados, la facilidad en el manejo y el ahorro en el tiempo durante su uso, son factores importantes al momento de los análisis, por los cuales son una buena elección para la purificación de los extractos.

- El uso de dos tipos de matrices diferentes durante el primer método validado permitió demostrar la variabilidad de las extracciones entre peces de especies diferentes, y provenientes de diferentes orígenes. Los peces de especie *Salmo salar* adquirido en un mercado local de Barcelona, presentaba menor efecto matriz con respecto a peces *Leuciscus cephalus* provenientes del río Sava. Muy posiblemente, los peces adquiridos en el mercado local, provenga de una piscifactoría, cuyas condiciones de producción son controladas y los peces de la especie *Leuciscus cephalus*, provenientes de río natural, y que tienden a vivir en las profundidades, o partes bajas de los ríos, por lo que están mucho más expuestos a material contaminante tanto del agua como de los sedimentos. Durante los procesos de extracción de los analitos, los contaminantes también se extraen, y en muchos casos, los procesos de purificación del extracto no son suficientes para eliminarlos en su totalidad, por lo que estarán presentes durante el análisis por HRMS.

- Durante el primer método validado, la matriz de *Salmo salar* pudo ser exitosamente validada para 21 fármacos cuyo LOD fué inferior a 10 ng/g de matriz en peso seco para 17 compuestos, y entre 10 y 25 ng/ g de matriz en peso seco para 4 compuestos. De la misma manera, la matriz de *Leuciscus cephalus* pudo ser exitosamente validada para 19 compuestos cuyo LOD fue inferior a 10 ng/g de matriz en peso seco para 13 compuestos, y por encima de 10 ng/g de matriz en peso seco para 6 compuestos

- La reproducibilidad del método evaluado en el mismo día (*interday*), y a lo largo de varios días (*intraday*) analizado en la matriz de *Salmo salar* usando el primer método validado tiene variaciones de desviaciones relativas estandares (RSD) en los 3 niveles de concentración escogidos, inferiores al 25 % para todos los compuestos analizados. Por otro lado, la reproducibilidad método evaluado en el mismo día (*interday*), y a lo largo de varios días (*intraday*) analizado en la matriz de *Leuciscus cephalus* tiene variaciones de RSD inferiores al 25 % en los 3 niveles de concentración escogidos para la mayoría de los fármacos validados. Sin embargo, se presentan compuestos con valores superiores al 25 % de RSD en una o dos de las concentraciones validadas, pero no en las 3.

- Las curvas de calibración de cada uno de los fármacos validados preparadas en cada una de las matrices trabajadas, presentaron coeficientes de determinación, r^2 , superiores a 0,99 para todos los fármacos en las dos matrices, exceptuando el acetaminofén (0,97) y ketoprofeno (0,98) en la matriz de *Leuciscus cephalus*. Este valor de r^2 es un indicativo de la

buena respuesta lineal que presentan los compuestos en cada matriz al momento de su cuantificación por HRMS.

- La aplicación de el primer método validado, permitió la determinación de fármacos como el acetaminofén y el propranolol en concentraciones de 24 y 80 ng/g en peso seco de dos muestras tomadas de diferentes puntos del río Adige, en Italia. Adicionalmente, en otros tres puntos de muestreo, se detectaron acetaminofén, propranolol y venlafaxina por debajo del límite de cuantificación (LOQ).

- Durante el segundo método validado, la matriz de *Leuciscus cephalus* fué exitosamente validada para 47 compuestos con límites de detección inferiores a 1,0 ng/g de pez en peso fresco, con recuperaciones superiores al 60 % para 45 de ellos, y recuperaciones entre 40 y 60 % para los dos compuestos restantes, en los 3 niveles de concentraciones validados (5, 25, 50 ng/g de pez).

- La reproducibilidad del segundo método validado evaluado en el mismo día (*interday*), y a lo largo de varios días (*intraday*) tiene variaciones de RSD inferiores al 20 % para todos los fármacos validados. Sin embargo, se presentan compuestos con valores superiores al 20 % de RSD en una o dos de las concentraciones validadas, pero no en las 3.

- Las curvas de calibración de cada uno de los fármacos validados en el segundo método, presentaron r^2 , superiores a 0,99 para todos los fármacos validados, exceptuando el ácido mefenámico y la sulfadimetoxina (0,98).

- La aplicación del segundo método validado, permitió la cuantificación de fármacos en peces del río Adige de la siguiente manera: cafeína, diltiazem, furazolidona y sulfapiridina en concentraciones hasta de 49 ng/g de pez en peso fresco. Adicionalmente, bezafibrato, claritromicina, trimetoprim y verapamilo fueron detectados, pero con concentraciones por debajo del LOQ. También fue posible la cuantificación de diltiazem y verapamilo en concentraciones hasta 5 ng/g de pez en peso fresco y debajo del LOQ respectivamente en peces del río Evrotas. En el caso de los peces del río Llobregat, se logró la detección de claritromicina y verapamilo en concentraciones debajo del LOQ. Finalmente se lograron cuantificar fármacos en peces del río Sava de la siguiente manera: cafeína, carbamazepina, diltiazem, y verapamilo en concentraciones hasta de 69, 2, 6 y 35 ng/g de pez en peso fresco respectivamente. Adicionalmente bezafibrato, claritromicina, y ketoprofeno fueron detectados, pero con concentraciones debajo del LOQ.

- La aplicación del segundo método validado, permitió la detección de benzoilecgonina, cocaína, nicotina y ofloxacina por el método de *suspect screening* en peces del río Sava, Adige y Evrotas.
- En términos generales, los diferentes métodos validados presentan alta sensibilidad, alta selectividad, reproducibilidad, versatilidad a la hora de analizar diferentes familias de compuestos, ser relativamente rápidos y sencillos al momento de procesar las muestras y relativamente económicos.
- La adquisición de espectrometría de masas con la tecnología SWATH puede ser comparada con la adquisición de espectros de masas usando QqQ, ya que el tamaño de las ventanas de adquisición, se podrían llegar a comparar a los equivalentes adquiridos usando MRM. De la misma manera la tecnología SWATH, fue aplicada como una herramienta analítica efectiva que permite la detección de analitos sin configuración previa de la masa de los iones precursores, masa de los fragmentos, tiempos de retención o valores de energía.
- Una ventaja adicional de la adquisición en SWATH, está en que la obtención de todos los espectros MS/MS de todos los analitos están disponibles para identificaciones de tipo cualitativo gracias al análisis retrospectivo que se puede desarrollar en cualquier momento sin necesidad de reinyección de la muestra.
- En el análisis de agua del río Llobregat analizada en las cercanías de San Joan Despí, se detectaron 27 de los 47 fármacos analizados por análisis direccionado en un rango entre 4 y 2500 ng/L. Entre los fármacos que se encuentran en mayor concentración están la cafeína, metoprolol, sotalol y valsartan con concentraciones entre los 1500 y 2500 ng/L. Adicionalmente, por análisis de sospechosos se detectaron 26 compuestos extra, de los cuales 15 se detectaron exclusivamente en el agua, y 11 en matrices del agua y de los peces.
- En el análisis de los órganos internos de los peces de la especie *Anguilla anguilla* se detectaron 9 fármacos por análisis direccionado. La máxima concentración fue calculada para la acridona en bilis (432 ng/mL). El fármaco más comúnmente detectado fue la sertralina detectada en todos los órganos, excepto en la bilis y el plasma.
- En el análisis de los órganos internos de los peces de la especie *Chelon ramada* se detectaron 11 fármacos por análisis direccionado. La máxima concentración fue calculada para la sertralina en pancreas (1604 ng/g) y en hígado (1236 ng/g). Los fármacos más comúnmente detectados fueron el diltiazem, la sertralina y la venlafaxina.

- En el análisis de los órganos internos de los peces de la especie *Cyprinus carpio* se detectaron 10 fármacos por análisis direccionado. La máxima concentración fue calculada para la sertralina en pancreas (1165 ng/g). El fármaco más comunmente detectados fué la sertralina detectada en todos los órganos, excepto en la bilis.

- En el análisis de los órganos internos de los peces de la especie *Luciobarbus graellsii* se detectaron 5 fármacos por análisis direccionado. La máxima concentración fué calculada para la sertralina en riñones (428 ng/g). El fármaco más comunmente detectados fue la sertralina detectada en todos los órganos, excepto en la bilis

- Por medio del análisis de sospechosos se detectaron anfetamina y trazodona en muestras de *Anguilla anguilla*; fentermina, tiamulina y el tramadol en muestras de *Chelon Ramada*; terazosin en muestras de *Cyprinus carpio*, y ondasentrón en muestras de *Anguilla anguilla* y *Chelon Ramada*.

- La acumulación de fármacos parece estar más orientada hacia el riñon, la piel, el hígado, el cerebro y el páncreas, ya que fueron los órganos donde más se detectaron compuestos de tipo farmacéutico, metabolitos y drogas de abuso.

