



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**ENSAYOS DE BIOACUMULACIÓN DE PRINCIPIOS
ACTIVOS FARMACOLÓGICOS DE *PROCAMBARUS
CLARKII* Y *SCROBICULARIA PLANA*. USO COMO
BIOINDICADORES EN EL PARQUE NATURAL DE
DOÑANA**

TESIS DOCTORAL

Julia Kazakova
Sevilla, Enero 2020

ENSAYOS DE BIOACUMULACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS
FARMACOLÓGICOS DE *PROCAMBARUS CLARKII* Y
SCROBICULARIA PLANA. USO COMO BIOINDICADORES EN EL
PARQUE NATURAL DE DOÑANA.

El Director



Fdo.: D. Miguel Ángel Bello López

Catedrático de Universidad
Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

La Directora



Fdo.: Dña. Rut Fernández Torres

Profesora Titular de Universidad
Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

Memoria presentada por Julia Kazakova para optar al título de Doctor en
Química por la Universidad de Sevilla



Fdo.: Julia Kazakova
Licenciada en Química

D. FERNANDO DE PABLOS PONS, CATEDRÁTICO DE QUÍMICA ANALÍTICA
Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado “**Ensayos de bioacumulación de principios activos farmacológicos de *Procambarus clarkii* y *Scrobicularia plana*. Uso como bioindicadores en el Parque Natural de Doñana**”, que constituye la Memoria presentada por Julia Kazakova para aspirar al grado de Doctor en Química, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Doctores Miguel Ángel Bello López y Rut Fernández Torres, profesores de este Departamento, reuniendo, a mi juicio, las condiciones exigidas para este tipo de trabajos.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 22 de Octubre de 2019.

A circular blue stamp from the Department of Analytical Chemistry at the University of Sevilla. The text around the perimeter reads "DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA" at the top and "UNIVERSIDAD DE SEVILLA" at the bottom. In the center is a crest or emblem. A handwritten signature in blue ink is written over the stamp.

Fdo.: Fernando de Pablos Pons

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a los directores de esta Tesis, D. Miguel Ángel Bello López y Dña. Rut Fernández Torres, por su gran apoyo recibido a lo largo de estos años. Gracias por todo el apoyo y la enseñanza aportada, y al enseñarme lo bonito que es el mundo de la investigación.

Al Ministerio de Educación y Ciencia a través del Proyecto CTM2015-67902-C-1-P. FEDER Project UNSE10-1E-429.

Al Servicio de Microanálisis de la Universidad de Sevilla (CITIUS, Celestino Mutis) por el uso de sus instalaciones.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Sevilla a través de las ayudas del VI Plan propio de Investigación para el uso de los Servicios generales de Investigación, Año 2018 y Año 2019.

Al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través del proyecto PGC2018-096608-B-C22.

Al Director del Departamento de Química Analítica, D. Fernando de Pablos Pons, por permitirme a llevar a cabo este trabajo y facilitarme los medios necesarios para ello.

A todos mis compañeros del Grupo de Investigación, por su gran ayuda, amistad y generosidad. A Manolo, María Jesús, Mercedes, Juan Luís, Cristina, Noemí y al resto del personal docente y no docente del Departamento de Química Analítica.

A Chari, Inma y María Jesús, por su gran amistad, y la ayuda prestada.

A mi marido, por su lealtad y apoyo incondicional y amor sincero. Por saber estar a mi lado en los momentos de agobio, de dificultad y por hacerme sacar las fuerzas. Gracias por creer en mi y por empujar a conseguir mi sueño.

Y por último, a mi cuñada y a su familia por su gran apoyo y su preocupación a lo largo de todo este tiempo.

A Ernesto Rodríguez Gelo

Índice

OBJETO DE LA TESIS	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 La contaminación ambiental	9
1.2 Los Principios Activos Farmacológicos como contaminantes emergentes	12
1.3 Bioindicadores: <i>Procambarus clarkii</i> y <i>Scrobicularia plana</i>	19
1.3.1 <i>Procambarus clarkii</i>	20
1.3.2 <i>Scrobicularia plana</i>	23
1.4 Parque Nacional de Doñana	23
1.5 Principios activos farmacológicos objeto de estudio	26
1.5.1 Quinolonas/Fluoroquinolonas	26
1.5.2 Sulfonamidas	28
1.5.3 Tetraciclinas	29
1.5.4 Anfencoles/Fenicoles	30
1.5.5 Antiepilépticos	31
1.5.6 Anti-inflamatorios no esteroideos (AINES)	32
1.5.7 Beta-bloqueantes (β -bloqueantes)	33
1.5.8 Penicilinas	34
1.5.9 Trimetoprima	35
BIBLIOGRAFÍA	36
CAPÍTULO 2. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO CON DETECCIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRIA DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO (HPLC-MS/MS) PARA LA DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS FARMACOLÓGICOS EN PROCAMBARUS CLARKII	49
2.1 Reactivos y disoluciones patrón	51
2.2 Instrumentación	51
2.3 Separación cromatográfica y detección MS/MS	52
2.3.1 Condiciones de detección empleando fuente de electrospray (ESI)	52
2.3.2 Condiciones de separación cromatográfica	54
2.4 Optimización del procedimiento de extracción de músculo abdominal y glándulas digestivas de <i>Procambarus clarkii</i>	55
2.4.1 Optimización de la potencia de microondas	57
2.4.2 Optimización del extractante	57
2.5 Validación del Procedimiento Analítico Propuesto	60
BIBLIOGRAFÍA	71
CAPÍTULO 3. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS FARMACOLÓGICOS EN <i>PROCAMBARUS CLARKII</i> Y <i>SCROBICULARIA PLANA</i> MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	77

CON DETECCIÓN DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (UPLC-MS/MS qTOF)	
3.1 Reactivos y disoluciones patrón	79
3.2 Instrumentación	80
3.3 Optimización de la separación cromatográfica y detección	80
3.3.1 Condiciones de detección	80
3.3.2 Condiciones de separación cromatográfica	84
3.4 Procedimiento para la extracción de principios activos farmacológicos de músculo abdominal y glándula digestiva de <i>Procambarus clarkii</i> y músculo de <i>Scrobicularia plana</i>	88
3.5 Validación del Procedimiento Analítico Propuesto	92
BIBLIOGRAFÍA	106
CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE EVOLUCIÓN TEMPORAL. PRESENCIA DE PRINCIPIOS ACTIVOS FARMACOLÓGICOS EN AGUAS Y ESPECÍMENES DE <i>PROCAMBARUS CLARKII</i> DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA Y SU ENTORNO	111
4.1 Introducción	113
4.2 Localización de los puntos de muestreo	113
4.3 Datos climatológicos de la zona entre los años 2011-2016	119
4.4 Análisis de muestras de agua y de especímenes de <i>Procambarus clarkii</i>	121
BIBLIOGRAFÍA	128
CAPÍTULO 5. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN: ESPECÍMENES DE <i>PROCAMBARUS CLARKII</i> Y <i>SCROBICULARIA PLANA</i> EXPUESTOS A FLUMEQUINA, CIPROFLOXACINA E IBUPROFENO	131
5.1 Ensayos de exposición	133
5.2 Resultados	136
5.2.1 Grupos de exposición Control y Control DMSO	137
5.2.2 Ensayo con <i>Procambarus clarkii</i>	137
5.2.3 Ensayo con <i>Scrobicularia plana</i>	150
5.2.4 Ensayo de exposición de <i>Procambarus clarkii</i> a concentración de 10 mg L ⁻¹	161
CONCLUSIONES	167

Objeto de la Tesis

OBJETO DE LA TESIS

El primer objetivo de la presente Tesis es desarrollar, optimizar y validar procedimientos analíticos que permitan la extracción de principios activos farmacológicos en muestras biológicas y su posterior determinación por cromatografía líquida acoplada a sistemas de detección de espectrometría de masas. Los procedimientos serán validados para el análisis de hasta 26 principios activos farmacológicos pertenecientes a muy diversas familias terapéuticas en músculo abdominal y glándula digestiva de especímenes de cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*), y en especímenes de coquina de fango (*Scrobicularia plana*). Se optimizarán y validarán dos procedimientos haciendo uso de dos tipos de detección: espectrometría de masas de triple cuadrupolo y espectrometría de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (qTOF).

En lo que respecta al procedimiento de extracción, se optimizará una extracción enzimática asistida por energía de microondas a baja potencia que permita buenas recuperaciones de los analitos en los especímenes seleccionados.

Las especies a analizar han sido seleccionadas con la finalidad de su uso como organismos bioindicadores del espacio natural protegido “Parque Nacional de Doñana”, situado entre las provincias de Cádiz, Huelva y Sevilla (España). Usando la metodología analítica desarrollada en esta Memoria, se llevará a cabo un estudio temporal (6 años) sobre la presencia de principios activos farmacológicos en aguas y especímenes de *Procambarus clarkii* capturados en el Parque Nacional de Doñana y en su entorno más inmediato.

Adicionalmente, se llevarán a cabo varios ensayos de exposición a escala de laboratorio empleando tres fármacos: flumequina, ciprofloxacina e ibuprofeno de especímenes de *Procambarus clarkii* y *Scrobicularia plana* a fin de evaluar su acumulación en tejido y vísceras (*P.clarkii*) y la presencia de ciertos metabolitos tras los ensayos.

Capítulo 1

Introducción

1.1 La contaminación medioambiental

Cada vez más, la preocupación y concienciación por la conservación y protección del medio ambiente es un tema que acapara titulares de medios de comunicación, agendas políticas y una parte importante de las publicaciones y comunicaciones científicas. Se puede encontrar un gran número de definiciones de medio ambiente entre las que destaca la dada en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente (Estocolmo, 1972): “*es el conjunto de componentes físicos, químicos, biológicos y sociales capaces de causar efectos directos o indirectos, en un plazo corto o largo, sobre los seres vivos y las actividades humanas*” [1]. Esta preocupación creciente se debe, principalmente, a tres factores:

- La sobreexplotación de los recursos naturales, limitándose el futuro abastecimiento de los mismos.
- El deterioro de calidad de vida fruto de la degradación ambiental.
- La obligación moral de las generaciones actuales de preservar el patrimonio natural para futuras generaciones.

Cualquier tipo de perturbación sobre el medio ambiente es perjudicial, tanto para el ser humano como para todas las especies que habitan en el ecosistema correspondiente. Ese tipo de “perturbación” es lo que conocemos como contaminación, que el Real Decreto Ley 1/2016 de 16 de diciembre define como “*la introducción directa o indirecta, mediante la actividad humana, de sustancias, vibraciones, calor o ruido en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan tener efectos perjudiciales para la salud humana o la calidad del medio ambiente, o que puedan causar daños a los bienes materiales o deteriorar o perjudicar el disfrute u otras utilizaciones legítimas del medio ambiente*” [2]. Podría tomarse como punto de partida de la problemática de la contaminación ambiental en el comienzo de la Revolución Industrial, que produjo, no solo un extraordinario auge económico, científico y técnico, sino que, se inició el uso intensivo, extensivo e irracional de muchos recursos naturales. Este problema se ha ido agravando debido al elevado crecimiento de la población, y al incremento de las actividades antropogénicas. También han contribuido al deterioro ambiental accidentes involuntarios provocados por el hombre y desastres naturales tales como seísmos, desbordamiento de ríos e inundaciones, erupciones volcánicas, etc. Entre aquellas actividades antropogénicas se pueden destacar la minería, industrias químicas, metalúrgicas, petroleras, las actividades agrícolas, etc., que perjudican gravemente el medio ambiente debido a la liberación de compuestos tóxicos como metales pesados,

minerales radioactivos, plaguicidas y fertilizantes o dioxinas, entre otras muchas, y que reciben el nombre genérico de contaminantes ambientales.

Hay que hacer una distinción entre contaminantes clásicos, que son sustancias perjudiciales, perfectamente conocidas y reguladas, como, por ejemplo, pesticidas e intermediarios industriales, por lo que se dispone de un gran número de métodos para su identificación y determinación, y los denominados como contaminantes emergentes: sustancias de muy diversa naturaleza química no reconocidas tradicionalmente como contaminantes, pero cuya presencia en el medio ambiente puede provocar efectos perjudiciales sobre el ecosistema y los organismos que habitan en él, así como en el ser humano.

El control de todos los posibles contaminantes emergentes no está regulado por las administraciones públicas, por lo que la disponibilidad de técnicas y métodos oficiales para su análisis es nula o muy limitada. En los últimos años se han identificado un gran número de este tipo de sustancias, entre las que se pueden destacar: ácidos nafténicos, aditivos en gasolinas (metil tert-butil éter (MTBE) y 1,2-dibromobutano (EDB)), aromas sintéticos, benzotriazoles, compuestos perfluorados, algunos edulcorantes artificiales, fármacos, drogas de abuso, hormonas, disruptores endocrinos, filtros solares, micro y nanoplásticos, plastificantes, productos de degradación de pesticidas y nuevos pesticidas, productos derivados de procesos de desinfección de aguas, retardantes de llama, surfactantes, cianobacterias y algas, compuestos organometálicos, y, especialmente importantes son los principios activos farmacológicos, sus metabolitos y productos de degradación, por su naturaleza bioactiva intrínseca. La tabla 1.1 muestra una posible clasificación de los contaminantes emergentes.

Tabla 1.1. Posible clasificación de los contaminantes emergentes [3].

<i>Productos Farmacéuticos</i>	
Antibióticos (veterinarios y humanos)	Trimetoprima, eritromicina, lincomicina, sulfametoxazol
Antiinflamatorios y analgésicos	Codeína, ibuprofeno, acetaminofen, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, fenopreno
Antidepresivos	Diazepam
Reguladores lipídicos	Bezafibrato, ácido clofibrico, ácido fenofibrico
β- bloqueantes	Metaprolol, propanolol, timolol
Medios de contraste de Rayos X	Iopromida, iopamidol, diatrizoato
Esteroides y hormonas	α -etinilestradiol (EE2), estradiol, estrona, estriol, dietilestribestrol
Drogas de abuso	Metanfetaminas, metilendioximetanfetamina (MDMA), morfina, 6-acetilmorfina
<i>Productos de Cuidado Personal</i>	
Fragancias	Nitroalmizcles, musks policíclicos y macrocíclicos
Filtros solares	Benzofenona, metilbenciliden canfor
Repelentes de insectos	N,N-dietil-m-toluamida (DEET)
Antisépticos	Triclosan, clorofeno
<i>Surfactantes y metabolitos</i>	
Alquilfenol etoxilados, alquilfenol carboxilados, alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol)	
<i>Retardantes de llama</i>	
Difeniléter polibromado (PDEs), tris (2-cloroetil)fosfato	
<i>Edulcorantes artificiales</i>	
Sucralosa	
<i>Nanomateriales</i>	
Nanopartículas de plata, TiO ₂ , fulerenos	
<i>Aditivos de Gasolina</i>	
Dialquiléteres, metil-t-butil-éter (MTBE)	
<i>Productos industriales</i>	
Antimonio, agentes alquilantes (EDTA), sulfonas aromáticas	
<i>Compuestos perfluorados</i>	
Sulfonato perfluorooctano (PFOs), ácido perfluorooctánico (PFOA), ácidos perfluorocarboxílicos (PFCAs)	

1.2 Los Principios Activos Farmacológicos como contaminantes emergentes

El consumo de medicamentos, tanto de uso humano como veterinario, ha crecido en las últimas décadas debido al aumento de la población a nivel mundial, cuya consecuencia inmediata ha sido un aumento de la demanda alimentaria, lo que lleva a una mayor explotación de las actividades agrícolas y ganaderas. Así, el consumo de antibióticos ha subido en un 65% a lo largo del último siglo, y no solo por el uso humano. En la Unión Europea están autorizados alrededor de 3000 principios activos, siendo Europa el segundo mayor consumidor de medicamentos de uso humano (24% del total) por detrás de EEUU.

Entre las familias de los fármacos que actualmente se consideran más perjudiciales para el medio ambiente se encuentran:

- Antibióticos, debido a la posibilidad de que las cepas se vuelvan resistentes a este tipo de fármacos con lo que pierden su actividad terapéutica. Esta familia ocupa el tercer puesto en volumen de uso de todos los medicamentos empleados en medicina humana, y el 70% de los empleados en medicina veterinaria.
- Medios de contraste radiográfico, que no se eliminan en las plantas de tratamiento de aguas residuales alcanzando las aguas subterráneas y los suelos, y algunos de ellos tienen naturaleza radioactiva.
- Citostáticos, debido a su gran potencia farmacológica ya que presentan propiedades carcinogénicas, mutagénicas o embriogénicas, y no se eliminan de forma adecuada en los procesos de depuración.
- También cabe destacar la presencia de los estrógenos que se utilizan como anticonceptivos y en los tratamientos de los desórdenes hormonales como la menopausia que son los responsables de la aparición de fenómenos de feminización, hemafrodítismo y disminución de la fertilidad en ciertos organismos.

Las actividades del ser humano, ya sean accidentales o voluntarias, son las principales responsables de la liberación de fármacos al medio ambiente. Se puede considerar como un vertido accidental la eliminación de este tipo de compuestos transformados total o parcialmente, en el sistema del alcantarillado. Del mismo modo, el

estiércol que excretan los animales de granja que han sido tratados con fármacos se considera como un contaminante, ya que se deposita directamente sobre el suelo o bien se usa como fertilizante en campos agrícolas. Según las características de los suelos y las propiedades físico-químicas de este tipo de contaminantes emergentes, sus metabolitos y/o los productos de degradación, estos llegan a las aguas subterráneas contaminando los acuíferos o bien se quedan retenidos en el suelo afectando de esta forma al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica. En la figura 1.1 se muestra un esquema de las posibles vías de entrada de los principios activos farmacológicos al medio ambiente.

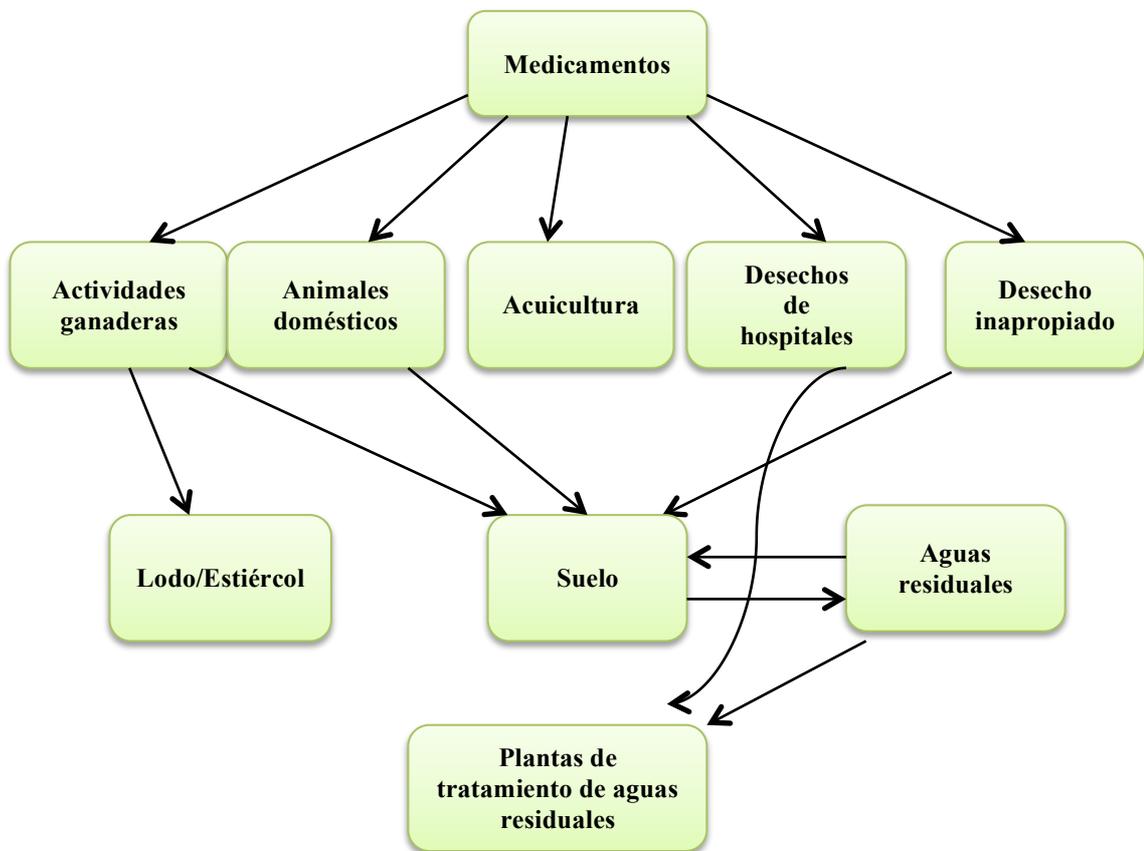


Figura 1.1. Vías de entrada de fármacos al medioambiente.

Los fármacos pueden llegar al medio ambiente mediante varias vías, de todas ellas, hay que destacar las aguas residuales urbanas que proceden, principalmente, de descargas de fuentes domésticas con un aporte adicional de escorrentías viales y fuentes industriales, se componen en un 99.9% de agua y un 0.1 % de sólidos disueltos y suspendidos. Este tipo de aguas pueden contener materia orgánica biodegradable y no biodegradable como aceite, disolventes y contaminantes orgánicos persistentes, microorganismos, nutrientes, metales y compuestos de naturaleza inorgánica. También

se produce una acumulación de este tipo de contaminantes emergentes en zonas agrícolas y ganaderas.

El objetivo principal de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) es prevenir o minimizar el impacto medioambiental de las aguas recibidas de los efluentes y sus entornos. Las estaciones de las EDAR dependen de la naturaleza de las aguas receptoras. La recolección, tratamiento y descarga de aguas residuales municipales está regulada por la *Directiva UE 91/271/CEE* [4] que describe los procedimientos y actuaciones de las EDAR. El objetivo principal de las estaciones depuradoras es prevenir o minimizar el impacto medioambiental de las aguas recibidas de los efluentes y sus entornos. Las funciones de las EDAR dependen de la naturaleza de las aguas receptoras.

El tratamiento de las aguas residuales urbanas es una secuencia continua de procesos físicos, químicos y biológicos, como se muestra en la figura 1.2 (EDAR de tipo terciario).



Figura 1.2. Etapas del tratamiento de aguas residuales en una EDAR[5].

Cuando las aguas residuales llegan a la planta de tratamiento, el primer paso que se lleva a cabo es el pre-tratamiento que consiste en una filtración con el fin de eliminar los residuos sólidos o de mayor volumen. Posteriormente tiene lugar el tratamiento primario en el que se eliminan sólidos en suspensión, los principales procesos fisico-químicos que se llevan a cabo en esta etapa son: sedimentación, flotación, coagulación-floculación y filtración. Una vez completado el tratamiento primario, las aguas residuales se someten al tratamiento secundario que hace uso de procesos biológicos

que utilizan microorganismos a fin de eliminar la materia orgánica biodegradable, tanto coloidal como disuelta, así como compuestos que contienen nutrientes tales como nitrógeno y fósforo. Finalmente, se lleva a cabo el tratamiento terciario cuya finalidad es eliminar la carga orgánica residual y aquellas sustancias contaminantes que no se hayan eliminado en la etapa anterior. Para este último tratamiento se puede hacer uso de resinas de intercambio iónico, adsorción sobre carbón activo, ultrafiltración, ósmosis inversa, electro-desinfección, o membranas cerámicas.

Según el tipo de tratamiento que se lleva a cabo, el porcentaje de eliminación de medicamentos en las aguas residuales es muy variable; así por ejemplo, en el caso del trimetoprima oscila entre un 40-70%; para la ciprofloxacina es del 86%; para la carbamazepina es aproximadamente del 7% para su forma inalterada y de un 44 % para el metabolito mientras que para la familia de los anti-inflamatorios no esteroideos, entre los cuales se encuentran el diclofenaco, ibuprofeno y el naproxeno, los porcentajes de eliminación son un 40% para la forma inalterada y de un 34% para la forma metabolizada, 90-95% y 66-93% respectivamente [3]. De forma genérica, en el tratamiento con lodos activos se consigue una eliminación entre un 40-86 % para los antibióticos, 66-95% para la familia de los anti-inflamatorios, 30-95% para los β -bloqueantes y 50-83% para los reguladores lipídicos [3]. Debido a la elevada producción y consumo y a la continua introducción de estos compuestos, no necesitan ser especialmente persistentes para ocasionar efectos negativos por su continua acumulación en el medio ambiente.

En los años 70 se demostró, por primera vez, la presencia de fármacos en aguas residuales de Estados Unidos con la detección del ácido clofibrato, metabolito activo de varios reguladores lipídicos tales como clofibrato, etofibrato y etofilin [5]. Sin embargo, no fue hasta finales de los años 1990 y principios de 2000 cuando el interés sobre estos contaminantes emergentes en el medio acuático y en organismos vivos cobra fuerza. El desarrollo de nuevas técnicas analíticas como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) ha permitido su identificación y/o determinación en aguas continentales de todo el mundo. Así, por ejemplo se identificó la presencia 30 compuestos de diferentes familias terapéuticas, entre ellos fluoroquinolonas (ciprofloxacina), penicilinas (amoxicilina), sulfonamidas (sulfametoxazol), tetraciclinas (oxitetraciclina) y anti-inflamatorios no esteroideos (ibuprofeno) en aguas residuales urbanas de Italia [6]. En Almería se encontraron fármacos de diferentes familias como antiepilépticos (carbamazepina), anti-inflamatorios no esteroideos (ibuprofeno y diclofenaco), trimetoprima y β -bloqueantes (atenolol) en aguas procedentes de hospitales privados [7]. Cabe destacar que existe un gran número de referencias bibliográficas sobre la presencia de medicamentos en todos tipo de aguas, tanto

subterráneas como superficiales [8-10]. Un ejemplo cercano geográficamente, es la detección de atenolol, un β -bloqueantes, en aguas del río Guadalquivir en una concentración de 10 ng L^{-1} [11].

La presencia de fármacos y otros contaminantes en aguas condiciona, lógicamente, la vida de los organismos que viven en ellas o que hacen uso de las mismas. El agua es vital para el mantenimiento de los ecosistemas por lo que, si este medio se encuentra contaminado, se perjudica gravemente el desarrollo de la vida en ellos. Así pues, existen miles de referencias bibliográficas relacionadas con la contaminación de innumerables ecosistemas por metales pesados, pesticidas o hidrocarburos aromáticos policíclicos, [12, 13, 14, 15] que afectan tanto a especies vegetales como animales, sin embargo, son más escasos los estudios de la presencia de fármacos, productos de degradación de estos y metabolitos tanto en especies vegetales como animales. En la última década se han llevado a cabo estudios sobre la presencia de productos de cuidado e higiene personal, [16, 17,18] si bien estos aún son bastante escasos y en cuanto a su evaluación en especies vegetales prácticamente inexistentes.

Cabe destacar que actualmente la comunidad científica muestra un gran interés por la determinación de medicamentos en animales debido a que algunos de ellos forman parte de la cadena alimentaria del ser humano. Entre 2000 y 2003 se observó un inusual incremento en la tasa de mortalidad de ejemplares jóvenes y adultos de una especie de buitres en Pakistán, disminuyendo drásticamente la población y situándolo en la lista de animales en peligro de extinción. Los buitres habrían estado expuestos a diclofenaco al alimentarse de ganado previamente tratado con este anti-inflamatorio no esteroideo, ocasionándoles fallo renal agudo y muerte. Es el primer caso documentado de desastre ecológico debido a la presencia de contaminantes emergentes en el medio ambiente [19].

Uno de los primeros estudios sobre la presencia de fármacos de consumo veterinario en diferentes tipos de peces [20] identifica algunos principios activos farmacológicos de la familia de fluoroquinolonas tales como norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina y flumequina en ejemplares de bacalao, lucio joven, perca, trucha arcoíris y trucha de lago. En lo que respecta al continente Europeo, se encontraron fármacos de diferentes familias, como anfenicoles (clorfenicol, tianfenicol), anti-inflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno y ácido salicílico), fluoroquinolonas (ciprofloxacina y norfloxacin), sulfonamidas (sulfametoxazol), anti-epilépticos (carbamazepina) y trimetoprima en el río Turia, que recibe aguas de dos plantas de cría de ejemplares de trucha en las que se emplean diversos tipos de fármacos [21].

Es de enorme interés profundizar en la metabolización, bioacumulación y los efectos fisiológicos de los fármacos en el organismo de las especies animales debido a que si estas especies forman parte de la cadena alimentaria del ser humano, pueden afectarle de forma negativa. Existen referencias a ensayos de bioacumulación y de metabolización de naproxeno en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de un criadero finlandés [22]. También se ha llevado a cabo un estudio similar con trimetoprima, sulfametoxazol y carbamazepina en pez mosquito (*Gambusia holbrooki*) procedente de estanques de agua dulce y salada de Miami [23]. Por último, cabe destacar el estudio de toxicidad de danofloxacina, enrofloxacina, trimetoprima y oxitetraciclina realizado sobre embriones de pez cebra (*Danio rerio*) [24].

En lo que se refiere al medio acuático, otros organismos sobre los que se han documentado estudios son los moluscos. Así pues, existen referencias sobre los efectos fisiológicos producidos por la presencia de diclofenaco e ibuprofeno en el mar Báltico [25]. El diclofenaco es uno de los anti-inflamatorios no esteroideos más frecuentes en las aguas, y se ha constatado su presencia tanto en aguas como en moluscos (*Mytilus edulis trossulus*) en Francia [26]. Uno de los estudios más recientes, del año 2018, describe la presencia de trimetoprima y carbamazepina en moluscos (*Perna viridis*) y ostras (*Crassostrea hongkongensis*) procedentes de acuicultura de Hong-Kong [27]. Finalmente, cabe destacar que también existen referencias bibliográficas sobre la presencia, bioacumulación y eliminación de carbamazepina, sulfametazina y trimetoprima en crustáceos (*Gammarus pulex*) [28].

Debido a la problemática de la presencia de fármacos en organismos vivos, que pueden entrar en la cadena trófica del ser humano, en 1990 la Unión Europea aprobó el *Reglamento CEE N° 2377/90* en el que “se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal”. Tras varias actualizaciones, hoy en día, está vigente el *Reglamento CEE N° 37/2010* “relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal”. En la tabla 1.2, se muestra una comparativa de los límites máximos de residuos (LMR) establecidos en ambos reglamentos para los fármacos objeto de estudio en esta Memoria. El cloranfenicol es uno de los principios activos farmacológicos que se encuentra en la lista de sustancias prohibidas en ambos reglamentos y por tanto no puede establecerse un LMR.

Tabla 1.2. Comparación entre los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios para especies animales destinadas al consumo humano establecidos en los *Reglamentos CEE N° 2377/90* y *CEE N° 37/2010*.

Sustancia farmacológicamente activa	Especie animal	LMR (<i>Reglamento CEE N° 2377/90</i>)	LMR (<i>Reglamento CEE N° 37/2010</i>)
Amoxicilina	Todas	50 µg kg⁻¹ (músculo, grasa, hígado y riñón) y 4 µg kg⁻¹ (leche)	50 µg kg⁻¹ (músculo, grasa, hígado y riñón; no aplicable a peces) y 4 µg kg⁻¹ (leche).
Clortetraciclina	Todas	100 µg kg⁻¹ (músculo y leche), 300 µg kg⁻¹ (hígado), 600 µg kg⁻¹ (riñón), 200 µg kg⁻¹ (huevos)	100 µg kg⁻¹ (músculo y leche), 300 µg kg⁻¹ (hígado; no aplicable a peces), 600 µg kg⁻¹ (riñón; no aplicable a peces), 200 µg kg⁻¹ (huevos).
Danofloxacina	Todas excepto bovinos, ovinos, caprinos y aves	100 µg kg⁻¹ (músculo), 50 µg kg⁻¹ (grasa), 200 µg kg⁻¹ (hígado), 200 µg kg⁻¹ (riñón).	100 µg kg⁻¹ (músculo), 50 µg kg⁻¹ (grasa; no aplicable a peces), 200 µg kg⁻¹ (hígado; no aplicable a peces), 200 µg kg⁻¹ (riñón; no aplicable a peces)
Diclofenaco	Bovinos y porcinos	No se establecen LMR para éste fármaco	<u>Bovinos:</u> 5 µg kg⁻¹ (músculo e hígado), 1 µg kg⁻¹ (grasa), 10 µg kg⁻¹ (riñón) y 0.1 µg kg⁻¹ (leche) <u>Porcinos:</u> 5 µg kg⁻¹ (músculo e hígado), 1 µg kg⁻¹ (piel y grasa) y 10 µg kg⁻¹ (riñón)
Enrofloxacina (Suma de enrofloxacina y de ciprofloxacina)	Todas excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, conejos y aves	100 µg kg⁻¹ (músculo), 100 µg kg⁻¹ (grasa), 200 µg kg⁻¹ (hígado), 200 µg kg⁻¹ (riñón)	100 µg kg⁻¹ (músculo), 100 µg kg⁻¹ (grasa), 200 µg kg⁻¹ (hígado), 200 µg kg⁻¹ (riñón)
Florfenicol (Suma de florfenicol y de sus metabolitos medidos en florfenicol- amina)	Peces	1000 µg kg⁻¹ (músculo y piel en proporciones normales)	1000 µg kg⁻¹ (músculo y piel en proporciones normales)
Flumequina	Peces	600 µg kg⁻¹ (músculo y piel en proporciones normales) 150 µg kg⁻¹ (músculo y piel en proporciones normales)	600 µg kg⁻¹ (músculo y piel en proporciones normales)
Marbofloxacina	Salmónidos Bovinos y porcinos	150 µg kg⁻¹ (músculo, hígado, riñón), 50 µg kg⁻¹ (grasa) y 75 µg kg⁻¹ (leche de bovinos)	150 µg kg⁻¹ (músculo, hígado, riñón), 50 µg kg⁻¹ (grasa) y 75 µg kg⁻¹ (leche de bovinos)
Oxitetraciclina	Todas	100 µg kg⁻¹ (músculo y leche), 300 µg kg⁻¹ (hígado), 600 µg kg⁻¹ (riñón) y 200 µg kg⁻¹ (huevos)	100 µg kg⁻¹ (músculo y leche), 300 µg kg⁻¹ (hígado), 600 µg kg⁻¹ (riñón) y 200 µg kg⁻¹ (huevos)
Sulfonamidas	Todas	100 µg kg⁻¹ (todos los tejidos diana)	100 µg kg⁻¹ (todos los tejidos diana)
Tianfenicol	Todas	50 µg kg⁻¹ (todos los tejidos diana)	50 µg kg⁻¹ (para todos los tejidos diana)
Trimetoprima	Todas	50 µg kg⁻¹ (todos los tejidos diana)	50 µg kg⁻¹ (para todos los tejidos diana)

Tras la 41ª Reunión de la Comisión del Codex Alimentarius, celebrada en julio de 2018, se publica una nueva lista de límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, sin embargo, se trata de una lista de recomendaciones y no está al día de hoy trasladada a nuestra normativa. Así, para el caso de amoxicilina, los límites recomendados para el pescado de aleta son $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ tanto para el músculo como para filete. Para oxitetraciclina, los límites son de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el músculo del pescado y para el músculo del langostino jumbo (*Penaeus monodon*), y por último se recomienda la presencia de un máximo $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para flumequina en el músculo de trucha. Para el resto de fármacos que aparecen en los dos reglamentos mencionados anteriormente no existen LMR recomendadas para el caso de peces.

1.3 Bioindicadores: *Procambarus clarkii* y *Scrobicularia plana*

Tal y como se describe en numerosas reseñas bibliográficas, los organismos acuáticos, ya sean crustáceos o moluscos, se pueden emplear como indicadores de contaminación medioambiental debido a que acumulan en su organismo muchas sustancias contaminantes.

Un **bioindicador**, es un organismo o conjunto de organismos, que tienen la propiedad de responder a la variación de un determinado factor abiótico o biótico del ecosistema, de tal manera que esta respuesta queda reflejada en el cambio de valor en una o más variables de cualquier nivel de dicho organismo [29]. Estas especies se emplean como un método indirecto de medida, representando a una variable a la que es más difícil acceder directamente. Se han identificado como tales organismos a numerosas especies de plantas, insectos, peces, reptiles o mamíferos, entre los cuales se pueden destacar: mariposas, nutrias, crustáceos, moluscos, esponjas marinas, líquenes, etc.

Se considera como bioindicador ideal aquel que es sensible a pequeños cambios, ya sean físicos o químicos, del medio ambiente en el que habita y debe poseer las siguientes características:

- Presentar una amplia distribución geográfica.
- Ser una especie de fácil muestreo.
- Ser sésil o semisésil.
- Vivir en un territorio restringido.
- Ser un organismo bien conocido y estudiado a nivel biológico y fisiológico.

En la presente Tesis se han seleccionado dos especies como organismos bioindicadores, cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*) y coquinas de fango (*Scrobicularia plana*), para estudios relacionados con la presencia de principios activos farmacológicos en un entorno natural y protegido como es el Parque Nacional de Doñana (España).

1.3.1 *Procambarus clarkii*

El cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*) es un crustáceo nativo del suroeste de Estados Unidos que fue introducido en España en los años 60. La expansión del mismo estuvo favorecida por su resistencia al parásito *Aphanomyces astaci* que acabó con gran parte de los cangrejos europeos. En el año 1974 se introdujo esta especie procedente de Luisiana (EEUU) en los arrozales del Alto y Bajo Guadalquivir, además, los pescadores los distribuyeron por el Parque Nacional de Doñana a partir de la población natural de los cangrejos en los cauces y canales cercanos. Dos años después, se explotaba la producción de *Procambarus clarkii* en los arrozales y se capturaron los primeros ejemplares en el Arroyo de la Rocina y el Caño de las Nuevas, que se encuentra en el interior del Parque Nacional de Doñana. En el año 1977, la localización conocida como la Rocina era un lugar de captura de cangrejo rojo americano y en el año 1979, las capturas de estos ejemplares se extienden por todo el Bajo Guadalquivir y embalses de Sevilla, Huelva y Cádiz; posteriormente en el año 1984, se registró la presencia de los primeros ejemplares en el Lucio del Bolín. En la actualidad, el *Procambarus clarkii* se considera una especie invasora, debido a que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el territorio del Parque Nacional de Doñana y sus alrededores [29]. En la figura 1.3 se muestra la distribución del cangrejo rojo a nivel mundial.

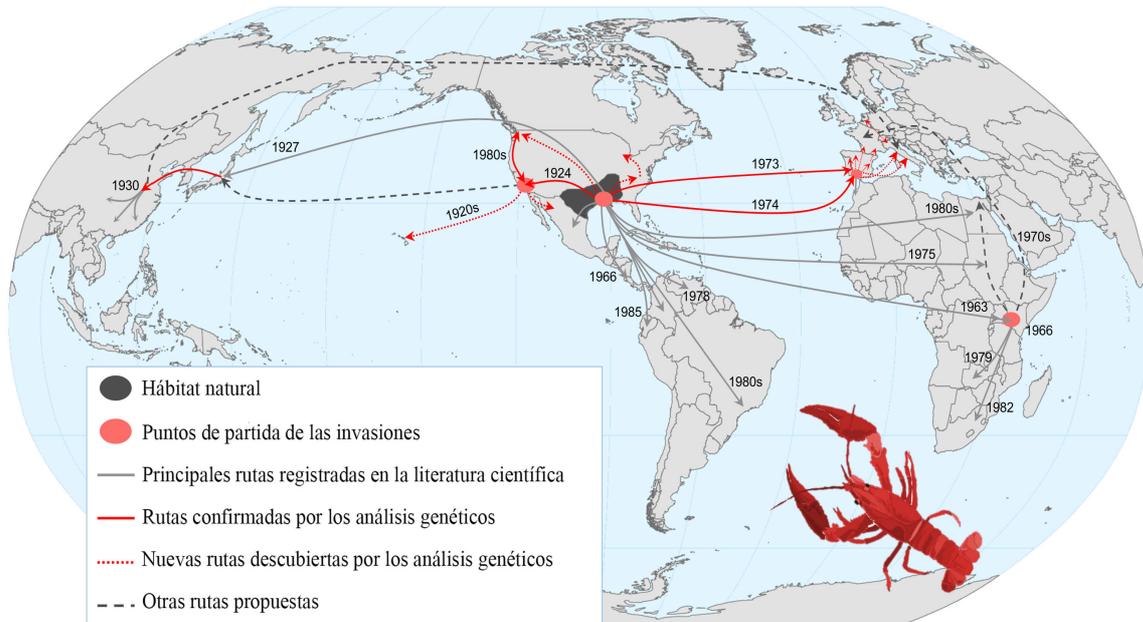


Figura 1.3. Distribución del *Procambarus clarkii* [29].

A pesar de ser una especie invasora, sirve de alimento para las especies del Parque Nacional de Doñana y son un importante recurso económico para los habitantes de la zona.

Desde el punto de vista biológico, el *Procambarus clarkii* (atribuido a Girard, 1852) es un crustáceo decápodo que pertenece a la familia Cambaridae, cuya vida media oscila entre tres y once años. Presenta una coloración rojiza aunque puede presentar tonalidades verdes o marrones y alcanza una longitud entre 5.5 y 10 cm. En la figura 1.4 se muestran las diferentes tonalidades de ejemplares de *Procambarus clarkii*.

Es omnívoro y se alimenta de plantas acuáticas, caracoles, anfibios, peces, y animales y plantas muertas. Se reproducen tras la fecundación en otoño, estación cuando la hembra excava galerías cercanas al agua para la puesta de huevos, quedando estos plegados a sus pleópodos. En primavera nacen pequeños cangrejos sin pasar por estadios intermedios. Su hábitat natural son cursos de agua, lagos, pantanos, áreas agrícolas y charcas donde excavan túneles para refugiarse [33, 34].

