

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

## **Programa de Doctorado Química Analítica y Medio Ambiente**

**Juan Manuel Peña Herrera**

### **Resumen**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A diferencia del primer método, con su amplio pero limitado número de analitos, el segundo método validado incluía también la detección de compuestos por análisis de sospechosos (*suspect screening analysis*). En esta metodología se examinaron muestras de pescado fresco (fw) para detectar la presencia de 47 fármacos en modo direccionado validados hasta 50 ng/g de pez (fw). Como

complemento de la metodología validada, se incluyeron más de 500 fármacos, drogas de abuso, metabolitos y TPs para el análisis por *suspect screening*. Los resultados positivos se confirmaron considerando tanto los iones moleculares como los iones de fragmentos característicos apoyados por la base de datos de la biblioteca instrumental, que incluye la biblioteca *SCIEX All-In-One HR-MS/MS* y también el paquete de biblioteca NIST 2017, que compilan espectros en alta resolución para más de 17000 compuestos. La confirmación también fue apoyada por la base de datos online *ChemSpider* que está conectada con el software analítico *SCIEX O.S.*

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

Otro aspecto de esta tesis se refiere a la investigación de la acumulación organo-específica de los fármacos en peces de agua dulce autóctonos recogidos en el río Llobregat, en Cataluña, España. La detección y, cuando fue posible, la cuantificación, se dirigió a diez biofluidos, órganos y tejidos. Se analizaron las agallas, bilis, cerebro, corazón, hígado, músculo, páncreas, piel, plasma y riñón de 12 muestras pertenecientes a cuatro especies comunes de la parte baja del río cerca de Barcelona, haciendo análisis direccionado específico y análisis de compuestos sospechosos. Adicionalmente, se monitorizó el agua del río en busca de los mismos compuestos.

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