Como recomendaciones finales:

- Teniendo en cuenta el incremento del consumo de los fármacos que se ha demostrado en la introduccion de esta tesis, y de la permanente detección de fármacos en el agua y la biota que se ha confirmado igualmente en esta tesis, se requieren acciones por parte de los gobiernos y politicas públicas para reducir o eliminar la descarga de este tipo de productos en ambientes acuáticos a fin de prevenir daños ecológicos, quizas irreversibles, sobre la fauna y la flora que habita en dichas aguas. Urge implementar programas de mejora de las plantas de tratamiento de aguas residuales para la remoción de fármacos, al igual que mejorar el control sobre las descargas de aguas que contengan estos productos como, por ejemplo, de hospitales, empresas, casas de producción animal e industrias farmacéuticas. Finalmente, se debe fortalecer el impulso a los programas que generen producción de fármacos más efectivos con dosis mas bajas y controladas a fin de evitar la futura descarga en aguas residuales.

- Se requieren mayores esfuerzos en seguir desarrollando técnicas de análisis de muestras ambientales que sean coherentes con una conciencia ambiental, una química verde (*green chemistry*) y además, segura para el analista. Desarrollos analíticos que tengan menos material de desecho, menos consumo de disolvente tóxico, y menos consumo de energía, entre lo que se incluye menor tiempo de análisis, deben ser promovidos más efectivamente.

La tendencia a desarrollar métodos que requieran menos cantidad de material a analizar, es decir, técnicas miniaturizadas de extracción, soportadas por las nuevas tecnologías de instrumentos analíticos muy rápidos y sensibles son ideales para cumplir con este objetivo. Sin embargo, se espera que esas evoluciones en las técnicas de extracción y análisis no comprometan la calidad de la investigación y la fiabilidad de los resultados obtenidos y reportados, en terminos de precisión, exactitud, y sensibilidad del método, con el fin de poder seguir dando argumentos fuertes, reales y fiables a la hora de promover políticas públicas medioambientales.

Bibliografía



1. Proia, L.; Osorio, V., The Effect of PhACs on Biological Communities in Rivers: Field Studies. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2013**; Vol. 62, pp 649-670.
2. Corcoran, J.; Winter, M. J.; Tyler, C. R., Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical reviews in toxicology* **2010**, *40* (4), 287-304.
3. aus der Beek, T.; Weber, F. A.; Bergmann, A.; Hickmann, S.; Ebert, I.; Hein, A.; Küster, A., Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environmental toxicology and chemistry* **2016**, *35* (4), 823-835.
4. OECD Health at a Glance 2019. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/4dd50c09-en> (accessed 02.11.2019).
5. OECD.Stat Indicators O. Health at a Glance 2019. https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC (accessed 10.10.2019).
6. Simó Miñana, J., Utilización de medicamentos en España y en Europa. *Atención Primaria* **2012**, *44* (6), 335-347.
7. AEMPS Observatorio de uso de medicamentos. <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/home.htm> (accessed 11.09.2019).
8. Jones, O.; Voulvoulis, N.; Lester, J., Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. *Environmental technology* **2001**, *22* (12), 1383-1394.
9. European_Comision_EU, Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. **2018**.
10. Schwarzenbach, R. P.; Escher, B. I.; Fenner, K.; Hofstetter, T. B.; Johnson, C. A.; Von Gunten, U.; Wehrli, B., The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* **2006**, *313* (5790), 1072-1077.
11. Heberer, T., Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters* **2002**, *131* (1), 5-17.
12. Behera, S. K.; Kim, H. W.; Oh, J.-E.; Park, H.-S., Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science of the Total Environment* **2011**, *409* (20), 4351-4360.
13. Evgenidou, E. N.; Konstantinou, I. K.; Lambropoulou, D. A., Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review. *Science of the Total Environment* **2015**, *505*, 905-926.
14. Bottoni, P.; Caroli, S.; Caracciolo, A. B., Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological & Environmental Chemistry* **2010**, *92* (3), 549-565.
15. Lapworth, D.; Baran, N.; Stuart, M.; Ward, R., Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environmental pollution* **2012**, *163*, 287-303.
16. Patrolecco, L.; Ademollo, N.; Grenni, P.; Tolomei, A.; Caracciolo, A. B.; Capri, S., Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. *Microchemical Journal* **2013**, *107*, 165-171.

17. Lopez-Serna, R.; Petrovic, M.; Barcelo, D., Direct analysis of pharmaceuticals, their metabolites and transformation products in environmental waters using on-line TurboFlow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2012**, *1252*, 115-29.
18. Gros, M.; Petrovic, M.; Barcelo, D., Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Analytical Chemistry* **2008**, *81* (3), 898-912.
19. Oulton, R. L.; Kohn, T.; Cwiertny, D. M., Pharmaceuticals and personal care products in effluent matrices: A survey of transformation and removal during wastewater treatment and implications for wastewater management. *Journal of Environmental Monitoring* **2010**, *12* (11), 1956-1978.
20. Mandaric, L.; Kalogianni, E.; Skoulikidis, N.; Petrovic, M.; Sabater, S., Contamination patterns and attenuation of pharmaceuticals in a temporary Mediterranean river. *Science of the Total Environment* **2019**, *647*, 561-569.
21. Jelic, A.; Gros, M.; Ginebreda, A.; Cespedes-Sánchez, R.; Ventura, F.; Petrovic, M.; Barcelo, D., Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research* **2011**, *45* (3), 1165-1176.
22. Verlicchi, P.; Al Aukidy, M.; Zambello, E., Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—a review. *Science of the Total Environment* **2012**, *429*, 123-155.
23. Rivera-Jaimes, J. A.; Postigo, C.; Melgoza-Alemán, R. M.; Aceña, J.; Barceló, D.; López de Alda, M., Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment* **2018**, *613-614*, 1263-1274.
24. Yang, Y.; Ok, Y. S.; Kim, K. H.; Kwon, E. E.; Tsang, Y. F., Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment* **2017**, *596-597*, 303-320.
25. Lopez-Serna, R.; Jurado, A.; Vazquez-Sune, E.; Carrera, J.; Petrovic, M.; Barceló, D., Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environ Pollut* **2013**, *174*, 305-15.
26. López-Serna, R.; Pérez, S.; Ginebreda, A.; Petrović, M.; Barceló, D., Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction-liquid chromatography- electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta* **2010**, *83* (2), 410-424.
27. Osorio, V.; Marce, R.; Perez, S.; Ginebreda, A.; Cortina, J. L.; Barcelo, D., Occurrence and modeling of pharmaceuticals on a sewage-impacted Mediterranean river and their dynamics under different hydrological conditions. *Science of the Total Environment* **2012**, *440*, 3-13.
28. Mendoza, A.; Aceña, J.; Pérez, S.; De Alda, M. L.; Barceló, D.; Gil, A.; Valcárcel, Y., Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: a case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. *Environmental research* **2015**, *140*, 225-241.

29. Water, U., The United Nations World Water Development Report 2017: wastewater the untapped resource. Paris: UNESCO: **2017**.
30. Daughton, C. G., Pharmaceuticals in the environment: sources and their management. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2013**; Vol. 62, pp 37-69.
31. Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D., Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology* **2006**, 76 (2), 122-159.
32. Oliveira, T. S.; Al Aukidy, M.; Verlicchi, P., Occurrence of common pollutants and pharmaceuticals in hospital effluents. In *Hospital Wastewaters*, Springer: **2017**; pp 17-32.
33. Ginebreda, A.; Pérez, S.; Rivas, D.; Kuzmanovic, M.; Barceló, D., Pollutants of emerging concern in rivers of catalonia: occurrence, fate, and risk. In *Experiences from Surface Water Quality Monitoring*, Springer: **2015**; pp 283-320.
34. Cairá, M. R.; Ionescu, C., *Drug metabolism: current concepts*. Springer Science & Business Media: **2006**; Vol. 7.
35. Parkinson, A.; Ogilvie, B.; Buckley, D.; Kazmi, F.; Czerwinski, M.; Parkinson, O., Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. *Biotransformation of xenobiotics* **1996**, 131-160.
36. Celiz, M. D.; Tso, J.; Aga, D. S., Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2009**, 28 (12), 2473-2484.
37. Jones, O.; Voulvoulis, N.; Lester, J., Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water research* **2002**, 36 (20), 5013-5022.
38. Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J. M.; Llombart, M.; García-Jares, C.; Rodríguez, I.; Gómez, M.; Ternes, T., Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research* **2004**, 38 (12), 2918-2926.
39. Rainsford, K., Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology* **2009**, 17 (6), 275-342.
40. Goodman, L. S., *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill New York: **1996**; Vol. 1549.
41. Lahti, M.; Brozinski, J. M.; Jylhä, A.; Kronberg, L.; Oikari, A., Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2011**, 30 (6), 1403-1411.
42. Holčapek, M.; Kolářová, L.; Nobilis, M., High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2008**, 391 (1), 59-78.
43. Aceña, J.; Pérez, S.; Eichhorn, P.; Solé, M.; Barceló, D., Metabolite profiling of carbamazepine and ibuprofen in *Solea senegalensis* bile using high-resolution mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2017**, 409 (23), 5441-5450.
44. Ternes, T., Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment. ACS Publications: **2001**.