El cangrejo rojo presenta una fisiología muy resistente, puede vivir en ambientes con niveles bajos de oxígeno disuelto (2-14 mg/L), soporta grandes cambios de temperaturas, siendo una temperatura óptima para la vida entre 17-22°C, y, por último, presenta una notable resistencia a ambientes contaminados. En la figura 1.5 se muestra la anatomía interna y externa de *Procambarus clarkii*.



Figura 1.4. Diferentes tonalidades de *Procambarus clarkii* [30,31]

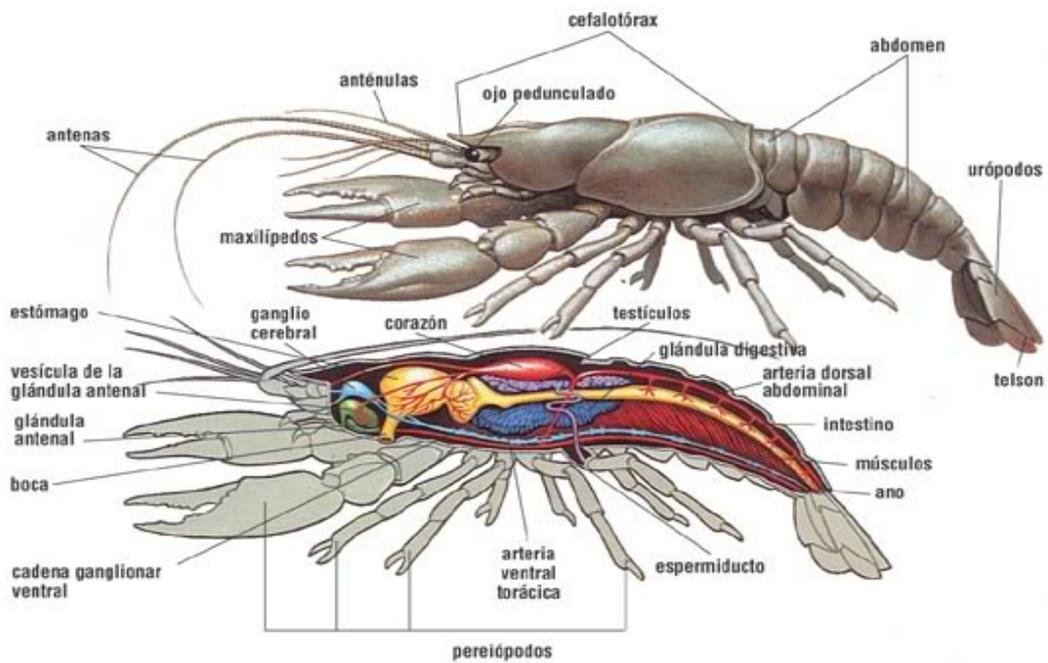


Figura 1.5. Anatomía interna y externa de cangrejo rojo [35].

1.3.2 *Scrobicularia plana*

La *Scrobicularia plana* (atribuido a Da Costa, 1778) es un molusco bivalvo que pertenece a la familia Semelidae, también recibe el nombre de coquina de fango, coquina del Guadalquivir, coquina de río o coquina basta. Se caracteriza por presentar una concha quebradiza con valvas ovaladas y simétricas. Las valvas se unen por un ligamento que, junto a la “charnela”, permite la apertura de la concha. Presenta una coloración gris en la superficie exterior y en el interior es blanca-transparente. Presenta una longitud entre 5 y 7 cm. Vive enterrado en el sustrato blando en zonas de mareas con salinidad variable tales como rías y estuarios. Se encuentra ampliamente distribuida desde Noruega al Mediterráneo y el oeste de África [36]. En la figura 1.6 se muestra la anatomía externa de *Scrobicularia plana*.

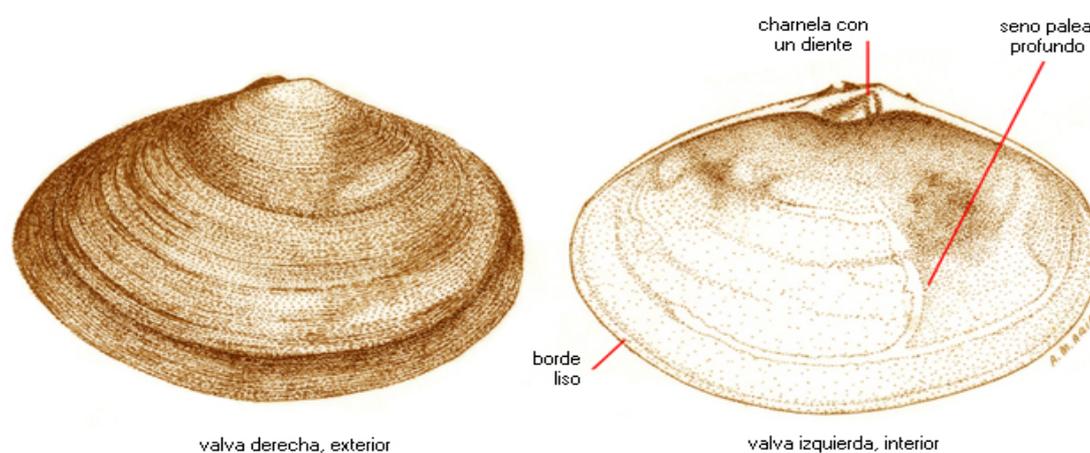


Figura 1.6. Anatomía externa de *Scrobicularia plana* [37].

1.4 Parque Nacional de Doñana

El Parque Nacional de Doñana (PND) se encuentra situado en Andalucía, entre las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz, al sur de la Península Ibérica en las proximidades de la costa del Atlántico y en la desembocadura del río Guadalquivir. Se trata de un conjunto de Parque Nacional y Reserva Natural que está rodeado por varias reservas, parajes y monumentos naturales, así como por el paisaje protegido constituido por el corredor verde del Guadiamar. En el año 1969 recibe la calificación del Parque Nacional y en el año 1980 la UNESCO declara al PND como Reserva de la Biosfera y 14 años más tarde se le otorga el título de Patrimonio de la Humanidad [38].

El Parque Nacional de Doñana está situado sobre el acuífero Almonte-Marismas, del río Tinto al Guadalquivir, y ocupa 3000 Km². El drenaje natural del acuífero se produce a través del río Guadiamar, los arroyos de la Rocina y El Partido, y las propias marismas. Este lugar acoge una población humana aproximada de 200.000 habitantes distribuidos en 22 núcleos urbanos entre los que destacan La Palma del Condado, Almonte con la Aldea del Rocío, Sanlúcar la Mayor y el Aznalcóllar. En la figura 1.7 se muestra un mapa de localización de Parque Nacional de Doñana [39].

Debido a la cercanía del Parque con la localidad de Aznalcóllar, este espacio natural se vio contaminado en el año 1998 debido a la rotura de la balsa de lixiviados de la mina situada en dicha localidad, que produjo un vertido de residuos tóxicos (aguas ácidas de mina) de grandes dimensiones y cuyas consecuencias persisten aun en el medio ambiente veinte años después del mismo, constatando la presencia de metales residuales tales como cobre, zinc, cadmio, arsénico y plomo en suelos y muestras vegetales en las cercanías del Corredor Verde del Guadiamar [40].

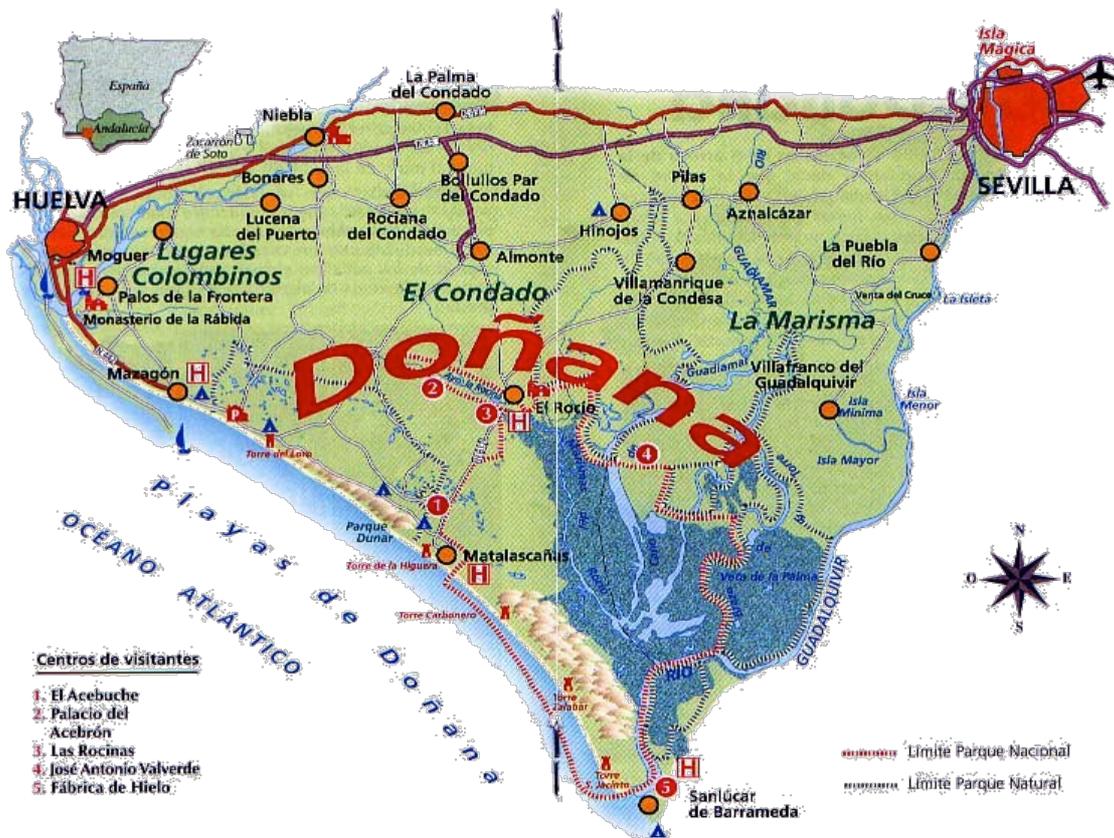


Figura 1.7. Mapa de localización de Parque Nacional de Doñana [41].

En el Parque Natural de Doñana se integran una gran variedad de ecosistemas con una biodiversidad única en toda Europa, entre los que se pueden destacar las marismas, playas, dunas móviles, montes, bosques y lagunas. De todas ellas, las marismas son las que ocupan una mayor extensión, aproximadamente 27.000 hectáreas, y presentan una gran importancia ya que son un lugar de paso, cría e invernada para miles de aves europeas y africanas.

Cabe destacar que Doñana presenta una gran diversidad de flora y fauna. Así, existen más de 900 especies de plantas vasculares y helechos, un gran número de especies vegetales raras o endémicas, unas 20 especies de peces de agua dulce, 11 especies de anfibios, 21 de reptiles, 37 de mamíferos no marinos y 360 aves de las que cerca de 130 se reproducen en el interior del parque. También se debe tener en cuenta la existencia de miles de invertebrados como insectos, arácnidos, anélidos, etc., entre los cuales hay un gran número aún sin catalogar [42,43].

Las actividades agrícolas son la principal fuente de ingresos en las cercanías del PND pero afectan negativamente a este espacio natural en tres formas:

- Se lleva a cabo extracción de agua subterránea para usarla de regadío.
- Las aguas superficiales se usan para arrozales.
- Se produce contaminación por fertilizantes y plaguicidas usados en cultivos.

Al noreste de marisma, con una extensión de 35000 hectáreas, se cultiva arroz, mientras que al noroeste y sobre las arenas estabilizadas, con una extensión de 4000 hectáreas, se localizan los cultivos de fresa. En las proximidades del arroyo El Partido se han detectado elevadas concentraciones de nutrientes tales como NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , metales como aluminio y cromo, cuya presencia se puede relacionar con el uso de fertilizantes y plaguicidas en las cercanías de Doñana. Otra posible causa de la presencia de compuestos nitrogenados es la presencia de un gran número de cabezas de ganado [44].

Además, los efluentes procedentes de almazaras, industrias de procesado de uva y vegetales, así como de industrias cárnicas y lácteas contaminan el arroyo de El Partido y el curso bajo del río Guadiamar [45]. Por otro lado, cabe destacar que no todos los municipios cercanos al Parque Nacional de Doñana disponen de una Estación Depuradora de Aguas Residuales; las principales estaciones depuradoras se encuentran en Almonte, Bollullos Par del Condado y Rociana del Condado [46].

1.5 Principios activos farmacológicos objeto de estudio

1.5.1 Quinolonas /Fluoroquinolonas

Los fármacos pertenecientes a la familia de quinolonas/fluoroquinolonas se emplean tanto en medicina humana como veterinaria. Las quinolonas de uso clínico tienen una estructura formada por dos anillos, con nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3. La farmacocinética y el espectro de actividad aumentan de manera significativa cuando se introduce un átomo de flúor en la posición 6, ya que mejora la penetración en tejidos y la unión a su diana. En la figura 1.8 se muestra la estructura típica de las quinolonas.

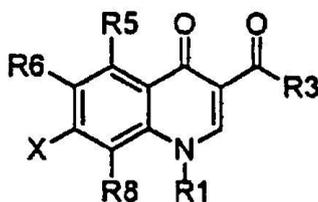
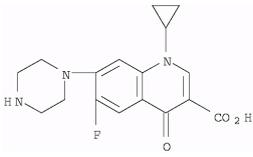
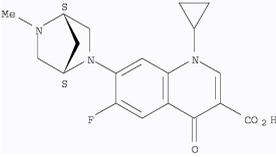
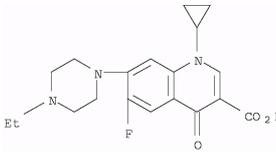
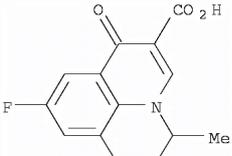
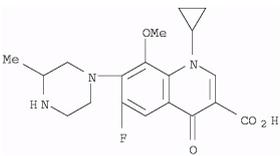
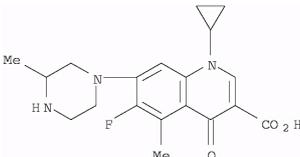
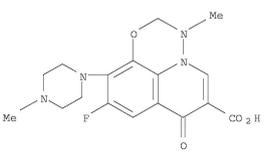
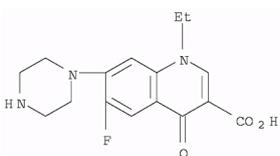


Figura 1.8. Estructura común de las quinolonas

En el presente trabajo se han estudiado siete fluoroquinolonas: **ciprofloxacina** (CPR), **danofloxacina** (DNF), **enrofloxacina** (ENR), **flumequina** (FMQ), **grepafloxacina** (GPF), **gatifloxacina** (GTF), **norfloxacina** (NRF) y una quinolona, **marbofloxacina** (MRB). Existe un gran número de publicaciones científicas sobre la determinación de compuestos de esta familia de fármacos en diferentes matrices como, por ejemplo, detección de fluoroquinolonas en humor acuoso mediante LC-MS [47], o bien en orina mediante HPLC-DAD [48]. En lo que respecta a las muestras de origen animal, se ha empleado la cromatografía acoplada a espectrometría de masas [51, 52], se han determinado en leche de vaca mediante electroforesis capilar o MALDI-TOF/MS [49, 50], en gambas mediante cromatografía acoplada a un detector de fluorescencia [53]. Por último cabe destacar las numerosas reseñas bibliográficas sobre la detección de quinolonas/fluoroquinolonas en muestras ambientales tales como en sedimentos mediante HPLC-FLD [54], en aguas ambientales, tejidos y fluidos biológicos de peces mediante LC-MS [55, 56].

En la tabla 1.3 se muestra la fórmula molecular, algunos datos de interés, así como las indicaciones clínicas de las quinolonas/fluoroquinolonas estudiadas.

Tabla 1.3. Fórmula molecular, datos adicionales e indicaciones clínicas de fluoroquinolonas objeto de estudio.

	<p>Ciprofloxacin[85721-33-1]: 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4 dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl). pKa: 6.43, 8.68.</p> <p>Indicaciones: Infecciones de vías respiratorias bajas causadas por bacterias Gram negativas, otitis media supurativa, infecciones de vías urinarias, infecciones de piel, infecciones de huesos y de articulaciones.</p>
	<p>Danofloxacin[112398-08-0]:1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-7-[(1S,4S)-5-methyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-4-oxo-.pKa: 6.43, 9.00</p> <p>Indicaciones: Neumonías, infecciones entéricas, metritis, abscesos, infecciones de piel y tejidos blandos e infecciones urogenitales.</p>
	<p>Enrofloxacin [93106-60-6]: (1-cyclopropyl-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-). pKa: 6.43, 7.76</p> <p>Indicaciones: Infecciones bacterianas individuales o mixtas del aparato respiratorio, digestivo y urinario, otitis externa, infecciones de piel y heridas en perros y gatos.</p>
	<p>Flumequin [42835-25-6]: (1<i>H</i>,5<i>H</i>-Benzo [<i>ij</i>] quinolizine-2-carboxylic acid, 9 fluoro-6,7-dihydro-5-methyl-1-oxo-). pKa: 5.70, -1.98</p> <p>Indicaciones: Infecciones gastrointestinales y respiratorias de animales (bovinos, cerdos, equinos, ovinos, perros y gatos).</p>
	<p>Gatifloxacin[112811-59-3]:(1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-). pKa: 6.43, 8.72.</p> <p>Indicaciones: Neumonía aguda, exacerbaciones bacterianas de bronquitis crónica, sinusitis aguda, infecciones no complicadas de piel y tejido celular y pielonefritis.</p>
	<p>Grepafloxacin [119914-60-2]: (1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4 dihydro-5-methyl-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-). pKa: 6.44, 8.74.</p> <p>Indicaciones: Bronquitis aguda, neumonía, gonorrea uretral en hombres y endocervical y rectal en mujeres, uretritis y cervicitis no gonocócica.</p>
	<p>Marbofloxacin [115550-35-1]: (7<i>H</i>- Pyrido[3,2,1-<i>ij</i>][4,1,2]benzoxadiazine-6-carboxylic acid). pKa: 6.02, 7.34.</p> <p>Indicaciones: Infecciones de piel, infecciones de tejidos blandos, infecciones del tracto urinario superior e inferior, infecciones del tracto respiratorio (perros y gatos).</p>
	<p>Norfloxacin [70458-96-7]:(1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl-). pKa: 0.16, 8.68</p> <p>Indicaciones: Infecciones del tracto urinario superior e inferior incluyendo cistitis, pielitis y cistopielitis.</p>

1.5.2 Sulfonamidas

Las sulfonamidas fueron los primeros principios farmacológicos activos usados de forma efectiva para tratar infecciones de cualquier tipo, pero se dejaron de usar debido a que las bacterias adquirieron resistencias a ellas y al desarrollo de fármacos más activos y menos tóxicos. Sin embargo, actualmente, con la recuperación de la eficacia sobre ciertas bacterias y la aparición de la trimetoprima que actúa de forma sinérgica con las sulfonamidas, se ha vuelto a trabajar con este tipo de fármacos. Tal es así, que las sulfonamidas constituyen el segundo grupo de antibióticos más usado en la Unión Europea después de las tetraciclinas, con una media de un 23 % de las ventas totales en países como Dinamarca, Reino Unido y Alemania, mientras que en Estados Unidos éstas representan solo un 2,3%.

Las sulfonamidas constituyen una familia de agentes antimicrobianos sintéticos, derivados todos ellos de la sulfanilamida, y utilizados principalmente en acuicultura y en ganadería, para el tratamiento de animales destinados a consumo humano. También son prescritos en medicina humana para el tratamiento de infecciones de tracto urinario, ojos y oídos, bronquitis crónicas, meningitis, así como algunos tipos de neumonía y diarrea, y suelen aplicarse en combinación con diaminopirimidinas como la trimetoprima, con el fin de potenciar su actividad antibiótica.

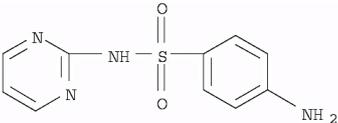
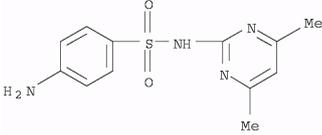
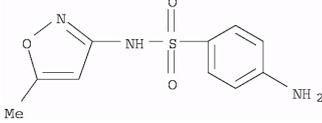
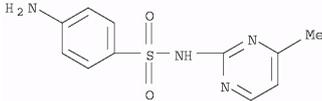
El uso de las sulfonamidas en medicina humana es bastante escaso, mientras que en medicina veterinaria es elevado debido a que su coste es moderado. Son antibióticos de amplio espectro y muy efectivos como promotores de crecimiento, aunque este uso está prohibido actualmente (1831/2003/EC).

En el presente trabajo, se han estudiado las siguientes sulfonamidas: **sulfadiazina** (SDZ), **sulfamerazina** (SMR), **sulfametazina** (SMT) y **sulfametoxazol** (SMX).

En la bibliografía se ha descrito la determinación de sulfonamidas en gambas mediante LC/ESI/MS/MS [57], en miel, en huevos de gallina mediante HPLC-DAD [58] y en diversos alimentos por electroforesis [59]. También se ha descrito su análisis en aguas residuales urbanas mediante LC-MS/MS [60].

En la tabla 1.4 aparece la fórmula molecular, datos adicionales (CAS, peso molecular y pK_a) y las indicaciones clínicas de cada una de ellas.

Tabla 1.4. Fórmula molecular, datos adicionales y las indicaciones clínicas de las sulfonamidas estudiadas.

	<p>Sulfadiazina [68-35-9]: (4-amino-N-2-pyrimidinyl-). pKa: 6.81, 1.64</p> <p>Indicaciones: Conjuntivitis, infección urinaria y gonorrea, quemaduras, linfogranuloma venéreo, nocardiosis, sinusitis, tracoma, profilaxis de meningitis meningocócica, toxoplasmosis en SIDA.</p>
	<p>Sulfametazina [57-68-1]: (4-amino-N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)-). pKa: 7.89, 1.69</p> <p>Indicaciones: Coccidiosis, neumonías, mastitis, poliartrosis, colibacilosis, salmonelosis.</p>
	<p>Sulfametoxazol [723-46-6]: (N-(5-methyl-3-isoxazolyl)-). pKa: 5.81, 1.39.</p> <p>Indicaciones: Neumonía por <i>P. carinii</i>, nocardiosis, toxoplasmosis, listeriosis, osteomielitis y artritis séptica, infecciones de piel y tejidos blandos.</p>
	<p>Sulfamerazina [127-79-7]: (4-amino-N-(4-methyl-2-pyrimidinyl)-). pKa: 7.35, 1.64.</p> <p>Indicaciones: Neumonía lobular y meningitis meningocócica.</p>

1.5.3 Tetraciclinas

Las tetraciclinas constituyen una familia terapéutica que incluye productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina, tigeiclina, PTK 7906) derivados de diferentes especies de *Streptomyces spp.* Pertenecen a la familia de antimicrobianos con actividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, bacterias aerobias o anaerobias y microorganismos atípicos como *Chlamydia sp*, *Rickettsia sp*, *Mycoplasma sp*, *Borrelia sp*, *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori*, *Plasmodium sp*. Hoy en día, se ha reducido el uso de las tetraciclinas debido al desarrollo de cepas resistentes a las mismas y el desarrollo de nuevos agentes microbianos más eficaces que estas.

Las tetraciclinas naturales y semisintéticas poseen un núcleo compuesto por cuatro anillos fusionados dando lugar a una estructura tetracíclica lineal. Todas forman complejos quelantes con cationes calcio, magnesio o hierro, dificultando de esta forma su absorción ya que al formar complejos se vuelven insolubles en agua.

Existe un gran número de referencias bibliográficas relacionadas con la de determinación de tetraciclinas en diferentes matrices tanto biológicas como ambientales. Así, se ha descrito la determinación de tetraciclinas en leche mediante sensor quimioluminiscente [61], espectrofluorimetría [62], o HPLC-ESI-MS/MS [63], en orina mediante electroforesis capilar [64], o en músculo de peces y en miel mediante UPLC-MS/MS [65, 66]. Respecto a las muestras de matriz ambiental, se han determinado diversas tetraciclinas en muestras de agua a través de detección fluorimétrica [67] y en suelos mediante HPLC-PDA [68].

En esta Memoria se han estudiado solamente dos tetraciclinas: **clortetraciclina** (CLT) y la **oxitetraciclina** (OXT). En la tabla 1.5 se muestran las indicaciones clínicas de cada una de ellas y otros datos adicionales.

Tabla 1.5. Formula molecular, datos adicionales y las indicaciones clínicas de las tetraciclinas estudiadas.

	<p>Clortetraciclina [57-62-5]: (7-chloro-4-(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-, 4S, 4aS, 5aS, 6S, 12aS)-). pKa: 4.50, 11.01</p>
	<p>Oxitetraciclina [79-57-2]: (4-(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-, (4S,4aR, 5S, 5aR, 6S, 12aS)-). pKa: 4.50, 10.80</p>

1.5.4 Anfénicoles/Fénicoles

Esta familia de fármacos antimicrobianos, que derivan del ácido dicloroacético, incluye a **cloranfenicol** (CLF), **florfénicol** (FLF) y **tianfenicol** (TIF), objeto de estudio del presente trabajo. Hoy en día, tanto en medicina humana como veterinaria, se usan para el tratamiento de infecciones graves, como antibiótico de segunda elección, debido a que en los años 50 se demostró que podría provocar graves alteraciones permanentes de la sangre.

No existe un gran número de referencias bibliográficas sobre la determinación de anfénicoles/fénicoles. Se han encontrado reseñas sobre la detección de esta familia de principios activos farmacológicos en leche mediante LC-MS/MS [69] o bien mediante HPLC-MS en *Procambarus clarkii* [70].

En la tabla 1.6 se muestran datos adicionales y las indicaciones clínicas de cada uno de los principios activos farmacológicos pertenecientes a esa familia de fármacos.

Tabla 1.6. Formula molecular, datos adicionales y las indicaciones clínicas de los anfenicoles estudiados.

	<p>Cloranfenicol [56-75-7]: <i>N</i>-[(1R, 2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrophenyl)ethyl]. pKa: 11.03, -1.73</p>
<p>Indicaciones: fiebre tifoidea y paratifoidea, tos ferina, brucelosis, rickettsiosis, infecciones broncopulmonares, infecciones quirúrgicas, tracoma e infecciones oculares.</p>	
	<p>Tianfenicol [15318-45-3]: <i>N</i>-[(1R, 2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]ethyl]-. pKa: 11.05, -1.73</p>
<p>Indicaciones: sinusitis, otitis, laringofaringitis, traqueítis, bronquitis, bronconeumonía.</p>	
	<p>Florfenicol [73231-34-2]: <i>N</i>-[(1S, 2R)-1-(fluoromethyl)-2-hydroxy-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]ethyl]-. pKa: 10.73, -1.79</p>
<p>Indicaciones: Enfermedades respiratorias del ganado porcino y bovino, enfermedades digestivas.</p>	

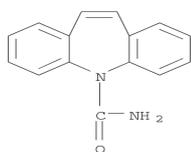
1.5.5 Antiepilépticos

Los antiepilépticos es una familia de fármacos que se emplean para combatir, prevenir o interrumpir los ataques epilépticos y las convulsiones. La epilepsia es una enfermedad crónica del sistema nervioso central debida a la aparición de actividad eléctrica anormal en la corteza cerebral dando lugar a convulsiones violentas y pérdidas del conocimiento. Para tratar este tipo de enfermedad se emplean fármacos de composición química heterogénea. En este trabajo se estudiará un principio activo farmacológico perteneciente a ese grupo, la **carbamazepina** (CBZ).

En la bibliografía se describe la determinación de carbamazepina en muestras de aguas mediante HPLC-UV/FL [71], en plasma mediante HPLC-MS [72], en músculo de peces mediante LC-QTOF-MS/MS [73] o bien en suero humano mediante HPLC [74].

En la tabla 1.7 se muestran la formula molecular, los datos adiciones y las indicaciones clínicas de la misma.

Tabla 1.7. Formula molecular, datos adicionales y las indicaciones clínicas de carbamazepina.



Carbamazepina [298-46-4]: 5H-Dibenz[b,f] azepine 5-carboxamide.
pKa: 13.94, -0.49

Indicaciones: trastorno afectivo bipolar, de esquizofrenia y trastorno esquizoafectivo, del descontrol de impulsos con epilepsia o sin ella, de trastorno explosivo intermitente.

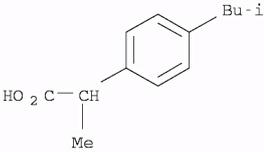
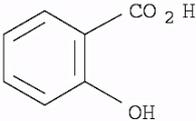
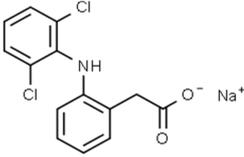
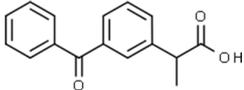
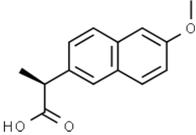
1.5.6 Anti-inflamatorios no esteroideos (AINES)

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) son una de las familias de fármacos con mayor consumo a nivel mundial ya sea con o sin preinscripción médica debido a sus propiedades anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Se trata de un grupo muy heterogéneo químicamente. En el presente trabajo se han estudiado cinco AINES: **ibuprofeno** (IBU), **ácido salicílico** (SAC), **diclofenaco sódico** (DIC), **ketoprofeno** (KET) y **naproxeno** (NAX).

Existe un gran número de reseñas bibliográficas sobre la determinación de AINES en diferentes matrices. A modo de ejemplo se pueden mencionar: determinación de estos fármacos mediante LC-MS quiral en aguas, sedimento de río y lodo [75]; en músculo de ratones mediante GC-MS [76]; en fluidos biológicos mediante HPLC [77]; en orina mediante HPLC-UV/Vis [78].

En la tabla 1.8 se muestran las indicaciones clínicas, fórmula molecular y datos adicionales de la familia de AINES objeto de estudio.

Tabla 1.8. Formula molecular, datos adicionales y las indicaciones clínicas de AINES objeto de estudio.

	<p>Ibuprofeno [15687-27-1]: (Benzeneacetic acid). pKa: 4.41</p> <p>Indicaciones: artritis reumatoide, espondilitis anquilopoyética, artrosis y otros procesos reumáticos agudos o crónicos, alteraciones músculo esqueléticas y traumáticas con dolor e inflamación.</p>
	<p>Acido salicilico [69-72-7]: (Benzoica cid, 2-hydroxy-). pKa: 3.01</p> <p>Indicaciones: Aditivo en los productos para el cuidado de la piel diseñados para tratar acné, psoriasis, callosidades, la piel de gallina y las verrugas</p>
	<p>Diclofenaco sódico: [15307-79-6]: 2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]benzeneacetic acid sodium salt. pKa: 3.01</p> <p>Indicaciones: Enfermedades reumáticas agudas, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artrosis, lumbalgia, gota en fase aguda, inflamación postraumática y postoperatoria, cólico renal y biliar, migraña aguda, y como profilaxis para dolor postoperatorio y dismenorrea.</p>
	<p>Ketoprofeno: [22071-15-4]: 2-(3-Benzoylphenyl) propanoic acid. pKa: 4.45</p> <p>Indicaciones: Artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, gota (episodios agudos), dolor asociado a inflamación, dolor dental, traumatismos, dolor posquirúrgico, esguinces, tendinitis, bursitis, tortícolis y dismenorrea.</p>
	<p>Naproxeno [22204-53-1]: (2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) propanoic acid. pKa: 4.15</p> <p>Indicaciones: Dolor leve o moderado, estados febriles, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoporosis, episodios agudos de gota, espondilitis anquilosante, síndromes reumatoides, dismenorrea, alteraciones musculoesqueléticas con dolor e inflamación</p>

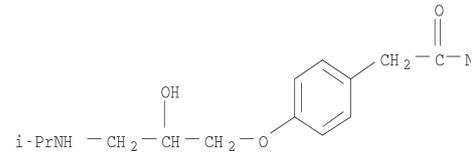
1.5.7 Beta-bloqueantes (β -bloqueantes)

Esta familia de fármacos se prescribe para el tratamiento de trastornos cardíacos y en la prevención posterior a un infarto de miocardio. La mayoría de los β -bloqueantes actúan como antagonistas puros, es decir que al unirse a un receptor no lo activan. En el presente trabajo se ha estudiado **atenolol** (ATN) que es un β -bloqueante cardiosselectivo, es decir, tiene una mayor afinidad por los receptores β_1 y β_2 . En la bibliografía se ha

descrito la determinación de atenolol en orina mediante HPLC y espectrofluorimetría [79, 80] y en plasma mediante RP-HPLC [81].

La fórmula molecular, los datos adicionales y las indicaciones clínicas de ese principio activo farmacológico se muestran en la tabla 1.9.

Tabla 1.9. Fórmula molecular, datos adicionales y las indicaciones clínicas del atenolol.

	<p>Atenolol [29122-68-7]: (RS)- 2-[4-[2-hydroxy-3-(1-methylethylamino)propoxy]phenyl]ethanamide. pKa: 13.88, 9.43</p> <p>Indicaciones: Hipertensión, prevención y tratamiento de angina de pecho estable, infarto agudo de miocardio y arritmias cardíacas.</p>
---	---

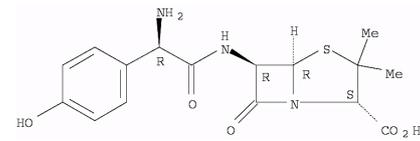
1.5.8 Penicilinas

Las penicilinas pertenecen a la familia de antibióticos bactericidas y pueden ser de origen natural o semisintético. Contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. Las penicilinas de origen natural son producidas por diferentes especies de *Penicillium spp.* Las penicilinas difieren unas de otras por sustituciones en la posición 6 del anillo, donde cambios en la cadena lateral pueden inducir modificaciones en la actividad antibacteriana y en las propiedades farmacocinéticas.

En la bibliografía se ha descrito la determinación espectrofotométrica de amoxicilina en medicamentos y en fluidos biológicos [82], así como la determinación mediante RP-HPLC y LC-MS/MS en plasma humano [83, 84].

En el presente trabajo se ha seleccionado **amoxicilina** (AMX), cuyas indicaciones clínicas, la fórmula molecular y algunos datos adicionales se muestran en la tabla 1.10

Tabla 1.10. Fórmula molecular, datos adicionales y las indicaciones clínicas de la amoxicilina.

	<p>Amoxicilina [26787-78-0]: (4-Thia-1-azabicyclo [3.2.0] heptane-2-carboxylic acid. pKa: 7.04.</p> <p>Indicaciones: Sinusitis bacteriana aguda, otitis, amigdalitis y faringitis estreptocócica aguda, exacerbación aguda de bronquitis crónica, neumonía, cistitis aguda, fiebre tifoidea, infección protésica articular, erradicación <i>Helicobacter pylori</i>, enfermedad de Lyme.</p>
---	--

1.5.9 Trimetoprima

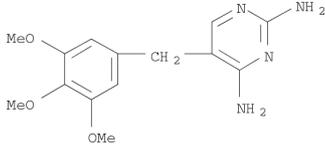
La **trimetoprima** (TMP) pertenece al grupo de fármacos denominados anfólicos, que son aquellos que inhiben la dihidrofólico reductasa (DHFR). Este fármaco inhibe de forma selectiva la DHFR, pero es menos potente en plásmidos y mucho menos en el caso de células humanas.

La trimetoprima tiene efecto antibacteriano propio, pero casi siempre se utiliza en asociación fija con sulfametoxazol en proporción 5:1 (S:T); el nombre genérico de esta asociación es *Co-trimoxazol*. La trimetoprima es de 20 a 100 veces más potente que el sulfametoxazol.

En la bibliografía se describe la determinación de este principio activo farmacológico mediante HPLC en plasma humano [86] y mediante electroforesis capilar en alimentos procesados de origen animal [85], entre otros.

En la tabla 1.11 aparecen la fórmula molecular, datos adicionales (CAS, y pK_a) y las indicaciones clínicas de trimetoprima.

Tabla 1.11 Fórmula molecular, datos adicionales e indicaciones clínicas de trimetoprima.

	Trimetoprima [738-70-5]: 5-[(3,4,5-trimethoxyphenyl) methyl]-. pKa: 7.04
	Indicaciones: Infecciones urinarias (pielonefritis, cistitis, uretritis, prostatitis, etc), infecciones gastrointestinales, infecciones respiratorias superiores e inferiores, tratamiento y profilaxis de la neumonía causada por <i>Pneumocystis carinii</i> e infecciones de transmisión sexual.

Bibliografía

[1] *Informe de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente* (Estocolmo, 1972). Nueva York (1973).

[2] *Real Decreto Legislativo 1/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de prevención y control integrados de la contaminación*. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (BOE-A-2016-12601).

[3] G. McEneff, W. Schmidt, B. Quinn. *Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Short Summary of Current Knowledge and the Potential Impacts on Aquatic Biota and Humans*. EPA Research Report 142 (2014).

[4] D. Barceló y M.J López de Alba. *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. Panel científico-técnico de seguimiento de política de aguas, Convenio de Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente (2012).

[5] S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calmari, R. Fanelli, E. Zuccato. *A multiresidue analytical method using solid - phase extraction and high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters*. Journal of Chromatography A. 1092 (2005) 206-215.

[6] M.J. Gómez, M. Petrovic, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló. *Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters*. Journal of Chromatography A. 1114 (2) (2006), 224-233.

[7] M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló. *Development of multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface wastewaters*. Talanta 70 (4) (2006) 678-690.

[8] M. Petrovic, M. Gros, D. Barceló. *Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 1124 (1-2) (2006) 68-81.

- [9] D.C. da Silva, C.S. Oliveira. *Development of micellar HPLC-UV method for determination of pharmaceuticals in water samples*. Journal of Analytical Methods in Chemistry 30 (2018) 1-12.
- [10] J. Robles Molina, B. Gilbert López, J.F. García Reyes, A. Molina Díaz. *Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in province of Jaén, South East Spain*. Science Total Environment 479-480 (2014) 247-257.
- [11] A.H. Ringwood, D.E. Connors, C.J. Keppler. *Cellular responses of oysters, Crassostrea virginica, to metal contaminated sediments*. Marine Environmental Research 48 (1999) 427-437.
- [12] J. Lopez Barea. *Biomarkers in ecotoxicology: an overview*. Archives of Toxicology, Supplement 17 (1995) 57-79.
- [13] T. Gebel. *Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic*. Toxicology 144 (2000) 155-162.
- [14] S. Omeji, M.O. Adabu, A. K. Egwumah. *Assessment of heavy metal concentrations in water and body parts of four commercial fish species in River Okpokwu, Benue State, Nigeria*. IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology 12 (8-1) (2018) 70-77.
- [15] M.F. Meyer, S. M. Powers, S.E. Hampton. *An evidence synthesis of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment: imbalances among compounds, sewage treatment techniques, and ecosystem types*. Environmental Science & Technology (2019) Ahead of Print.
- [16] G. Teijon, C. Lucila, K. Tamoh, A. Molina Diaz, A.R. Fernandez Alba. *Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain)*. Science of Total Environment 408 (17) (2010) 3584-3595.
- [17] M.J. Andres Costa, E. Carmona, Y. Pico. *Universal method to determine acidic licit and illicit drugs and personal care products in water by liquid chromatography quadrupole time-of-flight*. MethodsX 3 (2016) 307-314.

- [18] R. E. Green, I. Newton, S. Shultz, A.A. Conningham, M. Gilbert, D.J. Pain, V. Prakash. *Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent*. Journal of Applied Ecology 41 (5) (2004) 793-800.
- [19] S.A. Tittlemier, J. Van de Riet, G. Burns, R. Potter, C. Murphy, W. Rourke, H. Pearce, G. Dufresne. *Analysis of veterinary drug residues in fish and shrimp composites collected during the Canadian Total Diet Study, 1993-2004*. Food Additives and Contaminants 24 (1) (2007) 14-20.
- [20] E. Carmona, V. Andreu, Y. Picó. *Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish –Turia river as case study*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 146 (2017) 117-125.
- [21] J.M. Brozinski, M. Laliti, A. Oikari, L. Kronberg. *Detection of naproxen and its metabolites in fish bile following intraperitoneal and aqueous exposure*. Environmental Science Pollution Research 18 (2011) 811-818.
- [22] J. Wang, P.R. Gardinali. *Analysis of selected pharmaceuticals in fish and the fresh water bodies directly affected by reclaimed water using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 404 (2012) 2711-2720.
- [23] G. Carlsson, J. Patring, L. Norrgren, A. Oskarsson. *Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (Danio rerio) embryos*. Aquatic Toxicology 126 (2013) 30-41.
- [24] H. Ericson, G. Thorsén, L. Kumbland. *Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels*. Aquatic Toxicology 99 (2011) .
- [25] G. Daniele, M. Fieu, S. Joachim, A. James-Casas et al. *Development of a multi-residue analysis of diclofenac and some transformation products in bivalves using QUEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Application to samples from mesocosm studies*. Talanta 155 (2016) 1-7.
- [26] S. Rebekah Burket, Y. Saporozhnikova, J.S. Zheng, S.S. Chung, B.W. Brooks. *At the Intersection of urbanization, water and food security: Determination of select contaminants of emerging concern in mussels and oysters from Hong Kong*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66 (2018) 2009-2017.