45. Cook, P. A.; Bellis, M. A., Knowing the risk: relationships between risk behaviour and health knowledge. *Public health* **2001**, *115* (1), 54-61.
46. Kümmerer, K., Pharmaceuticals in the environment. *Annual review of environment and resources* **2010**, *35*, 57-75.
47. Daughton, C. G., Chapter 1 Pharmaceuticals in the environment: sources and their management. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Petrović, M.; Barceló, D., Eds. Elsevier: 2007; Vol. 50, pp 1-58.
48. Eichhorn, P., General introduction on pharmaceuticals. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2013**; Vol. 62, pp 1-36.
49. Lindqvist, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L., Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Res* **2005**, *39* (11), 2219-28.
50. Vidal-Dorsch, D. E.; Bay, S. M.; Maruya, K.; Snyder, S. A.; Trenholm, R. A.; Vanderford, B. J., Contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents and marine receiving water. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2012**, *31* (12), 2674-2682.
51. Doerr-MacEwen, N. A.; Haight, M. E., Expert stakeholders' views on the management of human pharmaceuticals in the environment. *Environmental management* **2006**, *38* (5), 853-866.
52. Emke, E.; Evans, S.; Kasprzyk-Hordern, B.; de Voogt, P., Enantiomer profiling of high loads of amphetamine and MDMA in communal sewage: A Dutch perspective. *Science of The Total Environment* **2014**, *487*, 666-672.
53. Benotti, M. J.; Snyder, S. A., Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds: implications for ground water replenishment with recycled water. *Groundwater* **2009**, *47* (4), 499-502.
54. Fatta-Kassinos, D.; Kalavrouziotis, I. K.; Koukoulakis, P. H.; Vasquez, M., The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *Science of the Total Environment* **2011**, *409* (19), 3555-3563.
55. Patel, M.; Kumar, R.; Kishor, K.; Mlsna, T.; Pittman Jr, C. U.; Mohan, D., Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical reviews* **2019**, *119* (6), 3510-3673.
56. Esplugas, S.; Bila, D. M.; Krause, L. G. T.; Dezotti, M., Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of hazardous materials* **2007**, *149* (3), 631-642.
57. Beretsou, V. G.; Psoma, A. K.; Gago-Ferrero, P.; Aalizadeh, R.; Fenner, K.; Thomaidis, N. S., Identification of biotransformation products of citalopram formed in activated sludge. *Water Research* **2016**, *103*, 205-214.
58. Göbel, A.; McArdell, C. S.; Joss, A.; Siegrist, H.; Giger, W., Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment* **2007**, *372* (2), 361-371.
59. Gros, M.; Petrovic, M.; Ginebreda, A.; Barcelo, D., Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ Int* **2010**, *36* (1), 15-26.

60. Gulkowska, A.; Leung, H. W.; So, M. K.; Taniyasu, S.; Yamashita, N.; Yeung, L. W.; Richardson, B. J.; Lei, A.; Giesy, J. P.; Lam, P. K., Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water research* **2008**, *42* (1), 395-403.
61. Clara, M.; Kreuzinger, N.; Strenn, B.; Gans, O.; Kroiss, H., The solids retention time—a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water research* **2005**, *39* (1), 97-106.
62. Miege, C.; Choubert, J.; Ribeiro, L.; Eusèbe, M.; Coquery, M., Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants—conception of a database and first results. *Environmental Pollution* **2009**, *157* (5), 1721-1726.
63. Jelic, A.; Fatone, F.; Di Fabio, S.; Petrovic, M.; Cecchi, F.; Barcelo, D., Tracing pharmaceuticals in a municipal plant for integrated wastewater and organic solid waste treatment. *Science of the Total Environment* **2012**, *433*, 352-361.
64. EPA_US, Primer for Municipal Wastewater Treatment Systems. US Environmental Protection Agency Municipal Support: **2004**.
65. Zorita, S.; Mårtensson, L.; Mathiasson, L., Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the Total Environment* **2009**, *407* (8), 2760-2770.
66. Yasojima, M.; Nakada, N.; Komori, K.; Suzuki, Y.; Tanaka, H., Occurrence of levofloxacin, clarithromycin and azithromycin in wastewater treatment plant in Japan. *Water science and technology* **2006**, *53* (11), 227-233.
67. Watkinson, A.; Murby, E.; Costanzo, S., Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water research* **2007**, *41* (18), 4164-4176.
68. Khan, S.; Ongerth, J., Occurrence and removal of pharmaceuticals at an Australian sewage treatment plant. *Water* **2005**, *32* (4), 80-85.
69. Ternes, T.; Joss, A., *Human pharmaceuticals, hormones and fragrances*. IWA publishing: **2007**.
70. Göbel, A.; Thomsen, A.; McArdell, C. S.; Joss, A.; Giger, W., Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environmental science & technology* **2005**, *39* (11), 3981-3989.
71. Benotti, M. J.; Brownawell, B. J., Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry-and wet-weather conditions. *Environmental science & technology* **2007**, *41* (16), 5795-5802.
72. Montemurro, N.; García-Vara, M.; Peña-Herrera, J. M.; Lladó, J.; Barceló, D.; Pérez, S., Conventional and Advanced Processes for the Removal of Pharmaceuticals and Their Human Metabolites from Wastewater. In *Integrated and Sustainable Environmental Remediation*, American Chemical Society: **2018**; Vol. 1302, pp 15-67.
73. Rivera-Utrilla, J.; Sánchez-Polo, M.; Ferro-García, M. Á.; Prados-Joya, G.; Ocampo-Pérez, R., Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* **2013**, *93* (7), 1268-1287.

74. Ternes, T. A., Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water research* **1998**, 32 (11), 3245-3260.
75. Alygizakis, N. A.; Gago-Ferrero, P.; Borova, V. L.; Pavlidou, A.; Hatzianestis, I.; Thomaidis, N. S., Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Science of the Total Environment* **2016**, 541, 1097-1105.
76. Ferrer, I.; Thurman, E. M., Analysis of pharmaceuticals in drinking water, groundwater, surface water, and wastewater. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2013**; Vol. 62, pp 91-128.
77. da Silva, B. F.; Jelic, A.; López-Serna, R.; Mozeto, A. A.; Petrovic, M.; Barceló, D., Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* **2011**, 85 (8), 1331-1339.
78. Petrovic, M.; Eljarrat, E.; Gros, M.; de la Cal, A.; Barceló, D., Emerging contaminants in the water-sediment system: case studies of pharmaceuticals and brominated flame retardants in the Ebro River Basin. *The water framework directive: ecological and chemical status monitoring, Water quality measurement series*. Wiley, Wiltshire **2008**, 287-298.
79. Ying, G.-G.; Zhao, J.-L.; Zhou, L.-J.; Liu, S., Fate and occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment (surface water and sediment). In *Comprehensive analytical chemistry*, Elsevier: **2013**; Vol. 62, pp 453-557.
80. Arya, G.; Tadayan, S.; Sadighian, J.; Jones, J.; de Mutsert, K.; Huff, T. B.; Foster, G. D., Pharmaceutical chemicals, steroids and xenoestrogens in water, sediments and fish from the tidal freshwater Potomac River (Virginia, USA). *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **2017**, 52 (7), 686-696.
81. Fernandes, M. J.; Paíga, P.; Silva, A.; Llaguno, C. P.; Carvalho, M.; Vázquez, F. M.; Delerue-Matos, C., Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. *Chemosphere* **2019**, 124729.
82. Daughton, C. G.; Ternes, T. A., Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental health perspectives* **1999**, 107 (Suppl 6), 907.
83. Gros, M.; Rodriguez-Mozaz, S.; Barcelo, D., Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2012**, 1248, 104-21.
84. Choi, K.; Kim, Y.; Park, J.; Park, C. K.; Kim, M.; Kim, H. S.; Kim, P., Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Science of the Total Environment* **2008**, 405 (1-3), 120-128.
85. Battaglin, W. A.; Bradley, P. M.; Iwanowicz, L.; Journey, C. A.; Walsh, H. L.; Blazer, V. S., Pharmaceuticals, hormones, pesticides, and other bioactive contaminants in water, sediment, and tissue from Rocky Mountain National Park, 2012–2013. *Science of the Total Environment* **2018**, 643, 651-673.

86. Carmona, E.; Andreu, V.; Picó, Y., Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Science of the Total Environment* **2014**, *484*, 53-63.
87. López-Serna, R.; Petrović, M.; Barceló, D., Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Science of the Total Environment* **2012**, *440*, 280-289.
88. Grabicova, K.; Grabic, R.; Fedorova, G.; Fick, J.; Cerveny, D.; Kolarova, J.; Turek, J.; Zlabek, V.; Randak, T., Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream. *Water research* **2017**, *124*, 654-662.
89. Osorio, V.; Pérez, S.; Ginebreda, A.; Barceló, D., Pharmaceuticals on a sewage impacted section of a Mediterranean River (Llobregat River, NE Spain) and their relationship with hydrological conditions. *Environmental Science and Pollution Research* **2012**, *19* (4), 1013-1025.
90. Osorio, V.; Larranaga, A.; Acena, J.; Perez, S.; Barcelo, D., Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Science of the Total Environment* **2016**, *540*, 267-77.
91. Postigo, C.; Sirtori, C.; Oller, I.; Malato, S.; Maldonado, M. I.; De Alda, M. L.; Barceló, D., Solar transformation and photocatalytic treatment of cocaine in water: Kinetics, characterization of major intermediate products and toxicity evaluation. *Applied Catalysis B: Environmental* **2011**, *104* (1-2), 37-48.
92. Śliwka-Kaszyńska, M.; Jakimska-Nagórska, A.; Wasik, A.; Kot-Wasik, A., Phototransformation of three selected pharmaceuticals, naproxen, 17 α -Ethinylestradiol and tetracycline in water: Identification of photoproducts and transformation pathways. *Microchemical Journal* **2019**, *148*, 673-683.
93. Zonja, B.; Gonçalves, C.; Pérez, S.; Delgado, A.; Petrovic, M.; Alpendurada, M. F.; Barceló, D., Evaluation of the phototransformation of the antiviral zanamivir in surface waters through identification of transformation products. *Journal of hazardous materials* **2014**, *265*, 296-304.
94. Andrezzi, R.; Raffaele, M.; Nicklas, P., Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* **2003**, *50* (10), 1319-1330.
95. Gonçalves, C.; Perez, S.; Osorio, V.; Petrovic, M.; Alpendurada, M.; Barcelo, D., Photofate of oseltamivir (Tamiflu) and oseltamivir carboxylate under natural and simulated solar irradiation: kinetics, identification of the transformation products, and environmental occurrence. *Environmental science & technology* **2011**, *45* (10), 4307-4314.
96. Backhaus, T.; Karlsson, M., Screening level mixture risk assessment of pharmaceuticals in STP effluents. *Water research* **2014**, *49*, 157-165.
97. Fono, L. J.; Kolodziej, E. P.; Sedlak, D. L., Attenuation of wastewater-derived contaminants in an effluent-dominated river. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (23), 7257-7262.
98. Kormos, J. L.; Schulz, M.; Wagner, M.; Ternes, T. A., Multistep approach for the structural identification of biotransformation products of iodinated X-ray contrast media by liquid chromatography/hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry and ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance. *Analytical chemistry* **2009**, *81* (22), 9216-9224.

99. Trautwein, C.; Kümmerer, K., Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere* **2011**, *85* (5), 765-773.
100. Nödler, K.; Licha, T.; Barbieri, M.; Pérez, S., Evidence for the microbially mediated abiotic formation of reversible and non-reversible sulfamethoxazole transformation products during denitrification. *Water research* **2012**, *46* (7), 2131-2139.
101. Trautwein, C.; Kümmerer, K.; Metzger, J. W., Aerobic biodegradability of the calcium channel antagonist verapamil and identification of a microbial dead-end transformation product studied by LC-MS/MS. *Chemosphere* **2008**, *72* (3), 442-450.
102. Lara-Martín, P. A.; Renfro, A. A.; Cochran, J. K.; Brownawell, B. J., Geochronologies of pharmaceuticals in a sewage-impacted estuarine urban setting (Jamaica Bay, New York). *Environmental science & technology* **2015**, *49* (10), 5948-5955.
103. Daughton, C. G.; Brooks, B. W., Active pharmaceutical ingredients and aquatic organisms. *Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations* **2011**, 2.
104. Arnot, J. A.; Gobas, F. A., A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews* **2006**, *14* (4), 257-297.
105. Pico, Y.; Belenguer, V.; Corcellas, C.; Díaz-Cruz, M. S.; Eljarrat, E.; Farré, M.; Gago-Ferrero, P.; Huerta, B.; Navarro-Ortega, A.; Petrovic, M., Contaminants of emerging concern in freshwater fish from four Spanish Rivers. *Science of the Total Environment* **2019**, *659*, 1186-1198.
106. Katagi, T., Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. In *Reviews of environmental contamination and toxicology*, Springer: **2010**; pp 1-132.
107. Vasquez, M.; Lambrianides, A.; Schneider, M.; Kümmerer, K.; Fatta-Kassinos, D., Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: what we know and what we should know. *Journal of hazardous materials* **2014**, *279*, 169-189.
108. Commission_Regulation_EU, No 37/2010 On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union **2010**.
109. Brooks, B. W.; Chambliss, C. K.; Stanley, J. K.; Ramirez, A.; Banks, K. E.; Johnson, R. D.; Lewis, R. J., Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24* (2), 464-469.
110. Statham, C. N.; Melancon, M. J.; Lech, J. J., Bioconcentration of xenobiotics in trout bile: a proposed monitoring aid for some waterborne chemicals. *Science* **1976**, *193* (4254), 680-681.
111. Kallio, J.-M.; Lahti, M.; Oikari, A.; Kronberg, L., Metabolites of the aquatic pollutant diclofenac in fish bile. *Environmental science & technology* **2010**, *44* (19), 7213-7219.
112. Brozinski, J.-M.; Lahti, M.; Oikari, A.; Kronberg, L., Identification and dose dependency of ibuprofen biliary metabolites in rainbow trout. *Chemosphere* **2013**, *93* (9), 1789-1795.

113. Brozinski, J.-M.; Lahti, M.; Oikari, A.; Kronberg, L., Detection of naproxen and its metabolites in fish bile following intraperitoneal and aqueous exposure. *Environmental Science and Pollution Research* **2011**, *18* (5), 811-818.
114. Kidd, K. A.; Blanchfield, P. J.; Mills, K. H.; Palace, V. P.; Evans, R. E.; Lazorchak, J. M.; Flick, R. W., Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (21), 8897-8901.
115. Armstrong, B. M.; Lazorchak, J. M.; Jensen, K. M.; Haring, H. J.; Smith, M. E.; Flick, R. W.; Bencic, D. C.; Biales, A. D., Reproductive effects in fathead minnows (*Pimephales promelas*) following a 21 d exposure to 17 α -ethinylestradiol. *Chemosphere* **2016**, *144*, 366-73.
116. Jackson, L. M.; Felgenhauer, B. E.; Klerks, P. L., Feminization, altered gonadal development, and liver damage in least killifish (*Heterandria formosa*) exposed to sublethal concentrations of 17 α -ethinylestradiol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2019**, *170*, 331-337.
117. Larsson, D.; Adolfsson-Erici, M.; Parkkonen, J.; Pettersson, M.; Berg, A.; Olsson, P.-E.; Förlin, L., Ethinylloestradiol—an undesired fish contraceptive? *Aquatic toxicology* **1999**, *45* (2-3), 91-97.
118. Lange, A.; Paull, G. C.; Hamilton, P. B.; Iguchi, T.; Tyler, C. R., Implications of persistent exposure to treated wastewater effluent for breeding in wild roach (*Rutilus rutilus*) populations. *Environmental science & technology* **2011**, *45* (4), 1673-1679.
119. Tetreault, G. R.; Bennett, C. J.; Shires, K.; Knight, B.; Servos, M. R.; McMaster, M. E., Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. *Aquatic Toxicology* **2011**, *104* (3-4), 278-290.
120. Niemuth, N. J.; Klaper, R. D., Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* **2015**, *135*, 38-45.
121. Lee, G.; Lee, S.; Ha, N.; Kho, Y.; Park, K.; Kim, P.; Ahn, B.; Kim, S.; Choi, K., Effects of gemfibrozil on sex hormones and reproduction related performances of *Oryzias latipes* following long-term (155 d) and short-term (21 d) exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2019**, *173*, 174-181.
122. Fraz, S.; Lee, A. H.; Pollard, S.; Srinivasan, K.; Vermani, A.; Wilson, J. Y., Parental gemfibrozil exposure impacts zebrafish F1 offspring, but not subsequent generations. *Aquatic Toxicology* **2019**, *212*, 194-204.
123. McCallum, E. S.; Krutzmann, E.; Brodin, T.; Fick, J.; Sundelin, A.; Balshine, S., Exposure to wastewater effluent affects fish behaviour and tissue-specific uptake of pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* **2017**, *605*, 578-588.
124. Brodin, T.; Fick, J.; Jonsson, M.; Klaminder, J., Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* **2013**, *339* (6121), 814-815.
125. Rodrigues, S.; Antunes, S. C.; Brandão, F. P.; Castro, B. B.; Gonçalves, F.; Nunes, B., Effects of anticholinesterase drugs on biomarkers and behavior of pumpkinseed, *Lepomis gibbosus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Environmental Monitoring* **2012**, *14* (6), 1638-1644.
126. Holmberg, A.; Fogel, J.; Albertsson, E.; Fick, J.; Brown, J. N.; Paxéus, N.; Förlin, L.; Johnsson, J. I.; Larsson, D. J., Does waterborne citalopram affect the aggressive and sexual

behaviour of rainbow trout and guppy? *Journal of hazardous materials* **2011**, 187 (1-3), 596-599.