- [27] T.H. Miller, N.R. Bury, S.F. Owen, L.P. Barron. *Uptake, biotransformation and elimination of selected pharmaceuticals in a freshwater invertebrate measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Chemosphere 183 (2017) 389-400.
- [28] M.A. Capó Martí. *Principios de Ecotoxicología*. Editorial Tébar, S.L., Madrid (2007). ISBN: 978-844-813-6727
- [29] F.J. Oficialdegui, M. Clavero, M.I. Sánchez, A. J. Green, L. Boyero, T.C. Michot, K. Klose, T. Kawai, C. Lejeusne. *Unravelling the global invasion routes of a worldwide invader, the red swamp crayfish (Procambarus clarkii)*. Freshwater Biology 64 (8) (2019) 1382-1400.
- [30] <https://idfg.idaho.gov/species/taxa/30194>
- [31] www.infohuevar.es/2018/06/10/naturaleza-el-cangrejo-rojo
- [32] M.W. Moody, K.J. Roberts, J.V. Huner. *Phylogeny of commercially important seafood and description of the seafood industry*. Clinical Reviews in Allergy & Immunology 11 (1993) 159-181.
- [33] P.J. Gutierrez-Yurrita, C. Montes. *Environmental factors controlling the crayfish Procambarus clarkii activity in Doñana National Park temporary freshwater marsh, SW, Spain*. Comparative Biochemistry and Physiology A. 120 (1998) 713-721.
- [34] <https://jb004.k12.sd.us/MY%20WEBSITE%20INFO/BIOLOGY%20/ANIMAL%20KINGDOM/CRAYFISH%20DISSECTION/CRAYFISH%20DISSECTION%20LAB%20COMPANION.htm>
- [35] P.A. Byrne, J.O. Halloran. *The role of bivalve molluscs as tolos in estuarine sediment toxicity testing: a review*. Hydrobiologia 465(2011) 209-217.
- [36] Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Andalucía. (www.ictioterm.es)
- [37] *Doñana Espacio Natural, Mapa Guía Digital*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. ISBN: 978-84-92807-06-2.

- [38] P. Madejón, J. MM Murillo, T. Marañón, F. Cabrera, M.A. Soriana. *Tracelement and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcóllar mine spill*. Science of the Total Environment 307 (2003) 239-257.
- [39] M. García Carmona, H. García Robles, C. Turpín Torrano, E. Fernández Ondoño, J. Lorite Moreno, M. Sierra Aragón, F.J. Martín Peinado. *Residual pollution and vegetation distribution in amended soils 20 years after a pyrite mine tailings spill (Aznalcóllar, Spain)*. Science of the Total Environment 650 (2019) 933-940.
- [40] <https://sites.google.com/site/parquenacionaldonana45215/>.
- [41] *Doñana Espacio Natural, Mapa Guía Digital*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. ISBN: 978-84-92807-06-2.
- [42] Formularios Oficiales Red Natura 2000. Elaboración: DGCN MIMAM, Ministerio de Medio Ambiente.
- [43] M.A. Taggart, J. Figuerola, A.J. Green, R. Mateo, C. Deacon, D. Osborn, A.A. Meharg. *After the Aznalcóllar mine spill: Arsenic, zinc, selenium, lead and copper levels in the livers and bones of the waterfowl species*. Environmental Research 100 (2006) 349-361.
- [44] *Programa de Investigación del Corredor Verde del Guadiamar PICOVER 1999-2002*. Consejería de Medio Ambiente 192 (2000)
- [45] J.J. Oñate, D. Pereira, F. Suarez. *Strategic environmental assessment of the effects of European Union's Regional development plans in Doñana National Park (Spain)*. Environmental Management 31 (2003) 642-655.
- [46] A.A. Alhusban, O.A. Tarawneh, O. Dawabsheh Sanabel, A. Alhusban Ahmad, W. Abumhareb Feras. *Liquid chromatography- tandem mass spectrometry for rapid and selective simultaneous determination of fluoroquinolones level in human aqueous humor*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 97 (2019) 36-43.
- [47] H. Leijoto de Oliveira, S. Anacleto, A.T. Maria da Silva, A.C. Pereira, W.S. Borges, E.C. Figueiredo, K.B. Borges. *Molecularly imprinted pipette-tip solid phase extraction for selective determination of fluoroquinolones in human urine using HPLC-DAD*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 1033-1034 (2016) 27-39.

- [48] H. Zhang, Y. Ren, X. Bao. *Simultaneous determination of (fluoro)quinolones antibacterial residues in bovine milk using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 49 (2) (2009) 367-374.
- [49] Z. Meng, Z. Shi, S. Liang, X. Dong, H. Li, H. Sun. *Residues investigation of fluoroquinolones and sulphonamides and their metabolites in bovine milk by quantification and confirmation using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food Chemistry 174 (2015) 597-605.
- [50] W.Hongwu, L. Yanquinq, W. Shoulian, Y.Su, Z. Jiali, H. Huichang. *Selective extraction and determination of fluoroquinolones in bovine milk samples with montmorillonite magnetic molecularly imprinted polymers and capillary electrophoresis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 408 (2) (2016) 589-598.
- [51] V. Springer, J. Jacksen, P. Ek, A.G. Lista, A. Emmer. *Capillary electrophoretic determination of fluoroquinolones in bovine milk followed by off-line MALDI-TOF-MS analysis*. Chromatographia 78 (3-4) (2015) 285-290.
- [52] M.T. Martins, F. Barreto, R. Hoff Barcelos, L. Jank, J.B. Arsand, T.C. Feijo, E.E.S. Schapoval. *Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine milk, swine and poultry liver by LC-MS/MS*. Food Additives & Contaminants, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment 32(3) (2015), 333-341.
- [53] U. Schroeder, A. Machetzki. *Determination of flumequine, nalixidic acid and oxolinic acid in shrimps by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. European Food Research and Technology 225 (5-6) (2007) 627-635.
- [54] M.D. Prat, D. Ramil. R. Compano, J.A. Hernandez-Arteseros, M. Granados. *Determination of flumequine and oxolinic acid in sediments and soils by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-fluorescence*. Analytica Chimica Acta 567 (2) (2006) 229-235.

- [55] M.D. Prat, J. Benito, R. Compano, J.A. Hernandez-Arteseros, M. Granados. *Determination of quinolones in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorimetric detection*. Journal of Chromatography A 1041 (1-2) (2004) 27-33.
- [56] J.A.R. Paschoal, F.G.R. Reyes, S. Rath. *Determination of quinolone residues in tilapias (*Oreochromis niloticus*) by HPLC-FLD and LC-MS/MS QToF*. Food additives & contaminants, Part A: chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment 26 (10) (2009) 1331-1340.
- [57] B.S. Reddy, S. Yadlopalli, Y.S. Rao, P.R. Prasad, K. Prabhakar, N.Y. Sreedhar. *LC/ESI/MS/MS method development and validation for the determination of sulfonamide antibiotic residues in shrimp samples*. Journal of Ultra Chemistry 14 (1) (2018) 26-36.
- [58] J.M.K.J.K. Premarathne, D.A. Satharasighe, A.R.C. Gunasena, D.M.S. Munasinghe, P. Abeynayake. *Establishment of a method to detect sulfonamide residues in chicken meat and eggs by high-performance liquid chromatography*. Food Control 72(Part B) (2017) 276-282.
- [59] D. Tingting, J. Duan, L. Xinghua, X. Xiangdong, S. Hongmei, K. Weijun. *Determination of sulfonamide residues in food by capillary zone electrophoresis with on-line chemiluminescence detection based on an Ag (III) complex*. International Journal of Molecular Sciences 18(6) (2017) 1-11.
- [60] X. Qiang, L.F. Yanjie. *Ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for the analysis of antibiotic residues of environmental waters*. Environmental Science and Pollution Research 22 (21) (2015) 16857-16867.
- [61] Z.Q. Jiang, C.Z. Hui, X.Y. Zhang, P.W. Jian. *Determination of tetracyclines in milk with a molecularly imprinted polymer-based microtiter chemiluminescence sensor*. Analytical Letters 52 (8) (2019) 1315-1327.
- [62] B. Gala, A. Gomez Hens, D. Perez Bendito. *Simultaneous determination of ampicillin and tetracycline in milk by using a stopped-flow/T-format spectrofluorimeter*. Talanta 44 (10) (1997) 1883-1889.

- [63] D.A. Bohm, C.S. Stachel, P. Gowik. *Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC*. Journal of Chromatography A 1216 (46) (2009) 8217-8223.
- [64] D. Moreno Gonzalez, M.Krulisova, L. Gamiz Garcia, A.M. Garcia Campoma. *Determination of tetracyclines in human urine samples by capillary electrophoresis in combination with field amplified sample injection*. Electrophoresis 39 (4) (2018) 608-615.
- [65] A. Grande Martinez, D. Moreno Gonzalez, F. J. Arrebola-Liebanas, A. Garrido Frenich, A.M. Garcia Campana. *Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 155 (2018) 27-32.
- [66] S.P. Singh, A. Pundhir, S.Ghosh. *Validation of an analytical methodology for determination of tetracyclines residues in honey by UPLC-MS/MS detection*. Indian Journal of Natural Products and Resources 6 (4) (2015) 293-298.
- [67] M. Granados, M. Encabo, R. Campano, M.D. Prat. *Determination of tetracyclines in water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection*. Chromatographia 6 (9/10) (2005) 471-477.
- [68] B.Sun, Y. Dong, H.J. Shan, C.Tong. *Development of a SPE-HPLC-PDA method for the determination of tetracyclines in soils*. Applied Mechanics and Materials 675-677 (8) (2005) 288-294.
- [69] H.Y. Liu, S.L. Lin, M.R. Fuh. *Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk and honey using modified QuEChERS extraction coupled with polymeric monolith-based capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Talanta 150 (2016) 233-239.
- [70] J. Kazakova, R. Fernández Torres, M. Ramos Payán. M.A. Bello López. *Multiresidue determination of 21 pharmaceuticals in crayfish (Procambarus clarkii) using enzymatic microwave assisted liquid extraction and ultrahigh-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 160 (2018) 144-151.

- [71] A. Tara, G. Sharma, J.C. Bigelow. *An HPLC-UV and fluorescence method for the detection of three pharmaceuticals in water systems*. International Journal of Pharma Research and Health Sciences 6 (4) (2018) 2701-2705.
- [72] M.G. Volonte, M.A. Vinas, C.E. Gorriti, M.C. Escales, L.A. Sanchez, M.E. Ruiz. *Development and validation of an HPLC method for determination of carbamazepine in human plasma*. Latin American Journal of Pharmacy 28 (1) (2009) 80-85.
- [73] J.M. Pena Herrera, N. Montemurro, D.Barcelo, S.Perez. *Development and validation of an analytical method for determination of pharmaceuticals in fish muscle base don QuEChERS extraction and SWATH acquisition using LC-QTOF-MS/MS system*. Talanta 199 (2019) 370-379.
- [74] S. Ghafghazi, T.M. Zanjani, M. Vasough, M. Sabetkasaei. *Interference-free determination of carbamazepine in human serum using high performance liquid chromatography: a comprehensive research with three-way calibration methods*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 16 (1) (2017) 120-131.
- [75] Y. Xucan , X.Li, P. Guo, Z. Xiong, L. Zhao. *Simultaneous enantiomeric analysis of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs in water, river sediment, and sludge using chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Analytical Methods 10 (36) (2018) 4404-4413.
- [76] D. Wolecki, M.Caban, K. Pazdro, E. Mulkiewicz, P. Stepnowski, J. Kumirska. *Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and natural estrogens in the mussels Mytilus edulis trossulus*. Talanta 200 (2019) 316-323.
- [77] M. Hassan, U. Alshana. *Switchable-hydrophicity solvent liquid-liquid microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological fluids prior to HPLC-DAD determination*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 174 (2019) 509-517.
- [78] J.M. Kim, S.W. Myung. *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by HPLC-UV/Vis analysis coupled electromembrane extraction*. Bulletin of the Korean Chemical Society 39 (3) (2018) 335-340.
- [79] B. Yilmaz, S. Arslan. *Determination of atenolol in human urine by using HPLC*. Separation Science plus 1 (1) (2018) 4-10.

- [80] Y. Gorbani, H. Yilmaz, H. Basan. *Spectrofluorimetric determination of atenolol from human urine using high-affinity molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent*. Luminescence 32 (8) (2017) 1391-1397.
- [81] A. Yusuf, S.N Alvi, M.M Hammami. *Development and validation of RP-HPLC method for the determination of atenolol in human plasma*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5 (2) (2016) 169-179.
- [82] D.K. Sharma, S.Sood, P. Raj. *Spectrophotometric determination of amoxicillin, ampicillin, cefalexin and cefadroxil in pharmaceutical formulations, biological fluids and spiked water samples*. Analytical Chemistry Letters 9 (3) (2019) 345-361.
- [83] S. Perveen, R.I. Yousuf, S. Gauhar, W. Gul, A.F. Sheikn. *Simultaneous determination of amoxicillin and ranitidine in human plasma by RP-HPLC method*. International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences 7 (1) (2018) 38-48.
- [84] J. Balazsi, C. Pazis, F.D. Irimie, M.I. Tosa, L.C. Bencze, R. Totos. *Validated LC-MS/MS method for the concomitant detection of amoxicillin and clavulanic acid from human plasma*. Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia 62 (2-1) (2017) 167-178.
- [85] L.Liu, Q. Wan, X.Xu, S. Duan, C. Yang. *Combination of micelle collapse and field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in animal originated foodstuffs*. Food Chemistry 219 (2017) 7-12.
- [86] E.Sayar, S. Sakin, S. Ceuheroglu, H.A. Atilla. *Development and validation of an HPLC method for simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in human plasma*. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 35 (1-2) (2010) 41-46.

Capítulo 2

*Optimización y validación de un procedimiento cromatográfico con detección mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo (HPLC-MS/MS) para la determinación de principios activos farmacológicos en *Procambarus clarkii**

2.1 Reactivos y disoluciones patrón

Los siguientes patrones, de pureza entre el 97 y el 99% fueron adquiridos a Fluka Sigma-Aldrich, S.A. (Madrid, España): ciprofloxacina (CPR), danofloxacina (DNF), enrofloxacina (ENR), flumequina (FMQ), gatifloxacina (GTF), grepafloxacina (GPF), marbofloxacina (MRB), norfloxacina (NRF), clortetraciclina (CLT), oxitetraciclina (OXT), sulfametoxazol (SMX), sulfadiazina (SDZ), sulfametazina (SMT), sulfamerazina (SMR), trimetoprima (TMP), ibuprofeno (IBU), ácido salicílico (SAC), amoxicilina (AMX), carbamazepina (CBZ), atenolol (ATN), cloranfenicol (CLF), tianfenicol (TIF) y florfenicol (FLF). Metanol y acetonitrilo de calidad LC-MS y ácido fórmico de pureza 98-100% fueron suministrados por VWR International Eurolab (Barcelona, España). *Proteinasa-K* PCR recombinante, de concentración 20.2 mg mL⁻¹, fue suministrada por Roche Diagnosis (Barcelona, España). El agua ultrapura utilizada se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q Millipore (Billerica, MA, USA).

Se prepararon disoluciones stock de 400 mg L⁻¹ de cada analito a partir de los patrones, excepto para CPR, OXT y CLT, cuya concentración fue de 100 mg L⁻¹. Las disoluciones se prepararon disolviendo cada analito en metanol (DNF, ENR, FMQ, GTF, GPF, MRB, NRF, SMX, SMT, SDZ, SMR, TMP, AMX, CBZ, ATN, IBU y SAC), en agua ultrapura (CLT, OXT, CLF, TIF, y FLF), o en una mezcla 80:20 (v/v) metanol:agua (CPR). Todas las disoluciones permanecieron estables al menos durante 2 meses conservadas a 4°C excepto CPR, que solo permanece estable durante un mes a temperatura ambiente y CLT y OXT, que han de ser preparadas diariamente. Las disoluciones de trabajo se prepararon, a diario, por dilución en agua ultrapura, a partir de las correspondientes disoluciones stock.

2.2 Instrumentación

El análisis cromatográfico se llevó a cabo usando un cromatógrafo líquido Agilent 1290 Infinity acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo y trampa lineal de iones Applied Biosystems 3200 QTRAP LC/MS/MS (ABSciex, Foster City, USA) equipado con una fuente de ionización de electrospray (TurboSpray®). Para la separación de los analitos se empleó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4.6 mm (i.d.), tamaño de partícula de 3 μm) con una precolumna Zorbax ODS (12.5 mm × 4.6 mm (i.d.), tamaño de partícula 5 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051, USA).

2.3 Separación cromatográfica y detección MS/MS

2.3.1 Condiciones de detección empleando fuente de electrospray (ESI)

La optimización de las condiciones de ionización de los analitos en la fuente de ionización electrospray (ESI) se llevó a cabo mediante infusión directa con bomba de jeringa de disoluciones acuosas de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, tomando como óptima una señal superior a 10^5 cuentas por segundo. Para todos los analitos, a excepción de flumequina y el grupo de sulfonamidas, fue necesario añadir $10 \mu\text{L}$ ácido fórmico puro para incrementar suficientemente la señal. Se usó como modo de trabajo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) para la detección de cada ión “precursor” y los correspondientes fragmentos, monitorizados en Q1 y Q3. Se seleccionaron $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}-\text{H}]^-$ como iones precursores de ionización en modo positivo y negativo, respectivamente. Se usó nitrógeno a una presión de 4 psi como gas de colisión. Los gases de fuente (nitrógeno) GS1 y GS2 se optimizaron a 30 psi mientras que el gas de cortina (nitrógeno) se estableció a 20 psi. Los voltajes de ESI óptimos fueron 5,5 kV, para el modo positivo, y -4,5 kV para el negativo. La temperatura de la fuente se fijó a $500 \text{ }^\circ\text{C}$ para ambos modos de ionización. La optimización de parámetros del espectrómetro de masas (iones precursores, energía de colisión, potencial de salida en la celda de colisión y las transiciones de cuantificación y confirmación) se llevó a cabo la inyección de disoluciones de cada uno de los analitos disueltos en las fases móviles a un flujo de 10 mL min^{-1} . Los iones padre seleccionados en el primer cuadrupolo (Q₁) fueron fragmentados en la celda de colisión (Q₂), y tanto los iones padre como los fragmentos fueron medidos en el tercer cuadrupolo (Q₃). Para cada fármaco se monitorizaron dos iones, el ion de señal más intensa (Q₃_{quant}), que se usó para cuantificar, mientras que el otro se usó para confirmar (Q₃_{qualit}). En la tabla 2.1 se muestran las condiciones óptimas de detección para cada uno de los analitos, así como los iones seleccionados para cada compuesto.

Tabla 2.1. Condiciones óptimas de MS/MS para los principios activos farmacológicos estudiados.

	t_R (min)	Modo de ionización	Transiciones MRM (m/z)			DP	EP	CEP	CE	CXP
			Q_1	$Q_{3\text{cuanti}}$	$Q_{3\text{cuali}}$					
SAC	3.90	Positivo	139	121	98	46	4	20	17/11	4
AMX	6.01	Positivo	366	114	134	31	5	44	23/41	4
ATN	6.19	Positivo	267	145	190	41	4	16	21/33	4
SDZ	8.03	Positivo	251	92	156	36	5	14	37/19	4
TMP	8.89	Positivo	291	230	123	66	8	16	21/33	4
MRB	9.27	Positivo	363	72	320	51	4	32	45/23	4
SMR	9.40	Positivo	265	92	108	46	4	28	37/35	4
NRF	9.63	Positivo	320	276	233	46	9	14	21/25	6
OXT	9.87	Positivo	461	426	201	36	3.5	28	23/49	6
CPR	9.87	Positivo	332	245	314	46	3.5	24	29/23	4
DNF	10.34	Positivo	358	340	82	56	3.5	22	35/65	6
SMT	10.35	Positivo	279	185	92	46	5	18	21/41	4
GPF	10.51	Positivo	360	316	273	51	11	30	21/27	6
GTF	10.96	Positivo	376	332	261	51	6.5	20	23/35	6
ENR	12.24	Positivo	360	316	245	41	9.5	20	19/29	6
CLT	12.33	Positivo	479	462	444	51	5	32	23/25	6
SMX	13.84	Positivo	254	156	92	41	4,5	12	19/35	4
CBZ	15.43	Positivo	237	194	192	46	4	12	33/21	4
FMQ	15.81	Positivo	262	244	202	46	5	24	19/35	4
TIF	7.93	Negativo	354	185	79	-40	-9	-28	-30/-44	-2
FLF	13.21	Negativo	355	185	110	-35	-10.5	-22	-26/-44	-2
CLF	14.83	Negativo	321	152	121	-40	-7.5	-26	-26/-46	0
IBU	20.96	Negativo	204	161	159	-20	-6.5	-16	-6/-4	-2

DP: Potencial entre Q_0 y el orificio (*Declustering potential*); EP: Potencial de entrada (*Entrance potential*); CE: Energía de colisión (*Collision energy*); CEP: Potencial de entrada en la celda de colisión (*Collision cell entrance potential*); CXP: Potencial de salida en la celda de colisión (*Collision cell exit potential*)

2.3.2 Condiciones de separación cromatográfica

Tomando como base un procedimiento cromatográfico previo [1] se optimizó la separación de los 23 principios activos farmacológicos seleccionados en esta muestra. Se ensayaron diferentes gradientes a fin de conseguir la mejor resolución de los correspondientes picos cromatográficos. En la tabla 2.2 se muestran las condiciones óptimas de separación de los 19 analitos que se analizan con detección en modo positivo, y en la tabla 2.3 de los otros 4 analitos que se detectan en modo negativo. Con el fin de evitar la posible degradación de los analitos durante el proceso de muestra las muestras se mantuvieron a 10°C en el automuestreador. Se termostatóizó, así mismo, la columna de separación cromatográfica a 20°C. En las figuras 2.1 y 2.2 se muestran los cromatogramas (modo positivo y negativo respectivamente) obtenidos con la metodología cromatográfica optimizada para una disolución patrón (de 50 µg L⁻¹) de los compuestos analizados.

Tabla 2.2. Gradiente de elución para el modo de ionización positivo.

Tiempo (min)	%Fase móvil A (*)	% Fase móvil B (*)	Flujo (µL min ⁻¹)
0.0	100	0	400
12.0	70	30	400
17.0	0	100	400
21.0	0	100	400
21.1	100	0	400
26.0	100	0	400

* A: Disolución acuosa de ácido fórmico al 0.1 % (v/v); B: Acetonitrilo.

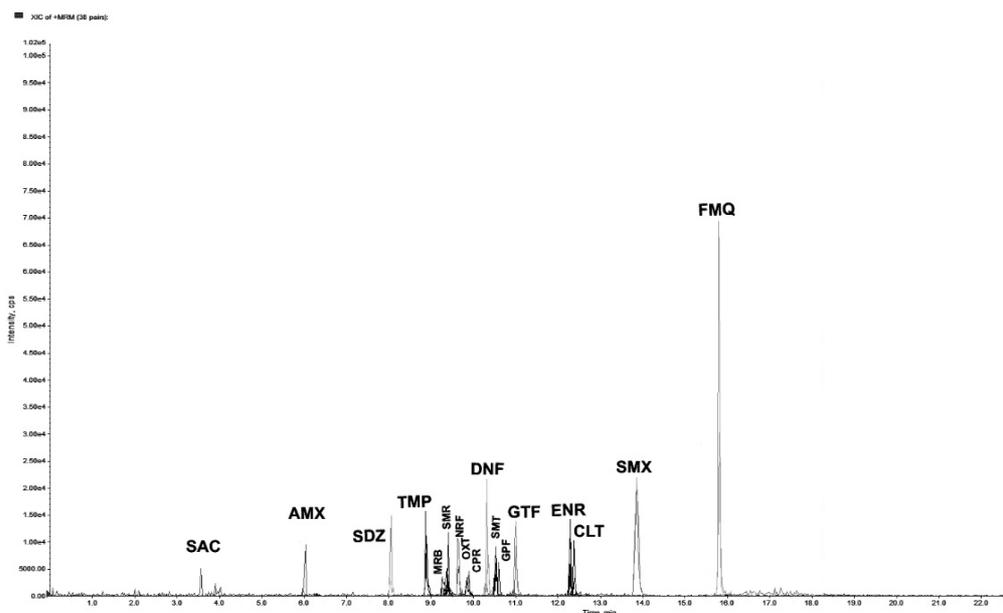


Figura 2.1. Cromatograma en modo positivo (concentración de 50 µg L⁻¹).

Tabla 2.3 Gradiente de elución para el modo de ionización negativo.

Tiempo (min)	% Fase móvil A(*)	% Fase móvil B (*)	Flujo ($\mu\text{L min}^{-1}$)
0.0	90	10	400
15.0	70	30	400
15.1	70	30	400
21.0	0	100	400
21.1	100	0	400
26.0	100	0	400

* A: Disolución acuosa de ácido fórmico al 0.1 % (v/v); B: Acetonitrilo.

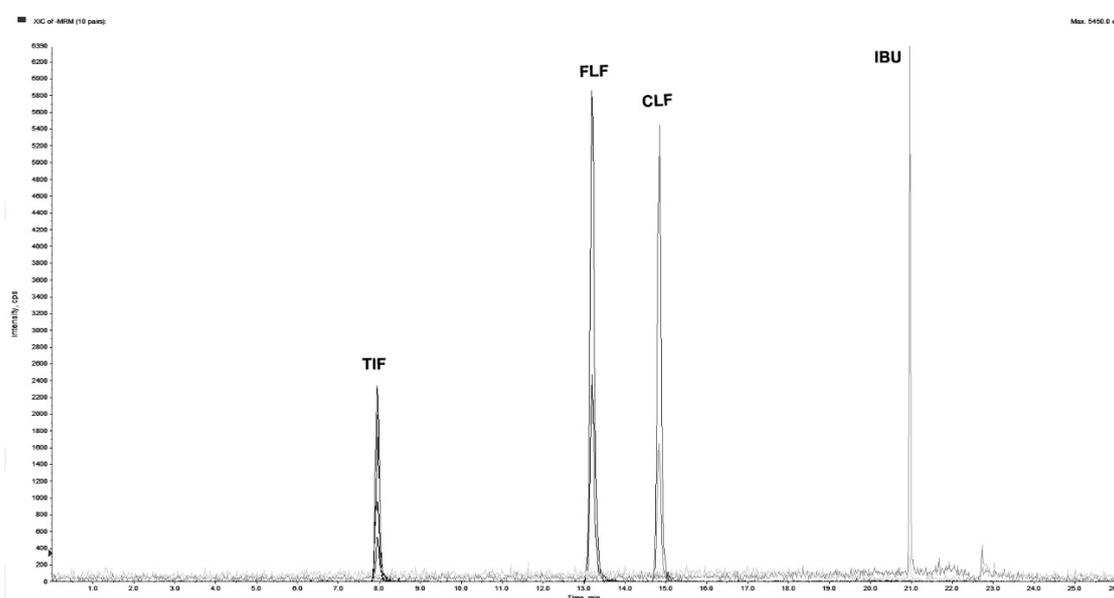


Figura 2.2. Cromatograma en modo negativo (concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$).

2.4 Optimización del procedimiento de extracción de músculo abdominal y glándulas digestivas de *Procambarus clarkii*

Para optimizar el procedimiento de extracción se tomó como referencia un método basado en una digestión enzimática asistida por microondas a baja potencia previamente desarrollado en nuestro Grupo de Investigación para la determinación de fármacos en músculo de peces [2]. Se llevaron a cabo numerosos ensayos para adaptar el procedimiento de extracción al tipo de muestra objeto de estudio a fin de optimizar la recuperación, selectividad y minimizar el posible efecto matriz en la posterior

determinación mediante espectrometría de masas. Para ello, se estudiaron y optimizaron los diferentes parámetros implicados en el proceso de extracción: disolvente extractante, tiempo y potencia de extracción e influencia de la presencia de enzima *Proteinasa-K*.

Para la optimización de las variables de extracción se emplearon especímenes suministrados por la empresa SEAFOOD SEVILLA S.L. (Isla Mayor, Sevilla). Los cangrejos se diseccionaron, separando el músculo abdominal y la glándula digestiva (de color amarillo, y que ocupa la mayor parte del celoma en la región cefalotorácica, figuras 2.3 y 2.4).

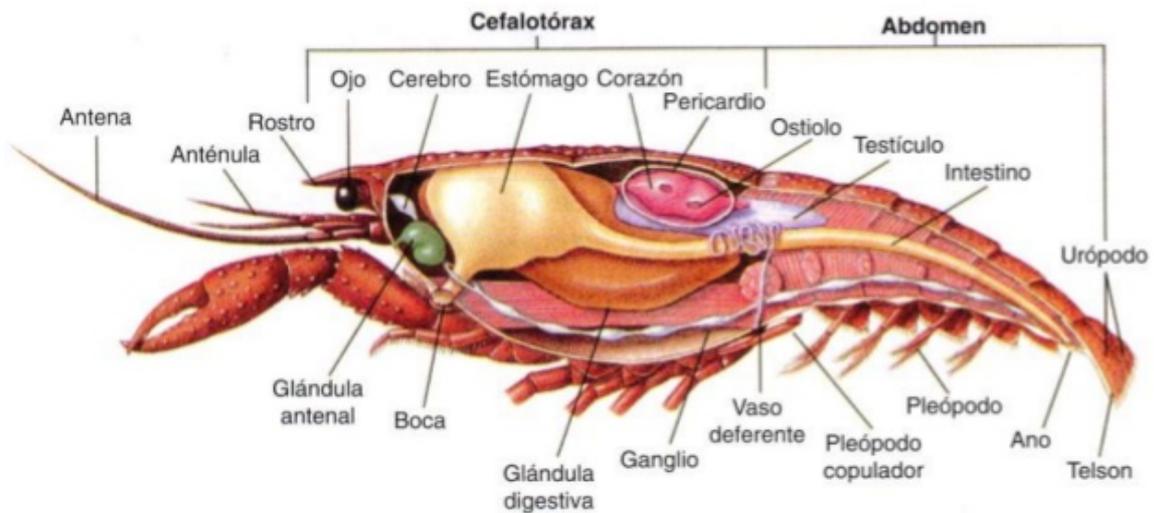


Figura 2.3. Anatomía del *Procambarus clarkii*.



Figura 2.4. Disección de los especímenes de *P.clarkii*; a la izquierda se muestra el músculo abdominal y a la derecha glándula digestiva.

Se pesaron el músculo abdominal y las glándulas digestivas de cada espécimen y, tras su congelación a -80°C se liofilizaron durante 48 y 96 horas, respectivamente. Las muestras liofilizadas y trituradas en mortero de ágata fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Para los diferentes ensayos de optimización se usaron 0.5 g de un “pool” de muestra liofilizada (músculo abdominal o glándula digestiva) ya que en estudios previos [1] se había constatado la existencia de un importante efecto matriz para cantidades superiores.

2.4.1 Optimización de la potencia de microondas

Se llevaron a cabo una serie de ensayos previos a fin de conocer la estabilidad de los analitos frente a la energía de microondas. Se seleccionó una potencia de microondas de 50 W como punto de partida teniendo en cuenta la experiencia de estudios previos que incluían a varios de los analitos seleccionados [1]. Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de $250\ \mu\text{g L}^{-1}$ conteniendo todos los analitos, se introdujeron en los reactores del microondas y se aplicó una potencia constante de 50 W a diferentes tiempos (5, 7 y 10 minutos). Una vez fríos los reactores, las distintas disoluciones se inyectaron en el cromatógrafo. Se constató que a esta potencia algunos de los analitos se degradan a tiempos superiores a los 5 minutos, por lo que se fijó 50 W durante 5 minutos como valor óptimo para la optimización del resto de parámetros.

2.4.2 Optimización del extractante

Para la elección del disolvente extractante óptimo se ensayaron metanol, acetonitrilo y agua, ya que un estudio previo [1] mostró que en muestras de tejido de pez estos disolventes son los que producen mejores rendimientos de extracción y menores efectos matriz. Para ello, porciones de 0.5 g de muestra liofilizada y triturada (músculo abdominal o glándula digestiva) fueron fortificadas con los analitos añadiendo, gota a gota y con continua agitación, 5 mL de disolución acuosa conteniendo $0.25\ \mu\text{g}$ de cada uno de los 23 principios activos farmacológicos seleccionados; a continuación, las muestras se dejaron en reposo en el frigorífico a 4°C durante 12 horas y, posteriormente, fueron congeladas a -80°C , y liofilizadas de nuevo.

Las muestras fortificadas fueron extraídas en el microondas a 50 W durante 5 minutos con 5 mL de cada extractante y $5\ \mu\text{L}$ de ácido fórmico puro. Una vez frías, se

centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos (20 minutos en el caso de glándulas digestivas) y la fase líquida separada se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco se reconstituyó en 1 mL de disolución acuosa de ácido fórmico al 0,1% (v/v), se microfiltró a través de un filtro de PTFE (0,2 μm) y se inyectó (10 μL) en el sistema cromatográfico. El extracto reconstituido procedente de las glándulas digestivas fue nuevamente centrifugado antes de su microfiltración.

Los resultados obtenidos mostraron recuperaciones por debajo del 50% para todos los analitos y los diferentes extractantes, por lo que se ensayó con mezclas 1:1 (v/v) de los mismos. Se obtuvieron los mejores resultados en el caso de la mezcla 1:1 agua:acetonitrilo con rendimientos que oscilaron en el rango 60-90% para, prácticamente, todos los analitos estudiados excepto para las tetraciclinas, cuyos rendimientos de extracción se aproximaron al 50%. La mezcla 1:1 acetonitrilo:metanol condujo a rendimientos de extracción del orden del 70% en el caso de las fluoroquinolonas no obteniéndose resultados satisfactorios para el resto de los analitos. Asimismo, la mezcla 1:1 metanol:agua da lugar a muy bajos rendimientos de extracción, que en el caso de las sulfonamidas, se sitúan alrededor del 40%. Por todo lo expuesto, se tomó como disolvente extractante óptimo una mezcla 1:1 agua:acetonitrilo.

En un estudio previo [2] se demostró que la presencia de la enzima *Proteinasa-K* a pH ligeramente ácido, en combinación con la energía de microondas, mejora considerablemente los rendimientos de extracción de algunos principios activos farmacológicos. Por ello, 0.5 g de músculo abdominal o glándula digestiva de *P.clarkii* (fortificados con 0.25 μg de cada uno de los 23 analitos) se introdujeron en los reactores de microondas y se añadieron 5 mL de una mezcla acetonitrilo:agua (1:1 v/v), 50 μL de *Proteinasa-K* y 5 μL de ácido fórmico puro. Las muestras fueron tratadas a 50 W de potencia durante 5 minutos. Tras enfriar los reactores, sus contenidos se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos (20 minutos en el caso de las glándulas digestivas). El extracto líquido sobrenadante se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y el extracto seco correspondiente se reconstituyó con 1 mL de disolución acuosa de ácido fórmico al 0.1 % (v/v). La disolución resultante fue microfiltrada a través de un filtro de PTFE (0.2 μm) e inyectada (10 μL) en el cromatógrafo. El extracto reconstituido procedente de las glándulas digestivas fue nuevamente centrifugado antes de su microfiltración.

En la tabla 2.4 se muestran los resultados obtenidos para las extracciones de muestras fortificadas, con y sin *Proteinasa-K*. Las recuperaciones se calcularon tomando dos réplicas por cada una de las muestras y las desviaciones se expresan en función de la desviación estándar absoluta.

Tabla 2.4. Recuperaciones de los analitos tras la extracción con y sin *Proteinasa-K* de muestras fortificadas con 0.5 µg g⁻¹.

	Músculo abdominal [<i>Proteinasa-K</i>]	Músculo abdominal	Glándula digestiva dopada [<i>Proteinasa-K</i>]	Glándula digestiva
SAC	114±9	97±2	107±3	93±2
AMX	72± 0.8	63 ± 3	75 ± 0.2	60 ± 2
ATN	80 ±0.4	70 ±3	79 ± 0.3	71 ± 3
SDZ	96 ± 3	84 ± 5	98 ± 1	81 ± 6
TMP	71 ± 1	60 ± 2	75 ± 3	64 ± 3
MRB	81± 2	70 ± 8	88 ± 1	74 ± 6
SMR	83 ± 4	72 ± 7	92 ± 2	86 ± 3
NRF	84 ± 3	70 ± 6	81 ± 4	73 ± 2
OXT	77 ± 1	64 ± 8	79 ± 0.5	68 ± 2
CPR	89 ± 1	76 ± 3	91 ± 2	84 ± 5
DNF	71 ± 2	62± 8	81 ± 1	72 ± 6
SMT	91 ± 2	81 ± 2	88 ± 3	84 ± 1
GPF	76 ± 0.8	64 ± 8	86 ± 0.2	74 ± 6
GTF	83 ± 4	72 ± 7	87 ± 6	76 ± 2
ENR	79 ± 1	61 ± 4	80 ± 0.5	72 ± 3
CLT	84 ± 3	83 ± 4	82 ± 1	80 ± 2
SMX	97 ± 0.5	85 ± 5	93 ± 0.9	87 ± 2
CBZ	87 ±0.9	74 ± 2	90 ± 1	80 ± 3
FMQ	77 ± 4	60 ± 5	79 ± 2	63 ± 3
TIF	76 ± 2	66 ± 5	78 ± 1	69 ± 6
FLF	78 ± 2	65 ± 5	80 ± 3	69 ± 2
CLF	81 ± 0.6	68 ± 4	83 ± 0.8	79 ± 0.5
IBU	84 ± 12	67 ± 6	86 ± 10	69 ± 9

Como puede observarse, la presencia de *Proteinasa-K*, en combinación con una baja potencia de microondas, mejora los rendimientos de extracción para los dos tipos de muestras analizadas. En el caso del músculo abdominal las recuperaciones oscilan entre 71-100% en presencia de *Proteinasa-K* y entre 60-97% sin la presencia de enzima. Para las glándulas digestivas, los rendimientos oscilan entre 75-100% (con *Proteinasa-K*) y entre 60-93% (sin *Proteinasa-K*).

En base a las optimizaciones realizadas, el procedimiento de extracción de los principios activos farmacológicos queda tal y como se muestra en la figura 2.5.

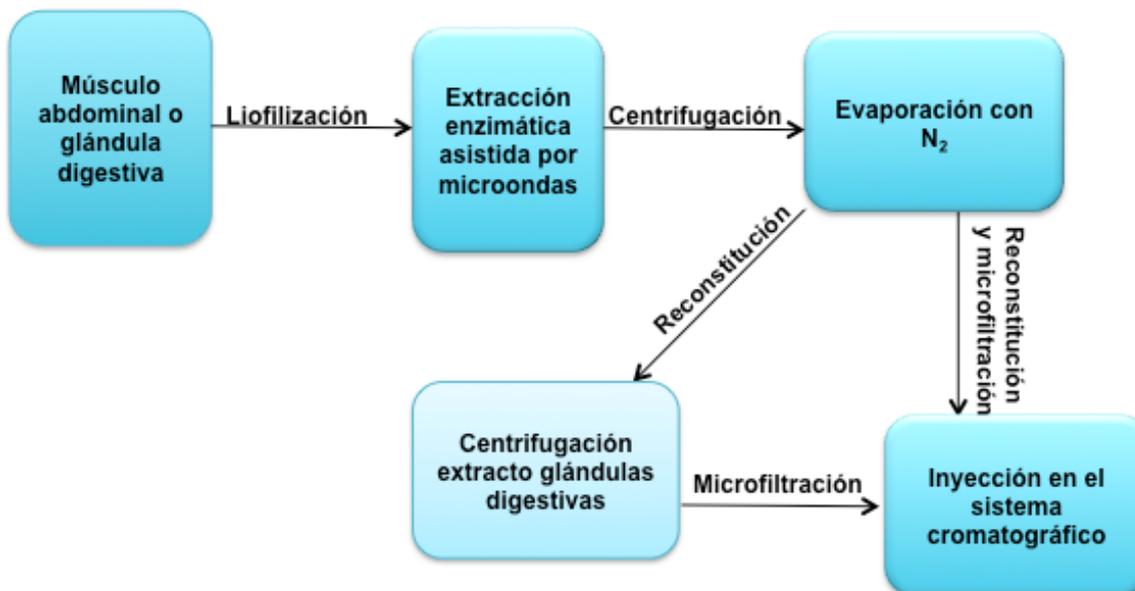


Figura 2.5. Procedimiento de extracción propuesto para las muestras de *P. clarkii*.

2.5 Validación del Procedimiento Analítico Propuesto

La ISO define la validación aplicada a los métodos analíticos como el proceso por el cual queda establecido, mediante estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica requerida.

Hoy en día contamos con una extensa variedad de documentación acerca de la validación de los métodos analíticos y son numerosas las organizaciones que fomentan su difusión e importancia: la **AOAC** (*Association of Official American Chemists*), **ICH** (*International Conference on Harmonisation*), **EURACHEM** (*European Analytical Chemistry*), **USP** (*United States Pharmacopodia*), **CDER** (*Center for Drug Evaluation and Research*), **EMA** (*European Medicines Agency*), etc.

La validación de la metodología empleada en este trabajo se realizó siguiendo las recomendaciones de la Comisión Europea de 12 de Agosto de 2002, por la que se aplica la *Directiva 96/23/CE* que regula la validación de métodos analíticos para análisis de residuos contaminantes en matrices biológicas y sustancias alimentarias.

La metodología propuesta fue validada teniendo en cuenta los siguientes parámetros de calidad: linealidad, sensibilidad (límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)), límites de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$), efecto matriz (efecto de supresión o realce de ionización y el efecto matriz

generalizado), precisión y recuperación. Para llevar a cabo el proceso de validación se emplearon “pools” de músculo abdominal o glándula digestiva de *P.clarkii*.