127. Schultz, M. M.; Painter, M. M.; Bartell, S. E.; Logue, A.; Furlong, E. T.; Werner, S. L.; Schoenfuss, H. L., Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquatic Toxicology* **2011**, 104 (1-2), 38-47.

128. Barry, M. J., Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. *Ecotoxicology* **2013**, 22 (2), 425-432.

129. Brodin, T.; Piovano, S.; Fick, J.; Klaminder, J.; Heynen, M.; Jonsson, M., Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2014**, 369 (1656), 20130580.

130. Tanoue, R.; Margiotta-Casaluci, L.; Huerta, B.; Runnalls, T. J.; Eguchi, A.; Nomiyama, K.; Kunisue, T.; Tanabe, S.; Sumpter, J. P., Protecting the environment from psychoactive drugs: Problems for regulators illustrated by the possible effects of tramadol on fish behaviour. *Science of the Total Environment* **2019**, 664, 915-926.

131. Memmert, U.; Peither, A.; Burri, R.; Weber, K.; Schmidt, T.; Sumpter, J. P.; Hartmann, A., Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environ Toxicol Chem* **2013**, 32 (2), 442-52.

132. Zhou, S.; Chen, Q.; Di Paolo, C.; Shao, Y.; Hollert, H.; Seiler, T. B., Behavioral profile alterations in zebrafish larvae exposed to environmentally relevant concentrations of eight priority pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* **2019**, 664, 89-98.

133. Bachour, R. L.; Golovko, O.; Kellner, M.; Pohl, J., Behavioral effects of citalopram, tramadol, and binary mixture in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere* **2020**, 238.

134. Godoy, A. A.; de Oliveira, Á. C.; Silva, J. G. M.; Azevedo, C. C. D. J.; Domingues, I.; Nogueira, A. J. A.; Kummrow, F., Single and mixture toxicity of four pharmaceuticals of environmental concern to aquatic organisms, including a behavioral assessment. *Chemosphere* **2019**, 235, 373-382.

135. Muir, D.; Simmons, D.; Wang, X.; Peart, T.; Villella, M.; Miller, J.; Sherry, J., Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care product chemicals in fish exposed to wastewater effluent in an urban wetland. *Scientific reports* **2017**, 7 (1), 16999.

136. Huerta, B.; Rodriguez-Mozaz, S.; Lazorchak, J.; Barcelo, D.; Batt, A.; Wathen, J.; Stahl, L., Presence of pharmaceuticals in fish collected from urban rivers in the US EPA 2008–2009 National Rivers and Streams Assessment. *Science of the Total Environment* **2018**, 634, 542-549.

137. Garcia, S. N.; Foster, M.; Constantine, L. A.; Huggett, D. B., Field and laboratory fish tissue accumulation of the anti-convulsant drug carbamazepine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2012**, 84, 207-211.

138. Nallani, G. C.; Paulos, P. M.; Constantine, L. A.; Venables, B. J.; Huggett, D. B., Bioconcentration of ibuprofen in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* **2011**, 84 (10), 1371-7.

139. Lagesson, A.; Fahlman, J.; Brodin, T.; Fick, J.; Jonsson, M.; Bystrom, P.; Klaminder, J., Bioaccumulation of five pharmaceuticals at multiple trophic levels in an aquatic food web - Insights from a field experiment. *Science of the Total Environment* **2016**, *568*, 208-15.
140. FDA, Orange book: approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. U.S. Food & Drug Administration 2018.
141. Rojo, M.; Álvarez-Muñoz, D.; Dománico, A.; Foti, R.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D.; Carriquiriborde, P., Human pharmaceuticals in three major fish species from the Uruguay River (South America) with different feeding habits. *Environmental Pollution* **2019**, *252*, 146-154.
142. Huerta, B.; Jakimska, A.; Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D., Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1288*, 63-72.
143. Ramirez, A. J.; Mottaleb, M. A.; Brooks, B. W.; Chambliss, C. K., Analysis of Pharmaceuticals in Fish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (8), 3155-3163.
144. Du, B.; Perez-Hurtado, P.; Brooks, B.; Chambliss, C., Evaluation of an isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method for pharmaceuticals in fish. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1253*, 177-183.
145. Subedi, B.; Du, B.; Chambliss, C. K.; Koschorreck, J.; Rüdell, H.; Quack, M.; Brooks, B. W.; Usenko, S., Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in German Fish Tissue: A National Study. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46* (16), 9047-9054.
146. Chu, S.; Metcalfe, C. D., Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1163* (1), 112-118.
147. W., B. B.; Kevin, C. C.; K., S. J.; Alejandro, R.; E., B. K.; D., J. R.; J., L. R., Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24* (2), 464-469.
148. Tanoue, R.; Margiotta-Casaluci, L.; Huerta, B.; Runnalls, T. J.; Nomiyama, K.; Kunisue, T.; Tanabe, S.; Sumpter, J. P., Uptake and Metabolism of Human Pharmaceuticals by Fish: A Case Study with the Opioid Analgesic Tramadol. *Environmental science & technology* **2017**, *51* (21), 12825-12835.
149. Tanoue, R.; Nomiyama, K.; Nakamura, H.; Kim, J.-W.; Isobe, T.; Shinohara, R.; Kunisue, T.; Tanabe, S., Uptake and Tissue Distribution of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wild Fish from Treated-Wastewater-Impacted Streams. *Environmental Science & Technology* **2015**, *49* (19), 11649-11658.
150. Margiotta-Casaluci, L.; Owen, S. F.; Cumming, R. I.; de Polo, A.; Winter, M. J.; Panter, G. H.; Rand-Weaver, M.; Sumpter, J. P., Quantitative cross-species extrapolation between humans and fish: the case of the anti-depressant fluoxetine. *PLoS One* **2014**, *9* (10), e110467.
151. Arnnok, P.; Singh, R. R.; Burakham, R.; Pérez-Fuentetaja, A.; Aga, D. S., Selective Uptake and Bioaccumulation of Antidepressants in Fish from Effluent-Impacted Niagara River. *Environmental Science & Technology* **2017**, *51* (18), 10652-10662.

152. Valdes, M. E.; Huerta, B.; Wunderlin, D. A.; Bistoni, M. A.; Barcelo, D.; Rodriguez-Mozaz, S., Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolization by fish. *Science of the Total Environment* **2016**, 557-558, 58-67.
153. Grabicova, K.; Lindberg, R. H.; Östman, M.; Grabic, R.; Randak, T.; Larsson, D. J.; Fick, J., Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. *Science of the Total Environment* **2014**, 488, 46-50.
154. Ondarza, P. M.; Haddad, S. P.; Avigliano, E.; Miglioranza, K. S.; Brooks, B. W., Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: Implications for protected areas influenced by urbanization. *Science of the Total Environment* **2018**.
155. Grabicova, K.; Staňová, A. V.; Uzun, O. K.; Borik, A.; Randak, T.; Grabic, R., Development of a robust extraction procedure for the HPLC-ESI-HRPS determination of multi-residual pharmaceuticals in biota samples. *Analytica chimica acta* **2018**, 1022, 53-60.
156. Wille, K.; De Brabander, H. F.; Vanhaecke, L.; De Wulf, E.; Van Caeter, P.; Janssen, C. R., Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 35, 87-108.
157. Miller, T. H.; Bury, N. R.; Owen, S. F.; MacRae, J. I.; Barron, L. P., A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environmental Pollution* **2018**, 239, 129-146.
158. Arsenault, J., Beginner's Guide to SPE Solid-Phase Extraction; 2012. *Waters Corporation* **2012**, 208.
159. Jelic, A.; Petrovic, M.; Barcelo, D., Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Talanta* **2009**, 80 (1), 363-71.
160. Berg, T.; Strand, D. H., 13C labelled internal standards—A solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218 (52), 9366-9374.
161. Michael, C.; Bayona, J. M.; Lambropoulou, D.; Agüera, A.; Fatta-Kassinos, D., Two important limitations relating to the spiking of environmental samples with contaminants of emerging concern: How close to the real analyte concentrations are the reported recovered values? *Environmental Science and Pollution Research* **2017**, 24 (17), 15202-15205.
162. Runnqvist, H.; Bak, S. A.; Hansen, M.; Styrisshave, B.; Halling-Sørensen, B.; Björklund, E., Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction—are we developing sound extraction methods? *Journal of Chromatography a* **2010**, 1217 (16), 2447-2470.
163. Moreno-Bondi, M. C.; Marazuela, M. D.; Herranz, S.; Rodriguez, E., An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2009**, 395 (4), 921-946.
164. Pavlović, D. M.; Babić, S.; Horvat, A. J.; Kaštelan-Macan, M., Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2007**, 26 (11), 1062-1075.
165. Fedorova, G.; Nebesky, V.; Randak, T.; Grabic, R., Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC-MS/MS. *Chemical Papers* **2014**, 68 (1), 29-36.