La **linealidad** se estimó mediante una calibración en matriz (*matrix-matched calibration*). Para ello, los extractos “blanco” de músculo abdominal o glándula digestiva se fortificaron, como se ha descrito previamente, a diez niveles de concentración, en el rango entre 0.25-250 ng mL⁻¹, lo que se corresponde con concentraciones de 0.5 a 500 ng g⁻¹ en las muestras liofilizadas.

Los **límites de detección y de cuantificación** se calcularon como la mínima concentración del analito que permite observar una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente, en las muestras fortificadas (n=3).

Para evaluar la **precisión del método**, se realizaron estudios de repetibilidad (en un único día) y de precisión intermedia (durante un mes). La precisión del método se evaluó mediante la comparación de los valores de concentración real y los obtenidos a partir de la recta de regresión para los estándares de validación y calculando la desviación estándar relativa (RSD).

En la tabla 2.5 aparecen los valores obtenidos para los parámetros relacionados con la linealidad, precisión y sensibilidad. Se pueden observar buenos rangos lineales, que oscilan entre 1 y 500 ng g⁻¹ (ENR hasta 250 ng g⁻¹). Las desviaciones estándar se determinaron para seis réplicas (repetibilidad) a tres niveles de concentración (10, 100 y 500 ng g⁻¹) (ENR hasta 250 ng g⁻¹) y en los días 1, 3 y 7, obteniéndose, en general, valores inferiores al 5% y valores máximos cercanos al 10%. Además, se obtuvieron adecuados límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para los principios activos farmacológicos estudiados.

Tabla 2.5. Parámetros de validación obtenidos para principios activos farmacológicos.

	Coef. de regresión (r ²)	Linealidad (%)	Intervalo lineal (ng g ⁻¹)	Repetibilidad*			Precisión intermedia*			LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
				10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹	10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹		
SAC	0.9998	99.56	12.6-500	0.9	0.2	0.8	5.4	8.8	2.9	3.8	12.6
AMX	0.9997	99.35	6.2-500	0.5	2.0	0.8	6.1	6.1	4.2	1.9	6.2
ATN	0.9978	98.28	3.0-500	0.3	1.6	0.7	4.9	6.6	5.1	1.5	3.0
SDZ	0.9968	99.92	10.8-500	0.6	3.4	0.2	4.4	10.5	8.5	3.2	10.8
TMP	0.9934	98.69	4.7-500	1.9	3.7	1.9	3.2	10.4	4.4	1.4	4.7
MRB	0.9996	98.17	2.8-500	3.2	1.1	2.1	8.9	7.9	4.5	0.6	2.8
OXT	0.9963	92.13	2.8-500	5.7	7.1	7.8	10.5	15.3	5.4	0.8	2.8
NRF	0.9984	95.84	10.0-500	9.9	6.7	2.4	6.5	17.9	11.1	6.1	10.0
SMR	0.9978	98.71	1.3-500	0.6	6.1	1.3	5.1	4.3	5.4	0.4	1.3
CPR	0.9945	95.06	3.5-500	0.6	3.8	5.1	8.4	10.0	12.9	1.0	3.5
DNF	0.9979	99.70	1.0-500	7.8	8.4	0.5	9.9	5.7	3.5	0.3	1.0
GPF	0.9942	91.64	2.2-500	5.4	2.1	5.6	9.9	12.3	5.4	0.7	2.2
SMT	0.9983	99.35	11.2-500	3.2	7.4	2.1	6.1	8.9	2.1	3.5	11.2
CLT	0.9971	99.24	1.7-500	0.4	0.6	0.1	8.1	9.9	5.9	0.5	1.7
GTF	0.9997	97.18	1.0-500	1.5	0.9	3.0	3.1	9.7	9.4	0.3	1.0
SMX	0.9982	98.42	1.0-500	0.8	4.8	1.2	2.6	7.1	2.9	0.3	1.0
ENR	0.9998	99.84	2.8-250	2.3	5.8	0.5**	8.6	2.3	4.0**	0.8	2.8
CBZ	0.9946	98.11	1.3-500	0.6	1.5	1.3	4.9	6.4	3.8	0.9	1.3
FMQ	0.9997	99.14	3.8-500	0.5	1.1	1.1	5.7	7.8	4.2	1.1	3.8
TIF	0.9978	99.56	3.9-500	6.4	2.6	0.7	1.5	2.2	2.2	1.2	3.9
FLF	0.9954	98.60	1.0-500	10.2	3.5	1.5	3.1	2.5	7.3	0.3	1.0
CLF	0.9965	98.07	1.0-500	10.2	0.5	2.1	9.1	6.8	12.7	0.3	1.0
IBU	0.9997	96.44	5.0-500	4.4	0.7	4.6	9.9	8.0	9.5	1.5	4.7

El efecto matriz se estudió evaluando la influencia de la naturaleza y cantidad de muestra sobre el proceso de extracción y sobre el proceso de ionización en el detector de masas. Para ello se usó el procedimiento propuesto por Hoff et al. [3], que consiste en una modificación del método original propuesto por Matuszweski et al. [4]. Se obtuvo, un resultado de porcentaje de recuperación que contiene, tanto los efectos de realce o supresión de ionización, producidos en la matriz sobre el proceso de ionización, como el efecto de la matriz sobre la recuperación en el proceso de extracción. El método de Hoff usa el área absoluta de las señales analíticas (picos) correspondientes a tres tipos de muestras: disoluciones estándar de patrones (S), muestras fortificadas antes del procedimiento de extracción (TS) y muestras fortificadas tras el procedimiento de extracción (R). Con estos datos de áreas de pico, se calculan tres parámetros: efecto matriz (ME), recuperaciones del método de extracción (RE_R) y recuperaciones totales del método (RE), tal y como se muestra a continuación:

$$ME(\%) = \left(\frac{TS}{S} \times 100 \right) - 100$$

$$RE_R = \frac{R}{TS} \times 100$$

$$RE(\%) = \frac{R}{S} \times 100 = \frac{(ME + 100) \times RE_R}{100}$$

Como se puede observar en la tabla 2.6 (desviaciones estándar), el efecto sobre la ionización debido a la matriz es, para la mayoría de los analitos, negativo, lo que implica cierta supresión en dicha ionización, salvo para SAC, DNF y TIF, que muestran un realce de ionización entre el 2 y el 5%. Para el resto de los analitos el efecto matriz varía desde valores bajos (<20%) a medios (20-40%), sin embargo, en el caso de las fluoroquinolonas, GTF y FMQ, se obtienen valores altos de supresión de ionización (>40%) (-43.8 para el caso de GTF y -51.4 para FMQ). De acuerdo con los datos obtenidos, se hace imprescindible realizar una calibración en matriz (*matrix matched calibration*) para llevar a cabo los análisis en muestras de músculo abdominal y glándula digestiva de *P.clarkii*. Para el método de extracción propuesto se obtuvieron buenas recuperaciones (RE_R) (70-106%).

Tabla 2.6. Evaluación del efecto matriz para las muestras de músculo abdominal y glándula digestiva a 250 µg L⁻¹.

	Músculo abdominal			Glándula digestiva		
	ME	RE _R	RE	ME	RE _R	RE
SAC	2.0	106.2	108.4	2.6	101.3	103.9
AMX	-6.8	71.5	66.7	-7.5	70.8	65.5
ATN	-4.9	81.3	77.3	-5.1	82.6	78.4
SDZ	-15.6	95.6	80.7	-14.9	94.3	80.2
TMP	-39.5	71.1	43.0	-38.1	72.4	44.8
MRB	-18.8	81.4	66.1	-17.6	80.8	66.6
OXT	-38.5	76.8	47.2	-37.2	77.4	48.6
NRF	-15.3	84.4	71.5	-14.9	85.3	72.6
SMR	-10.8	93.6	83.5	-11.5	92.4	81.8
CPR	-22.8	89.4	69.0	-21.7	88.1	68.9
DNF	4.0	70.7	73.6	3.6	71.3	73.9
GPF	-36.1	76.3	48.7	-35.8	75.2	48.3
GTF	-13.2	91.2	79.2	-12.8	90.7	79.0
ENR	-13.4	78.8	68.2	-12.4	77.9	68.2
CLT	-19.8	84.5	67.8	-20.1	85.2	68.1
SMX	-9.6	96.6	87.4	-9.2	95.7	86.9
CBZ	-3.7	85.7	82.5	-4.0	84.9	81.5
FMQ	-51.4	98.6	47.9	-52.5	97.4	46.3
TIF	5.1	75.8	79.7	4.6	74.9	78.3
FLF	-25.7	77.9	57.9	-26.3	78.4	57.7
CLF	-19.2	80.5	65.1	-19.9	81.2	65.0
IBU	-37.0	84.2	53.1	-36.3	83.7	53.3

%RSD: 8%

La **veracidad** se evaluó mediante ensayos de recuperación de muestras fortificadas que se sometieron al procedimiento de extracción y se midieron usando la calibración con patrones en la misma matriz que la de las muestras. El ensayo se realizó a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), por triplicado, a una concentración final de 10, 100 y 500 ng g⁻¹ (250 ng g⁻¹ para ENR), que, posteriormente, se sometieron al procedimiento de extracción.

Como se puede observar en la tabla 2.7, se obtuvieron recuperaciones mayores al 70% para todos los analitos sin diferencias significativas para los tres niveles a los que se fortificaron las muestras, confirmándose así la idoneidad del procedimiento propuesto.

Tabla 2.7. Ensayos de recuperación (%) de muestras de músculo abdominal y glándula digestiva de *P.clarkii* fortificado (por triplicado) sometidas al procedimiento propuesto. (Valores medios \pm desviación estándar relativa (n=3)).

	Músculo abdominal			Glándula digestiva		
	Concentración de fortificado			Concentración de fortificado		
	10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹	10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹
SAC	98 \pm 3	106 \pm 3	114 \pm 9	96 \pm 2	102 \pm 2	110 \pm 4
AMX	68 \pm 1	71 \pm 2	72 \pm 1	69 \pm 2	70 \pm 3	73 \pm 2
ATN	79 \pm 2	82 \pm 1	86 \pm 3	78 \pm 3	80 \pm 1	85 \pm 2
SDZ	87 \pm 2	91 \pm 1	96 \pm 3	86 \pm 1	89 \pm 2	95 \pm 2
TMP	67 \pm 1	69 \pm 2	71 \pm 1	68 \pm 3	70 \pm 3	72 \pm 2
MRB	75 \pm 1	78 \pm 1	81 \pm 2	77 \pm 2	79 \pm 2	82 \pm 1
OXT	71 \pm 7	73 \pm 3	77 \pm 1	70 \pm 4	72 \pm 2	76 \pm 1
NRF	76 \pm 2	81 \pm 2	84 \pm 3	75 \pm 3	79 \pm 2	83 \pm 1
SMR	89 \pm 3	92 \pm 2	94 \pm 3	88 \pm 2	90 \pm 3	93 \pm 2
CPR	81 \pm 2	84 \pm 3	89 \pm 1	82 \pm 1	84 \pm 2	88 \pm 3
DNF	64 \pm 2	69 \pm 3	71 \pm 2	63 \pm 3	67 \pm 3	70 \pm 1
GPF	69 \pm 3	73 \pm 2	76 \pm 1	70 \pm 1	72 \pm 2	75 \pm 2
SMT	86 \pm 3	90 \pm 1	91 \pm 2	84 \pm 2	88 \pm 3	90 \pm 2
GTF	78 \pm 3	82 \pm 1	83 \pm 4	79 \pm 1	81 \pm 3	84 \pm 2
ENR*	74 \pm 2	76 \pm 3	79 \pm 1	75 \pm 2	77 \pm 2	78 \pm 2
CLT	78 \pm 2	80 \pm 3	84 \pm 3	79 \pm 3	82 \pm 1	87 \pm 3
SMX	91 \pm 2	95 \pm 1	97 \pm 1	90 \pm 2	93 \pm 2	96 \pm 2
CBZ	83 \pm 2	87 \pm 3	90 \pm 2	82 \pm 1	84 \pm 3	89 \pm 1
FMQ	69 \pm 3	73 \pm 2	77 \pm 4	71 \pm 4	75 \pm 2	79 \pm 2
TIF	71 \pm 2	74 \pm 2	76 \pm 2	73 \pm 3	76 \pm 3	78 \pm 1
FLF	72 \pm 2	75 \pm 4	78 \pm 2	69 \pm 1	73 \pm 2	76 \pm 3
CLF	77 \pm 1	80 \pm 1	81 \pm 1	74 \pm 3	79 \pm 1	82 \pm 1
IBU	79 \pm 2	81 \pm 2	84 \pm 12	74 \pm 3	78 \pm 2	82 \pm 6

* Ensayo realizado a 10, 100 y 250 ng g⁻¹

En las figuras 2.6 y 2.7 se muestran los cromatogramas extraídos para los iones en modo positivo y en modo negativo, de muestras fortificadas (100 ng g⁻¹) conteniendo todos los analitos.

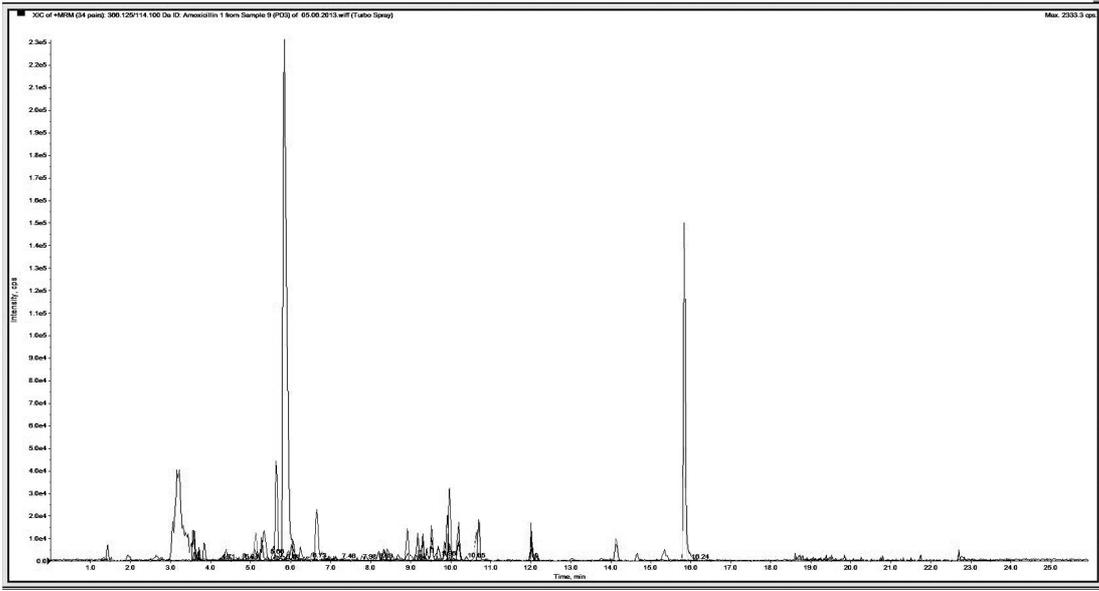


Figura 2.6. Cromatogramas extraídos para los iones en modo positivo de muestras fortificadas (100 ng g^{-1}).

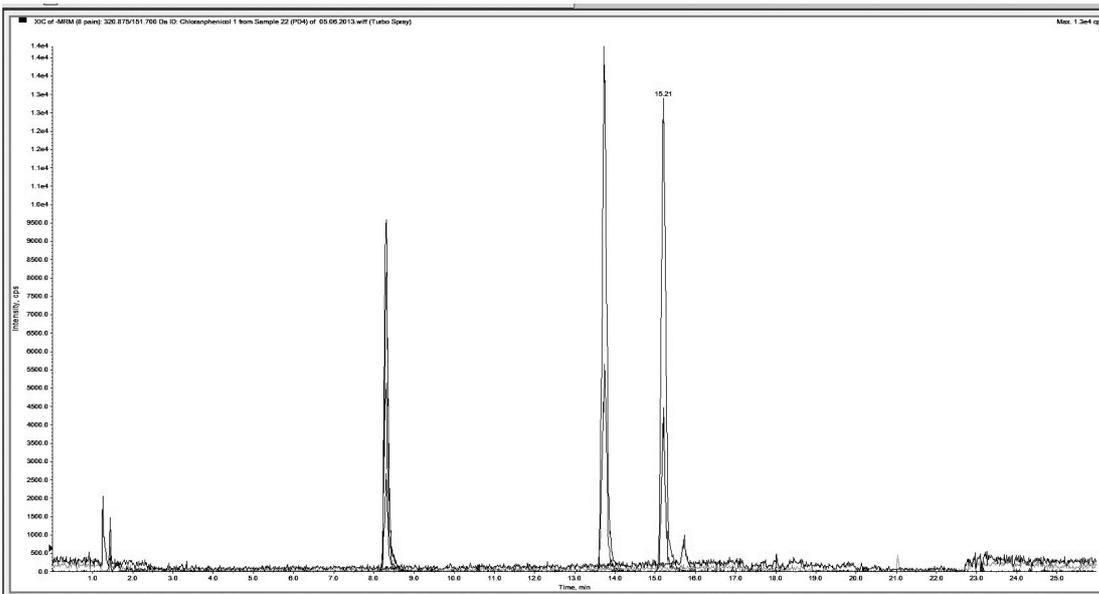


Figura 2.7. Cromatogramas extraídos para los iones en modo negativo de muestras fortificadas (100 ng g^{-1}).

La guía de validación para métodos que implican el análisis y determinación de residuos y contaminantes en matrices biológicas y alimentos, entre los que se incluyen los principios activos farmacológicos [4], establece que en el proceso de validación se debe establecer el **límite de decisión (CC α)**, que viene definido por la Unión Europea (Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002, *Directiva 2002/657/EC*) [5] como el “límite a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme (no es válida)” y la **capacidad de detección (CC β)** que se define como “el mínimo contenido de la sustancia que puede ser detectado, identificado y/o cuantificado en una muestra con una probabilidad de error β ”. En nuestro caso, los valores de CC α se calcularon a partir de diez muestras del tejido “blanco” (tejido sin fortificar) haciendo uso de la expresión:

$$CC_{\alpha} = \frac{2.33\sigma_N}{a}$$

donde “ σ_N ” es la desviación estándar del ruido al tiempo de retención de cada uno de los analitos y “ a ” es el valor medio de las pendientes de las curvas de calibración de matriz (*matrix matched calibration*) [5].

Los valores de CC β se calculan sumando 1.64 a los valores de la desviación estándar de CC α de cada señal en diez muestras fortificadas a niveles de CC α ($\beta = 5\%$).

En la tabla 2.8 se muestran los resultados obtenidos en el cálculo de CC α y CC β para los veintitrés analitos seleccionados. Los valores obtenidos para los límites de decisión y de detección fueron similares, e incluso inferiores, a los obtenidos en estudios previos para analitos similares en matrices de peces [1]. Por lo tanto, el procedimiento propuesto se puede considerar adecuado para la monitorización de los analitos seleccionados en muestras de tejido de *Procambarus clarkii*.

Tabla 2.8. Límite de decisión (CC α) y capacidad de detección (CC β) calculados. (Todos los resultados expresados en ng g⁻¹)

	Músculo abdominal		Glándula digestiva	
	CCα	CCβ	CCα	CCβ
SAC	3.08	6.82	4.15	7.15
AMX	0.82	2.54	0.93	2.71
ATN	0.72	2.46	0.86	2.68
SDZ	1.12	3.02	1.34	3.87
TMP	0.18	0.64	0.21	0.79
MRB	0.32	0.98	0.49	1.03
OXT	1.22	2.24	1.54	2.83
NRF	0.86	4.62	1.03	5.21
SMR	0.54	1.06	0.73	1.35
CPR	1.34	2.16	1.63	2.59
DNF	2.76	4.02	2.89	4.55
GPF	0.62	1.51	0.89	1.79
SMT	0.48	1.64	0.64	1.88
GTF	1.12	2.02	1.20	2.37
ENR	1.02	2.44	1.31	2.67
CLT	5.74	2.88	6.02	3.31
SMX	1.24	3.60	1.52	4.01
CBZ	0.51	1.83	0.67	2.19
FMQ	0.08	0.31	0.15	0.48
TIF	0.34	1.68	0.63	1.91
FLF	0.32	0.66	0.57	0.83
CLF	0.44	1.62	0.75	1.98
IBU	2.66	4.11	3.13	4.49

Son muy escasos, casi inexistentes, los trabajos que desarrollan métodos para el análisis de principios activos farmacológicos en muestras de especies salvajes. Cabe destacar los estudios llevados a cabo por *Alvarez-Muñoz y cols.* [6]. Los autores analizaron 23 principios activos y algunos de sus principales metabolitos en muestras de bivalvos procedentes del río Ebro, empleando un procedimiento de extracción en dos etapas con líquidos presurizados, purificación mediante SPE y posterior determinación con UHPLC con detección de espectrometría de masas triple cuadrupolo. Se necesitaron 0.5 g de muestra seca y el método propuesto proporcionó recuperaciones entre el 30-50% para SMX, único compuesto coincidente con los analizados en esta Tesis, con efectos matriz en torno al 40%. Los autores obtuvieron un LOD de 0.03 ng g⁻¹ y un

LOQ 0.09 ng g^{-1} , que se encuentran dentro del mismo orden de magnitud de los obtenidos para algunos compuestos analizados en la presente Tesis.

Sin embargo, la mayoría de trabajos referenciados en bibliografía se aplican a muestras de peces, ya sean adquiridas en mercados, piscifactorías o capturadas ex profeso para el análisis. Así pues, *Hertzog y cols.* [7] proponen un método rápido de extracción para el análisis cuantitativo de 15 principios activos (entre los que se encuentran ATN, CBZ y DCL) en muestras de pescado procedentes de mercado, empleando UHPLC con detección de espectrometría de masas de triple cuadrupolo, obteniendo recuperaciones entre el 58 y el 128% con LOQs que van desde 5 a 1000 ng g^{-1} , lo que supone menor sensibilidad respecto al procedimiento desarrollado en este capítulo.

En trabajos mas recientes, *Zhang y cols.* [8] proponen la extracción de 54 principios activos farmacológicos pertenecientes a cuatro familias de medicamentos (AINES, sedantes, sulfonamidas y quinolonas) en músculo de peces mediante una extracción enzimática asistida por energía de microondas empleando una disolución acuosa de cloruro de sodio como extractante en la que se introduce una fibra hueca en cuyo interior se deposita una fibra para microextracción en fase sólida empleando como disolventes internos octanol y tolueno. La detección se llevó a cabo mediante LC-HRMS empleando como fases móviles agua y metanol y el tiempo de análisis fue de 20 minutos. Se obtienen LOD y LOQ que oscilan en un rango de $0.01\text{-}0.50 \text{ ng g}^{-1}$ y de $0.05\text{-}2.00 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente y unas recuperaciones en un rango de 56-120%. El tamaño de muestra que se ha tomado es de 10 g, de ahí las mejoras en la sensibilidad y la necesidad de un importante clean-up.

En el trabajo de *Huang y cols.* [9] se describe la determinación de seis principios activos de uso veterinario en músculo de peces (2g) mediante una extracción asistida por microondas seguida de una purificación en fase sólida y finalmente sometidas a una extracción líquido-líquido dispersiva. La detección se llevó a cabo mediante UPLC-MS/MS en un tiempo de cuatro minutos empleando como fases móviles agua al 0.05 % en ácido fórmico y acetonitrilo. Con estas condiciones se obtienen rendimientos de extracción mayores al 87% con unos rangos en los LOD y LOQ de $0.45\text{-}10.01 \text{ ng g}^{-1}$ y $1.8\text{-}34.9 \text{ ng g}^{-1}$ respectivamente, los cuales resultan ligeramente superiores a los obtenidos en este capítulo, si bien en un menor tiempo de análisis.

En la mayoría de los dos trabajos referenciados anteriormente, así como en la numerosa bibliografía que se encuentra sobre el tema, es necesaria una etapa posterior a la extracción a fin de eliminar las posibles interferencias de la matriz, lo cual incrementa

el tiempo de análisis de las muestras, sin embargo, aunque en algunos casos esta etapa de purificación permite tener una mayor sensibilidad a la hora de determinar los principios activos farmacológicos, en la mayoría no se alcanzan límites de cuantificación mucho mas bajos que los optimizados en este Capítulo.

Bibliografía

- [1] R. Fernández Torres, M.A. Bello López, M. Olías Consentino, M. Callejón Mochón, M. Ramos Payán. *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 54 (5) (2011) 1146-1156.
- [2] R. Fernández Torres, M.A. Bello López, M. Olías Consentino, M. Callejón Mochón, J.L. Pérez Bernal. *Application of enzymatic probe sonication extraction for the determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples*. Analytica Chimica Acta 675 (2) (2010) 156-164.
- [3] R.B. Hoff, G. Rübensam, J. Louise, F. Barreto, L. Jank, M.C. Peralba, T.M. Pizzolato, M. Silvia Diaz-Cruz, D. Barceló. *Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis*. Talanta 132 (2015) 443-450.
- [4] B.K. Matuszweski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng. *Strategies for assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC MS/MS*. Analytical Chemistry 75 (2003) 3019-3030.
- [5] *Decisión de la Comisión de 12 de Agosto de 2002, Directiva 2002/657/EC*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (2002) L221 8-36.
- [6] D. Alvarez-Muñoz, B. Huerta, M. Fernandez-Tejedor, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló. *Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves*. Talanta (2015) 174-182.
- [7] G. I. Hertzog, K. L. Soares, S. S. Caldas, E. G. Primel. *Study of vortex-assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish.. Anal. Bioanal. Chem (2015) 407: 4793-4803*.
- [8] Y. Zhang, W.Guo, Z. Yue, L.Lin, F. Zhao, P.Chen, W.Wu, H. Zhu, B.Yang, Y. Kuang. *Rapid determination of 54 pharmaceuticals and personal care products in fish samples using enzymatic microwave-assisted extraction-hollow fiber-liquid/solid phase microextraction*. Journal of Chromatography B 1051 (2017) 41-53.

[9] P.Huang, P. Zhao, X. Dai, X. Hou, L.Zhao, N. Liang. *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 1011(2016) 136-144.

Capítulo 3

*Optimización y validación de un procedimiento analítico para la determinación de principios activos farmacológicos en *Procambarus clarkii* y *Scrobicularia plana* mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección de Espectrometría de Masas de tiempo de vuelo (UPLC-MS/MS qTOF)*

3.1 Reactivos y disoluciones patrón

Los siguientes patrones, de pureza entre el 97 y el 99.9 % fueron adquiridos a Fluka Sigma-Aldrich, S.A. (Madrid, España): ciprofloxacina (CPR), danofloxacina (DNF), enrofloxacina (ENR), flumequina (FMQ), gatifloxacina (GTF), grepafloxacina (GPF), marbofloxacina (MRB), norfloxacina (NRF), clortetraciclina (CLT), oxitetraciclina (OXT), sulfametoxazol (SMX), sulfadiazina (SDZ), sulfametazina (SMT), sulfamerazina (SMR), trimetoprima (TMP), ibuprofeno (IBU), ácido salicílico (SAC), naproxeno (NAX), diclofenaco (DIC), ketoprofeno (KET), amoxicilina (AMX), cloranfenicol (CLF), tianfenicol (TIF), florfenicol (FLF), carbamazepina (CBZ) y atenolol (ATN). Hidróxido sódico 0.1M en disolución acuosa volumétrica FlukaTM y metanol (LC-MS) fue suministrado por VWR (Barcelona, España). Ácido fórmico de pureza 98-100% (Suprapur® Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Acetonitrilo de calidad UHPLC-MS \geq 99.9% (ChromasolvTM LC-MS Ultra) y agua de calidad UHPLC-MS \geq 99.9% (ChromasolvTM LC-MS Ultra) fueron adquiridos a lab-Honeywell (España). *Proteinasa-K* PCR recombinante de concentración 20.2 mg mL⁻¹ fue suministrada por Roche Diagnosis (Barcelona, España). El agua ultrapura utilizada fue obtenida de un sistema Milli-Q-Millipore (Billerica, MA, USA). Leucina encefalina fue adquirida a Waters (Barcelona, España).

Se prepararon disoluciones patrón stock a una concentración de 400 mg L⁻¹ de todos los principios activos farmacológicos (DNF, ENR, FMQ, GTF, GPF, MRB, NRF, SMX, SMT, SDZ, SMR, TMP, AMX, CBZ, ATN, IBU, DIC, KET, NAX, SAC, CLF, TIF y FLF) excepto para CPR, OXT y CLT que debido a su baja solubilidad a concentraciones elevadas, se prepararon a una concentración de 100 mg L⁻¹. DNF, ENR, FMQ, GTF, GPF, MRB, NRF, SMX, SMT, SDZ, SMR, TMP, AMX, CBZ, ATN, IBU, DIC, KET, NAX y SAC fueron preparadas por dilución de la sustancia patrón en metanol. CLT, OXT, CLF, TIF y FLF fueron preparadas diluyendo la sustancia patrón en agua Milli-Q y CPR fue preparada en una mezcla 80:20 (v/v) metanol:agua mediante el siguiente procedimiento, 2.5 mg de compuesto se diluyen en 5 mL de agua Milli-Q, enrasando en un volumen final de 25 mL de metanol.

Las disoluciones stock se conservaron a 4°C, salvo CPR, (que se conservó en un lugar seco a temperatura ambiente al precipitar a baja temperatura) permaneciendo estable durante un mes a temperatura ambiente y CLT y OXT que han de ser preparadas diariamente. El resto de disoluciones permanecen estables durante al menos dos meses a 4°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon, a diario, por dilución en agua, a partir de las correspondientes disoluciones stock.

La disolución calibrante detector de masas (formiato sódico) se prepara de la siguiente forma: a 20 mL de disolución acetonitrilo:agua (80:20, v/v) se le añaden 100 μL de disolución acuosa de NaOH 0.1 M y 200 μL de ácido fórmico al 10% (v/v). La disolución de Leucina de 200 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ que se usó como referencia para el detector de masas, se preparó disolviendo el patrón comercial en solución acetonitrilo:agua 1:1 (v/v) a la que se añade ácido fórmico para una concentración final del 0.1% (v/v); esta disolución permanece estable durante un mes a 4°C.

3.2 Instrumentación

La separación cromatográfica se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido de alta resolución Acquity® UPLC H-Class (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo XEVO G2-S QTOF (Waters, Micromass, Manchester, UK) equipado con una fuente de ionización de electrospray con una configuración Z-ortogonal. Para la separación de los analitos se empleó una columna de fase reversa Acquity UPLC® BEH C18 (50 mm \times 2.1 mm (i.d.), tamaño de partícula de 1.7 μm) acoplada a una precolumna Acquity UPLC® BEH C18 VanGuard™ (2.1 \times 5 mm (i.d.)).

El espectrómetro de masas Xevo G2-S-QTOF se calibró, cada día, en un rango de masas (m/z) de 50-1000 Da con la disolución calibrante de formiato sódico prepara como se describe en la sección 3.1, aceptando 2 ppm como error máximo permitido para dar por válida la calibración. Además, se empleó una sonda de entrada de spray de referencia independiente a la de muestra (*LockSpray*) para garantizar la exactitud y reproducibilidad en todos los análisis. Como referencia se empleó una disolución de Leucina Encefalina, introducida a un flujo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, utilizándose como masas de referencia 556.2681 para ionización positiva ($m/z [M+H]^+$) y 554.2615 para ionización negativa ($m/z [M-H]^{-1}$).

3.3 Optimización de la separación cromatográfica y detección

3.3.1 Condiciones de detección

La detección se llevó a cabo empleando un detector de masas cuadrupolo tiempo de vuelo equipado con una fuente de ionización de tipo electrospray con una configuración Z-ortogonal (este tipo de configuración permite una ionización de forma continua del analito y de la referencia, (*LockSpray*), mediante infusión directa de los analitos en el sistema de detección. Para optimizar las condiciones de detección, se preparó una disolución de 500

$\mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los analitos de forma individual y se infundió directamente tomando como óptima una señal superior a 10^4 cuentas por segundo. Se optimizaron: flujo del gas de nebulización y del cono, temperatura de la fuente y de desolvatación, voltaje del capilar y del cono y el offset de la fuente.

Los experimentos de masas, se realizaron en los modos de adquisición de barrido completo (MS) y de fragmentación (MS/MS) tanto en ionización positiva como negativa y se trabajó en “modo resolución”, que ofrece medidas con una sensibilidad adecuada y con un menor error en la masa analizada (< 2 ppm). Se usó nitrógeno como gas de desolvatación y gas de cono a flujos de 600 L h^{-1} y 30 L h^{-1} , respectivamente. Para los experimentos en modo MS/MS se empleó argón como gas en la celda de colisión. La temperatura de desolvatación se optimizó a $400 \text{ }^\circ\text{C}$ y la de la fuente a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ en modo positivo y 120°C en modo negativo. El voltaje del capilar se fijó a 1.50 kV en modo positivo y -2.00 kV en modo negativo, siendo el voltaje de cono 40 V para ambos modos. El potencial del detector se fijó a 3000 V para el modo positivo y 2900 V para el negativo.

La frecuencia de adquisición del *LockSpray* se estableció en 30 segundos, lo que significa que cada 30 segundos el flujo de la sonda (o capilar) del *LockSpray* se introduce en el espectrómetro de masas durante 0.3 segundos, dando así al software la posibilidad de realizar una corrección en tiempo real de la masa exacta. El voltaje del capilar de *LockSpray* se ajustó a 2.20 kV .

En la tabla 3.1 se muestran las condiciones de detección optimizadas para los principios activos farmacológicos seleccionados en esta Memoria, y en la tabla 3.2 se muestran los tiempos de retención, modo de ionización y masas teóricas y experimentales monitorizadas durante el análisis, energía de colisión aplicada en los experimentos MS/MS así como los principales fragmentos correspondientes a cada uno de los analitos analizados, medidos con su energía de colisión óptima. Los experimentos de MS/MS fueron realizados aplicando energías de colisión entre $15\text{-}30 \text{ V}$ y seleccionando el ión más intenso en cada caso.

Tabla 3.1. Condiciones óptimas de detección mediante qTOF.

	Modo de ionización positivo	Modo de ionización negativo
Voltaje de Capilar (kV)	1.50	-2.00
Voltaje de Cono (V)		40
Offset fuente		80
Tª de fuente (°C)	100	120
Tª de desolvatación (°C)		400
Flujo gas cono (L h⁻¹) N₂		30
Flujo gas desolvatación (L h⁻¹) N₂		600
Rango de adquisición (Da)		50-800
Tiempo de adquisición(s)		0.8

Tabla 3.2. Fragmentos obtenidos, tiempo de retención y modo de ionización para cada analito.

	t_R (min)	Modo de ionización	Masa teórica	Masa experimental	MS/MS	
					Fragmentos obtenidos	Energía de colisión (eV)
AMX	0.47	Positivo	365.1045	349.0857	134.7328 114.6931	15 20
ATN	0.54	Positivo	266.1630	267.1707	190.0652 145.5871	20 25
SDZ	1.03	Positivo	250.0524	251.0603	156.7139 92.1693	15 20
SMT	1.43	Positivo	278.0837	279.0914	185.6541 92.6751	15 20
TMP	1.51	Positivo	290.1378	291.1464	230.9128 123.8152	15 20
MRB	1.53	Positivo	362.1390	363.1463	320.1176 72.0763	20 25
NRF	1.67	Positivo	319.1332	320.1409	276.9541 233.8341	20 25
CPR	1.76	Positivo	331.1332	332.1410	314.0639 245.3285	25 30
SMR	1.77	Positivo	264.0680	265.0763	108.8561 92.3878	15 20
DNF	1.89	Positivo	357.1488	358.1568	340.0650 82.3279	15 20
ENR	1.97	Positivo	359.1645	360.1722	316.1872 245.3027	15 20
CLT	2.08	Positivo	478.1142	479.2003	462.1159 444.4365	20 25
GTF	2.14	Positivo	375.1594	376.1688	332.6105 261.8366	20 25
SMX	2.52	Positivo	253.0521	254.0597	156.7952 92.0631	15 20
GPF	2.56	Positivo	359.1645	360.1724	316.4782 273.2261	20 25
OXT	2.74	Positivo	460.1481	461.1579	426.9413 201.3725	25 30
CBZ	3.62	Positivo	236.0949	237.1029	194.0762 192.8439	15 20
FMQ	3.78	Positivo	261.0801	262.0880	244.3489 202.0715	15 20
KET	4.14	Positivo	254.0942	255.1023	209.1740 105.5472	15 20
DIC	4.39	Positivo	318.0166	296.0244	214.1362 215.7351	20 25
NAX	5.02	Positivo	230.0942	294.0089	185.2873 169.9843	15 20
TIF	1.64	Negativo	356.0047	353.9955	185.0919 79.8138	20 25
FLF	2.45	Negativo	358.0004	355.9915	185.1381 110.1463	20 25
SAC	2.52	Negativo	138.0316	137.0237	121.5971 98.0738	15 20
CLF	2.78	Negativo	322.0123	321.0043	152.4137 121.0651	20 25
IBU	5.54	Negativo	206.1306	205.1224	161.1258 159.2475	15 20

3.3.2 Condiciones de separación cromatográfica

La separación cromatográfica se llevó a cabo usando columnas de mayor empaquetamiento que aquellas usadas para la detección con triple cuadrupolo, consiguiendo, de esta forma, reducir el tiempo del análisis y una mejor resolución de analitos. Inicialmente, se probaron las mismas condiciones descritas en el epígrafe 1.3.2 del Capítulo 2 y una columna de alto empaquetamiento, Waters Acquity® BEH C18 (50 mm x 2.1 mm i.d., 1.7µm tamaño de partícula) pero los resultados no fueron demasiado satisfactorios en relación al tiempo de medida y a la resolución de los picos. Se procedió entonces a probar diversos gradientes de elución, siendo el más adecuado el que se muestra en la tabla 3.4, empleando como disolventes agua de calidad UPLC-MS y ácido fórmico al 0.1 % (v/v) en acetonitrilo. A diferencia del gradiente de elución optimizado para la determinación mediante HPLC-MS/MS (Capítulo 2) en este caso la separación cromatográfica es válida para ambos modos de ionización.

Tabla 3.4. Gradiente de elución optimizado.

Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (mL/min)
0.0	90	10	0.5
4.5	45	55	0.5
6.0	45	55	0.5
6.1	90	10	0.5
8.0	90	10	0.5

%A: agua pura de calidad UPLC-MS;

%B: Acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1%.

A fin de conseguir la adecuada reproducibilidad, resolución y separación de analitos se termostató la columna a 20°C y, para evitar las posibles degradaciones de muestras y patrones, la temperatura del inyector automático se fijó a 10 °C. En las figuras 3.1 (modo positivo) y 3.2 (modo negativo) se muestran los cromatogramas de iones totales (TIC: *Total Ion Chromatogram* y BPI: *Best Peak Chromatogram*) correspondientes a la separación de los principios activos farmacológicos seleccionados usando las condiciones óptimas descritas anteriormente. De estos cromatogramas se extrajeron posteriormente los cromatogramas correspondientes a cada uno de los compuestos analizados en esta Memoria. En las figuras 3.3 y 3.4 se muestran los cromatogramas de iones extraídos correspondientes a los 26 compuestos analizados en ambos modos.

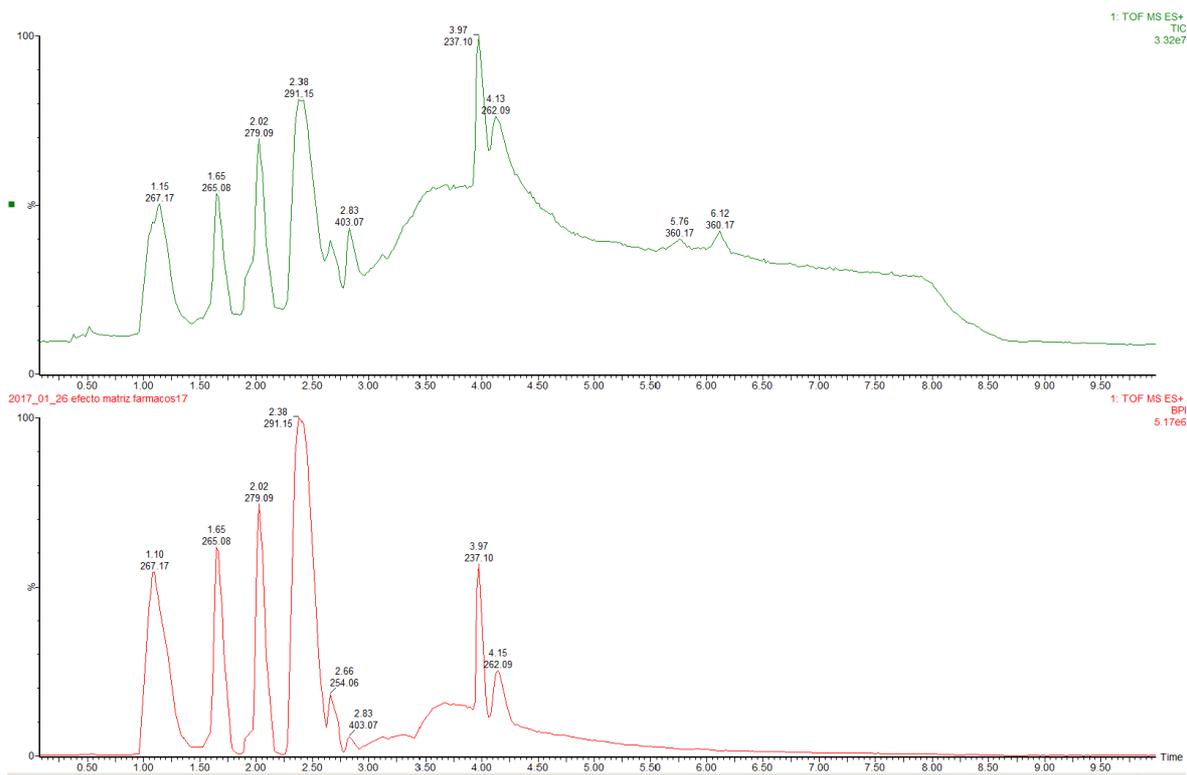


Figura 3.1 Cromatogramas (TIC y BPI) en modo positivo (concentración 100 $\mu\text{g L}^{-1}$).

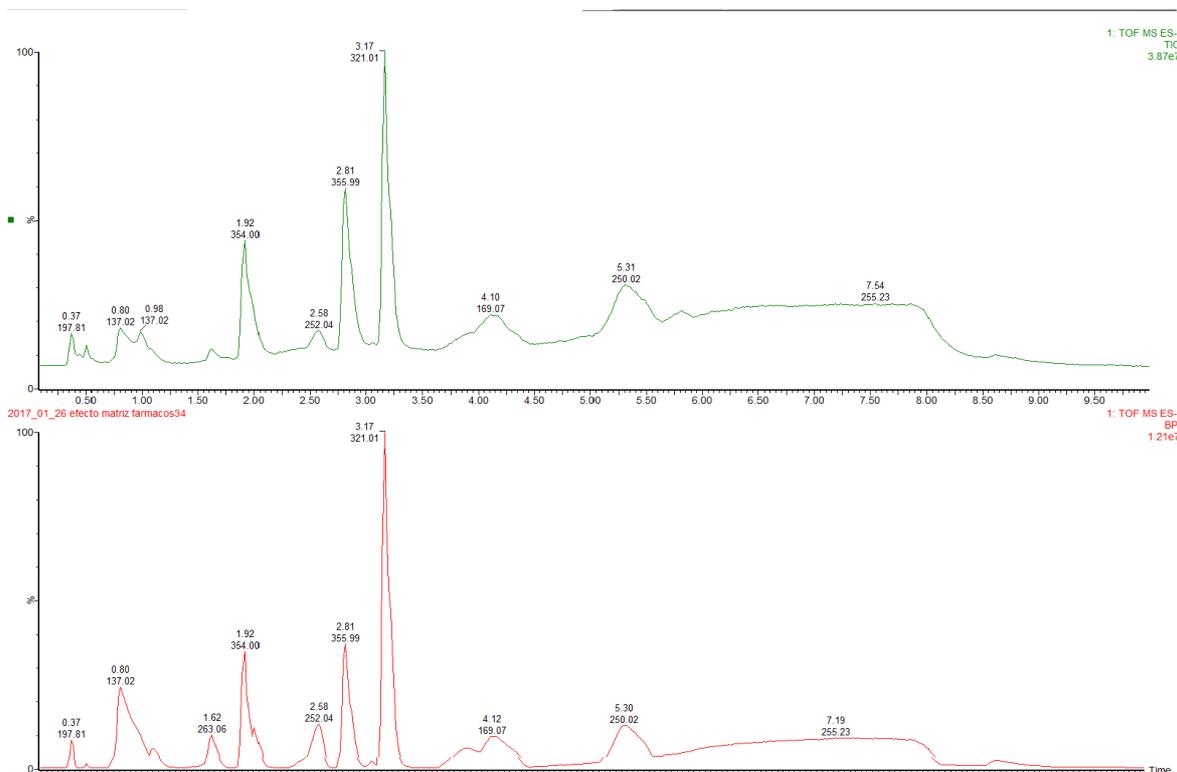


Figura 3.2 Cromatogramas (TIC y BPI) en modo negativo (concentración 100 $\mu\text{g L}^{-1}$)

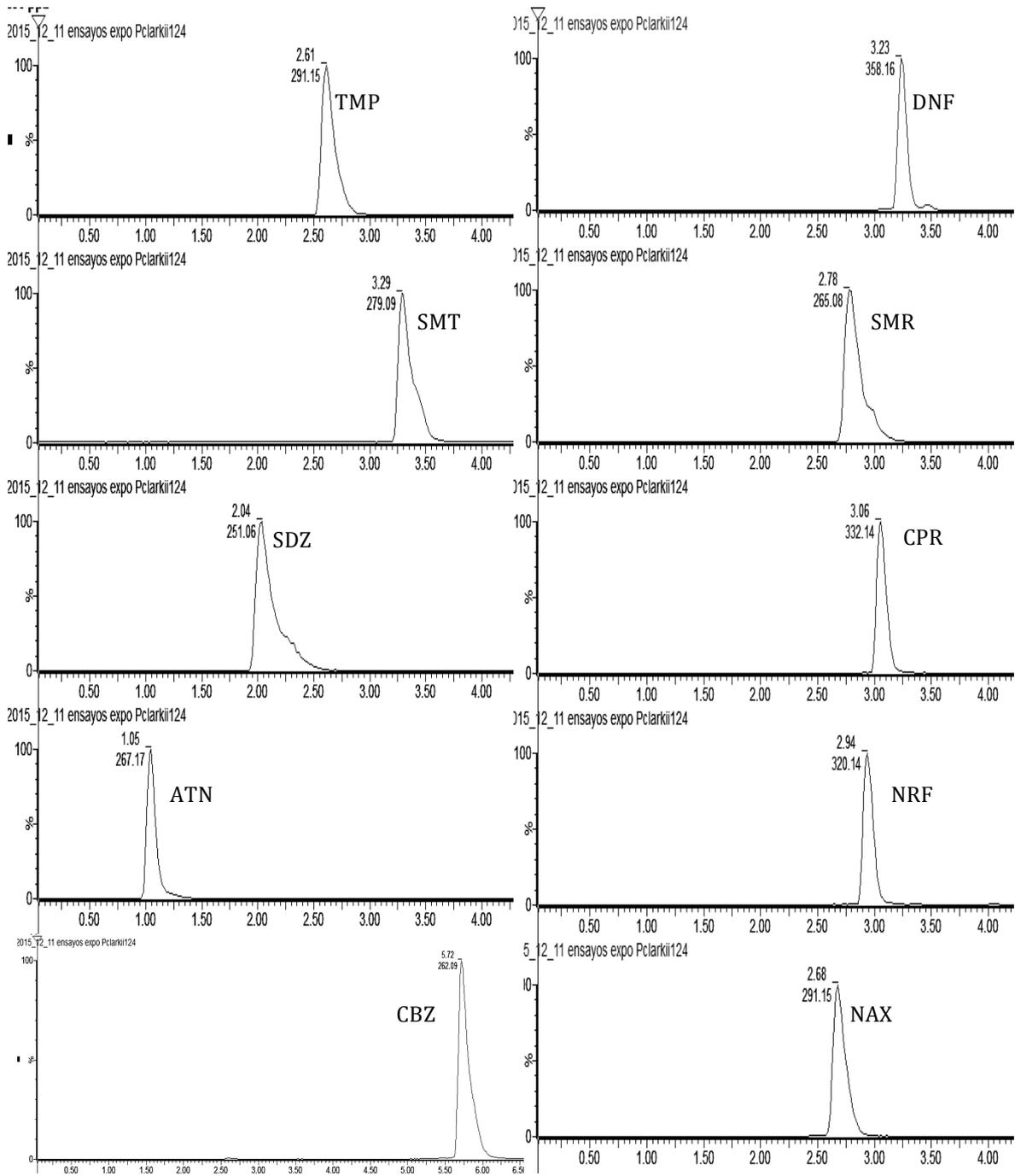


Figura 3.3 Cromatograma de iones extraídos de analitos en modo positivo.

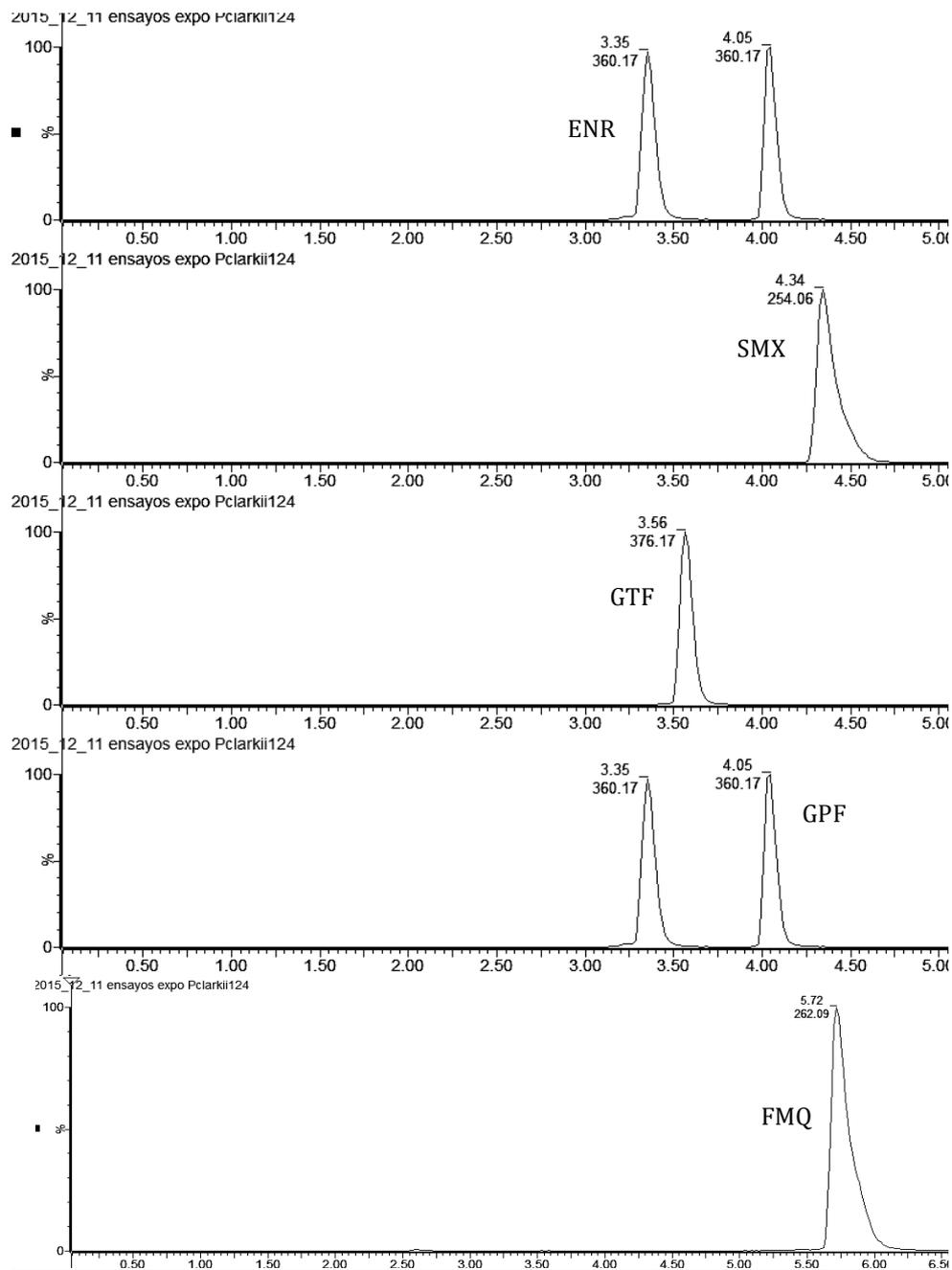


Figura 3.3. (continuación). Cromatograma de iones extraídos de analitos en modo positivo.

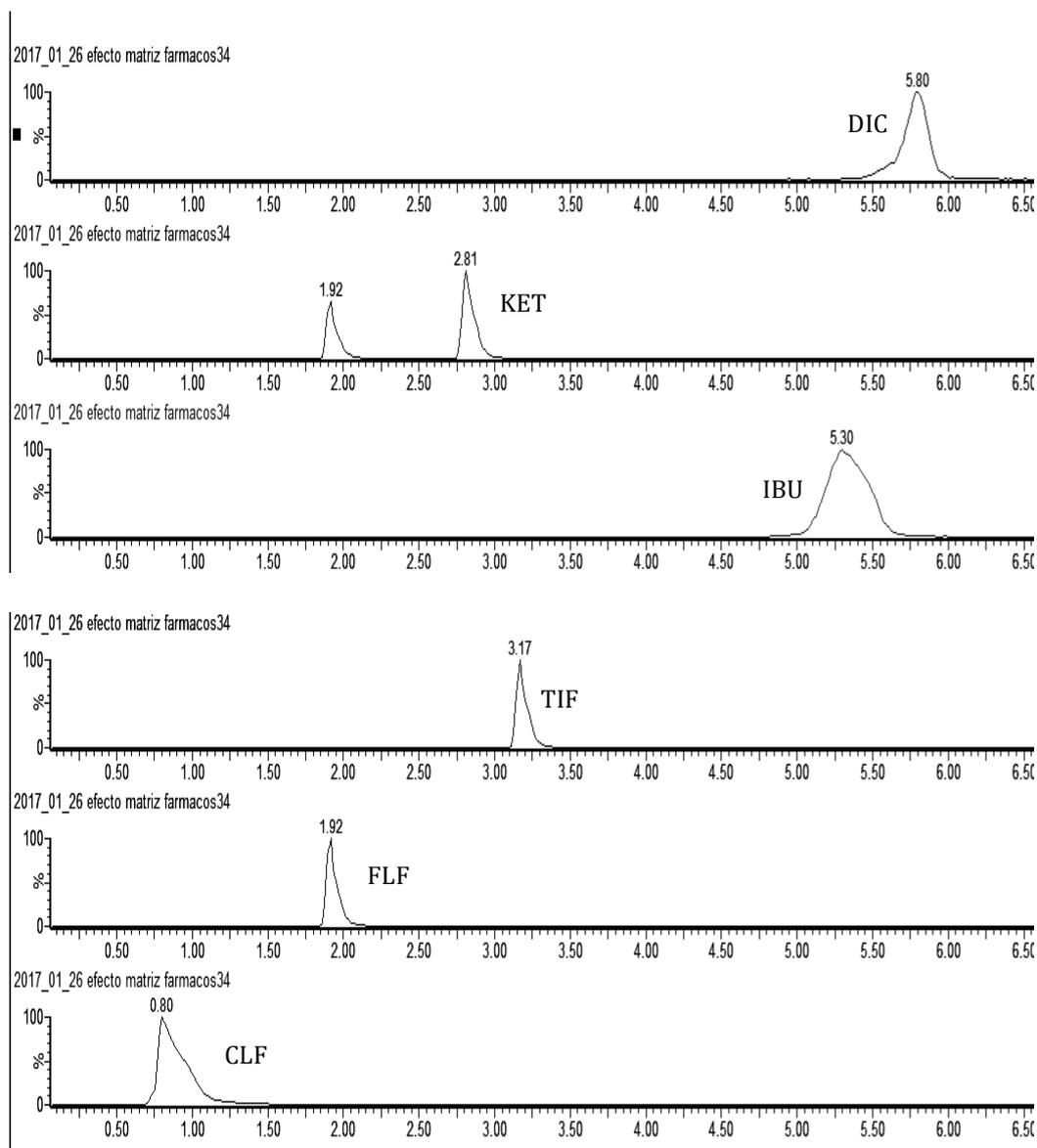


Figura 3.4. (continuación). Cromatograma de iones extraídos de analitos en modo negativo.

3.4. Procedimiento para la extracción de principios activos farmacológicos de músculo abdominal y glándulas digestivas de *Procambarus clarkii* y músculo de *Scrobicularia plana*

Dado que el desarrollo metodológico de este capítulo pretendía la optimización de un procedimiento analítico para el análisis de especímenes de forma individualizada, se hizo necesario evaluar, tomando como base el procedimiento de extracción optimizado en el apartado 2 del Capítulo 2, la reducción de tamaño de muestra de músculo abdominal o glándula digestiva de partida, y optimizar, en cada caso, los volúmenes de disolvente extractante y reconstituyente final. Para ello, se partió de tres cantidades (0.5, 0.25 y 0.1 g) de músculo abdominal o glándula digestiva liofilizadas de *P.clarkii* y se ensayaron los

siguientes volúmenes de extractante para cada cantidad de muestra: 10, 5 y 2 mL. Las muestras así extraídas se reconstituyeron en 1, 0.5 y 0.2 mL de disolución acuosa de ácido fórmico al 0.1 % (v/v) e inyectadas en el sistema cromatográfico. En la tabla 3.5 se muestran los resultados obtenidos en términos de recuperación, para las diferentes condiciones experimentales usando muestras fortificadas, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.4.2 del Capítulo 2, con todos los analitos a un nivel de 250 ng g^{-1}

Tabla 3.5 Recuperaciones de los analitos tras la extracción de distintas cantidades de muestras fortificadas de 250 ng g⁻¹.

	Músculo abdominal			Glándula digestiva		
	0.1 g	0.25 g	0.5 g	0.1 g	0.25 g	0.5 g
AMX	79±2	76±3	73±2	82±3	79±1	76±2
ATN	89±3	86±1	82±3	90±1	88±2	84±2
SDZ	98±1	95±2	91±2	98±1	95±1	93±3
SMT	97±1	95±1	92±2	97±2	93±2	94±2
TMP	83±2	81±2	78±1	81±2	78±2	75±1
MRB	84±2	82±1	79±2	85±1	82±1	80±3
NRF	89±4	84±2	81±1	89±2	86±1	82±3
CPR	92±2	89±1	86±2	93±1	90±2	87±1
SMR	95±2	92±3	90±1	97±2	94±2	91±1
DNF	74±1	72±1	70±3	76±1	73±1	70±2
ENR	85±3	80±1	78±2	84±2	81±2	79±2
CLT	88±3	87±3	85±1	90±1	88±1	87±1
GTF	85±1	84±2	83±2	87±2	85±2	84±1
SMX	97±2	95±1	93±2	98±2	96±1	93±2
GPF	77±3	74±1	70±3	79±2	75±2	73±2
OXT	80±1	78±2	75±1	83±1	81±3	78±1
CBZ	96±1	94±3	90±1	97±2	94±1	92±1
FMQ	84±1	81±1	79±2	85±2	82±2	81±2
KET	93±3	90±2	86±3	94±1	91±2	89±1
DIC	90±2	88±1	83±2	91±3	88±1	85±2
NAX	89±1	86±2	84±3	90±2	88±2	85±2
TIF	84±2	81±3	79±1	84±1	80±3	78±1
FLF	83±2	80±1	77±3	83±2	79±1	78±2
SAC	116±2	112±4	110±2	115±3	111±3	110±1
CLF	84±2	80±1	78±2	86±2	83±1	80±2
IBU	90±2	89±3	76±1	92±2	89±2	87±3

Como se puede observar en la tabla 3.5, los mejores rendimientos se obtienen para el tamaño de muestra menor (0.1 g), tanto de músculo abdominal como glándula digestiva de *P.clarkii*. Cabe destacar también que al trabajar con una menor cantidad de muestra, se reduce el efecto matriz.

Con todo ello, se propone el siguiente procedimiento de extracción, que, de forma esquemática se muestra en la figura 3.3. 0.1 g de músculo abdominal o glándula digestiva liofilizadas de *P. clarkii* se introducen en reactores de microondas, se añaden 2 mL de una mezcla acetonitrilo:agua (1:1 v/v), 10 µL de *Proteinasa-K* y 1 µL de ácido fórmico puro. Las muestras se someten a 50 W de potencia durante 5 minutos, y, tras enfriar los reactores, sus contenidos se centrifugan a 7000 rpm durante 10 minutos (20 minutos en el caso de las glándulas digestivas). El líquido sobrenadante se evapora bajo corriente de

nitrógeno y el extracto seco correspondiente, se reconstituye con 1 mL de disolución acuosa de ácido fórmico al 0.1 % (v/v); 10 µL de la disolución resultante, previamente microfiltrada a través de un filtro de PTFE (0.2 µm), se inyectan en el cromatógrafo. El extracto reconstituido procedente de las glándulas digestivas fue nuevamente centrifugado antes de su microfiltración.

La reducción del tamaño de muestra permitió obtener buenos rendimientos de extracción empleando volúmenes de extractante y reconstituyente final del extracto menor, quedando el procedimiento de extracción como se muestra en la figura 3.5. Ésta reducción en el tamaño de muestra permitió, asimismo, acortar el tiempo en la etapa de evaporación del extracto.

Tal y como se mencionó en el Capítulo 1 de esta Memoria, la *Scrobicularia plana* o coquina de fango, como se conoce comúnmente, se ha seleccionado como posible organismo bioindicador y se empleará en posteriores ensayos de exposición que se describirán en los siguientes capítulos. Dado que el procedimiento optimizado en el Capítulo 2, conduce a muy buenos resultados en el análisis de principios activos farmacológicos en muestras de invertebrado, se decidió aplicar el mismo procedimiento de extracción optimizado en muestras de *S. plana*. Se realizaron ensayos preliminares para evaluar la eficacia del procedimiento y a la vista de los excelentes resultados obtenidos se procedió a su validación.

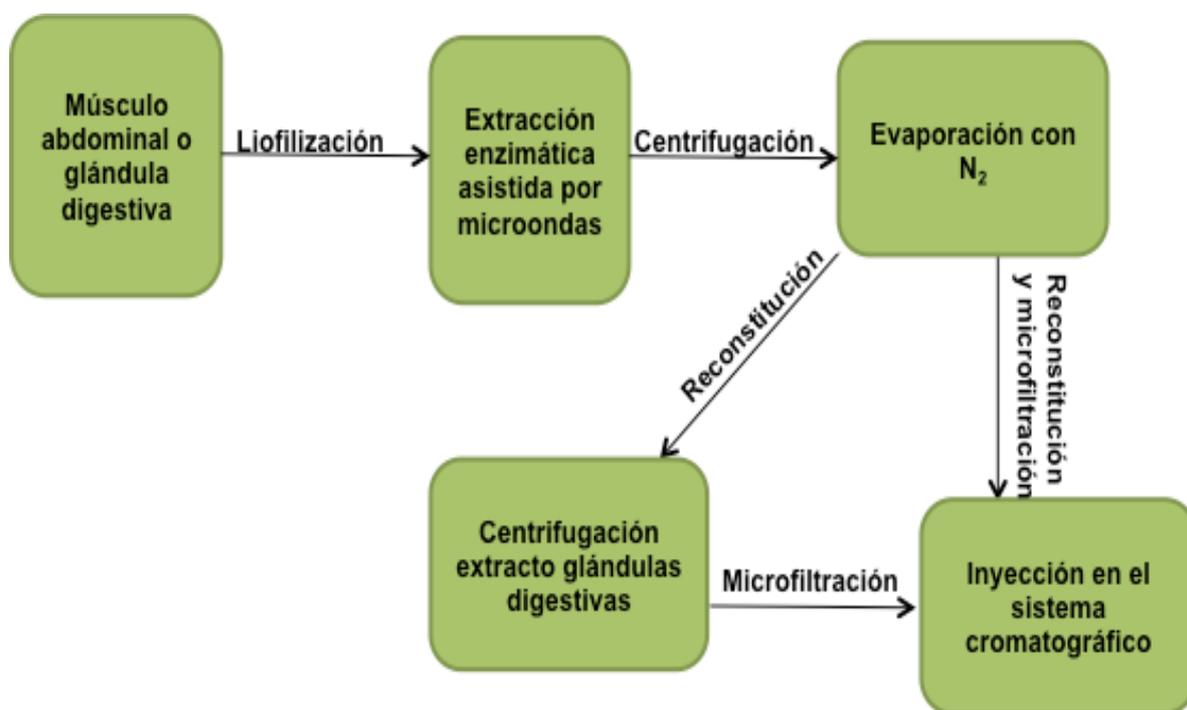


Figura 3.5. Procedimiento de extracción enzimática de los analitos en muestras de *Procambarus Clarkii* y *Scrobicularia plana*.

3.5 Validación del Procedimiento Analítico Propuesto

Del mismo modo que en el apartado 1.4 del Capítulo 1 de esta Memoria, la metodología propuesta se validó teniendo en cuenta las recomendaciones de la Comisión Europea en su Decisión de 12 de Agosto de 2002, por la que se aplica la *Directiva 2002/657/EC* [2] que regula la validación de métodos analíticos para análisis de residuos de contaminantes en matrices biológicas y sustancias alimentarias mediante la evaluación los siguientes parámetros de calidad: linealidad, sensibilidad (límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)), límites de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$), efecto matriz (efecto de supresión o realce de ionización y el efecto matriz generalizado), precisión y recuperación. Para llevar a cabo el proceso de validación se usaron “pools” de músculo abdominal o de glándula digestiva de *Procambarus clarkii* y de músculo de *Scrobicularia plana*.

La **linealidad** se estimó mediante una calibración en matriz. Para ello los extractos “blanco” de músculo abdominal o glándula digestiva y de músculo se fortificaron a diez niveles de concentración en un rango entre 0.25-250 ng mL⁻¹ que corresponden a concentraciones de 0.5 a 500 ng g⁻¹ en las muestras de partida.

Los **límites de detección y de cuantificación** se calcularon como la mínima concentración del analito que permite observar una relación señal/ruido de 3 y 10 en las muestras fortificadas (n=3).

Para evaluar la **precisión** del método, se realizaron estudios de repetibilidad (en un único día) y de precisión intermediana (durante distintos días). La precisión del método se evaluó mediante la comparación de los valores de concentración real y los obtenidos a partir de la recta de regresión para los estándares de validación y calculando la desviación estándar relativa (RSD).

El **efecto matriz** producido por realce o supresión de la ionización, las recuperaciones del método de extracción y las recuperaciones totales, se evaluaron según el procedimiento propuesto por Hoff et al. [3] que consiste en una modificación del método original propuesto por Matuszweski et al. [4] y cuyo procedimiento ha sido previamente descrito en el apartado 1.4 del Capítulo 1.

La **veracidad** se evaluó mediante ensayos de recuperación de muestras fortificadas que se sometieron al procedimiento de extracción y se midieron usando la calibración con patrones en la misma matriz (*matrix-matched calibration*) que la de las muestras. Se evaluaron las recuperaciones de los analitos, en muestras fortificadas a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), por triplicado, que, posteriormente, se sometieron al procedimiento de extracción obteniendo una concentración final de 5, 50 y 500 ng g⁻¹

De igual modo se calcularon los valores de CC α y CC β siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.4 del Capítulo 1 y como se describe en las guías de validación para métodos que implican el análisis y determinación de residuos y contaminantes en matrices biológicas y alimentos [4].

En la tabla 3.6 aparecen los valores obtenidos para los parámetros relacionados con la linealidad, precisión y sensibilidad para *P. clarkii* mientras que en la tabla 3.7 aparecen los valores para *S. plana*. Como se puede observar, en general, para *P. clarkii* se obtuvieron buenos rangos lineales entre 0.30-500 ng g⁻¹. Las desviaciones estándar se determinaron para seis replicas (repetibilidad) a tres niveles de concentración (10, 100 y 500 ng g⁻¹) y en el día 1, 3 y 7, obteniéndose en general valores inferiores al 0.3 % y valores máximos cercanos al 4.0 %. Además se obtuvieron valores para los límites de detección (LOD) entre 0.09 y 4.4 ng g⁻¹ y entre 0.7 y 10.5 ng g⁻¹ para los límites de cuantificación (LOQ). Estos valores mejoran, en la mayoría de los casos, a los obtenidos en el Capítulo 2, excepto en el caso de MRB, SMR, DNF, GTF, SMX, ENR y TIF para los

que los valores de LOQs obtenidos permiten la cuantificación a valores mucho más bajos con el detector de triple cuadrupolo que con qTOF.

Tabla 3.6. Parámetros de validación del procedimiento cromatográfico propuesto para *Procambarus clarkii*.

	Coef. de regresión (r ²)	Linealidad (%)	Intervalo lineal (ng g ⁻¹)	Repetibilidad (%RSD)*			Precisión intermedia(%RSD)*			LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
				10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹	10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹		
AMX	0.9994	99.81	2.30-500	0.2	0.4	0.5	0.9	2.1	1.6	0.09	2.30
ATN	0.9996	99.19	1.29-500	0.1	0.4	0.6	0.7	0.9	1.0	0.09	1.29
SDZ	0.9996	99.78	4.57-500	0.8	1.0	0.9	1.2	0.8	1.8	1.37	4.57
SMR	0.9997	99.99	1.42-500	0.3	0.9	1.0	2.4	1.9	0.8	0.13	1.42
TMP	0.9995	100.00	3.69-500	1.0	0.7	0.1	0.9	2.0	2.7	1.21	3.69
MRB	0.9999	99.86	2.52-500	0.2	0.4	0.8	1.1	2.3	1.4	0.41	2.52
NRF	0.9998	99.63	8.17-500	2.0	1.6	0.9	6.4	5.2	4.5	2.45	8.17
CPR	0.9994	99.84	2.68-500	0.1	2.2	0.3	2.1	1.0	1.6	0.20	2.68
SMT	0.9997	99.24	5.23-500	1.1	1.2	0.7	3.1	4.0	3.8	1.57	5.23
DNF	0.9985	98.48	0.83-500	0.1	0.4	0.5	2.6	1.9	1.4	0.12	0.83
ENR	0.9984	98.37	2.13-500	0.3	0.8	0.4**	1.9	2.1	1.5**	0.42	2.13
CLT	0.9991	99.45	0.35-500	0.9	0.4	0.3	2.3	1.8	1.5	0.35	1.19
GTF	0.9955	96.31	0.88-500	0.2	0.3	0.7	1.8	1.1	2.7	0.07	0.88
SMX	0.9995	99.44	0.70-500	0.1	0.4	0.9	1.6	1.2	2.5	0.21	0.70
GPF	0.9926	99.35	1.72-500	0.3	0.2	0.6	1.1	0.9	2.1	0.72	1.72
OXT	0.9987	98.17	1.67-500	0.8	0.3	0.2	1.1	0.9	3.3	0.55	1.67
CBZ	0.9995	98.82	0.73-500	0.8	0.2	0.4	0.9	1.7	2.6	0.73	1.08
FMQ	0.9996	99.57	3.45-500	1.6	1.6	0.7	4.6	2.1	1.4	1.03	3.45
KET	0.9993	99.28	2.50-500	1.3	0.9	0.5	3.9	1.6	2.5	3.84	5.91
DIC	0.9990	99.62	1.39-500	2.0	1.5	1.0	6.9	7.1	3.1	1.96	7.15
NAX	0.9995	99.74	3.18-500	1.9	1.0	0.9	8.4	10.2	3.5	2.20	5.41
TIF	0.9990	99.64	3.05-500	1.0	0.2	0.4	2.7	1.3	1.0	0.83	3.05
FLF	0.9978	98.85	0.91-500	0.1	0.8	0.5	1.6	0.8	0.9	0.17	0.91
SAC	0.9999	99.90	7.15-500	1.7	1.2	0.6	3.3	2.4	1.8	2.15	7.15
CLF	0.9990	99.79	0.84-500	0.2	0.6	0.1	0.9	1.4	1.8	0.15	0.84
IBU	0.9998	98.94	2.58-500	0.5	0.8	1.00	1.0	1.4	2.1	1.01	2.58

Tabla 3.7. Parámetros de validación del procedimiento cromatográfico propuesto para *Scrobicularia plana*.

	Coef. de regresión (r ²)	Linealidad (%)	Intervalo lineal (ng g ⁻¹)	Repetibilidad (%RSD)*			Precisión intermedia(%RSD)*			LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
				10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹	10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹		
AMX	0.9990	99.76	2.70-500	0.7	0.6	0.7	1.2	2.5	1.7	0.16	2.70
ATN	0.9992	99.10	2.43-500	1.9	1.5	1.3	3.3	2.7	1.8	0.19	2.43
SDZ	0.9998	99.80	5.09-500	1.3	1.1	0.5	4.9	5.3	3.2	1.54	5.09
SMR	0.9994	99.96	1.57-500	0.3	0.8	0.1	1.8	1.9	1.7	0.25	1.57
TMP	0.9998	100.00	4.15-500	1.5	0.9	0.4	4.6	3.5	2.9	1.96	4.15
MRB	0.9996	99.81	2.71-500	0.7	0.4	0.8	1.9	2.8	1.1	0.52	2.71
NRF	0.9992	99.59	8.92-500	1.9	2.5	1.4	7.9	8.8	6.2	2.95	8.92
CPR	0.9991	99.82	2.81-500	1.6	2.5	0.6	1.8	1.6	2.4	0.73	2.81
SMT	0.9990	99.15	5.85-500	2.3	1.7	0.9	4.4	5.8	4.1	2.17	5.85
DNF	0.9982	98.41	2.19-500	1.7	1.4	0.9	2.2	1.4	1.9	0.98	2.19
ENR	0.9987	98.46	1.65-500	0.2	0.4	0.8**	1.6	1.5	1.9**	0.52	1.65
CLT	0.9988	99.32	1.39-500	1.3	0.8	0.5	1.1	1.4	1.1	0.78	1.39
GTF	0.9959	96.59	0.94-500	0.7	0.6	1.2	1.4	1.4	0.8	0.15	0.94
SMX	0.9998	99.56	0.93-500	0.3	0.7	1.1	1.3	0.9	0.9	0.44	0.93
GPF	0.9928	99.49	1.92-500	0.5	0.6	0.8	0.9	1.5	1.8	0.93	1.92
OXT	0.9985	98.10	1.83-500	1.3	0.8	0.5	1.6	1.3	1.9	0.82	1.83
CBZ	0.9993	98.74	1.23-500	1.2	0.7	0.5	1.6	1.9	1.1	0.95	1.23
FMQ	0.9995	99.52	3.61-500	1.8	1.7	0.9	2.9	2.4	1.7	1.39	3.61
KET	0.9995	99.32	6.17-500	1.9	1.4	0.9	4.7	2.1	2.9	4.72	6.17
DIC	0.9987	99.58	7.59-500	2.6	1.8	1.4	7.5	7.3	3.8	2.74	7.59
NAX	0.9991	99.69	5.74-500	2.6	1.5	1.2	8.9	10.7	3.8	2.75	5.74
TIF	0.9988	99.57	3.75-500	3.5	0.6	0.8	3.1	1.6	1.4	0.99	3.75
FLF	0.9979	98.89	1.03-500	0.7	0.3	0.5	0.9	1.2	1.1	0.25	1.03
SAC	0.9996	99.84	7.37-500	2.3	1.9	0.8	3.7	2.8	2.1	2.97	7.37
CLF	0.9987	99.75	0.93-500	0.1	0.3	0.6	1.3	0.9	1.2	0.22	0.93
IBU	0.9995	98.90	2.86-500	1.1	1.3	1.2	1.8	1.9	2.8	1.16	2.86

* Los datos obtenidos se representan en función del porcentaje de la desviación estándar (%RSD). ** Nivel de fortificación 250 ng g⁻¹.

Los datos recogidos en la tabla 3.7 muestran valores para *S. plana* similares a los obtenidos para los *P. clarkii*, con lo que se demuestra de esta forma que el método de extracción enzimática es adecuado tanto para ambas especies. Así, se obtuvieron rangos lineales de cuantificación entre 0.40-500 ng g⁻¹ y las desviaciones estándar relativas se determinaron para seis replicas (repetibilidad) a tres niveles de concentración (10, 100 y 500 ng g⁻¹) y en el día 1, 3 y 7 (postura intermedia), fueron inferiores al 3.5 % y al 12 %. Además se obtuvieron valores adecuados para los límites de detección (LOD) entre 0.16 y 5.32 ng g⁻¹ y los límites de cuantificación (LOQ) entre 0.27 y 11.06 ng g⁻¹.

El **efecto matriz** debido a la supresión o al realce de ionización es un efecto frecuente cuando se emplea una fuente de ionización de tipo electrospray (ESI) como se ha descrito, la evaluación del efecto matriz se llevó a cabo por el método de Hoff [3], según el cual, porcentajes de efecto matriz < 20%, se consideran bajos, entre el 20-40% el efecto sería medio y > 40% se considera efecto matriz muy alto. Como se puede observar en la tabla 3.8 la ionización sufre un efecto negativo, de igual manera ocurriría en el caso del detector de triple cuadrupolo para la mayoría de los analitos para SAC, DNF y TIF para los que se observa un realce de ionización. Para los otros analitos el efecto de matriz varía desde valores bajos (< 20%) a medios (20-40%) en el caso de GTF, GPF, OXT e IBU, sin embargo en el caso de FMQ, se obtiene un alto de supresión de ionización (-49.6%). De acuerdo con los datos obtenidos se propone la calibración en matriz para llevar a cabo los análisis en muestras biológicas de *P. clarkii* y de *S. plana*. Como se observa en las tablas 3.8 y 3.9, con el método de extracción propuesto, se obtuvieron buenos resultados de recuperaciones de extracción (RE_R) en un rango del 74-105 % para el abdomen abdominal y entre 73-104 % para glándulas digestivas de *P. clarkii* y 75-102 % para *S. plana*.

Tabla 3.8. Evaluación del efecto matriz en muestras de *P.clarkii*.

	Músculo abdominal			Glándula digestiva		
	ME	RE _R	RE	ME	RE _R	RE
AMX	-4.3	79.1	75.7	-4.9	77.8	73.9
ATN	-2.4	89.7	87.5	-3.2	88.9	86.1
SDZ	-10.6	97.2	86.9	-11.4	96.7	85.7
SMR	-6.5	96.8	90.5	-7.3	94.5	87.6
TMP	-19.4	80.3	64.7	-20.1	79.5	63.5
MRB	-10.2	87.2	78.3	-10.8	86.5	77.2
NRF	-8.6	91.2	83.4	-9.4	88.7	80.4
CPR	-11.9	93.5	82.4	-12.6	92.6	80.9
SMT	-7.1	94.4	87.7	-7.9	93.8	86.4
DNF	2.0	73.8	75.3	2.7	72.7	74.7
ENR	-8.5	82.5	75.5	-9.6	80.8	73.0
CLT	-10.9	88.3	78.7	-11.7	86.8	76.6
GTF	-34.7	89.1	58.2	-35.3	87.5	56.6
SMX	-5.3	98.4	93.2	-6.4	97.1	90.8
GPF	-28.3	83.1	59.6	-28.8	81.7	58.2
OXT	-29.1	82.5	58.5	-29.6	80.9	56.9
CBZ	-1.5	89.4	88.1	-2.3	86.3	84.3
FMQ	-49.6	99.2	49.9	-50.6	97.6	48.2
KET	-10.5	89.3	79.9	-11.3	88.6	78.6
DIC	-8.0	91.2	83.9	-8.7	90.5	82.6
NAX	-12.4	87.6	76.7	-13.1	86.9	75.5
TIF	4.2	79.9	83.2	4.9	77.4	81.2
FLF	-20.1	81.9	65.4	-21.1	80.4	63.4
SAC	3.2	105.4	108.7	4.2	103.8	108.1
CLF	-15.4	84.8	71.7	-16.3	83.1	69.6
IBU	-28.1	88.7	63.8	-28.9	85.9	61.1

Tabla 3.9. Evaluación del efecto matriz en muestras de músculo de *S. plana*.

	ME	RE_R	RE
AMX	-6.7	77.4	72.2
ATN	-3.5	86.1	83.1
SDZ	-12.4	95.3	83.5
SMR	-7.2	94.8	87.9
TMP	-23.9	81.5	62.0
MRB	-13.2	85.9	74.6
NRF	-9.9	92.7	83.5
CPR	-13.4	91.9	79.6
SMT	-8.6	92.3	84.4
DNF	3.7	74.5	77.3
ENR	-9.2	80.6	73.2
CLT	-12.3	87.5	76.7
GTF	-36.2	87.5	55.8
SMX	-6.7	95.5	89.1
GPF	-31.9	81.8	55.7
OXT	-27.4	79.6	57.7
CBZ	-2.7	87.3	84.9
FMQ	-39.6	96.2	58.1
KET	-11.3	86.4	76.6
DIC	-10.7	90.1	80.5
NAX	-11.6	86.9	76.8
TIF	5.8	75.8	80.2
FLF	-19.5	78.4	63.1
SAC	5.6	101.8	109.6
CLF	-17.4	82.7	68.3
IBU	-30.7	86.9	60.2

La **veracidad** del método se evaluó mediante ensayos de recuperación de muestras fortificadas a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) que se sometieron al procedimiento de extracción enzimática asistida por microondas y posteriormente se midieron usando una calibración en matriz. Las muestras se fortificaron por triplicado a una concentración final de 10, 100 y 500 ng g⁻¹ y se sometieron al procedimiento de extracción. Como se puede observar en la tabla 3.10 y 3.11 se obtuvieron recuperaciones mayores al 73 % (*P. clarkii*) y mayores al 70 % (*S. plana*) para todos los analitos sin diferencias significativas para los tres niveles de fortificación confirmándose así la idoneidad del procedimiento propuesto.

Tabla 3.10. Porcentaje de recuperación (%) de muestras de tejido biológico de *P.clarkii* fortificado (por triplicado) sometidas al procedimiento propuesto. (Valores medios \pm desviación estándar relativa (n=3)).