166. Reinholds, I.; Pugajeva, I.; Perkons, I.; Bartkevics, V., The application of phospholipid removal columns and ultra-high performance liquid chromatography—tandem quadrupole mass spectrometry for quantification of multi-class antibiotics in aquaculture samples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2016**, *128*, 126-131.
167. Kung, T. A.; Tsai, C. W.; Ku, B. C.; Wang, W. H., A generic and rapid strategy for determining trace multiresidues of sulfonamides in aquatic products by using an improved QuEChERS method and liquid chromatography-electrospray quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **2015**, *175*, 189-196.
168. Li, J.; Zhang, J.; Liu, H.; Wu, L., A comparative study of primary secondary amino (PSA) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) as QuEChERS absorbents for the rapid determination of diazepam and its major metabolites in fish samples by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2016**, *96* (2), 555-560.
169. Zhang, Y.; Guo, W.; Yue, Z.; Lin, L.; Zhao, F.; Chen, P.; Wu, W.; Zhu, H.; Yang, B.; Kuang, Y.; Wang, J., Rapid determination of 54 pharmaceutical and personal care products in fish samples using microwave-assisted extraction-Hollow fiber-Liquid/solid phase microextraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2017**, *1051*, 41-53.
170. Fernandez-Torres, R.; Lopez, M. A. B.; Consentino, M. O.; Mochon, M. C.; Payan, M. R., Enzymatic-microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *54* (5), 1146-1156.
171. Huang, P.; Zhao, P.; Dai, X.; Hou, X.; Zhao, L.; Liang, N., Trace determination of antibacterial pharmaceuticals in fishes by microwave-assisted extraction and solid-phase purification combined with dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2016**, *1011*, 136-144.
172. Turnipseed, S. B.; Storey, J. M.; Wu, I.-L.; Giesecker, C. M.; Hasbrouck, N. R.; Crosby, T. C.; Andersen, W. C.; Lanier, S.; Casey, C. R.; Burger, R., Application and evaluation of a high-resolution mass spectrometry screening method for veterinary drug residues in incurred fish and imported aquaculture samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2018**, 1-16.
173. Baduel, C.; Mueller, J. F.; Tsai, H.; Ramos, M. J. G., Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. *Journal of Chromatography A* **2015**, *1426*, 33-47.
174. Morrison, S. A.; Sieve, K. K.; Ratajczak, R. E.; Bringolf, R. B.; Belden, J. B., Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation. *Talanta* **2016**, *146*, 16-22.
175. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. J., Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* **2003**, *86* (2), 412-431.
176. Al-Ansari, A. M.; Saleem, A.; Kimpe, L. E.; Trudeau, V. L.; Blais, J. M., The development of an optimized sample preparation for trace level detection of 17 α -ethinylestradiol and estrone in whole fish tissue. *Journal of Chromatography B* **2011**, *879* (30), 3649-3652.

177. Schultz, M. M.; Furlong, E. T.; Kolpin, D. W.; Werner, S. L.; Schoenfuss, H. L.; Barber, L. B.; Blazer, V. S.; Norris, D. O.; Vajda, A. M., Antidepressant pharmaceuticals in two US effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environmental science & technology* **2010**, *44* (6), 1918-1925.
178. Togunde, O. P.; Oakes, K. D.; Servos, M. R.; Pawliszyn, J., Optimization of solid phase microextraction for non-lethal in vivo determination of selected pharmaceuticals in fish muscle using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1261*, 99-106.
179. Wang, S.; Oakes, K. D.; Bragg, L. M.; Pawliszyn, J.; Dixon, G.; Servos, M. R., Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish. *Chemosphere* **2011**, *85* (9), 1472-1480.
180. Zhou, S. N.; Oakes, K. D.; Servos, M. R.; Pawliszyn, J., Application of Solid-Phase Microextraction for In Vivo Laboratory and Field Sampling of Pharmaceuticals in Fish. *Environmental Science & Technology* **2008**, *42* (16), 6073-6079.
181. Commission_Regulation_EU, SANTE/11813/2017 Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Official Journal of the European Union **2018**.
182. Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglini, G.; Cappiello, A., An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* **2011**, *30* (3), 491-509.
183. Taylor, P. J., Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry* **2005**, *38* (4), 328-334.
184. Kumar, S. J.; Kumar, G. V.; Dash, A.; Scholz, P.; Banerjee, R., Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal Research* **2017**, *21*, 138-147.
185. Young, M.; Shia, J.; Shah, D.; Tran, K.; Huang, D., Oasis PRIME HLB Food Applications Notebook. *Agilent Technologies* **2017**.
186. Han, L.; Matarrita, J.; Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J., Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. *J Chromatogr A* **2016**, *1449*, 17-29.
187. Supelco-Sigma-Aldrich Analysis of Compounds in Fatty Matrices. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/1/12023_T414114_Compounds_in_Fatty_Matrix_s.pdf (accessed 29.06.2019).
188. Pérez, S.; Petrovic, M.; Barcelo, D., Analyzing transformation products of synthetic chemicals. In *Transformation Products of Synthetic Chemicals in the Environment*, Springer: **2008**; pp 43-81.
189. Kind, T.; Tsugawa, H.; Cajka, T.; Ma, Y.; Lai, Z.; Mehta, S. S.; Wohlgemuth, G.; Barupal, D. K.; Showalter, M. R.; Arita, M., Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. *Mass spectrometry reviews* **2018**, *37* (4), 513-532.
190. Aceña, J.; Rivas, D.; Zonja, B.; Pérez, S.; Barceló, D., Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: Quantification and Confirmation Aspects. In *Fast Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis*, **2015**; pp 347-377.

191. Cappiello, A.; Famiglini, G.; Palma, P.; Truffelli, H., Matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of liquid chromatography & related technologies* **2010**, 33 (9-12), 1067-1081.
192. Matuszewski, B.; Constanzer, M.; Chavez-Eng, C., Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC- MS/MS. *Analytical chemistry* **2003**, 75 (13), 3019-3030.
193. King, R.; Bonfiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T., Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, 11 (11), 942-950.
194. Zhou, S.; Cook, K. D., A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, 12 (2), 206-214.
195. Holčapek, M.; Volna, K.; Jandera, P.; Kolářová, L.; Lemr, K.; Exner, M.; Cirkva, A., Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 39 (1), 43-50.
196. Bonfiglio, R.; King, R. C.; Olah, T. V.; Merkle, K., The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, 13 (12), 1175-1185.
197. Uclés, S.; Lozano, A.; Sosa, A.; Vázquez, P. P.; Valverde, A.; Fernández-Alba, A., Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta* **2017**, 174, 72-81.
198. Antignac, J.-P.; de Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F.; Le Bizec, B., The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 529 (1-2), 129-136.
199. Cooks, R. G.; Chen, G.; Wong, P.; Wollnik, H., Spectrometers, Mass. *XP-002155452, Encyclopedia of Applied Physics* **1997**, 19, 289-330.
200. Ramos, M. J. G.; Lozano, A.; Fernández-Alba, A. R., High-resolution mass spectrometry with data independent acquisition for the comprehensive non-targeted analysis of migrating chemicals coming from multilayer plastic packaging materials used for fruit purée and juice. *Talanta* **2019**, 191, 180-192.
201. Benotti, M. J.; Ferguson, P. L.; Rieger, R. A.; Iden, C. R.; Heine, C. E.; Brownawell, B. J., HPLC/TOF-MS: An Alternative to LC/MS/MS for Sensitive and Selective Determination of Polar Organic Contaminants in the Aquatic Environment. In *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, MS/MS and Time of Flight MS*, American Chemical Society: **2003**; Vol. 850, pp 109-127.
202. Martins, C.; Bromirski, M.; Conaway, M. P.; Makarov, A., Orbitrap mass spectrometry: Evolution and Applicability. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2016**; Vol. 71, pp 3-18.
203. Aceña, J.; Stampachiachiere, S.; Pérez, S.; Barceló, D., Advances in liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for quantitative and qualitative environmental analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2015**, 407 (21), 6289-6299.

204. García-Reyes, J. F.; Moreno-González, D.; Nortes-Méndez, R.; Gilbert-López, B.; Díaz, A. M., HRMS: Hardware and Software. In *Applications in High Resolution Mass Spectrometry*, Elsevier: **2017**; pp 15-57.
205. Raetz, M.; Duchoslav, E.; Bonner, R.; Hopfgartner, G., Hybrid SWATH/MS and HR-SRM/MS acquisition for phospholipidomics using QUAL/QUANT data processing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2019**.
206. Ferrer, I.; Thurman, E. M., Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1259*, 148-157.
207. Krauss, M.; Singer, H.; Hollender, J., LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397* (3), 943-951.
208. Gómez-Ramos, M.; Fernández-Alba, A., Application of LC-time-of-flight and orbitrap-MS/MS for pesticide residues in fruits and vegetables. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2016**; Vol. 71, pp 119-154.
209. Petrović, M.; Hernando, M. D.; Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D., Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1067* (1-2), 1-14.
210. Gonsior, M.; Peake, B. M.; Cooper, W. T.; Podgorski, D. C.; D'Andrilli, J.; Dittmar, T.; Cooper, W. J., Characterization of dissolved organic matter across the Subtropical Convergence off the South Island, New Zealand. *Marine Chemistry* **2011**, *123* (1), 99-110.
211. Shakeri Yekta, S.; Gonsior, M.; Schmitt-Kopplin, P.; Svensson, B. H., Characterization of dissolved organic matter in full scale continuous stirred tank biogas reactors using ultrahigh resolution mass spectrometry: a qualitative overview. *Environmental science & technology* **2012**, *46* (22), 12711-12719.
212. Benassi, M.; Berisha, A.; Romão, W.; Babayev, E.; Römpp, A.; Spengler, B., Petroleum crude oil analysis using low-temperature plasma mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2013**, *27* (7), 825-834.
213. Makarov, A.; Scigelova, M., Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217* (25), 3938-3945.
214. Fjeldsted, J., Advances in time-of-flight mass spectrometry. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2016**; Vol. 71, pp 19-49.
215. Dawson, J.; Guilhaus, M., Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, *3* (5), 155-159.
216. Sage, A. B.; Taylor, P., Commercial Strategies in Non-Target and Suspected Target Screening of Water Samples. In *Assessing Transformation Products of Chemicals by Non-Target and Suspect Screening – Strategies and Workflows Volume 2*, American Chemical Society: **2016**; Vol. 1242, pp 131-141.
217. SCIEX See It All with SWATH® Acquisition. <https://sciex.com/technology/swath-acquisition> (accessed 02.11.2019).

218. Holewinski, R. J.; Parker, S. J.; Matlock, A. D.; Venkatraman, V.; Van Eyk, J. E., Methods for SWATH™: data independent acquisition on TripleTOF mass spectrometers. In *Quantitative Proteomics by Mass Spectrometry*, Springer: **2016**; pp 265-279.
219. Lozano, A.; Ferrer, C.; Fernández-Alba, A. R., Selectivity enhancement using sequential mass isolation window acquisition with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry for pesticide residues. *Journal of Chromatography A* **2019**, *1591*, 99-109.
220. Frederick, K.; Ciborowski, P., 9 - SWATH-MS: Data Acquisition and Analysis. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*, Ciborowski, P.; Silberring, J., Eds. Elsevier: Boston, **2016**; pp 161-173.
221. Vázquez, P. P.; Lozano, A.; Ferrer, C.; Bueno, M. M.; Fernández-Alba, A., Improvements in identification and quantitation of pesticide residues in food by LC-QTOF using sequential mass window acquisition (SWATH®). *Analytical Methods* **2018**, *10* (24), 2821-2833.
222. Bean, T. G.; Rattner, B. A.; Lazarus, R. S.; Day, D. D.; Burket, S. R.; Brooks, B. W.; Haddad, S. P.; Bowerman, W. W., Pharmaceuticals in water, fish and osprey nestlings in Delaware River and Bay. *Environmental Pollution* **2018**, *232*, 533-545.
223. Jakimska, A.; Huerta, B.; Bargańska, T.; Kot-Wasik, A.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D., Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1306*, 44-58.
224. Moschet, C.; Piazzoli, A.; Singer, H.; Hollender, J., Alleviating the reference standard dilemma using a systematic exact mass suspect screening approach with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2013**, *85* (21), 10312-10320.
225. Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J., Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48* (4), 2097-2098.
226. Gago-Ferrero, P.; Schymanski, E. L.; Bletsou, A. A.; Aalizadeh, R.; Hollender, J.; Thomaidis, N. S., Extended Suspect and Non-Target Strategies to Characterize Emerging Polar Organic Contaminants in Raw Wastewater with LC-HRMS/MS. *Environmental Science & Technology* **2015**, *49* (20), 12333-12341.
227. Turnipseed, S. B.; Storey, J. M.; Wu, I. L.; Andersen, W. C.; Madson, M. R., Extended liquid chromatography high resolution mass spectrometry screening method for veterinary drug, pesticide and human pharmaceutical residues in aquaculture fish. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2019**, *36* (10), 1501-1514.
228. Royal_Society_of_Chemistry ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Default.aspx> (accessed 01.11).
229. Giulivo, M.; Capri, E.; Kalogianni, E.; Milacic, R.; Majone, B.; Ferrari, F.; Eljarrat, E.; Barceló, D., Occurrence of halogenated and organophosphate flame retardants in sediment and fish samples from three European river basins. *Science of the Total Environment* **2017**, *586*, 782-791.
230. FAO Measuring Fish Composition. <http://www.fao.org/3/x5957e01.htm> (accessed 31.12.2018).

231. Kruve, A.; Rebane, R.; Kipper, K.; Oldekop, M.-L.; Evard, H.; Herodes, K.; Ravio, P.; Leito, I., Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica chimica acta* **2015a**, *870*, 29-44.
232. Kruve, A.; Rebane, R.; Kipper, K.; Oldekop, M.-L.; Evard, H.; Herodes, K.; Ravio, P.; Leito, I., Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica chimica acta* **2015b**, *870*, 8-28.
233. Chuang, Y. H.; Zhang, Y.; Zhang, W.; Boyd, S. A.; Li, H., Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables. *J Chromatogr A* **2015**, *1404*, 1-9.
234. Guideline, I. H. T. In *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*, International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland, **2005**; pp 11-12.
235. Hermes, N.; Jewell, K. S.; Wick, A.; Ternes, T. A., Quantification of more than 150 micropollutants including transformation products in aqueous samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using scheduled multiple reaction monitoring. *Journal of Chromatography A* **2018**, *1531*, 64-73.
236. Fuentes, A. V.; Pineda, M. D.; Venkata, K. C. N., Comprehension of Top 200 Prescribed Drugs in the US as a Resource for Pharmacy Teaching, Training and Practice. *Pharmacy* **2018**, *6* (2), 43.
237. Jones, O. A. H.; Voulvoulis, N.; Lester, J. N., Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research* **2002**, *36* (20), 5013-5022.
238. Sousa, J. C. G.; Ribeiro, A. R.; Barbosa, M. O.; Ribeiro, C.; Tiritan, M. E.; Pereira, M. F. R.; Silva, A. M. T., Monitoring of the 17 EU Watch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers. *Science of the Total Environment* **2019**, *649*, 1083-1095.
239. Bletsou, A. A.; Jeon, J.; Hollender, J.; Archontaki, E.; Thomaidis, N. S., Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *66*, 32-44.
240. López-Serna, R.; Petrović, M.; Barceló, D., Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)–tandem mass spectrometry (MS/MS). *Chemosphere* **2011**, *85* (8), 1390-1399.
241. Anastassiades, M., The QuEChERS Method – Background Information and Recent Developments. CRL-SRM 1st Joint CRL-Workshop Stuttgart, **2006**.
242. Gillet, L. C.; Navarro, P.; Tate, S.; Röst, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R., Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* **2012**, *11* (6), O111. 016717.
243. Zhang, Y.; Bilbao, A.; Bruderer, T.; Luban, J.; Strambio-De-Castillia, C.; Lisacek, F. d. r.; Hopfgartner, G. r.; Varesio, E., The use of variable Q1 isolation windows improves selectivity in LC–SWATH–MS acquisition. *Journal of proteome research* **2015**, *14* (10), 4359-4371.
244. SANTE/11813, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. European Commission Brussels: **2017**.