	Músculo abdominal			Glándula digestiva		
	10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹	10 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹
AMX	73 \pm 2	77 \pm 1	78 \pm 3	75 \pm 1	78 \pm 1	80 \pm 2
ATN	83 \pm 1	85 \pm 3	88 \pm 4	86 \pm 2	87 \pm 2	89 \pm 1
SDZ	89 \pm 3	92 \pm 2	97 \pm 2	90 \pm 1	94 \pm 3	98 \pm 3
SMR	90 \pm 2	93 \pm 3	95 \pm 1	91 \pm 2	92 \pm 3	96 \pm 1
TMP	70 \pm 3	74 \pm 5	80 \pm 1	69 \pm 1	73 \pm 2	79 \pm 3
MRB	76 \pm 2	79 \pm 1	82 \pm 4	78 \pm 2	80 \pm 4	84 \pm 2
NRF	78 \pm 1	81 \pm 4	88 \pm 3	80 \pm 2	83 \pm 2	87 \pm 3
CPR	83 \pm 2	86 \pm 3	90 \pm 1	85 \pm 1	88 \pm 2	91 \pm 1
SMT	88 \pm 1	90 \pm 2	93 \pm 4	89 \pm 2	92 \pm 2	95 \pm 1
DNF	67 \pm 2	69 \pm 1	71 \pm 3	68 \pm 2	71 \pm 3	74 \pm 2
ENR	75 \pm 2	78 \pm 4	82 \pm 3	77 \pm 1	79 \pm 2	83 \pm 1
CLT	79 \pm 3	83 \pm 3	88 \pm 5	81 \pm 2	85 \pm 1	89 \pm 3
GTF	80 \pm 2	82 \pm 1	84 \pm 3	81 \pm 1	83 \pm 2	86 \pm 1
SMX	92 \pm 3	94 \pm 1	96 \pm 3	93 \pm 1	96 \pm 2	98 \pm 1
GPF	69 \pm 2	72 \pm 3	76 \pm 1	70 \pm 3	73 \pm 2	77 \pm 3
OXT	73 \pm 5	77 \pm 2	79 \pm 3	74 \pm 2	78 \pm 1	80 \pm 2
CBZ	88 \pm 1	91 \pm 2	94 \pm 2	89 \pm 2	92 \pm 1	95 \pm 2
FMQ	72 \pm 4	77 \pm 2	82 \pm 3	74 \pm 1	78 \pm 2	83 \pm 1
KET	86 \pm 1	88 \pm 2	90 \pm 2	87 \pm 2	89 \pm 1	92 \pm 3
DIC	84 \pm 2	85 \pm 3	89 \pm 3	82 \pm 1	86 \pm 3	90 \pm 2
NAX	82 \pm 3	84 \pm 1	87 \pm 1	83 \pm 1	86 \pm 2	89 \pm 3
TIF	74 \pm 1	79 \pm 2	81 \pm 3	75 \pm 2	80 \pm 1	82 \pm 2
FLF	73 \pm 2	78 \pm 3	80 \pm 1	74 \pm 1	79 \pm 2	81 \pm 3
SAC	99 \pm 3	105 \pm 2	115 \pm 2	98 \pm 2	104 \pm 1	113 \pm 2
CLF	78 \pm 1	80 \pm 2	82 \pm 3	79 \pm 2	81 \pm 3	84 \pm 2
IBU	82 \pm 3	87 \pm 3	89 \pm 4	84 \pm 1	89 \pm 1	91 \pm 3

Tabla 3.11. Ensayos de recuperación (%) de muestras de músculo de *S. plana* fortificado (por triplicado) sometidas al procedimiento propuesto. (Valores medios \pm desviación estándar relativa (n=3)).

	Músculo de <i>S.plana</i>		
	10 ng g⁻¹	100 ng g⁻¹	500 ng g⁻¹
AMX	70 \pm 2	73 \pm 1	79 \pm 3
ATN	80 \pm 1	84 \pm 2	87 \pm 1
SDZ	88 \pm 3	90 \pm 3	95 \pm 2
SMR	86 \pm 2	89 \pm 1	93 \pm 2
TMP	68 \pm 1	70 \pm 2	74 \pm 2
MRB	73 \pm 3	76 \pm 1	79 \pm 3
NRF	77 \pm 2	80 \pm 1	84 \pm 2
CPR	82 \pm 1	84 \pm 2	88 \pm 1
SMT	87 \pm 2	89 \pm 1	93 \pm 3
DNF	65 \pm 3	68 \pm 1	71 \pm 2
ENR	73 \pm 2	75 \pm 2	78 \pm 1
CLT	74 \pm 2	77 \pm 1	80 \pm 3
GTF	83 \pm 2	86 \pm 1	89 \pm 2
SMX	89 \pm 1	91 \pm 2	94 \pm 3
GPF	72 \pm 3	75 \pm 1	77 \pm 2
OXT	68 \pm 2	70 \pm 1	74 \pm 3
CBZ	85 \pm 3	87 \pm 1	91 \pm 2
FMQ	70 \pm 1	73 \pm 2	78 \pm 2
KET	82 \pm 3	84 \pm 1	89 \pm 2
DIC	80 \pm 2	83 \pm 2	87 \pm 3
NAX	79 \pm 1	82 \pm 2	86 \pm 1
TIF	70 \pm 3	73 \pm 2	77 \pm 1
FLF	72 \pm 1	76 \pm 2	79 \pm 1
SAC	95 \pm 3	102 \pm 3	108 \pm 2
CLF	76 \pm 2	79 \pm 2	83 \pm 1
IBU	80 \pm 2	84 \pm 1	89 \pm 3

En la tabla 3.12 y 3.13 se muestran los resultados obtenidos en el cálculo de límite de decisión ($CC\alpha$) y de la capacidad de detección ($CC\beta$) para los veintiséis analitos seleccionados. Los valores obtenidos para estos parámetros fueron similares e incluso inferiores a los obtenidos en estudios previos para analitos similares en matrices de peces [1]. Por lo tanto, el procedimiento propuesto es adecuado para la determinación de los principios activos farmacológicos en muestras de músculo abdominal y glándula digestiva de *Procambarus clarkii* y músculo de *Scrobicularia plana*.

Tabla 3.12. Límites de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) calculados. (Todos los resultados vienen expresados en $ng\ g^{-1}$).

	Músculo abdominal		Glándula digestiva	
	$CC\alpha$	$CC\beta$	$CC\alpha$	$CC\beta$
AMX	0.64	2.02	0.68	2.15
ATN	0.37	1.84	0.41	2.03
SDZ	0.93	2.73	1.20	3.28
SMR	0.39	0.81	0.45	0.94
TMP	0.08	0.49	0.13	0.63
MRB	0.26	0.93	0.31	1.30
NRF	1.25	4.79	1.84	5.04
CPR	1.15	2.24	1.37	3.41
SMT	0.43	1.38	0.86	2.21
DNF	1.85	2.98	2.07	3.33
ENR	1.25	2.28	1.75	2.86
CLT	3.97	2.16	4.39	2.98
GTF	0.93	1.85	1.17	2.08
SMX	1.06	2.63	1.34	2.89
GPF	0.58	1.39	0.72	1.61
OXT	0.83	2.06	0.94	2.37
CBZ	0.28	1.59	0.47	1.79
FMQ	0.03	0.19	0.19	0.35
KET	0.75	1.89	0.91	2.37
DIC	1.36	2.58	1.69	2.93
NAX	1.87	2.19	2.13	2.49
TIF	0.27	1.49	0.51	1.73
FLF	0.20	0.53	0.47	0.88
SAC	2.86	4.98	3.09	5.21
CLF	0.56	1.39	0.72	1.63
IBU	1.75	3.07	1.89	3.38

Tabla 3.13. Límites de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) calculados. (Todos los resultados vienen expresados en $ng\ g^{-1}$).

	Músculo abdominal		Glándula digestiva	
	$CC\alpha$	$CC\beta$	$CC\alpha$	$CC\beta$
AMX	0.84	2.51	0.75	2.36
ATN	0.41	1.98	0.57	2.73
SDZ	1.27	2.91	1.54	3.64
SMR	0.59	1.32	0.66	1.08
TMP	0.39	0.67	0.44	0.98
MRB	0.51	1.37	0.79	1.79
NRF	1.86	5.19	2.43	5.56
CPR	1.54	2.68	1.70	4.05
SMT	0.77	1.65	1.12	2.95
DNF	2.17	3.05	2.49	3.70
ENR	1.63	2.63	2.06	3.04
CLT	4.39	2.70	4.73	3.27
GTF	1.32	2.16	1.85	2.73
SMX	1.40	2.78	1.59	3.08
GPF	0.93	1.66	1.09	1.98
OXT	1.30	2.57	1.63	2.86
CBZ	0.50	1.72	0.87	1.99
FMQ	0.34	0.70	0.73	0.84
KET	1.22	2.31	1.40	2.89
DIC	1.74	2.99	1.86	3.19
NAX	2.06	2.44	2.56	2.79
TIF	0.53	1.70	0.85	1.94
FLF	0.76	0.92	0.79	1.17
SAC	3.17	5.37	3.53	5.78
CLF	0.87	1.64	0.95	1.80
IBU	1.91	3.23	2.17	3.64

Son escasos aún en bibliografía los trabajos que emplean espectrometría de masas de alta resolución para la determinación de principios activos en muestras de tejidos de invertebrados, empleando en la mayoría de los casos procedimientos complejos, bien por el tratamiento de extracción o por la posterior etapa de limpieza y preconcentración que implica extracción en fase sólida en la mayoría de los casos. En un trabajo reciente de *Peña-Herrera y cols.* [5] se describe la determinación de 21 principios activos

farmacológicos en músculo de salmón, haciendo uso de dos metodologías de extracción diferentes (extracción con ultrasonidos y mediante QuEChERS) obteniéndose en ambos casos rendimientos superiores al 70% y límites de cuantificación para los compuestos analizados superiores a los obtenidos en esta Tesis. La detección de los fármacos se llevó mediante LC-HRMS/MS usando como fases móviles una disolución acuosa de formiato amónico (5mM) y una mezcla binaria metanol:acetonitrilo (1:1, v/v) siendo la duración del análisis de 9 minutos. El tamaño de muestra empleado (1g) en este caso es superior al descrito en el presente capítulo, lo que lo haría incompatible con la cuantificación en muestras individuales.

Otros autores, *Dasenaki y cols.* [6] describen la determinación de 143 principios activos farmacológicos en muestras de leche y de músculo de pez por UHPLC-QTOF MS siendo previamente extraídos mediante una extracción líquido-líquido seguida de una etapa posterior de limpieza con hexano a baja temperatura. Se obtienen LOQs y LODs del mismo rango que los obtenidos en este capítulo, que oscilan entre 0.2-20 ng g⁻¹. Al igual que en el caso anterior, la cantidad de muestra empleada es superior a la que se usa en nuestro caso.

Munaretto y cols. [7] proponen un procedimiento basado en el uso de una separación cromatográfica con detección mediante espectrometría de masas empleando analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo para el análisis de 117 compuestos. Los autores emplearon 10 g de muestra obteniendo recuperaciones de entre el 70 y el 120% y unos límites de cuantificación en el rango de 5-25 ng g⁻¹. En comparación con los resultados obtenidos en este capítulo cabe destacar el elevado número de compuestos analizados, sin embargo, es necesario una gran cantidad de muestra y los límites de cuantificación son bastante superiores a los obtenidos en este capítulo de Tesis.

Grabicova y cols. [8] proponen un procedimiento para la determinación de 74 principios activos en muestras de tejido cerebral, músculo e hígado de carpas, que implica una separación cromatográfica en 15 min con recuperaciones entre el 60 y el 130% y LOQs entre 0.1 y 8.4 ng g⁻¹ para algunos de los principios activos analizados en este capítulo. En términos generales, se alcanzan similares LOQs aunque las recuperaciones obtenidas son mejores con el procedimiento propuesto en esta Tesis.

Bibliografía

- [1] R. Fernández Torres, M.A. Bello López, M. Olías Consentino, M. Callejón Mochón, M. Ramos Payán. *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 54 (5) (2011) 1146-1156.
- [2] *Decisión de la Comisión de 12 de Agosto de 2002, Directiva 2002/657/EC*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (2002) L221 8-36.
- [3] R.B. Hoff, G. Rübensam, J. Louise, F. Barreto, L. Jank, M.C. Peralba, T.M. Pizzolato, M. Silvia Diaz-Cruz, D. Barceló. *Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis*. Talanta 132 (2015) 443-450.
- [4] B.K. Matuszweski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng. *Strategies for assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC MS/MS*. Analytical Chemistry 75 (2003) 3019-3030.
- [5] J.M. Peña Herrera, N. Montemurro, D. Barceló, S. Pérez. *Development and validation of an analytical method for determination of pharmaceuticals in fish muscle base don QuEChERS extraction and SWATH acquisition using LC-QTOF-MS/MS system*. Talanta 199 (2019) 370-379.
- [6] M. E. Dasenaki, A.A. Bletsou, G.A. Koulis, N.K. Thomaidis. *Qualitative multiresidue screening method for 143 veterinary drugs and pharmaceuticals in milk and fish tissue using liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63 (2015) 4493-4508.
- [7] J. Munaretto, M. May, N. Saibt, R. Zanella. *Liquid Chromatography with high resolution mass spectrometry for the identification of organic contaminants in fish fillet: screening and quantification assessment using two scan modes for data acquisition*. Journal of Chromatography A 1456 (2016) 205-216.

[8] K. Grabicova, A. V. Staňová, O. K. Uzun, A. Borik, T. Rand, R. Grabic. *Development of a robust extraction procedure for the HPLC-ESI-HRPS determination of multi-residual pharmaceuticals in biota samples.* *Analytica Chimica Acta* 1022 (2018) 53-60

Capítulo 4

*Estudio de evolución temporal. Presencia de principios activos farmacológicos en aguas y especímenes de *Procambarus clarkii* del Parque Nacional de Doñana y su entorno.*

4.1 Introducción

Como se expuso en la introducción de esta Memoria, desde hace años existe una gran preocupación sobre la presencia de contaminantes, ya sean clásicos o emergentes, en entornos naturales especialmente protegidos. Por ello, es necesario establecer mecanismos que garanticen la integridad de estos espacios, y entre estos se encuentra el desarrollo de métodos analíticos con sensibilidad adecuada que sean capaces de identificar y cuantificar a los analitos de interés en muestras procedentes de estas zonas.

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos al aplicar la metodología analítica descrita en el Capítulo 2 de esta Memoria a los especímenes y muestras de agua procedentes de zonas seleccionadas del Parque Nacional de Doñana. Este entorno natural viene siendo objeto de estudio, desde hace años, por el Grupo de Investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis y son, adicionalmente, numerosas las reseñas bibliográficas que describen la presencia de diversos tipos de contaminantes en la zona. Así, por ejemplo, se ha descrito la presencia de metales pesados tales como arsénico (As) y cadmio (Cd), entre otros, en el entorno natural mencionado anteriormente, así como la acumulación de los mismos en especímenes de *Procambarus clarkii* y *Mus spretus* [1,2].

4.2 Localización de los puntos de muestreo

Para este estudio se seleccionaron varios puntos de muestreo teniendo en cuenta aspectos relacionados con las actividades que se llevan a cabo en las proximidades de los mismos, así como la representatividad de los diversos ecosistemas que componen el Parque Nacional de Doñana y su entorno inmediato, y la presencia de cursos de agua que permitieran la presencia de los especímenes seleccionados en este estudio.

Se seleccionaron seis puntos de muestreo: en el curso alto del **Arroyo de la Rocina (ROC)**, curso bajo del **Arroyo de la Rocina (Casa Bernabé, BER)**, **Arroyo el Partido (PAR)**, **Arroyo El Ajolí (AJO)**, el **Matochal (MAT)** y el **Lucio del Palacio (LDP)**. En la tabla 4.1 se detalla la localización exacta de los puntos de muestreo escogidos para el presente estudio, a través de sus coordenadas UTM, y la posible problemática ambiental que pretende reflejar.

Como se describe de forma concisa en la tabla 4.1, los posibles efectos negativos sobre el medio ambiente en cada uno de los puntos de muestreo se deben, esencialmente, a actividades agrícolas y ganaderas en las proximidades de los mismos.

Con respecto a las actividades agrícolas, los que más impacto parecen tener a priori, son el cultivo de fresas, el de cítricos y el de arroz. Cabe destacar que el cultivo de fresa es una de las actividades antropogénicas que más contaminan debido a que requiere una gran cantidad de pesticidas y fertilizantes, así como gran cantidad de agua. A pesar de que el cultivo de arroz se puede considerar como agricultura tradicional, se ha descrito en la bibliografía la presencia de plaguicidas en aguas procedentes de este tipo de cultivo. En lo que respecta a las actividades ganaderas, hay que distinguir entre dos posibles influencias negativas sobre un entorno natural. La primera es el tránsito de ganado, ya que en su orina y estiércol se pueden encontrar, por la necesaria administración en muchos casos, fármacos sin metabolizar o bien metabolizados parcial o totalmente. La segunda causa es el sobrepastoreo, que provoca la erosión de los suelos.

Por otro lado, cabe destacar, que varias de las localizaciones seleccionadas están próximas a núcleos urbanos, por lo que no se descartan los posibles vertidos de aguas residuales, depuradas o no. Los dos únicos puntos de muestreo que, a priori, no reciben estos efluentes son ROC y LDP (este último por estar situado muy en el interior del PND).

Tabla 4.1. Localización de los puntos de muestreo y sus características ecológicas.

Punto de muestreo (Código) (Localización)	Coordenadas UTM	Características ecológicas
Rocina (ROC) (Curso alto del Arroyo la Rocina)	X: 178653 Y: 4119937	Posible contaminación ambiental debida a los cultivos de fresa. Tránsito de ganado.
Bernabé (BER) (Arroyo de la Rocina cerca de la aldea “ El Rocío”)	X: 187036 Y: 4116086	Posible contaminación ambiental debida a los cultivos de cítricos. Tránsito de ganado.
Partido (PAR) (Curso alto del Arroyo el Partido)	X: 191173 Y: 412977	Posible contaminación ambiental debida a los cultivos cítricos. Presencia del ganado equino.
Ajolí (AJO) (Arroyo del Partido en las cercanías de la aldea “El Rocío”)	X: 192352 Y: 4115565	Posible contaminación ambiental debida a los cultivos de cítricos. Presencia del ganado equino y bovino
El Matochal (MAT) (Arroyo Guadiamar, en las proximidades del Parque Nacional de Doñana)	X: 208681 Y: 4102207	Posible contaminación ambiental debida a los cultivos de arroz. Efecto del vertido de Boliden.
Lucio del Palacio (LDP) (Reserva Biológica de Doñana, interior del parque)	X: 193800 Y: 4099515	Punto de muestreo no afectado por fuentes antropogénicas por lo que se toma como referencia.

En la figura 4.1 se muestra un mapa del Parque Nacional de Doñana y su entorno más inmediato, y en la figura 4.2, la localización de los puntos de muestreo ya seleccionados.



Figura 4.1. Mapa del entorno del Parque Nacional de Doñana.



Figura 4.2. Mapa de localización de puntos de muestreo de Parque Nacional de Doñana.

Los muestreos se realizaron durante un periodo de seis años, desde 2011 hasta 2016, con una frecuencia anual, generalmente entre los meses de Mayo y Octubre, dependiendo de las condiciones meteorológicas del año de muestreo, dado que la toma de muestra de *Procambarus clarkii* se ve condicionada por los periodos de hibernación que realiza esta especie y que dependen en gran medida de la temperatura del agua, así como la presencia de agua en los puntos de muestreo. Así, para su captura se tuvo en cuenta que los ejemplares estuvieran fuera del periodo de hibernación y se encontrasen en edad adulta (lo que viene determinado por su tamaño). Inicialmente, en el primer año, se realizaron dos muestreos en los meses de mayo y junio, siempre que existiese agua en el punto de muestreo. Posteriormente, y debido a la ausencia de agua y las bajas temperaturas en los últimos años, se realizó únicamente un muestreo anual, generalmente antes de los meses de verano, en los que varios puntos de muestreo quedaban completamente secos.

Las muestras de agua tomadas en cada una de las localizaciones fueron transportadas al laboratorio a una temperatura inferior a 4 °C, y congeladas a -80°C. Para su análisis, una vez descongeladas, se microfiltraron a través de filtro de PTFE de 0.2 µm de poro y se inyectaron directamente en el cromatógrafo.

Los cangrejos fueron capturados haciendo uso de nasas cangrejeras tubulares de malla (tipo holandesa modificada acorde a la recomendación de la Junta Andalucía, BOJA número 152, 9 de Agosto de 2016), usando en el interior cebo adecuado (figuras 4.3 y 4.4). Los especímenes se recogieron de las nasas a las 24 horas para evitar el canibalismo entre cangrejos y el estrés de los mismos, lo que puede provocar su muerte, así como la entrada accidental de otros animales como tortugas, ranas o peces. Los especímenes capturados se transportaron al laboratorio en neveras con agua a una temperatura inferior a 4°C a fin de ralentizar el metabolismo de los mismos, y disminuir su estrés. En el laboratorio se diseccionaron separando el músculo abdominal y la glándula digestiva, según el procedimiento descrito en el apartado 2.4 del Capítulo 2 (otras partes fueron almacenadas para otros estudios en ejecución por otros Grupos de Investigación). Estas fracciones se pesaron y se liofilizaron durante 48 horas (músculo abdominal) y 96 horas (glándula digestiva) y finalmente se trituró de forma conjunta el tejido biológico con un mortero de ágata conservándose a -80°C hasta su extracción y posterior análisis, por lo que los datos que se obtienen se corresponden a un “pool” de los especímenes capturados en cada punto y fecha.

El número de ejemplares capturados cada año, y en cada punto de muestreo fue variable debido a las condiciones climatológicas; no obstante, se puede tomar como media un número aproximado de 100 especímenes por año.



Figura 4.3. Nasas tubulares de malla usadas en la captura de *P.clarkii*



Figura 4.4. Puesta de nasas para la captura en LDP.

4.3 Datos climatológicos de la zona entre los años 2011-2016

Dado que la respuesta de los organismos bioindicadores puede venir condicionada por las condiciones ambientales de su entorno, es importante destacar aquellos aspectos más relevantes de la climatología de la zona. Así, el Parque de Doñana está ubicado en una zona de clima típicamente mediterráneo, caracterizado por veranos secos e inviernos relativamente húmedos. Las temperaturas son suaves durante todo el año, con temperaturas máximas que varían aproximadamente 17 °C de invierno a verano. Una de las características más importantes de esta zona es que de tres a cinco meses es verano, cuando está dominado por el anticiclón subtropical, y en estas condiciones, el clima es extremadamente seco. Sin embargo, ciertas zonas del parque retienen corrientes de agua debido a contribuciones externas de ríos y riachuelos. Tanto la temperatura como la

lluvia condicionan la abundancia de cangrejos de río y la dilución o concentración de posibles contaminantes en las corrientes de agua.

En las tablas 4.2 y 4.3 se detallan las temperaturas medias mensuales y la precipitación media mensual en el periodo 2011-2016. Estos datos corresponden a dos estaciones de vigilancia ambiental localizadas en los alrededores del Parque Nacional de Doñana: Estación RAIFSE004 de Isla Mayor (*Red de Alerta e Información Fitosanitaria, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, España*) y Estación RIA2110, situada en Almonte (*Red de Información AgroClimática (IFAPA), Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Junta de Andalucía, España*).

Tabla 4.2. Temperaturas medias mensuales y precipitación media mensual en el periodo 2011-2016 registradas en RAIFSE004 de Isla Mayor.

Temperaturas medias mensuales (°C)												
Precipitación media mensual (mm)												
Año	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.
2011	10.6	11.0	13.1	17.6	21.3	23.7	23.8	24.0	21.7	19.4	13.8	10.1
	1.1	1.7	3.0	1.9	0.6	0.3	0.1	0.2	1.2	1.7	3.0	0.3
2012	9.0	7.7	13.4	14.2	21.1	23.5	23.3	23.9	21.3	17.6	14.1	11.0
	0.7	0.0	1.1	1.6	0.7	0.0	0.1	0.1	1.8	3.7	3.9	1.0
2013	10.4	8.2	10.9	14.6	17.7	21.5	24.2	24.2	22.0	18.7	12.2	10.4
	1.3	4.0	4.2	1.1	0.3	0.0	0.1	0.0	1.5	1.7	0.1	1.3
2014	11.4	11.5	13.1	16.5	21.3	22.5	24.5	22.0	18.0	18.7	14.8	12.8
	2.1	1.1	0.9	0.6	0.0	0.2	0.0	0.0	0.2	2.8	1.7	0.5
2015	8.4	9.6	13.1	16.5	21.3	22.5	24.5	22.0	18.0	18.7	14.8	12.8
	1.9	0.2	1.1	0.6	0.0	0.2	0.0	0.0	0.2	2.8	1.7	0.5
2016	12.4	11.7	11.7	15.5	18.4	23.3	25.7	25.3	22.2	19.0	13.3	14.3
	0.3	0.5	0.1	1.4	4.6	0.0	0.0	0.1	0.4	4.5	3.1	5.4

Tabla 4.3. Temperaturas medias mensuales y precipitación media mensual en el periodo 2011-2016 registradas en RIA2110 de Almonte.

Temperaturas medias mensuales (°C)												
Precipitación media mensual (mm)												
Año	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.
2011	10.8	11.2	13.5	17.6	20.9	23.9	24.9	26.3	23.3	20.5	14.0	10.3
	1.1	2.2	3.3	3.9	0.6	0.0	0.0	0.0	1.0	2.1	4.2	0.4
2012	9.3	7.4	13.5	14.4	20.6	24.0	24.8	26.2	22.7	18.5	14.2	11.0
	1.1	0.1	1.6	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.4	3.6	3.7	1.3
2013	10.8	10.1	13.3	15.9	17.3	21.7	24.7	25.9	23.2	19.5	12.8	10.6
	1.5	2.3	5.7	0.9	0.2	0.0	0.0	0.9	1.5	2.1	0.1	2.4
2014	11.5	11.6	13.6	17.6	20.2	21.7	23.5	25.0	22.4	20.9	15.7	9.9
	2.0	2.1	1.3	1.8	0.5	0.1	0.0	1.4	1.6	1.3	7.0	1.5
2015	9.4	11.0	14.0	17.1	21.2	23.4	26.6	25.1	21.3	18.9	14.6	12.4
	2.4	0.2	1.5	0.9	0.0	0.0	0.0	0.9	0.2	3.8	2.2	1.0
2016	12.2	12.0	12.1	15.6	18.2	23.0	26.4	26.6	23.7	19.5	14.3	11.8
	2.7	1.4	1.0	2.6	4.8	0.0	0.0	1.1	0.4	2.8	1.1	3.1

4.4. Análisis de muestras de agua y de especímenes de *P. clarkii*

Aplicando la metodología descrita en el Capítulo 2 de esta Memoria se analizaron muestras de músculo abdominal y de glándula digestiva correspondientes a “pools” de especímenes de *Procambarus clarkii* capturados en los diferentes puntos de muestreo cada año. En la tabla 4.4 (músculo abdominal) y 4.5 (glándula digestiva) se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de los 23 principios activos farmacológicos seleccionados. En la tabla 4.6 aparecen los resultados obtenidos en el análisis directo de las diferentes muestras de aguas tomadas.

Tabla 4.4. Principios activos farmacológicos identificados y cuantificados en el músculo abdominal de *P. clarkii* en los puntos de muestreo seleccionados.

Año de muestreo	Punto de muestreo	Principios activos farmacológicos (ng g ⁻¹)				
		FMQ	CPR	CBZ	SMX	IBU
2011	ROC					
	BER					
	PAR	Detectado	Detectado			
	AJO					
	MAT					
2012	LDP					
	ROC					
	BER					
	PAR	Detectado				
	AJO			Detectado	Detectado	
2013	MAT					
	LDP					
	ROC					
	BER					
	PAR	Detectado				
2014	AJO					
	MAT*					
	LDP					
	ROC		Detectado			
	BER					
2015	PAR					
	AJO	21.2±2.3				Detectado
	MAT					
	LDP					
	ROC			10.8 ±0.5		
2016	BER					
	PAR					
	AJO	26.2±4.1		9.6±1.8		
	MAT					
	LDP					

*Punto de muestreo seco. No se capturaron especímenes.

Tabla 4.5. Principios activos farmacológicos identificados y cuantificados en glándula digestiva de *P. clarkii* en los puntos de muestreo seleccionados.

Año de muestreo	Punto de muestreo	Principios activos farmacológicos (ng g ⁻¹)			
		FMQ	CPR	CBZ	SMX
2011	ROC	Detectado	Detectado		
	BER				
	PAR				
	AJO				
	MAT				
LDP					
2012	ROC	Detectado		Detectado	Detectado
	BER				
	PAR				
	AJO				
	MAT				
LDP					
2013	ROC	Detectado			
	BER				
	PAR				
	AJO				
	MAT*				
LDP					
2014	ROC	Detectado	Detectado		
	BER				
	PAR				
	AJO				
	MAT				
LDP					
2015	ROC	27.6 ±3.8		14.6±2.0	
	BER				
	PAR				
	AJO				
	MAT				
LDP					
2016	ROC	34.2±5.3		20.8±0.8	
	BER				
	PAR				
	AJO				
	MAT				
LDP					

*Punto de muestreo seco. No se capturaron especímenes.

Tabla 4.6. Principios activos farmacológicos identificados y cuantificados en aguas en los puntos de muestreo seleccionados.

Año de muestreo	Punto de muestreo	Principios activos farmacológicos (ng L ⁻¹)				
		FMQ	CPR	CBZ	SAC	IBU
2011	ROC					
	BER					
	PAR	Detectado	Detectado			
	AJO					
	MAT					
2012	LDP					
	ROC					
	BER					
	PAR			Detectado		
	AJO	Detectado				
2013	MAT					
	LDP				Detectado	Detectado
	ROC					
	BER					
	PAR					
2014	AJO					Detectado
	MAT					
	LDP					
	ROC		5.1±0.8			
	BER					
2015	PAR					
	AJO					
	MAT					
	LDP					
	ROC					
2016	BER					
	PAR					
	AJO					
	MAT					
	LDP					
2016	ROC					
	BER					
	PAR					
	AJO	5.1±1.2				
	MAT					
2016	LDP					Detectado

*Puno de muestreo seco.

Como se puede observar en las tablas 4.4, 4.5 y 4.6, se han identificado e incluso cuantificado algunos de principios activos farmacológicos objeto de estudio de la presente Tesis en los puntos de muestreo seleccionados durante un periodo de seis años. Cabe destacar que las sustancias, cuando han sido detectadas o medidas, lo han sido tanto en músculo como en glándula digestiva de los especímenes, excepto IBU detectado en especímenes capturados en el punto de muestreo AJO en 2014, que solo fue detectado en músculo. También hay que señalar como la cantidad medida de FMQ en los especímenes capturados en AJO en 2014 es mayor en el músculo. También en el

año 2011, CPR fue detectada en solo una de las fracciones de los especímenes capturados en PAR y AJO.

Durante el año 2011 se identificó la presencia de flumequina y ciprofloxacina en músculo abdominal, glándula digestiva y en agua en el Arroyo el Partido. Este punto se encuentra en las proximidades del Parque Natural de Doñana, concretamente en la zona denominada pre-Parque en la que la presencia del ganado equino y vacuno es abundante y el cauce de este arroyo desemboca directamente en los caños que riegan las marismas del Parque Natural. Debido a ello, la presencia de principios activos farmacológicos en animales que forman parte de la fauna de Doñana podría atribuirse a una potencial fuente antropogénica proveniente de la presencia de explotaciones ganaderas de la zona.

En el año 2012 en el punto denominado Matochal (MAT) se detectaron carbamazepina y sulfametoxazol. En dicha localización no se capturaron especímenes en el año 2013 ya que a causa de las altas temperaturas y la falta de lluvias, éste no presentaba suficiente agua para recoger muestras. Cabe destacar que este punto de muestreo se seleccionó para evaluar los posibles efectos negativos sobre la fauna de los cultivos de arrozales próximos al Parque.

En todos los años de muestreo, excepto en 2011, se ha encontrado flumequina en el punto de muestreo denominado Ajolí (AJO), también en las muestras de agua, excepto 2011 y 2013, por lo que este punto parece especialmente sensible a este principio activo. En 2012 y 2013 solo se alcanzaron niveles detectables, mientras que en los años posteriores se encontraron niveles cuantificables. La problemática ambiental que presenta este punto es la misma que en el caso del PAR, por tanto, la presencia de estos principios activos tanto en los especímenes de *P. clarkii* como en las muestras de aguas se podrían relacionar con el tránsito de ganado equino y bovino dado que este principio activo es de uso muy frecuente en ganadería, y este podría ser el principal vector de contaminación de este arroyo.

En la campaña del 2014 se detectó ciprofloxacina (CPR) en el curso alto del Arroyo la Rocina, mientras que en el año 2015 se midió carbamazepina en una concentración de 10.8 mg g^{-1} en el mismo punto de muestreo. El muestreo de 2014 se realizó tras la peregrinación anual al Rocío que, como es bien conocido, moviliza cerca de un millón de personas durante unos pocos días. Ciprofloxacina es un antibiótico ampliamente usado en humanos para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas, por lo que su presencia en los especímenes de *Procambarus clarkii* podría ser indicativo de la influencia del tránsito de personas en el interior del parque. Carbamazepina es un fármaco antiepiléptico y su presencia podría deberse a que el Arroyo de la Rocina se encuentra a unos dos kilómetros de la aldea el El Rocío. Debido

a que este punto de muestreo es uno de los principales aportes de agua a las marismas del Parque Nacional de Doñana, la presencia de estos y otros contaminantes perjudica gravemente al ecosistema de este espacio natural.

Por último, cabe destacar que durante las campañas 2012 y 2015 se detectó salicílico e ibuprofeno en muestras de aguas procedentes de Lucio del Palacio. Este punto fue seleccionado inicialmente, por su localización, como referencia de ausencia de contaminación, y la presencia de estos principios activos pone de manifiesto la problemática que nos ocupa en el interior del espacio natural. En este punto se encuentra ubicado centro de investigación de la Estación Biológica de Doñana denominado “Palacio de Doñana” y alberga laboratorios, viviendas de guardas y locales de servicios tales como talleres, cuadras, naves, etc.. Mantiene una infraestructura importante al servicio de la investigación científica, con facilidades de alojamiento, (así por ejemplo en un año proporciona alojamiento a unas 2500 personas y sirve unas 7000 comidas), vehículos todoterreno, guardas y personal de asistencia en el campo, laboratorios y equipamiento informático. Por todo ello, introduce en la zona más profunda y protegida del parque una fuente de contaminación antropogénica importante. Asimismo, se detectó en muestras de agua ácido salicílico en los puntos de Matochal y Bernabé, que están en las proximidades de núcleos urbanos que rodean el Parque.

No existe apenas información anterior a los estudios de esta Tesis sobre la presencia de principios activos farmacológicos en los cursos de agua del Parque Nacional de Doñana, y menos aún en organismos de dicho hábitat. La referencia más cercana es un estudio de evolución temporal realizado entre los años 2008 y 2009 que incluye, entre otros datos, los niveles encontrados de una selección de principios activos farmacológicos y productos de cuidado e higiene personal. Los análisis se realizaron mediante cromatografía líquida con detección de fluorescencia, tras la extracción de las muestras de agua mediante SPE con cartuchos Oasis HLB [3]. Se tomaron muestras de 4 puntos de muestreo: 2 en el río Guadiamar, otro en arroyo de la Rocina, cercano a la depuradora de aguas residuales, y el último en arroyo de El Partido.

Con respecto a los compuestos analizados en esta Memoria, los niveles de ácido salicílico medidos oscilaron entre 0.04 y 1.40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para las muestras tomadas en el río Guadiamar. En el punto de la Rocina los autores midieron concentraciones de hasta 2.24 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido salicílico y de hasta 2.04 $\mu\text{g L}^{-1}$ en El Partido. Solo se obtuvieron concentraciones reseñables de carbamazepina en el punto de muestreo de la Rocina, donde se llegaron a medir 1.11 $\mu\text{g L}^{-1}$. Asimismo, los autores no detectaron sulfometoxazol, al igual que en las muestras de agua analizadas en esta Tesis; no obstante, este compuesto fue detectado en especímenes de *P. clarkii* capturados en el

Ajolí en 2012. El análisis de ibuprofeno en muestras de agua de la Rocina y el Partido mostró contenidos de hasta $4.55 \mu\text{g L}^{-1}$.

Los estudios sobre la evolución temporal de principios activos farmacológicos descritos en el presente capítulo se realizaron posteriormente de los realizados por *Camacho Muñoz y cols. (2010)* y cabe destacar que el estudio presentado en la siguiente Tesis cubre un periodo de varios años, emplea una detección mucho más sensible y se complementa con el análisis de organismos vivos, como es *Procambarus clarkii* que forman parte de la fauna del Parque Natural.

Bibliografía

- [1] M. García Sevillano, M. González Fernández, R. Jara Biedma, T. García Barrera, J. López Barea, C. Pueyo, J.L. Gómez Ariza. *Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 404 (6-7) (2012) 1967-1981.
- [2] A. Torreblanca, J. Del Ramo, J. Díaz-Mayans. *Effects of cadmium on the biochemical composition of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852)*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 47 (1991) 933-938.
- [3] D. Camacho Muñoz, J. Martín, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso. *Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain)*. Journal of Hazardous Materials 183 (2010) 602-608.

Capítulo 5

Ensayos de exposición: Especímenes de Procambarus clarkii y Scrobicularia plana expuestos a flumequina, ciprofloxacina e ibuprofeno

En el presente capítulo se describen los ensayos de exposición a flumequina, ciprofloxacina e ibuprofeno al que fueron sometidos especímenes de *Procambarus clarkii* y de *Scrobicularia plana* a fin de estudiar su posible acumulación en músculo abdominal y glándula digestiva (*P. clarkii*) y en músculo (*S. plana*). Con ello se pretende conocer la respuesta de este organismo en relación a la acumulación y eliminación de ciertos contaminantes y, así, poder analizar con mayor rigor aquellos especímenes capturados en el medio ambiente para su uso como bioindicadores. Se empleó para ello la metodología puesta a punto en esta Tesis, y descrita en capítulos anteriores.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de exposición de especímenes de *P. clarkii* a dos mezclas binarias de flumequina:ibuprofeno y ciprofloxacina:ibuprofeno a una concentración de 10 mg L⁻¹ al objeto de identificar los posibles metabolitos generados en los especímenes expuestos, para su posterior búsqueda en muestras expuestas a menores niveles, ya que pudiera darse el caso de no detección de los compuestos y si de alguno de sus metabolitos, en muestras ambientales.

5.1 Ensayos de exposición

Los ensayos de exposición se llevaron a cabo en las instalaciones del Departamento de Ecología y Gestión Costera del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN) en la provincia de Cádiz. Estos experimentos se realizaron como parte de los Proyectos de Investigación CTM2012-38720-C03-00 y CTM2015-67902-C02-01 del Ministerio de Economía y Competitividad, en el que participaban investigadores de las Universidades de Córdoba, Huelva y Sevilla, así del ICMAN-CSIC.

La duración del ensayo se estableció en 38 días, distribuidos de la siguiente forma: 10 días de aclimatación y depuración de los especímenes, en los 21 días siguientes los especímenes se sometieron a un coctel de fármacos a dos concentraciones, 10 y 100 µg L⁻¹, en el agua del tanque de exposición, (preparados a partir de un stock individual de los mismos disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y, por último, 7 días de depuración a fin de poder evaluar también el proceso de eliminación de los principios activos farmacológicos en los especímenes. Los especímenes de *Procambarus clarkii* para este ensayo se capturaron en los canales de distribución de agua de los arrozales de la Laguna de La Janda (Cádiz, España). Los

especímenes de *Scrobicularia plana* se recolectaron en el Parque Natural Bahía de Cádiz (Río San Pedro, margen izquierdo).

Se establecieron cuatro grupos de exposición simultánea: **control agua**, **control DMSO** (conteniendo la misma concentración de DMSO que contienen los fármacos suministrados), **concentración 1** ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los principios activos) y **concentración 2** ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada fármaco). Hay que destacar en este punto que la realización de los dos controles toma todo su sentido teniendo en cuenta que los especímenes también fueron usados en otras metodologías (metabolómica, epigenética y epigenómica) como parte de un Proyecto de Investigación en ejecución en ese momento.

El ensayo llevado a cabo con *P. clarkii* se realizó en doce tanques de 100 L (tres tanques para cada condición de ensayo) con agua dulce exenta de cloro, con aireación constante y refugios para los especímenes consistentes en tubos de PVC de 15 cm de diámetro a fin de evitar canibalismo. Se establecieron unas condiciones de trabajo semiestáticas en las cuales el agua se renovó cada 48 horas. Se dispusieron 150 organismos con un promedio de 10 cm en cada tanque. Los ejemplares de *P. clarkii* fueron alimentados con un pienso para peces de agua dulce suministrado cada 48 horas y 3 horas antes del cambio de agua. En la figura 5.1 se muestra uno de los tanques usado en las experiencias de exposición.



Figura 5.1 Tanque usado en los ensayos de exposición de *P. clarkii*.

En el caso de *S. plana*, el ensayo se realizó en doce tanques de 100 L con agua de mar filtrada por un filtro de 0.2 μ y con una aireación constante. Se dispusieron 140 ejemplares en cada tanque. La ratio volumen agua:organismos fue de 0.4-0.5 L/organismo y se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento. Se establecieron condiciones semiestáticas con luz natural y en las cuales el agua se renovó cada 48 horas. Las coquinas de fango fueron alimentadas con un alimento para filtradores suministrado cada 48 horas en un intervalo entre 2 y 3 horas antes del cambio de agua. En la figura 5.2 se muestra uno de los tanques usados en los ensayos de exposición.



Figura 5.2. Tanque usado en los ensayos de exposición de *S. plana*.