245. Ytrestøyl, T.; Aas, T. S.; Åsgård, T., Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture* **2015**, *448*, 365-374.
246. Borch Myhre, J.; Borgejordet, Å.; Nordbotten, A.; Bjørge Løken, E.; Aarflot Fagerli, R. *Nutritional composition of selected wild and farmed raw fish*; University of Oslo, Norwegian Food Safety Authority, Norwegian Directorate of Health **2012**.
247. Rejczak, T.; Tuzimski, T., A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry* **2015**, *13* (1).
248. González-Curbelo, M. Á.; Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; González-Sálamo, J.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Á., Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *71*, 169-185.
249. Panuwet, P.; Hunter Jr, R. E.; D'Souza, P. E.; Chen, X.; Radford, S. A.; Cohen, J. R.; Marder, M. E.; Kartavenka, K.; Ryan, P. B.; Barr, D. B., Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing biomonitoring. *Critical reviews in analytical chemistry* **2016**, *46* (2), 93-105.
250. Ghosh, C.; Shinde, C. P.; Chakraborty, B., Ionization polarity as a cause of matrix effects, its removal and estimation in ESI-LC-MS/MS bio-analysis. *J Anal Bioanal Tech* **2010**, *1*, 106.
251. Mandaric, L.; Diamantini, E.; Stella, E.; Cano-Paoli, K.; Valle-Sistac, J.; Molins-Delgado, D.; Bellin, A.; Chiogna, G.; Majone, B.; Diaz-Cruz, M. S., Contamination sources and distribution patterns of pharmaceuticals and personal care products in Alpine rivers strongly affected by tourism. *Science of the Total Environment* **2017**, *590*, 484-494.
252. Dragun, Z.; Marijić, V. F.; Vuković, M.; Raspor, B., Metal bioavailability in the Sava River water. In *The Sava River*, Springer: **2015**; pp 123-155.
253. Balmer, M. E.; Buser, H. R.; Müller, M. D.; Poiger, T., Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. *Environmental science & technology* **2005**, *39* (4), 953-962.
254. Barber, L. B.; Keefe, S. H.; Antweiler, R. C.; Taylor, H. E.; Wass, R. D., Accumulation of contaminants in fish from wastewater treatment wetlands. *Environmental science & technology* **2006**, *40* (2), 603-611.
255. Ščančar, J.; Heath, E.; Zuliani, T.; Horvat, M.; Kotnik, J.; Perko, S.; Milačič, R., Elements and persistent organic pollutants in the sediments of the Sava River. In *The Sava River*, Springer: **2015**; pp 95-121.
256. Dewé, W.; De Smet, M.; Evrard, N.; Culot, B.; Lastelle, M.; Saucez, G.; Ingels, D.; Taillieu, X., Partial within-animal calibration: A new calibration approach in lead optimisation high-throughput bioanalysis. *Journal of Chromatography B* **2007**, *854* (1-2), 183-191.
257. Peña-Herrera, J.; Montemurro, N.; Barceló, D.; Pérez, S., Development and validation of an analytical method for determination of pharmaceuticals in fish muscle based on QuEChERS extraction and SWATH acquisition using LC-QTOF-MS/MS system. *Talanta* **2019**.
258. Drotleff, B.; Hallschmid, M.; Lämmerhofer, M., Quantification of steroid hormones in plasma using a surrogate calibrant approach and UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS with SWATH-acquisition combined with untargeted profiling. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1022*, 70-80.

259. Ivosev, G.; Burton, L.; Bonner, R., Dimensionality reduction and visualization in principal component analysis. *Analytical chemistry* **2008**, *80* (13), 4933-4944.
260. Bonner, R.; Hopfgartner, G., SWATH acquisition mode for drug metabolism and metabolomics investigations. *Bioanalysis* **2016**, *8* (16), 1735-1750.
261. López-Blanco, R.; Nortes-Méndez, R.; Robles-Molina, J.; Moreno-González, D.; Gilbert-López, B.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A., Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1456*, 89-104.
262. Huerta, B.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barcelo, D., Analysis of Pharmaceutical Compounds in Biota. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2013**; Vol. 62, pp 169-193.
263. Poirier Larabie, S.; Houde, M.; Gagnon, C., Determination of the bioavailability of selected pharmaceutical residues in fish plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1522*, 48-55.
264. Mijangos, L.; Ziarrusta, H.; Zabaleta, I.; Usobiaga, A.; Olivares, M.; Zuloaga, O.; Etxebarria, N.; Prieto, A., Multiresidue analytical method for the determination of 41 multiclass organic pollutants in mussel and fish tissues and biofluids by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2019**, *411* (2), 493-506.
265. Peña-Herrera, J.; Montemurro, N.; Barceló, D.; Pérez, S., Development and validation of an analytical method for determination of pharmaceuticals in fish muscle based on QuEChERS extraction and SWATH acquisition using LC-QTOF-MS/MS system. *Talanta* **2019**, *199*, 370-379.
266. Berge, A.; Vulliet, E., Development of a method for the analysis of hormones and pharmaceuticals in earthworms by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (26), 7995-8008.
267. Núñez, M.; Borrull, F.; Fontanals, N.; Pocurull, E., Determination of pharmaceuticals in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407* (13), 3841-3849.
268. Socas-Rodríguez, B.; González-Sálamo, J.; Herrera-Herrera, A. V.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Á., Chapter Eleven - Recent Advances and Developments in the QuEChERS Method. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Ibáñez, E.; Cifuentes, A., Eds. Elsevier: **2017**; Vol. 76, pp 319-374.
269. British Standard, EN 15662:2018. Foods of plant origin. Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. QuEChERS-method. Standards Policy and Strategy Committee: **2008**.
270. Lehotay, S. J.; Tully, J.; Garca, A. V.; Contreras, M.; Mol, H.; Heinke, V.; Anspach, T.; Lach, G.; Fussell, R.; Mastovska, K., Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *Journal of AOAC International* **2007**, *90* (2), 485-520.
271. Agilent EMR - Enhanced Matrix Removal - video. <https://www.agilent.com/en/products/sample-preparation/sample-preparation->

[methods/quechers/quechers-enhanced-matrix-removal-lipid/enhanced-matrix-removal-video](#)
(accessed 18.11.2019).

272. McDonnell, C.; Tiwari, B. K., Chapter Five - Ultrasound: A Clean, Green Extraction Technology for Bioactives and Contaminants. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Ibáñez, E.; Cifuentes, A., Eds. Elsevier: **2017**; Vol. 76, pp 111-129.

273. Sigma-Aldrich Supel™QuE Z-Sep/C18 QuEChERS.
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/55506u?lang=es®ion=ES>
(accessed 09.12.2019).

274. Bisesi Jr, J. H.; Sweet, L. E.; van den Hurk, P.; Klaine, S. J., Effects of an antidepressant mixture on the brain serotonin and predation behavior of hybrid striped bass. *Environmental toxicology and chemistry* **2016**, 35 (4), 938-945.

275. Sabater, S.; Ginebreda, A.; Barceló, D., *The Llobregat: the story of a polluted Mediterranean River*. Springer: **2012**; Vol. 21.

276. Ferrer, I.; Ginebreda, A.; Figueras, M.; Olivella, L.; Tirapu, L.; Vilanova, M.; Barceló, D., Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A* **2001**, 938 (1-2), 187-197.

277. Kuster, M.; López de Alda, M. J.; Hernando, M. D.; Petrovic, M.; Martín-Alonso, J.; Barceló, D., Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology* **2008**, 358 (1), 112-123.

278. Ginebreda, A.; Muñoz, I.; de Alda, M. L.; Brix, R.; López-Doval, J.; Barceló, D., Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment International* **2010**, 36 (2), 153-162.

279. Muñoz, I.; López-Doval, J. C.; Ricart, M.; Villagrasa, M.; Brix, R.; Geiszinger, A.; Ginebreda, A.; Guasch, H.; de Alda, M. J. L.; Romani, A. M., Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry* **2009**, 28 (12), 2706-2714.

280. Erickson, R. J.; McKim, J. M.; Lien, G. J.; Hoffman, A. D.; Batterman, S. L., Uptake and elimination of ionizable organic chemicals at fish gills: I. Model formulation, parameterization, and behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* **2006**, 25 (6), 1512-1521.

281. Erickson, R. J.; McKim, J. M.; Lien, G. J.; Hoffman, A. D.; Batterman, S. L., Uptake and elimination of ionizable organic chemicals at fish gills: II. Observed and predicted effects of pH, alkalinity, and chemical properties. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* **2006**, 25 (6), 1522-1532.

282. Oikari, A.; Ånäs, E.; Kruzynski, G.; Holmbom, B., Free and conjugated resin acids in the bile of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **1984**, 33 (1), 233-240.

283. Valenti Jr, T. W.; Perez-Hurtado, P.; Chambliss, C. K.; Brooks, B. W., Aquatic toxicity of sertraline to *Pimephales promelas* at environmentally relevant surface water pH. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2009**, 28 (12), 2685-2694.

284. Bisesi Jr, J. H.; Bridges, W.; Klaine, S. J., Reprint of: Effects of the antidepressant venlafaxine on fish brain serotonin and predation behavior. *Aquatic toxicology* **2014**, *151*, 88-96.
285. Keysomi, M.; Sudagar, M.; Nasirir, A., Effect of citalopram on reducing transportation stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture Research and Development* **2013**, *4* (3).
286. Aceña, J. Tesis PhD: Transformació i metabolisme de fàrmacs al medi aquàtic mitjançant l'espectrometria de masses d'alta resolució. Universidad de Barcelona, Barcelona, **2017**.
287. Ramirez, A. J.; Brain, R. A.; Usenko, S.; Mottaleb, M. A.; O'Donnell, J. G.; Stahl, L. L.; Wathen, J. B.; Snyder, B. D.; Pitt, J. L.; Perez-Hurtado, P., Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2009**, *28* (12), 2587-2597.
288. Tanoue, R.; Nomiya, K.; Nakamura, H.; Hayashi, T.; Kim, J.-W.; Isobe, T.; Shinohara, R.; Tanabe, S., Simultaneous determination of polar pharmaceuticals and personal care products in biological organs and tissues. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1355*, 193-205.
289. Burkina, V.; Zlabek, V.; Zamaratskaia, G., Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. *Environmental toxicology and pharmacology* **2015**, *40* (2), 430-444.
290. FAO Fisheries and Aquaculture Department. *Anguilla anguilla*. <http://www.fao.org/fishery/species/2203/en> (accessed 29.12.2019).