Se realizaron muestreos periódicos de las aguas de los tanques y de los especímenes tal como se detalla a continuación. Las muestras de agua se tomaron los días 1, 3, 11, 13, 19, 21 y 22. Se conservaron a -80°C para su posterior análisis mediante el procedimiento descrito en capítulos anteriores.

Se retiraron especímenes los días 0, 1, 7, 21 y 28 de exposición. Se diseccionaron separando músculo abdominal y glándula digestiva en el caso de *P. clarkii* y músculo para el caso de *S. plana*. Las muestras se congelaron tras la disección inmediatamente empleando nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis. Las glándulas digestivas de los especímenes extraídos a cada tiempo de exposición fueron tratadas conjuntamente y, por tanto, los contenidos correspondientes se corresponden con el contenido medio del “pool”.

5.2 Resultados

A lo largo del ensayo de exposición se tomaron muestras de agua a fin de tener un control de parámetros físico-químicos y de concentración de principios activos farmacológicos a los que se encontraban expuestos los especímenes. En la tabla 5.1 se muestran los datos de parámetros físico-químicos de los ensayos de exposición. Como puede observarse, las condiciones en los tanques se mantuvieron bastante estables a lo largo del ensayo.

Tabla 5.1. Parámetros físico-químicos del agua de los tanques usados en los ensayos de exposición de *P. clarkii* y de *S.plana*.

Parámetros físico-químicos	Grupos de exposición	<i>Procambarus clarkii</i>	<i>Scrobicularia plana</i>
Temperatura (°C)	Control	17.9 ± 0.1	18.1 ± 0.3
	Control DMSO	17.9 ± 0.2	18.0 ± 0.1
	10 µg L ⁻¹	17.6 ± 0.2	17.9 ± 0.2
	100 µg L ⁻¹	17.7 ± 0.2	18.1 ± 0.1
Conductividad (µS cm ⁻¹) / Salinidad (g L ⁻¹ de NaCl) (<i>P.clarkii</i>) / (<i>S.plana</i>)	Control	475.5 ± 0.9	30.9 ± 0.1
	Control DMSO	475.6 ± 2.5	31.0 ± 0.2
	10 µg L ⁻¹	474.7 ± 3.9	31.0 ± 0.2
	100 µg L ⁻¹	481.1 ± 2.8	31.0 ± 0.3
pH	Control	8.3 ± 0.1	7.8 ± 0.1
	Control DMSO	8.3 ± 0.1	8.0 ± 0.1
	10 µg L ⁻¹	8.4 ± 0.2	8.0 ± 0.2
	100 µg L ⁻¹	8.3 ± 0.1	8.0 ± 0.1
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	Control	8.4 ± 0.1	8.5 ± 0.2
	Control DMSO	8.4 ± 0.1	8.9 ± 0.1
	10 µg L ⁻¹	8.4 ± 0.2	8.9 ± 0.1
	100 µg L ⁻¹	8.5 ± 0.4	9.0 ± 0.1

Para evaluar si la concentración de los principios activos farmacológicos se mantuvo constante durante el ensayo de exposición, las muestras de aguas se microfiltraron (0.2 µm) y se midieron en las condiciones descritas en el apartado 3.3 del Capítulo 3. El análisis del agua de cada tanque, reveló que los niveles no variaban sustancialmente entre cambios de agua.

5.2.1 Grupos de exposición Control y Control DMSO

Como cabía esperar, dado que en los tanques de control el agua no contenía los principios activos farmacológicos, en las muestras de *P. clarkii* analizadas a lo largo de todos los ensayos no se detectó la presencia de ninguno de los analitos. Sin embargo, en los tanques 2 y 3 de control agua se encontró flumequina a una concentración próxima a 3 ng g^{-1} y ciprofloxacina en una concentración de 2 ng g^{-1} tras dos días de exposición a los principios activos farmacológicos. Una vez transcurridos siete días de exposición, se encontró flumequina en el tanque 3 del grupo de exposición control DMSO en valores cercanos a 2 ng g^{-1} . La presencia de esos analitos en grupos denominados control se debe a una posible contaminación en los tanques.

5.2.2 Ensayo con *Procambarus clarkii*

A lo largo del ensayo de exposición se retiraron cinco especímenes de *Procambarus clarkii* cada uno de los días indicados en el apartado 5.1 de cada uno de los tanques usados para esas condiciones. Los organismos se diseccionaron separando músculo abdominal y glándula digestiva y se midieron según el procedimiento descrito en el apartado 3.3 del Capítulo 3. En la tabla 5.2 se muestran los resultados obtenidos de los especímenes seleccionados a cada tiempo de exposición con la desviación estándar correspondiente.

Tabla 5.2. Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo abdominal de *Procambarus clarkii* durante el ensayo de exposición (Tanque 10 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
0	1	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND
1	1	12.85±1.89	9.12±1.42	5.57±1.52
		11.95±3.21	9.28±2.54	6.17±1.93
		13.89±0.63	10.09±3.36	7.33±2.17
		12.94±1.32	9.94±2.71	6.21±2.25
		11.63±2.06	11.67±3.18	6.03±1.73
	2	13.89±3.17	10.92±1.50	7.12±3.14
		13.94±1.98	12.73±3.61	7.03±2.35
		12.86±1.52	11.52±1.23	6.92±2.59
		14.61±2.84	11.39±1.53	8.14±1.06
		13.57±3.63	12.69±1.99	7.61±1.73
	3	12.27±1.45	12.92±2.38	9.25±3.61
		10.95±1.93	11.63±3.67	7.67±2.76
		12.79±2.60	11.53±3.05	9.87±2.16
		12.63±3.06	12.81±2.15	9.58±3.04
		11.47±1.54	11.48±2.73	9.22±2.48
7	1	17.12±2.52	11.73±3.17	5.45±2.31
		16.54±1.62	11.18±2.69	5.95±1.92
		16.82±3.76	12.27±2.15	6.19±1.37
		16.24±3.54	11.39±2.49	5.89±2.22
		18.16±2.75	12.16±2.36	6.02±2.19
	2	18.19±0.95	14.24±3.31	8.11±1.63
		18.49±1.05	15.03±1.32	8.52±0.94
		17.86±2.39	14.21±0.82	7.24±2.14
		18.25±2.51	14.44±1.30	6.87±1.53
		16.94±3.16	14.51±0.89	7.99±1.49
	3	19.27±1.32	17.19±1.63	8.69±2.41
		18.74±2.17	17.55±2.48	8.59±1.77
		19.61±3.41	17.33±2.19	8.57±1.63
		19.29±4.05	18.62±3.21	9.26±0.85
		19.68±4.72	17.25±3.65	9.51±2.16
21	1	23.24±0.89	16.82±2.86	12.36±1.73
		25.43±1.56	14.47±1.63	11.43±2.05
		22.14±2.23	15.82±1.98	10.28±2.15
		20.02±2.16	16.31±0.65	13.56±2.73
		24.73±3.54	15.37±1.54	14.63±3.96
	2	27.41±3.05	16.04±1.63	17.25±4.16
		23.17±2.98	17.22±2.43	18.53±1.63
		22.51±1.64	17.72±2.85	16.41±1.73
		24.33±3.49	16.53±3.74	17.12±3.28
		23.09±3.98	16.76±4.06	15.52±1.49
	3	26.21±4.05	14.35±3.25	14.58±1.53
		24.26±2.61	15.79±3.96	16.13±2.54
		23.11±3.71	16.53±4.72	14.65±3.65
		24.26±1.70	15.48±2.64	14.56±4.16
		27.54±2.58	14.25±2.51	14.84±3.21

ND: No detectado

Tabla 5.2 (continuación). Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo abdominal de *Procambarus clarkii* durante el ensayo de exposición (Tanque 10 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
28	1	12.21±1.43	13.06±2.55	8.17±0.94
		13.27±0.69	14.87±2.86	9.45±2.38
		14.01±2.34	15.15±1.76	8.27±3.67
		12.53±2.65	13.64±1.94	9.28±2.87
		14.41±3.17	13.41±1.99	8.84±3.41
	2	14.39±2.98	12.28±2.15	10.29±3.19
		14.28±3.15	11.16±3.49	9.98±4.02
		16.72±4.07	12.34±3.31	11.26±4.72
		15.08±4.78	11.83±3.79	9.84±3.41
		14.72±2.85	12.09±4.17	11.63±2.56
	3	13.38±2.39	12.28±4.45	12.06±2.73
		14.35±1.53	12.91±3.82	10.11±2.86
		14.59±1.34	13.07±1.56	11.02±2.97
		14.32±1.75	11.93±1.34	12.35±2.31
		14.26±2.83	11.61±2.36	11.28±3.76

Se aprecia que tras un día de exposición a un nivel de 10 µg L⁻¹, se produce una acumulación de los analitos en el músculo abdominal de entre 10 y 14 µg g⁻¹ para flumequina, de 10-13 µg g⁻¹ para ciprofloxacina y en el rango de 6-10 µg g⁻¹ para ibuprofeno. La acumulación de FMQ y CPR aumenta sustancialmente a los 7 días, no así la de IBU, y a los 21 días se constata que la acumulación de FMQ casi se mantiene y aumentan las de CPR e IBU. Tras 7 días de depuración, los especímenes mantienen niveles de acumulación, en todos los fármacos, del orden de los valores tras 7 días de ensayo o ligeramente superiores.

Representando estos resultados agrupados por principios farmacológicos, la figura 5.1 muestra como la acumulación de flumequina en el músculo abdominal de *P. clarkii* presenta muy poca variación en lo que respecta a los tres tanques. De la figura 5.2 se deduce que hay una inversión del máximo de concentración de ciprofloxacina acumulada en el tejido en el tanque 3 en comparación con los dos otros tanques, es decir, esa concentración es máxima tras haber transcurrido siete días del ensayo de exposición, mientras que para el tanque 1 y 2 es a los veintidós días. Por último, cabe destacar que tal y como se aprecia en la figura 5.3, para el ibuprofeno se produce una mayor acumulación en los especímenes del tanque 2.

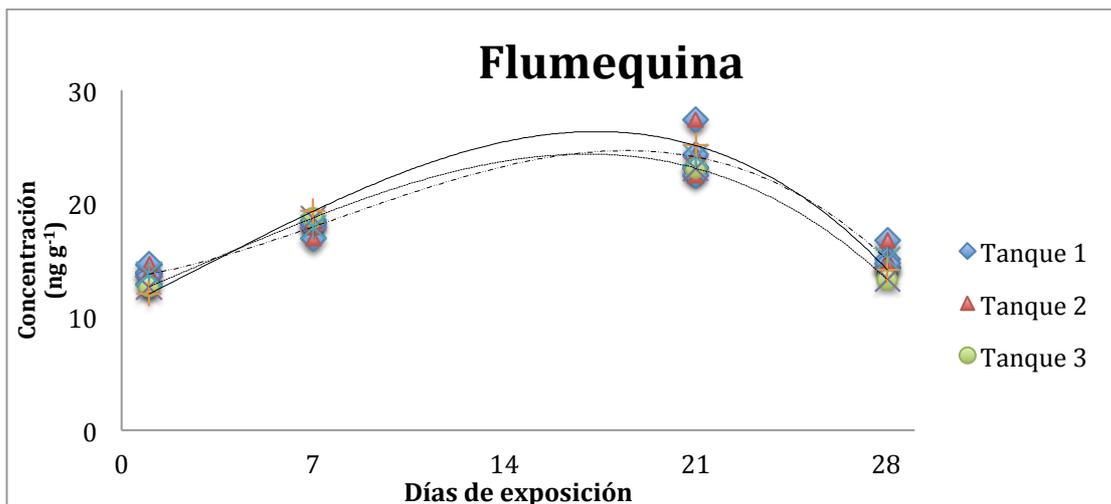


Figura 5.1. Evolución de la concentración de flumequina acumulada en músculo abdominal de *P.clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

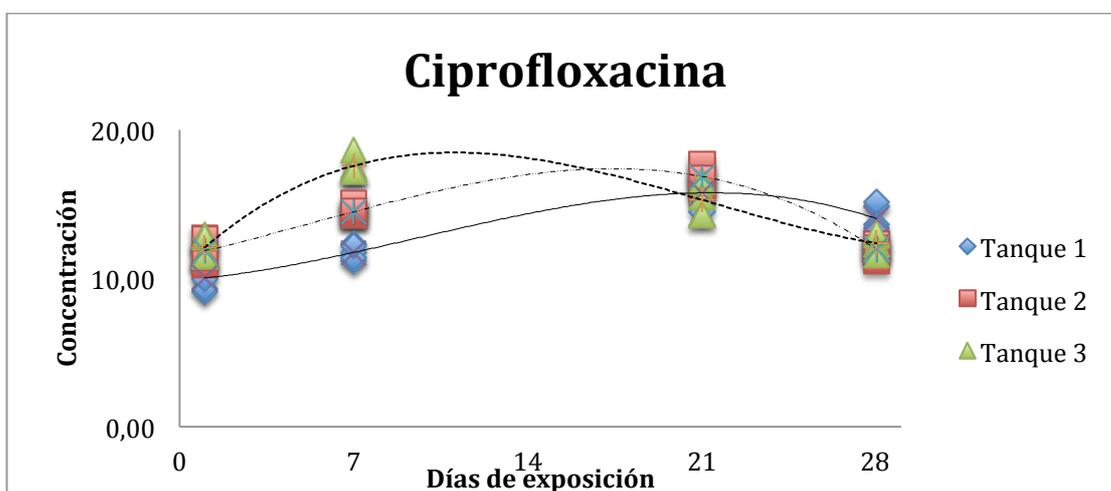


Figura 5.2. Evolución de concentración de ciprofloxacina acumulada en músculo abdominal de *P.clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

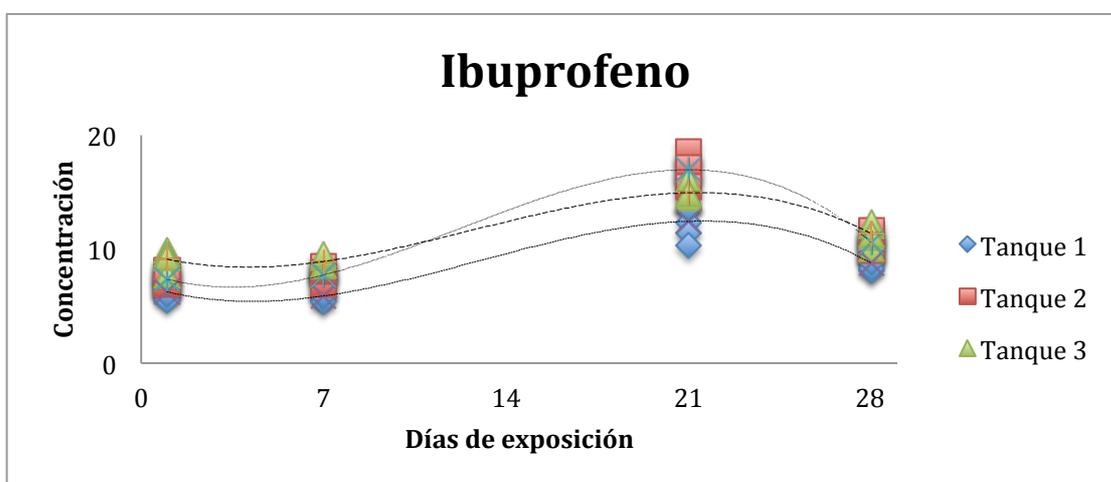


Figura 5.3. Evolución de la concentración de ibuprofeno acumulada en músculo abdominal de *P.clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Las figuras 5.1 a 5.3 ponen de manifiesto que los organismos expuestos presentan comportamientos homogéneos en cuanto a acumulación se refiere, sin embargo, las tendencias de acumulación son dependientes del principio activo suministrado, lo cual podría estar muy relacionado con el carácter lipídico de los mismos así como con la capacidad del organismo de metabolizar dicho compuesto y por supuesto con el estado de salud de estos después de la exposición.

Las muestras de glándula digestiva (“pools” de los 5 especímenes) se midieron según el procedimiento descrito en el apartado 3.3 de Capítulo 3. En la tabla 5.3 se muestran los resultados de acumulación en el ensayo de exposición, y en las figuras 5.4 a 5.6 se representan esos valores en función del principio activo para una mejor visualización.

Tabla 5.3. Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en glándula digestiva de *Procambarus clarkii* durante el ensayo de exposición (Tanque 10 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
0	1	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND
1	1	12.65±2.42	10.02±2.34	6.26±3.52
	2	13.77±3.89	11.85±2.76	7.36±3.61
	3	12.02±1.98	12.07±1.56	9.12±3.98
7	1	16.98±2.49	11.75±0.95	5.92±1.65
	2	17.95±3.14	14.49±2.43	7.75±1.30
	3	19.32±1.99	17.59±3.65	8.92±1.54
21	1	23.11±1.76	15.76±4.09	12.45±2.15
	2	24.15±2.21	16.86±3.87	16.97±2.63
	3	25.22±2.75	15.28±3.31	14.95±3.95
28	1	13.29±3.06	14.03±2.65	8.83±2.34
	2	15.04±2.51	11.94±2.98	10.60±2.12
	3	14.18±3.18	12.36±1.87	11.36±4.76

ND: No detectado

Los niveles de acumulación de flumequina, ciprofloxacina e ibuprofeno en glándula digestiva de *Procambarus clarkii* son similares a los de músculo abdominal. De nuevo se constata los elevados niveles que persisten tras siete días de la conclusión del ensayo de exposición. El comportamiento en todos los tanques es muy similar, y solo cabe destacar una mayor acumulación de CPR en el tanque 3 al comienzo del ensayo.

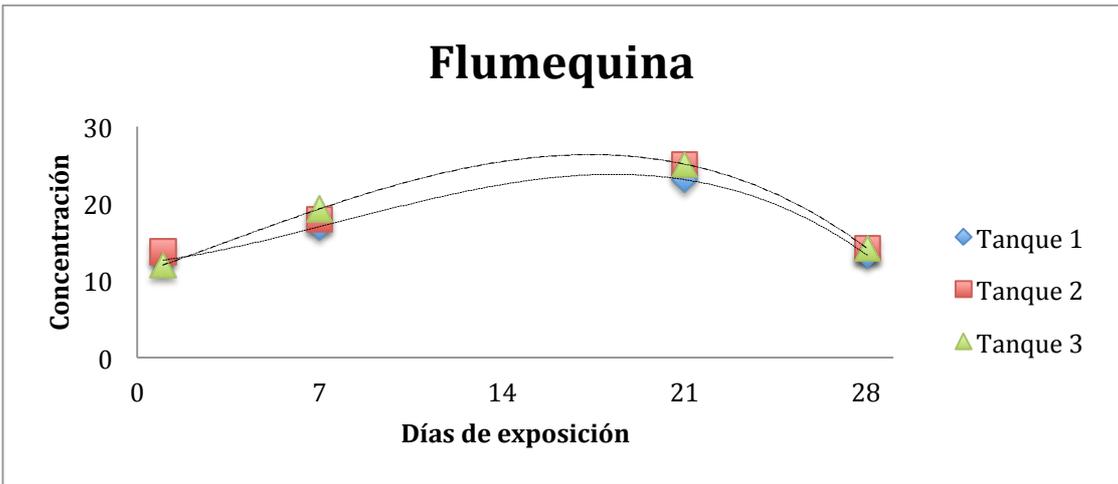


Figura 5.4. Evolución de la concentración de flumequina acumulada en glándula digestiva de *P. clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

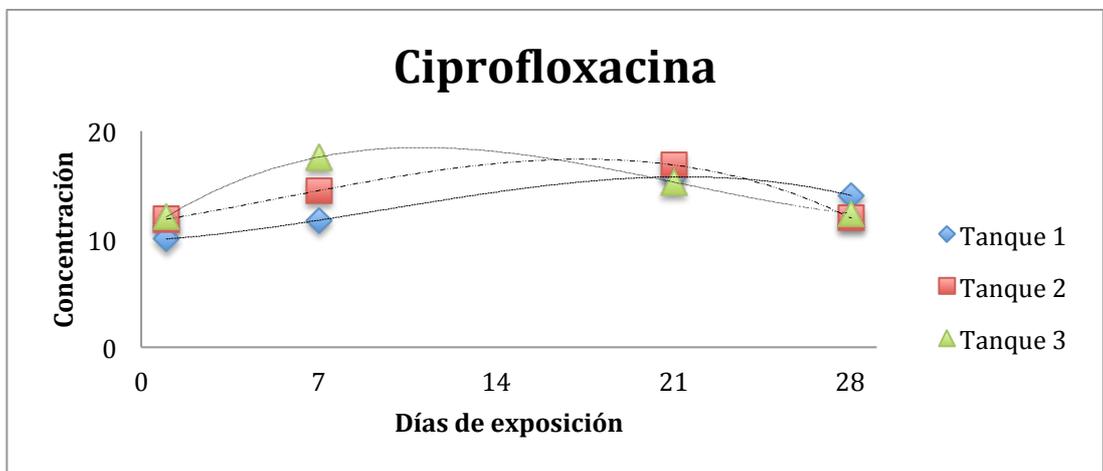


Figura 5.5. Evolución de la concentración de ciprofloxacina acumulada en glándula digestiva de *P. clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

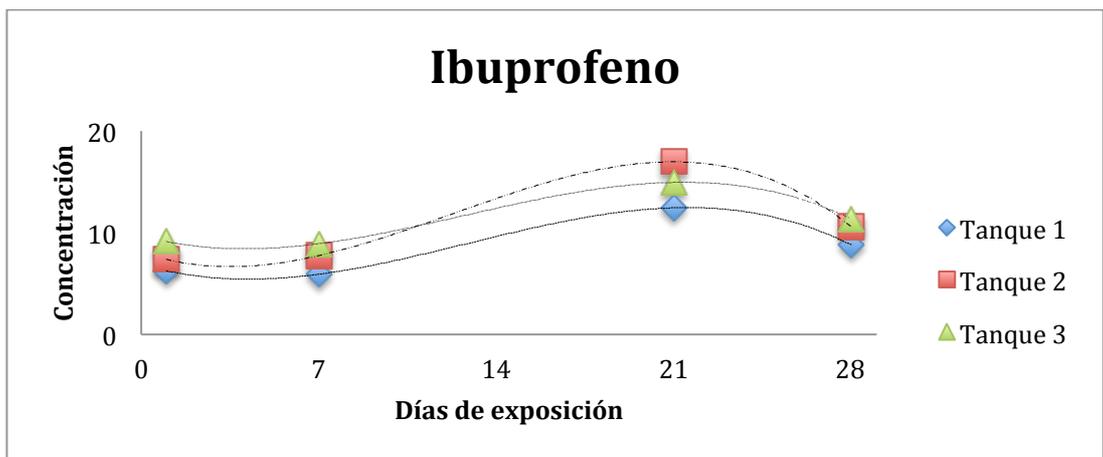


Figura 5.6. Evolución de la concentración de ibuprofeno acumulada en glándula digestiva de *P. clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Para llevar a cabo la determinación de los principios activos farmacológicos en el tanque de concentración de 100 µg L⁻¹ se siguió la metodología ya descrita para el tanque de menor concentración. En la tabla 5.4 se muestran los valores correspondientes a cada uno de los tanques con sus correspondientes desviaciones estándar.

Tabla 5.4. Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo abdominal de *Procambarus clarkii* durante el ensayo de exposición (Tanque 100 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
0	1	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND
1	1	82.54±4.76	63.73±3.73	41.32±4.03
		71.29±5.12	64.95±5.47	50.92±5.76
		73.18±6.54	63.41±3.46	43.87±6.31
		74.15±2.45	71.72±5.98	44.77±4.43
		81.27±6.73	66.84±5.76	52.19±4.51
	2	80.39±5.52	62.55±4.49	49.87±6.03
		72.74±4.76	74.63±5.32	53.16±5.92
		78.32±3.87	68.63±5.97	46.31±6.09
		79.43±4.45	69.81±6.74	42.94±6.63
		80.73±4.87	61.52±6.98	41.62±6.51
	3	82.18±5.61	67.99±7.53	53.65±6.32
		81.42±5.98	68.81±8.12	46.72±7.14
		75.22±6.18	62.86±3.42	41.98±7.85
		78.23±6.74	60.68±5.53	52.37±8.95
		80.09±7.03	63.44±4.43	55.55±4.23
7	1	148.15±3.98	99.51±2.44	127.73±7.71
		151.92±2.43	104.07±3.76	135.62±8.96
		163.53±3.28	103.62±2.95	142.09±9.12
		141.28±3.59	99.28±2.99	129.26±6.14
		157.92±4.51	106.81±3.06	139.94±5.43
	2	150.73±5.06	102.19±4.65	137.52±5.32
		163.51±5.74	106.83±4.76	128.64±4.98
		158.32±5.98	105.31±5.17	134.61±4.38
		169.27±6.17	99.89±3.14	121.05±12.06
		158.73±6.54	104.17±3.21	136.75±9.53
	3	142.63±7.12	99.87±4.52	143.54±8.65
		158.72±3.45	100.17±5.73	123.49±8.04
		163.83±3.98	105.50±5.31	129.74±7.99
		149.94±4.29	104.82±6.32	138.51±7.65
		160.73±5.32	103.27±2.98	135.07±7.53

Tabla 5.4 (continuación). Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo abdominal de *Procambarus clarkii* durante el ensayo de exposición (Tanque 100 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
21	1	205.34±4.73	157.32±5.64	178.73±7.09
		197.32±5.67	159.06±6.98	179.07±8.12
		203.72±6.61	160.20±9.90	178.15±7.43
		199.06±7.89	158.31±9.87	177.34±5.49
		204.49±8.92	157.35±8.56	179.24±5.67
	2	215.83±4.65	159.07±8.13	176.84±9.90
		203.94±7.54	157.09±8.96	182.51±9.03
		199.73±7.73	160.43±8.16	179.95±10.06
		208.85±6.15	158.17±8.54	184.18±11.32
		204.61±6.98	162.01±7.75	178.37±9.64
	3	203.82±7.52	159.85±7.32	179.08±9.99
		205.31±4.54	158.22±8.17	181.51±10.54
		204.78±6.17	160.25±8.65	180.47±11.51
		202.94±6.90	162.96±9.06	179.33±12.36
		204.16±7.89	159.51±9.98	178.16±13.09
28	1	106.31±4.18	79.42±7.54	83.14±9.45
		107.13±5.34	79.64±6.93	84.95±8.74
		110.65±5.52	79.54±7.75	83.31±8.98
		109.47±6.08	81.22±8.03	85.23±9.38
		111.18±7.31	82.31±8.83	86.17±9.76
	2	106.71±7.74	82.71±9.04	87.76±10.06
		105.43±6.89	84.60±10.05	87.16±11.23
		104.35±9.76	85.09±6.54	88.06±13.42
		103.12±9.99	84.13±7.66	87.03±12.96
		104.34±7.42	85.31±7.86	87.21±8.97
	3	114.16±6.75	84.17±7.05	90.16±7.56
		112.32±7.06	86.49±7.13	91.32±8.64
		115.05±7.70	85.32±7.54	92.64±9.43
		112.48±7.82	85.16±7.32	89.78±9.90
		113.62±9.15	85.09±9.76	91.71±8.54

Se puede observar que tras un día de exposición se produce una acumulación de flumequina que oscila entre 70-83 ng g⁻¹, de ciprofloxacina entre 60-69 ng g⁻¹ y entre 40 y 55 ng g⁻¹ para ibuprofeno. Esa acumulación se va aumentando de forma similar para los tres fármacos alcanzando mayor acumulación tras veintiún días de exposición. Una vez transcurridos los siete días de depuración, se observa que hay una acumulación cercana a 110 ng g⁻¹ para flumequina, para ciprofloxacina es de 86 ng g⁻¹ y de 92 ng g⁻¹ para ibuprofeno.

La figura 5.7 muestra como la acumulación de flumequina en el músculo abdominal de *P. clarkii* presenta muy poca variación en lo que respecta a los tres tanques. De la figura 5.8 se deduce que hay una inversión del máximo de concentración

de ciprofloxacina acumulada en el tejido de los especímenes del tanque 3 en comparación con los dos otros tanques, es decir, esa concentración es máxima tras haber transcurrido siete días del ensayo de exposición, mientras que para el tanque 1 y 2 es a los veintiún días. Por último, cabe destacar que tal y como se aprecia en la figura 5.9, que se produce una mayor acumulación de ibuprofeno en los animales del tanque 2.

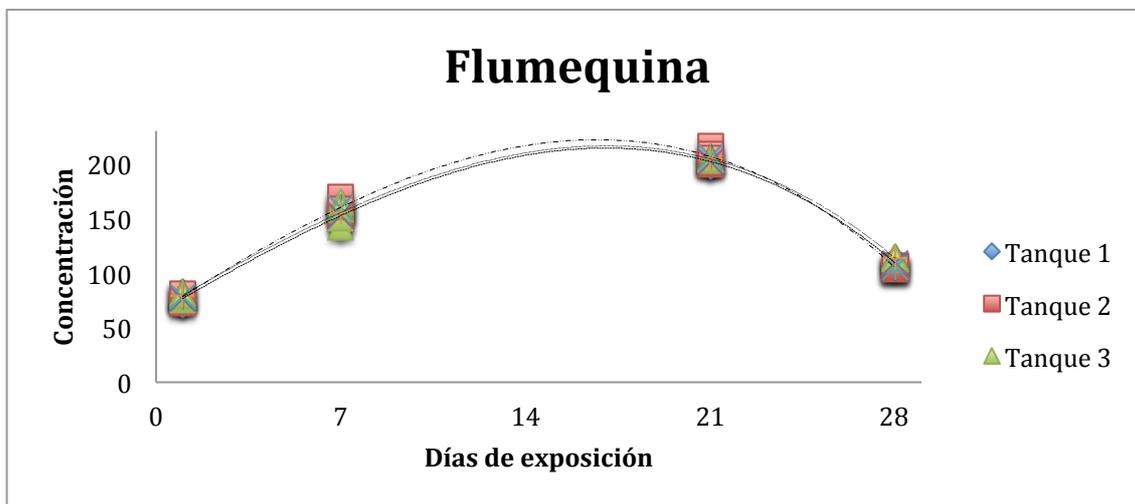


Figura 5.7. Evolución de la concentración de flumequina en músculo abdominal de *P.clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque $100 \mu\text{g L}^{-1}$)

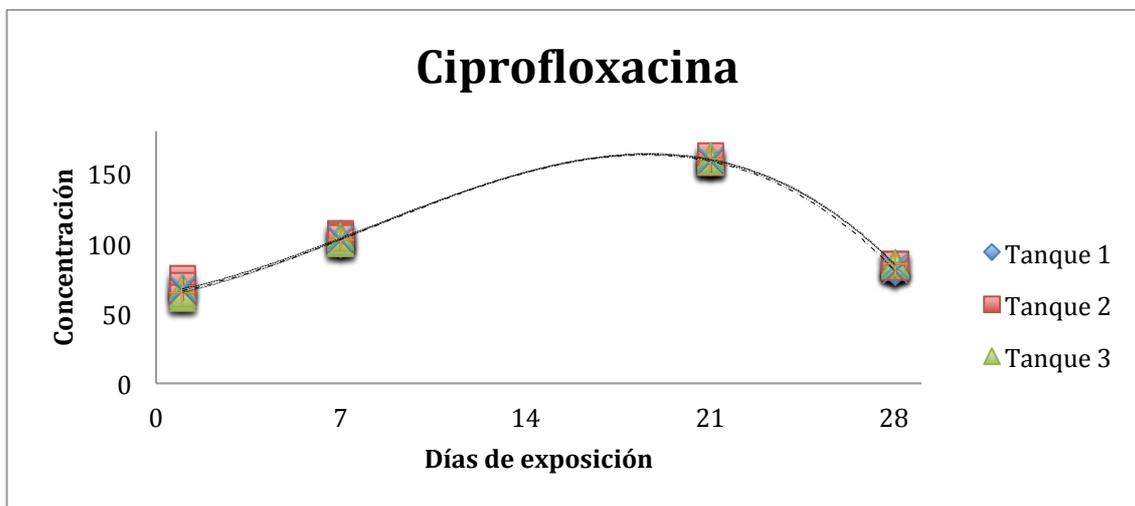


Figura 5.8. Evolución de la concentración de ciprofloxacina en músculo abdominal de *P.clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque $100 \mu\text{g L}^{-1}$).

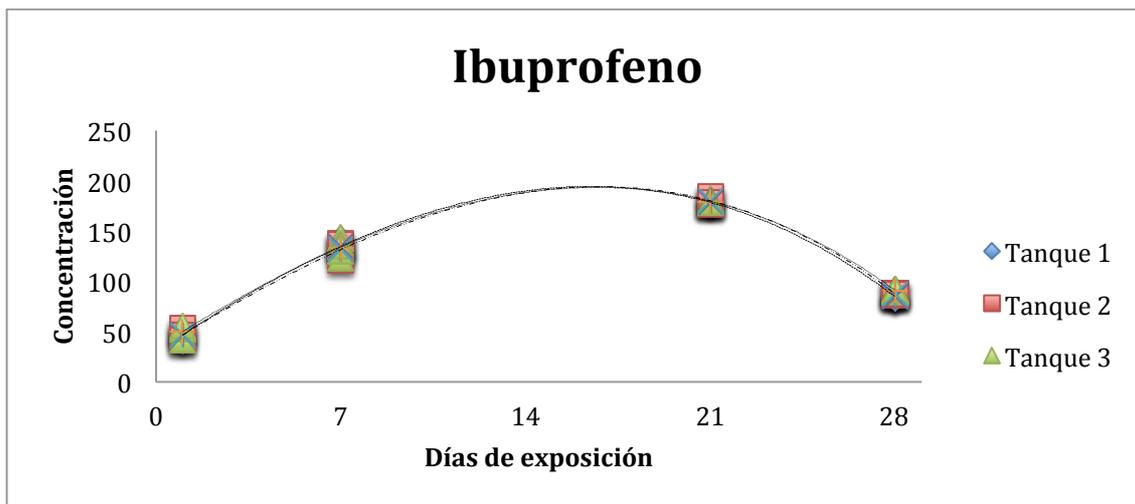


Figura 5.9. Evolución de la concentración de ibuprofeno en músculo abdominal de *P.clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque 100 $\mu\text{g L}^{-1}$)

Como puede apreciarse comparando las figuras 5.1 a 5.3 y 5.7 a 5.9, el comportamiento de acumulación en músculo abdominal de los especímenes muestra una tendencia similar en el caso de flumequina y ciprofloxacina en los dos niveles de concentración a los que se han expuestos, si bien hay que destacar una mayor dispersión en los resultados obtenidos en las muestras de los especímenes expuestos a alta concentración. Con respecto a ibuprofeno, sin embargo, las tendencias de acumulación presentan comportamientos diferentes entre bajo y alto nivel de exposición. En el caso de bajas concentraciones, este principio activo parece mantener su nivel de acumulación en músculo abdominal durante la primera semana, mientras que a altas concentraciones se aprecia claramente como los niveles de concentración encontrados muestran un aumento progresivo con los días de exposición hasta llegar a alcanzar su valor máximo a los 21 días.

Para la glándula digestiva de *Procambarus clarkii* se siguió el mismo procedimiento que para el tanque de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. En la tabla 5.5 se muestran los resultados correspondientes del ensayo de exposición a alta concentración.

Tabla 5.5. Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en glándula digestiva de *Procambarus clarkii* durante el ensayo de exposición (Tanque 100 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
0	1	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND
1	1	76.45±6.90	66.13±7.98	46.61±10.54
	2	78.32±7.49	67.43±8.05	46.78±11.34
	3	79.43±8.16	64.76±8.53	50.14±12.90
7	1	152.56±5.98	102.66±9.07	134.93±9.87
	2	160.11±7.39	103.68±8.65	131.71±10.06
	3	155.37±8.16	102.73±8.83	134.07±11.87
21	1	201.98±8.54	158.45±10.08	178.50±13.97
	2	206.59±7.31	159.35±9.49	180.37±12.06
	3	204.26±6.98	160.02±9.38	179.71±11.45
28	1	108.95±6.84	80.43±8.07	84.56±9.67
	2	104.79±9.34	84.37±7.99	87.44±10.06
	3	113.53±9.95	85.27±9.19	97.06±9.98

ND: No detectado

De la tabla 5.5 se deduce que la acumulación de los tres fármacos en la glándula digestiva es similar a la que se produce en el músculo abdominal de *P. clarkii*.

La figura 5.10 muestra como la acumulación de flumequina en el músculo abdominal de *P. clarkii* presenta muy poca variación lo que respecta a los tres tanques. De la figura 5.11 se deduce que hay una inversión del máximo de concentración de ciprofloxacina acumulada en el tejido de los animales del tanque 3 en comparación con los dos otros tanques, es decir, esa concentración es máxima tras haber transcurrido siete días del ensayo de exposición, mientras que para el tanque 1 y 2 es a los veintiún días. Por último, cabe destacar, como se aprecia en la figura 5.12, que se produce una mayor acumulación de ibuprofeno en los especímenes del tanque 2.

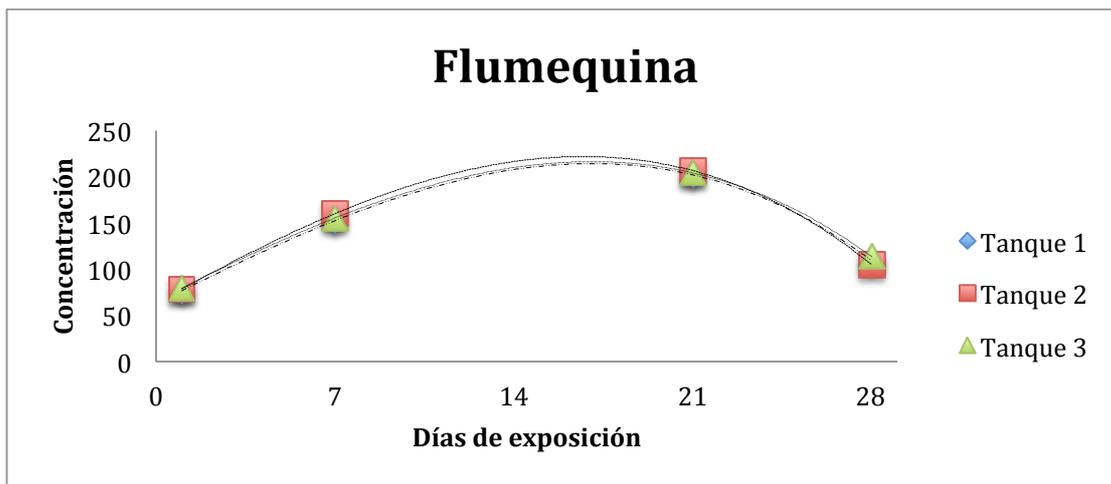


Figura 5.10. Evolución de la concentración de flumequina en glándula digestiva de *P. clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque $100 \mu\text{g L}^{-1}$).

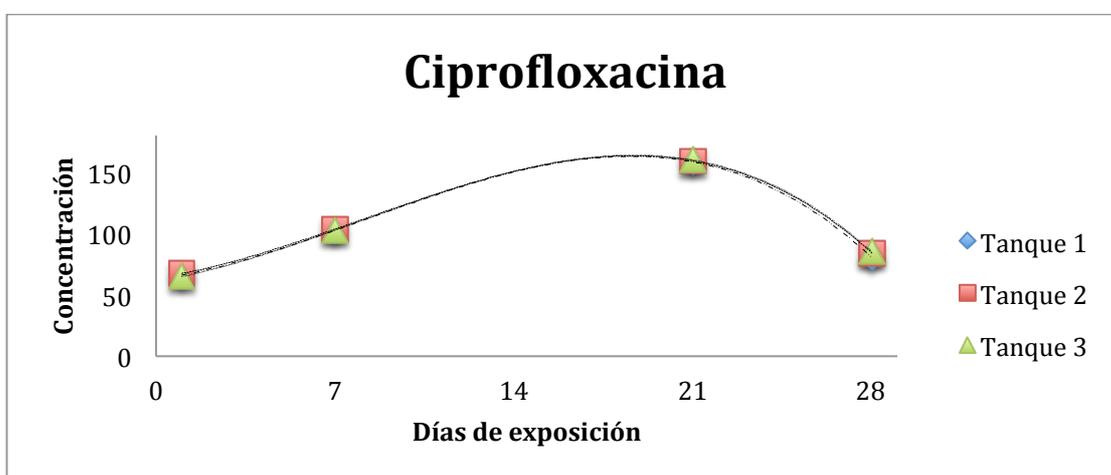


Figura 5.11. Evolución de la concentración de ciprofloxacina en glándula digestiva de *P. clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque $100 \mu\text{g L}^{-1}$).

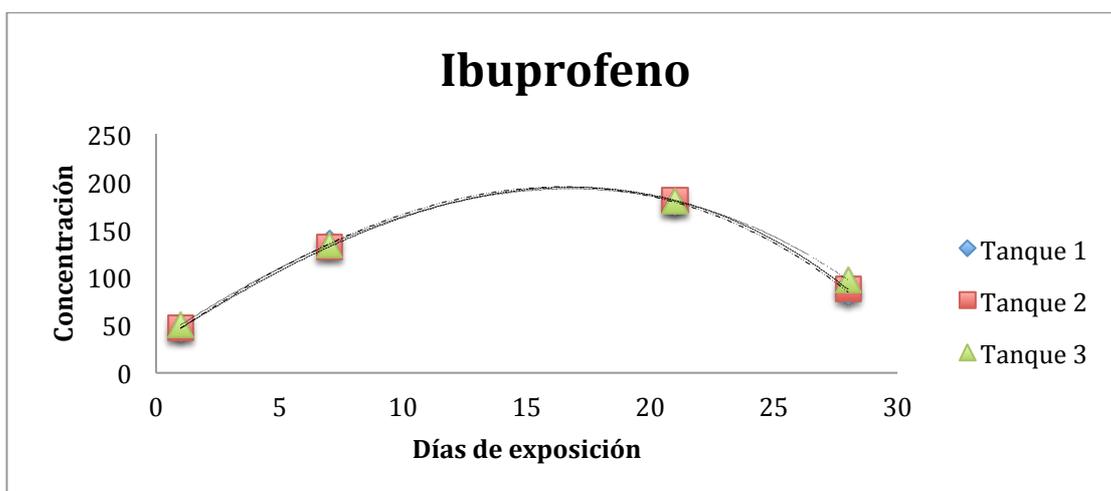


Figura 5.12. Evolución de la concentración de ibuprofeno en glándula digestiva de *P. clarkii* durante el ensayo de exposición. (Tanque $100 \mu\text{g L}^{-1}$).

Comparando las figuras 5.4 a 5.6 y 5.10 a 5.12 puede apreciarse que así como la tendencia a la acumulación en glándula digestiva, es la misma en el caso de flumequina, se aprecian ligeras variaciones en el caso de las tendencias mostradas con ciprofloxacina y de forma más acusada con ibuprofeno entre las muestras de los especímenes expuestos a alta y baja concentración de principios activos. Así pues, en el caso de ciprofloxacina, los especímenes expuestos a bajas concentraciones mantienen niveles de acumulación en glándula digestiva casi constantes, con un leve aumento a 21 días, sin embargo, los expuestos a altas concentraciones muestran un aumento progresivo en la acumulación hasta los 21 días de exposición. En el caso de ibuprofeno, a bajas concentraciones de exposición se aprecia como inicialmente se mantiene constante el nivel de acumulación, sin embargo, a altas concentraciones la tendencia muestra una acumulación mucho más elevada y progresiva con el tiempo de exposición.

5.2.3 Ensayo con *Scrobicularia plana*

Se midieron, de forma individual, (aplicando la metodología descrita en el Capítulo 3) los niveles de FMQ, CPR e IBU acumulados en diez especímenes de *Scrobicularia plana* durante el ensayo de exposición en tanques de concentración 10 µg L⁻¹. En la tabla 5.6 se muestran los valores correspondientes a cada uno de los tanques con sus correspondientes desviaciones estándar.

Tabla 5.6. Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo de *Scrobicularia plana* durante el ensayo de exposición (Tanque 10 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos			
		FMQ	CPR	IBU	
0	1	ND	ND	ND	
	2	ND	ND	ND	
	3	ND	ND	ND	
1	1	8.98±2.54	8.25±1.74	6.01±1.70	
		8.17±3.81	7.15±3.06	5.56±3.19	
		7.42±1.94	8.87±4.73	5.16±2.06	
		7.32±2.15	8.77±2.43	6.23±2.76	
		6.80±1.53	8.63±1.84	5.42±1.50	
		8.25±2.05	8.33±2.83	5.78±2.19	
		7.69±3.17	7.98±1.39	5.01±2.36	
		8.26±2.71	8.06±2.21	5.89±1.75	
		9.56±1.31	7.85±2.70	5.12±1.43	
	9.44±2.93	7.01±1.84	5.62±2.65		
	2	2	8.70±3.19	7.99±2.21	6.37±4.06
			8.56±2.23	8.55±2.05	6.85±2.70
			7.62±2.17	7.79±3.15	7.08±2.63
			8.85±3.02	7.16±2.78	6.99±3.73
			8.20±1.78	8.08±2.60	7.41±3.51
			7.60±1.92	7.83±1.30	6.05±2.98
			8.16±1.15	8.49±1.94	5.92±2.06
			9.16±2.29	8.19±2.39	7.65±1.43
			7.45±3.05	8.56±3.54	6.35±1.28
			8.56±4.17	8.42±3.79	7.02±2.06
			3	3	8.12±2.28
	8.53±1.53	8.02±3.07			7.30±2.74
	7.99±1.97	7.86±3.16			7.67±2.60
	8.62±3.06	9.12±3.43			7.66±3.06
	7.62±4.19	7.68±2.65			6.74±3.36
	9.22±3.62	8.79±2.78			7.01±4.17
	7.02±1.77	7.73±2.22			6.55±2.17
8.89±2.06	7.41±2.05	7.99±2.83			
7.35±1.50	8.27±1.93	7.75±2.90			
8.76±2.54	8.86±1.59	7.78±1.63			

Tabla 5.6 (continuación). Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo de *Scrobicularia plana* durante el ensayo de exposición (Tanque 10 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
7	1	7.42±3.24	8.52±3.25	6.54±3.72
		7.36±2.76	8.16±3.62	6.33±3.15
		8.46±4.64	8.28±3.33	6.72±2.60
		7.05±2.57	9.68±3.71	6.94±2.07
		7.68±2.78	7.81±2.96	7.36±3.55
		7.10±3.75	8.67±2.06	6.91±3.19
		7.41±1.62	8.45±3.19	6.65±2.43
		8.32±1.90	8.91±2.39	6.83±2.66
		7.77±1.59	8.52±2.65	6.98±2.95
		7.54±2.66	8.48±1.69	6.32±3.18
	2	8.10±4.19	7.99±2.18	7.66±1.76
		7.99±3.34	8.04±2.60	7.28±2.63
		6.39±3.87	7.36±2.76	7.90±2.33
		6.84±3.60	8.25±2.15	8.01±3.51
		8.36±3.27	7.45±3.21	7.55±3.27
		7.54±2.29	7.39±3.18	7.64±3.10
		7.20±2.65	7.24±3.61	7.16±2.81
		6.91±2.19	7.50±2.54	7.28±2.24
		7.33±1.98	7.86±2.19	7.62±2.47
		8.04±1.40	7.67±2.77	7.52±3.22
	3	9.69±2.02	8.41±3.56	7.75±2.71
		8.32±3.11	7.22±3.41	8.62±3.47
		8.96±3.61	8.79±2.89	7.21±3.59
		8.77±2.94	8.54±2.46	7.25±2.46
		8.67±3.21	8.13±2.24	7.66±3.24
		8.91±2.78	8.41±3.31	7.83±2.89
		8.75±2.34	8.29±3.64	7.44±3.28
		8.56±3.38	8.44±3.30	7.99±3.81
8.62±3.95	7.87±1.81	7.98±1.93		
	8.40±3.89	7.79±3.32	7.80±3.40	

Tabla 5.6 (continuación). Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo de *Scrobicularia plana* durante el ensayo de exposición (Tanque 10 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
21	1	7.68±3.48	6.45±3.33	7.05±4.18
		7.96±3.11	6.65±3.06	6.21±3.22
		6.41±2.35	7.12±3.10	6.35±3.26
		7.35±2.98	7.00±2.49	6.93±2.10
		6.47±3.89	7.41±3.71	7.16±3.42
		7.26±2.62	7.56±3.47	6.87±3.71
		NM	NM	NM
		NM	NM	NM
		7.84±2.48	7.69±3.96	6.85±2.67
		7.35±3.12	6.84±3.08	6.58±3.76
	2	7.85±3.39	7.42±3.16	7.46±2.88
		7.77±3.80	7.55±2.96	6.39±2.90
		7.70±2.65	7.46±3.37	7.39±2.51
		7.32±3.23	7.96±2.87	6.75±3.34
		7.26±2.44	7.18±3.76	7.09±3.71
		7.72±2.39	7.59±3.91	7.04±3.60
		7.40±3.59	7.38±2.99	6.88±4.01
		7.56±3.84	7.23±3.91	7.25±3.23
		7.59±3.27	7.34±2.80	7.15±3.65
		NM	NM	NM
	3	8.20±3.80	6.99±3.47	6.93±2.99
8.84±3.31		7.72±2.98	6.14±3.06	
9.02±3.45		7.36±2.99	6.51±3.78	
NM		NM	NM	
NM		NM	NM	
8.37±3.19		7.50±3.17	6.38±3.32	
8.26±2.93		7.39±2.90	6.48±2.16	
8.35±3.70	7.64±3.76	6.30±1.74		
8.54±3.97	7.88±3.91	6.10±2.50		
8.61±4.53	6.92±3.82	7.16±4.08		

NM: No medido.

Tabla 5.6 (continuación). Concentración (ng g^{-1}) de los analitos en músculo de *Scrobicularia plana* durante el ensayo de exposición (Tanque $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos			
		FMQ	CPR	IBU	
28	1	4.23±3.56	4.36±4.19	3.74±3.87	
		4.89±4.08	3.76±3.96	3.03±3.41	
		3.95±4.19	3.88±2.76	3.79±3.66	
		3.02±3.87	3.98±2.21	3.75±2.70	
		4.19±3.50	4.15±1.90	3.18±2.75	
		4.76±2.95	3.89±4.51	3.33±3.27	
		NM	NM	NM	
		NM	NM	NM	
		4.95±3.43	4.76±3.32	3.66±3.61	
		5.36±3.91	4.97±3.17	3.88±3.33	
		2	3.89±2.19	3.75±3.10	3.46±3.71
			4.82±2.86	4.36±2.26	3.35±2.90
			4.34±3.07	4.06±3.07	3.26±2.98
			4.23±3.19	3.59±3.43	3.10±2.17
	3.88±2.27		3.35±2.56	3.99±3.61	
	3.98±3.10		3.72±3.74	3.49±3.65	
	4.71±3.76		3.61±3.07	3.67±3.40	
	4.86±3.99		3.46±2.18	3.96±3.97	
	4.36±3.71		3.21±2.95	3.78±3.21	
	4.59±2.40		3.76±2.22	3.65±2.99	
	3		5.03±2.19	3.93±2.91	4.12±3.15
			4.71±3.21	4.65±2.76	3.84±2.75
			5.13±3.06	3.88±2.50	3.36±2.29
			5.06±3.18	4.36±2.43	4.23±3.41
		4.95±2.21	4.41±3.15	3.80±3.76	
		4.68±2.04	4.28±3.73	3.45±3.54	
		77±1.98	4.41±3.98	3.75±3.77	
		4.50±3.94	4.50±3.04	3.55±3.91	
5.00±3.17		4.32±3.38	3.64±3.21		
4.66±3.85		4.47±3.17	3.79±2.94		

NM: No medido

En la tabla 5.6 se observa que tras un día de exposición a un nivel de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, se produce una acumulación de los analitos en el músculo de los especímenes de entre 7 y 10 ng g^{-1} para flumequina, de $7-9 \text{ ng g}^{-1}$ para ciprofloxacina y en el rango de $5-7 \text{ ng g}^{-1}$ para ibuprofeno. Esta acumulación es inferior a la observada en músculo abdominal de *P.clarkii* al mismo nivel de exposición. La acumulación de FMQ, CPR e IBU es similar durante los diecinueve días siguientes. Tras 7 días de depuración, los especímenes mantienen niveles de acumulación, en todos los fármacos, oscilando valores entre $4-5 \text{ ng g}^{-1}$ para flumequina y entre $3-4 \text{ ng g}^{-1}$ ciprofloxacina e ibuprofeno.

La figura 5.13 muestra como la acumulación de flumequina en el músculo de *S.plana* es similar para el tanque 1 y el 2 mientras que en el tanque 3 la acumulación aumenta tras siete días de exposición. La misma variación se produce para los tres tanques de ciprofloxacina. Por último, cabe destacar, como se aprecia en la figura 5.15, que la acumulación de ibuprofeno para los tres tanques es similar.

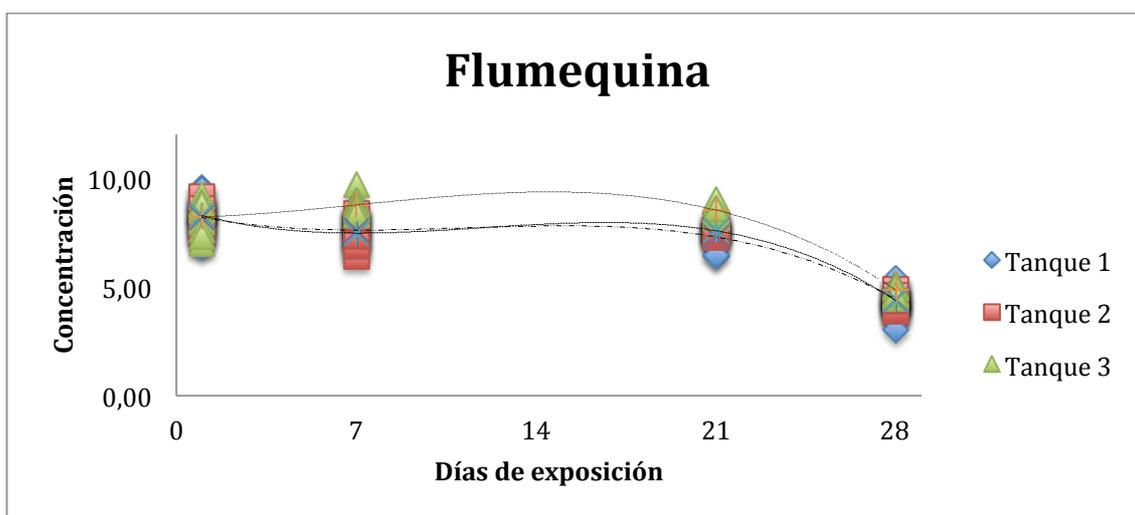


Figura 5.13. Evolución de la acumulación de flumequina en músculo de *S.plana* durante el ensayo de exposición. (Tanque $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

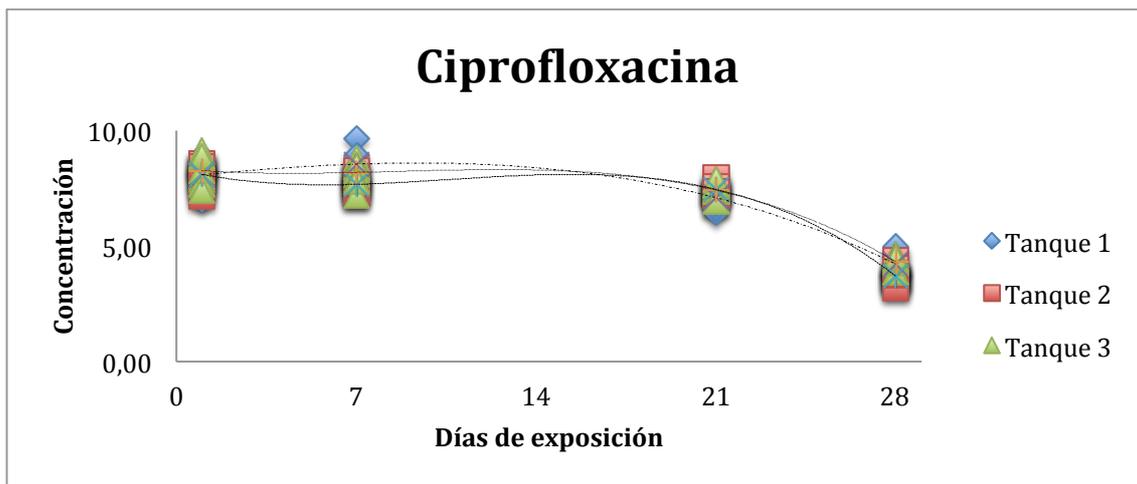


Figura 5.14. Evolución de la acumulación de ciprofloxacina en músculo de *S.plana* durante el ensayo de exposición. (Tanque $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

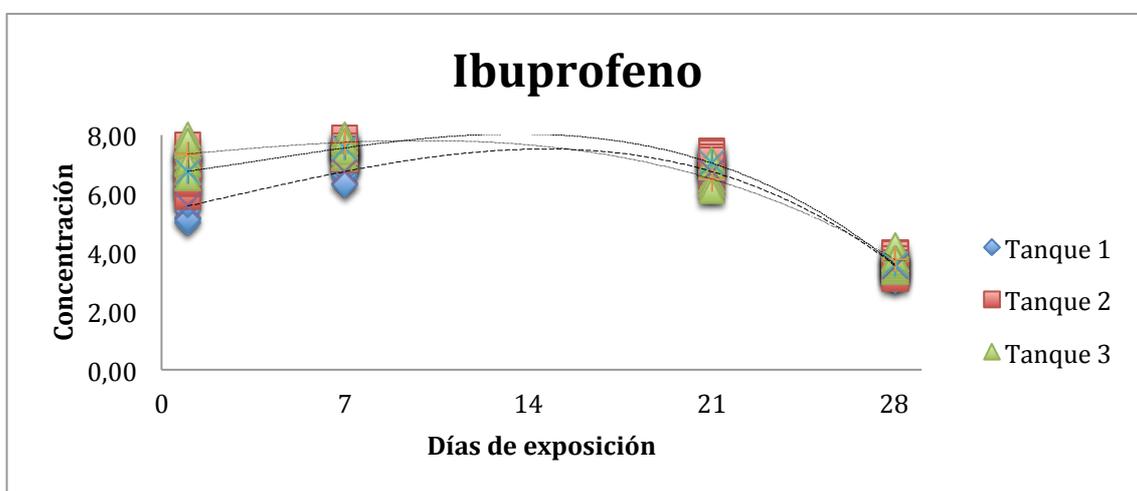


Figura 5.15. Evolución de la acumulación de ibuprofeno en músculo de *S.plana* durante el ensayo de exposición. (Tanque $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

En lo que respecta a los especímenes de *S.plana* expuestos a un nivel de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, en la tabla 5.7 se muestran los valores de concentración correspondientes a diez muestras individuales para cada uno de los tanques con su respectiva desviación estándar.

Tabla 5.7. Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo de *Scrobicularia plana* durante el ensayo de exposición (Tanque 100 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos			
		FMQ	CPR	IBU	
0	1	ND	ND	ND	
	2	ND	ND	ND	
	3	ND	ND	ND	
1	1	89.03±4.88	87.90±9.57	78.24±8.18	
		87.54±9.14	76.36±8.09	73.59±7.55	
		79.93±8.59	84.81±8.14	68.90±10.21	
		80.43±7.28	78.36±6.59	59.70±3.05	
		85.63±6.77	82.69±7.82	79.90±4.64	
		81.05±8.29	84.65±8.18	75.42±5.97	
		90.30±8.19	84.21±8.03	67.90±4.99	
		95.60±7.80	89.45±7.31	76.54±8.54	
		85.59±7.55	83.75±9.96	78.18±6.71	
		79.93±8.71	78.03±8.25	78.90±3.76	
	2	73.72±4.53	65.33±0.19	55.23±7.50	
		79.29±3.97	68.81±3.28	64.51±3.93	
		61.93±3.05	74.29±3.31	60.03±3.38	
		86.00±4.52	69.56±6.67	52.31±5.01	
		56.45±4.67	61.23±4.89	59.68±2.57	
		69.23±4.64	72.60±5.27	59.46±2.91	
		69.95±0.54	65.41±5.31	66.23±4.99	
		78.89±4.01	76.54±6.39	60.49±2.79	
		73.90±3.47	75.87±6.87	63.33±4.16	
		65.46±2.57	65.21±4.87	57.97±3.47	
		3	89.04±6.81	80.03±6.16	78.21±9.13
			72.10±5.71	79.02±5.61	77.15±6.66
			83.05±9.15	74.30±6.51	77.83±8.31
			70.36±0.09	78.23±4.47	80.02±4.84
			75.45±6.03	80.12±7.41	76.52±5.11
			90.26±1.67	75.32±5.95	79.28±5.14
			78.56±2.29	76.55±9.06	77.35±5.54
83.47±3.72	77.12±5.09		77.12±6.67		
82.66±9.55	78.69±4.97		78.62±7.34		
88.95±4.47	78.41±3.91	75.26±2.04			

ND: No detectado

Tabla 5.7. Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo de *Scrobicularia plana* durante el ensayo de exposición (Tanque 100 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
7	1	76.82±3.89	78.23±5.26	65.33±6.61
		75.74±8.71	87.00±9.66	68.92±6.64
		78.15±6.03	79.56±3.62	66.49±9.42
		77.34±6.30	81.02±2.76	59.34±7.63
		77.32±8.99	88.23±5.17	58.49±8.76
		77.89±5.56	85.42±7.38	53.36±4.90
		77.09±6.02	77.58±6.70	64.32±6.96
		75.65±3.81	82.64±6.84	69.35±7.08
		74.99±6.65	78.69±5.15	69.48±5.16
		76.20±7.73	80.35±4.88	66.78±3.29
	2	83.64±9.55	82.50±7.94	77.06±5.72
		87.14±9.04	82.06±7.76	81.24±4.87
		86.54±4.47	80.67±8.07	73.98±9.04
		79.00±6.51	85.33±6.46	75.83±8.84
		78.41±7.16	84.30±5.89	80.38±9.33
		79.65±7.79	80.11±6.48	74.46±4.25
		84.65±6.88	80.27±9.22	73.89±6.72
		83.23±5.27	83.96±5.17	75.68±6.43
		88.99±5.10	83.01±7.81	81.26±1.78
		84.70±4.83	83.26±8.59	74.55±6.53
	3	84.66±8.11	80.02±6.19	71.89±8.17
		79.47±5.45	81.36±8.57	74.20±9.45
		79.90±5.89	80.99±8.69	76.23±8.27
		78.78±6.87	75.20±9.51	80.03±2.28
		85.51±6.02	80.33±9.26	72.06±11.26
		80.85±7.24	80.90±4.63	76.56±3.07
		79.10±9.26	79.42±6.31	78.91±6.15
		80.23±8.49	72.66±5.43	76.06±7.22
		81.36±4.39	75.46±5.15	80.14±6.04
		87.23±5.08	76.80±10.29	76.01±5.82

Tabla 5.7. (continuación). Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo de *Scrobicularia plana* durante el ensayo de exposición (Tanque 100 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
21	1	76.48±9.85	74.75±4.61	59.03±12.06
		78.13±4.98	75.55±5.95	57.14±8.17
		77.39±7.12	76.10±9.22	58.46±9.45
		77.25±5.57	71.36±9.58	59.24±5.43
		75.39±6.17	72.14±7.76	60.17±9.28
		75.46±7.33	73.56±8.14	60.02±6.18
		78.64±6.21	76.98±5.92	56.99±7.24
		75.03±6.03	74.23±4.87	59.15±6.87
		74.99±6.92	75.05±9.22	57.82±7.99
		77.81±5.11	75.16±7.87	57.24±6.19
	2	76.29±9.21	88.20±9.97	61.45±9.26
		84.80±8.43	81.99±9.59	68.43±9.48
		75.46±8.35	87.46±5.73	68.33±7.20
		77.23±5.63	88.26±9.53	66.99±9.11
		76.29±8.53	84.96±5.35	65.13±7.93
		85.20±4.31	84.69±6.53	60.03±6.55
		81.32±5.17	82.36±9.48	62.23±5.69
		80.16±7.83	88.32±7.80	61.40±7.41
		76.97±6.38	81.03±5.61	68.05±9.14
		83.69±7.36	83.47±4.31	67.99±8.35
	3	88.99±8.43	76.61±8.48	68.17±6.57
		87.23±7.45	86.45±9.71	69.12±9.19
		85.62±7.68	84.90±8.83	70.34±7.34
		85.46±4.40	75.94±6.35	71.23±6.26
		85.74±7.39	86.57±6.13	74.15±8.13
		88.92±5.61	84.71±5.88	73.99±7.35
		86.46±7.81	82.64±8.49	70.42±8.53
		NM	NM	NM
	NM	NM	NM	

NM: No medido.

Tabla 5.7 (continuación). Concentración (ng g⁻¹) de los analitos en músculo de *Scrobicularia plana* durante el ensayo de exposición. (Tanque 100 µg L⁻¹).

Día	Tanque	Principios activos farmacológicos		
		FMQ	CPR	IBU
28	1	40.14±5.57	41.12±9.25	30.07±5.92
		52.05±6.17	39.04±7.76	31.14±8.43
		55.23±7.33	40.12±9.87	30.65±6.44
		65.12±6.21	40.58±6.87	31.45±5.77
		49.02±6.03	43.82±6.58	39.50±5.21
		50.26±7.12	41.28±5.22	33.59±6.19
		48.65±6.92	39.99±4.92	30.23±9.87
		39.35±8.14	43.19±6.87	30.66±6.31
		53.23±7.03	42.74±6.59	31.79±6.94
		50.11±7.61	41.26±7.17	39.44±6.41
	2	53.06±8.12	38.03±5.34	37.20±8.73
		48.13±6.89	40.16±7.32	31.94±9.07
		49.56±6.94	33.20±6.72	28.95±5.15
		51.26±6.57	35.46±9.06	29.33±6.74
		50.42±5.14	32.63±4.49	29.83±9.24
		53.66±7.18	37.29±5.73	32.46±6.84
		50.99±4.71	37.10±5.96	30.58±5.51
		49.24±5.42	40.56±6.20	30.26±4.18
		53.09±7.74	38.44±8.31	30.14±5.98
		54.32±7.94	38.23±7.35	36.47±6.04
	3	48.19±6.31	42.15±4.50	28.06±8.06
		46.59±7.17	38.02±5.09	30.99±7.76
		51.04±6.50	37.13±5.31	34.73±7.21
		47.89±9.47	41.64±6.49	32.84±6.51
		47.10±6.71	43.85±7.27	38.41±5.09
		47.66±5.43	40.99±5.23	38.46±4.13
		50.82±4.35	42.53±4.95	31.56±4.27
		225.50±3.13	143.20±9.16	102.65±4.95
51.33±4.16	37.36±7.32	33.38±5.31		
	51.06±8.32	44.10±6.21	33.75±6.17	

Se observa que la acumulación de los tres fármacos es similar a la de músculo abdominal de *P.clarkii* al mismo nivel de exposición, manteniéndose esa acumulación de entre 70-90 ng g⁻¹ para los tres fármacos durante los veintiún días de exposición. Tras siete días de depuración, se observa que la concentración de flumequina acumulada oscila entre 40-60 ng g⁻¹, entre 30-50 ng g⁻¹ para ciprofloxacina y entre 20-40 ng g⁻¹ para ibuprofeno. Cabe destacar que hay un resultado anómalo para los tres fármacos en el tanque tres que, corresponde al espécimen ocho y para el cual la concentración de FMQ

es de 226 ng g, para CPR es de 143 ng g y para ibuprofeno de 103 ng g, y cuyo origen se desconoce.

La figura 5.16 muestra como la acumulación de flumequina en el músculo de *S. plana* se diferencia en los días 7 y 21 de los tres tanques. La misma variación se produce para los tres tanques de ibuprofeno. Por último, cabe destacar que tal y como se aprecia en la figura 5.17, la acumulación para los tres tanques es similar para ciprofloxacina.

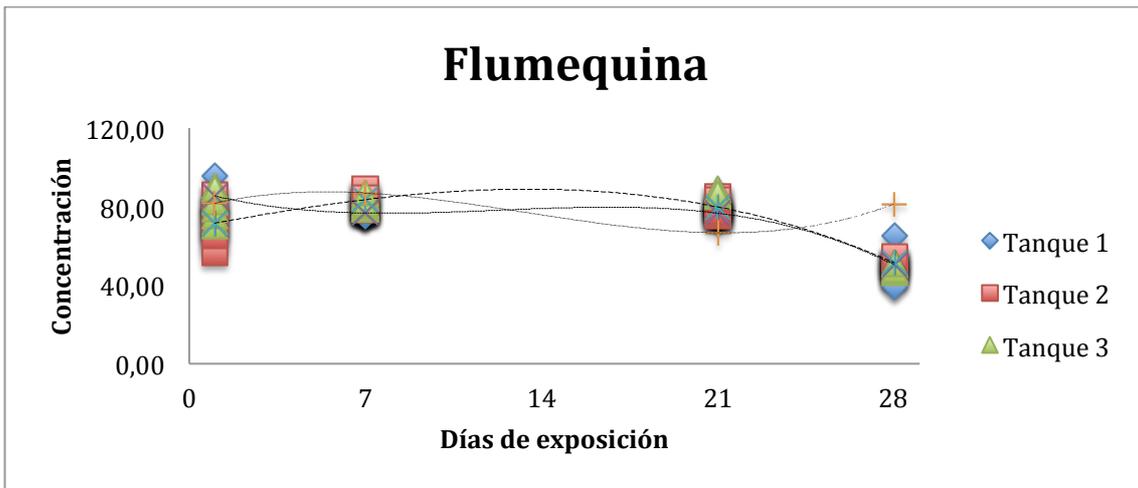


Figura 5.16. Evolución de la acumulación de flumequina en músculo de *S.plana* durante el ensayo de exposición. (Tanque 100 $\mu\text{g L}^{-1}$).

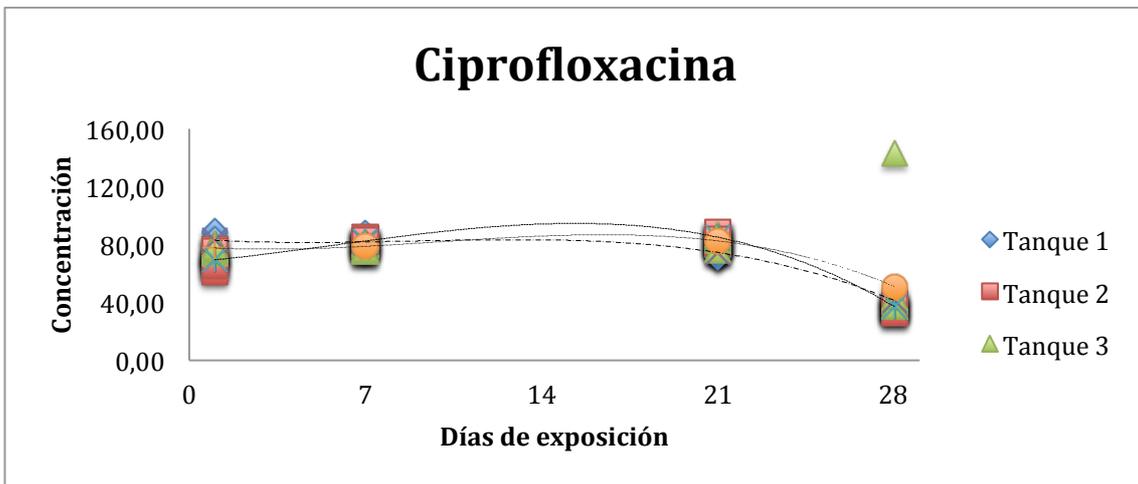


Figura 5.17. Evolución de la acumulación de ciprofloxacina en músculo de *S.plana* durante el ensayo de exposición. (Tanque 100 $\mu\text{g L}^{-1}$).

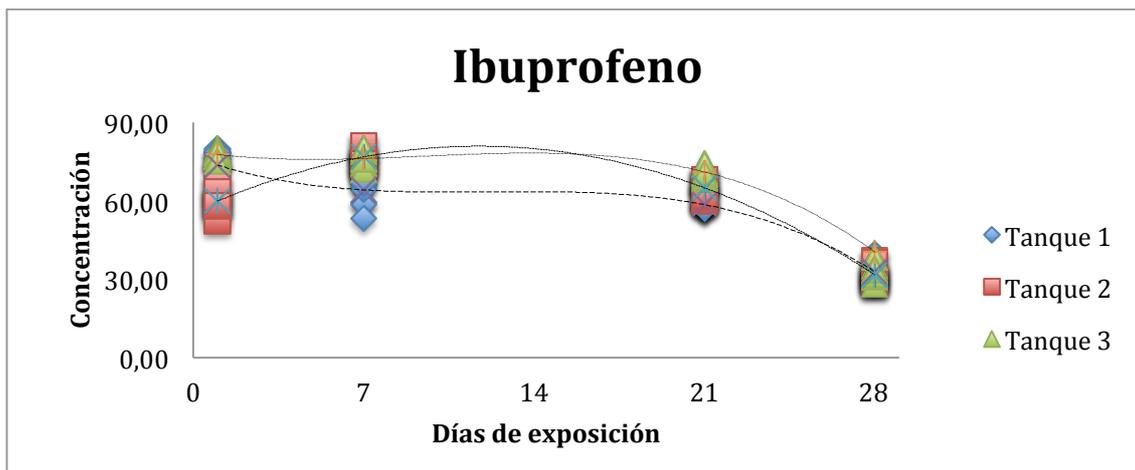


Figura 5.18. Evolución de la acumulación de ibuprofeno en músculo de *S.plana* durante el ensayo de exposición. (Tanque 100 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Comparando las figuras 5.13. a 5.15 y 5.16 a 5.18, se observa que el comportamiento de acumulación en músculo de los especímenes de *S.plana* muestra una tendencia similar en el caso de flumequina y ciprofloxacina en los dos niveles de concentración a los que se han expuestos, con unos resultados homogéneos. Con respecto a ibuprofeno, sin embargo, las tendencias de acumulación presentan comportamientos diferentes entre bajo y alto nivel de exposición. En el caso de bajas concentraciones, este principio activo alcanza el máximo de acumulación a los 21 días, mientras que para concentraciones altas, ese valor se acumula aproximadamente a los 14 días. Cabe destacar que este comportamiento solamente para los especímenes del tanque uno y tres, sin embargo, los organismos del tanque dos presentan el mismo patrón de acumulación que a concentración baja.

5.2.4 Ensayo de exposición de *Procambarus clarkii* a concentración de 10 mg L^{-1}

El uso de bioindicadores implica que si ha pasado un tiempo suficiente desde la exposición a un determinado factor (por ejemplo, la presencia de un determinado contaminante), sus efectos pueden no ser directamente constatables. En el caso que nos ocupa en esta Memoria, ha quedado demostrado el proceso de eliminación tras una exposición más o menos prolongada a ciertos principios activos farmacológicos. Es más que probable que, exposiciones menos prolongadas o intensas, en organismos presentes en el entorno ambiental objeto de estudio, no muestren la presencia de las sustancias contaminantes objeto de estudio. No obstante, los procesos metabólicos en los seres vivos pueden llevar a la formación de nuevos compuestos directamente relacionados con la sustancia original, los denominados metabolitos. La persistencia de estos metabolitos puede ser superior que la de los compuestos iniciales y, por tanto, permitiría

constatar la anterior presencia del contaminante aun cuando no fuese detectado como tal en el organismo bioindicador.

Por todo ello, se diseñó un ensayo preliminar, a escala de laboratorio muy reducida, sometiendo especímenes de *P. clarkii* a la exposición de “cócteles” binarios de flumequina, ciprofloxacina e ibuprofeno de concentraciones relativamente altas, a fin de poder detectar fácilmente los posibles metabolitos tras el proceso final de depuración tras el ensayo. Simultáneamente, con este ensayo se pretendía constatar la metabolización de los principios farmacológicos usados, por parte de los especímenes de *P. clarkii*.

Tras el estudio y análisis de los resultados obtenidos en este ensayo preliminar, está previsto profundizar en este tema realizando los correspondientes análisis e identificación de posibles metabolitos en todas las muestras procedentes de los ensayos de exposición descritos en los apartados anteriores, lo que constituirá una nueva y novedosa línea de investigación que se desarrollará en los próximos años.

Los ensayos de exposición se realizaron sobre especímenes de *P. clarkii* capturados en el Parque Nacional de Doñana. La duración de ensayo fue de 50 días de los cuales 10 días fueron de aclimatación y depuración, 30 de exposición y los últimos 10 días de depuración tras la exposición a los principios activos.

Transcurridos los 10 días de aclimatación, se sustituyó el agua de los estanques por agua fortificada a 10 mg L⁻¹ en cada uno de los analitos de mezclas binarias (ibuprofeno:flumequina, ibuprofeno:ciprofloxacina). El agua de los estanques fue renovada cada cuatro días con nueva disolución conteniendo los principios activos en la concentración anteriormente indicada.

El ensayo se realizó sobre un total de 10 especímenes, de los cuales 6 se dejaron en el tanque de aclimatación (blanco), otros 2 en el tanque que contenía la mezcla binaria ibuprofeno:flumequina y los otros 2 en el tanque de la mezcla binaria de ibuprofeno:ciprofloxacina.

Una vez completados los ensayos de exposición, tras los diez días de depuración posteriores, se procedió a la disección y posterior extracción de los ejemplares tal como ya ha sido descrito previamente y se procedió a evaluar la acumulación de los analitos ensayados, así como un análisis dirigido en los extractos procedentes de músculo buscando los principales metabolitos descritos en la bibliografía para los fármacos seleccionados.

Como se puede observar en la tabla 5.8, a los diez días de depuración tras la exposición, no se detectó ibuprofeno en ninguno de los especímenes, y acumulaciones importantes de FMQ y CPR en los especímenes expuestos a ellos. La magnitud de la acumulación es acorde a la concentración a la que fueron sometidos. La no detección de IBU podría indicar en principio, que este no es fácilmente absorbido por los especímenes expuestos, o bien, y mas probable, una mayor velocidad de eliminación de este fármaco.

Tabla 5.8. Acumulaciones (ng g^{-1}) en músculo de *P. clarkii* tras el ensayo de exposición en mezclas binarias (10 mg L^{-1}). (Para detalles véase el texto).

	Principios activos farmacológicos		
	FMQ	CPR	IBU
Tanque 1 (control)	ND	ND	ND
Tanque 2 (FMQ+IBU)	267.9 221.6	----	ND
Tanque 3 (CPR+IBU)	---	60.4 46.3	ND

ND: No detectado

En la tabla 5.9 se puede observar en primer lugar que, como cabía esperar, no se detectó ninguno de los metabolitos buscados en el tanque de control, así como no se detectaron metabolitos de los principios activos no añadidos en los otros tanques de exposición. En el tanque 2 se detectaron los metabolitos seleccionados de flumequina e ibuprofeno, excepto el ibuprofeno acilglucurónido, en los dos especímenes sometidos al ensayo de exposición. En el tanque 3, tras la exposición a ciprofloxacina e ibuprofeno, se detectó en ambos especímenes N-acetil ciprofloxacina, 2-hidroxi ibuprofeno y 3-hidroxiibuprofeno. Resulta destacable que aun cuando no se detectó IBU, tras el periodo de depuración, en los especímenes expuestos a ese principio activo, si se detectaron algunos de sus metabolitos, lo que pone de manifiesto la necesidad de este tipo de analíticas si la finalidad es el uso de estos especímenes como bioindicadores ambientales.

Tabla 5.9. Identificación de metabolitos seleccionados tras el ensayo de exposición de especímenes de *P. clarkii* a mezclas binarias de flumequina, ciprofloxacina e ibuprofeno. (Para detalles véase el texto).

Metabolitos	Tanque 1 (control)	Tanque 2 (FMQ+IBU)	Tanque 3 (CPR+IBU)
7-Hidroxi flumequina	*	D D	*
Flumequina acilglucurónido	*	D D	*
N-acetil ciprofloxacina	*	*	D D
Sulfo-ciprofloxacina	*	*	*
Oxo-ciprofloxacina	*	*	*
2-hidroxi ibuprofeno	*	D D	D D
3-hidroxi ibuprofeno	*	D D	D D
Ibuprofeno acil glucurónido	*	*	*

*: No detectado; D: Detectado

Conclusiones

De la presente Tesis se pueden destacar los siguientes aspectos:

1. Se ha optimizado y validado un procedimiento analítico para la extracción y determinación simultánea de veintitrés principios activos farmacológicos, pertenecientes a muy diversas familias terapéuticas, en músculo abdominal y glándula digestiva de *Procambarus clarkii*. La extracción combina el uso simultáneo de una mezcla extractante acetonitrilo:agua y una digestión enzimática asistida por energía de microondas a baja potencia. La determinación de los extractos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo (HPLC-MS/MS). El procedimiento permitió límites de detección entre 0.3 y 6.1 ng g⁻¹ y límites de cuantificación entre 1.0 y 9.8 ng g⁻¹.
2. Tomando como punto de partida la metodología descrita en el punto anterior, se ha optimizado y validado un procedimiento para la determinación de veintiséis principios activos farmacológicos mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (UPLC-MS-qTOF). El procedimiento permitió límites de detección entre 0.09-2.58 ng g⁻¹ para muestras procedentes de *Procambarus clarkii* y 0.12-3.29 ng g⁻¹ para *Scrobicularia plana*. Los límites de cuantificación oscilaron en los rangos 0.29-7.15 ng g⁻¹ para *P.clarkii* y 0.43-8.71 ng g⁻¹ para *S. plana*.
3. Se usó el método de HPLC-masas triple cuadrupolo para la determinación de los analitos seleccionados en especímenes de *P.clarkii* capturados en el Parque Nacional de Doñana durante un periodo de seis años. Algunos de los analitos fueron detectados e incluso cuantificados en varios de los puntos de muestreo seleccionados, lo que es indicativo de la penetración de la contaminación por contaminantes emergentes en ese entorno natural protegido. Se ha intentado correlacionar los datos obtenidos con posibles fuentes antropogénicas de contaminación.
4. Se sometieron especímenes de *P.clarkii* y *S.plana* a ensayos de exposición a una mezcla de tres principios activos, flumequina, ciprofloxacina e ibuprofeno, a dos niveles de concentración (10 y 100 µg L⁻¹), durante 21 días. Aplicando la metodología analítica descrita de masas-cuadrupolo tiempo de vuelo, se evaluó la acumulación de las diversas sustancias durante el ensayo de exposición, así como su persistencia tras el mismo.

5. Se llevó a cabo un ensayo sobre especímenes de *P.clarkii*, que fueron expuestos a mezclas binarias de flumequina, ciprofloxacina e ibuprofeno de concentración elevada (10 mg L^{-1}). Tras un periodo de depuración al finalizar el ensayo, se constató la persistencia en la acumulación de flumequina y ciprofloxacina y se detectaron, en los especímenes expuestos, diversos metabolitos, correspondientes a las principales rutas metabólicas, de todos los principios activos usados en el ensayo de exposición.