



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Metodología analítica para la determinación de drogas de uso humano y veterinario en purín porcino

Autor: Cristina Portela Monge

Tutor/es: Juan José Jiménez Sevilla

Rebeca López Serna

AGRADECIMIENTOS

Transmitir mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado a lo largo de esta etapa y han colaborado en esta investigación.

En primer lugar, agradecer a mis tutores, Juan José Jiménez Sevilla y Rebeca López Serna, por el tiempo dedicado y los conocimientos brindados, así como su ayuda en la información y organización en este Trabajo de Fin de Grado que forma parte de los proyectos de investigación sobre Contaminante Emergentes que se lleva a cabo en el Instituto de Procesos Sostenibles (IPS) de la Universidad de Valladolid.

También me gustaría agradecer a mi familia y compañeros de laboratorio por el apoyo y ayuda durante todos estos meses.

ÍNDICE

1. LISTA DE ABREVIATURAS

2. INTRODUCCIÓN

2.1 EL PROBLEMA MEDIOAMBIENTAL Y LOS CONTAMINANTES EMERGENTES

2.2 TRATAMIENTO Y DEPURACIÓN DE PURINES

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.4 COMPUESTOS ESTUDIADOS

3. OBJETIVOS

4. EXPERIMENTAL

4.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS EMPLEADOS

4.2 PREPARACIÓN DE PATRONES Y LÍNEAS DE CALIBRADO

4.3 PREPARACIÓN DE MUESTRA

4.3.1. Purín Bruto

4.3.2. Fases sólidas y líquidas del purín

4.4 DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL MEDIANTE UHPLC-MS

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIOS PREVIOS (COMPARACIÓN DE ADSORBENTES)

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL (OPTIMIZACIÓN DE FACTORES EXPERIMENTALES)

5.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA UNA MUESTRA DE PURÍN BRUTO

5.3.1 Método de adiciones patrón

5.3.2 Calibrado matriz-patrón

5.3.3 Recuperación y precisión

5.4 BALANCE DE MATERIA PARA UNA MUESTRA DE PURÍN SIN CENTRIFUGAR

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

8. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

1. LISTA DE ABREVIATURAS

- AcN: Acetonitrilo
- AEDT: Ácido etilendiaminotetracético
- AINE: Anti-inflamatorios no esteroides
- ARGs: Genes resistentes a los antibióticos (Antibiotic resistance genes)
- CE: Conductividad eléctrica
- EC: Energía de colisión para la fragmentación al pseudoión molecular, voltios (Collision energy)
- CECs: Contaminantes de interés emergente (Contaminants of emerging concern)
- CPX: Potencial de salida de la celda de colisión, voltios (Collision cell exit potential)
- CTC: Clortetraciclina
- DBO: Demanda bioquímica de oxígeno
- DER: Desviación estándar relativa
- DP: Potencial de entrada al espectrómetro de masas, voltios (Declustering potential)
- EDARs: Estaciones depuradoras de aguas residuales
- EDCs: Sustancias químicas que alteran el sistema endocrino (Endocrine-disrupting chemicals)
- EP: Potencial de entrada, voltios (Entrance potential)
- ESI: Ionización por electrospray (Electrospray ionization)
- FA: Ácido fórmico (Formic acid)
- FQs: Fluoroquinolonas (familia)
- FM: Fase móvil
- GC. Cromatografía de gases (Gas chromatography)
- GPC: Cromatografía de permeación en gel (Gel permeation chromatography)
- HLB: Equilibrado hidrofílico-lipofílico (Hydrophilic-lipophilic balanced)
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography).
- JOS: Josamicina
- LAs: Lincosamidas (familia)
- LC. Cromatografía de líquidos (Liquid chromatography)
- LIN: Lincomicina
- LOD: Límite de detección (Limit of detection)
- LOM: Lomefloxacina

- LOQ: Límite de cuantificación (Limit of quantification)
- m/z: relación masa/carga
- MAE: Extracción asistida por microondas (Microwave-assisted extraction)
- MAP: Método de Adiciones Patrón
- MeOH: Metanol
- MLs: Macrólidos (familia)
- MP: Matriz-Patrón
- MS. Espectrometría de Masas (Mass spectrometry)
- MS/MS: Espectrometría de masas en tándem
- MSPD: Dispersión de matriz en fase sólida (Matrix solid-phase dispersion)
- N.D.: No detectado (no se detecta respuesta en los cromatogramas de los extractos)
- N-NH₄⁺: Nitrógeno amoniacal
- NTK: Nitrógeno total Kjeldhal
- ODS: Octadecilsilano
- ORB: Orbifloxacina
- PEF: Pefloxacina
- PHWE: Extracción con agua caliente a presión (Pressurized hot water extraction)
- PLE: Extracción líquida presurizada (Pressurized liquid extraction)
- PMs: Pleuromutilinas (familia)
- POPs: Contaminantes orgánicos persistentes (Persistent organic pollutants)
- PPCPs: Productos farmacéuticos y de cuidado personal (Pharmaceuticals and personal care products)
- Q1: Masa del pseudoión molecular (m/z)
- Q3: Masa del fragmento (m/z)
- QqQ (analizador): Triple Cuadrupolo (Triple quadrupole)
- Q-TOF (analizador): Cuadrupolo de tiempo de vuelo (quadrupole to time-of flight)
- QuEChERS: Rápido, Fácil, Económico, Efectivo, Robusto y Seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)
- R²: Coeficiente de determinación
- ROX: Roxitromicina
- RT: Tiempo de retención, minutos (Time retention)
- S/N (relación): Señal/Ruido (Sign/Noise)
- SALLE: Salting-out liquid-liquid extraction

- SAs: Sulfonamidas (familia)
- SDX: Sulfadoxicina
- SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño (Size-exclusion chromatography)
- SFZ: Sulfisoxazol
- SM2: Sulfameracina
- SMM: Sulfamonometoxina
- SLE: Extracción sólido líquido (solid-liquid extraction)
- SPE. Extracción en fase sólida (Solid phase extraction)
- SPME: Microextracción en fase sólida (solid-phase microextraction)
- SQX: Sulfaquinoxalina
- TTCs: Tetraciclinas (familia)
- UAE. Extracción asistida por ultrasonidos (Ultrasound-assisted Extraction)
- UHPLC: Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (Ultra high performance liquid chromatography)

LISTA DE PRINCIPIOS ACTIVOS QUE SE VAN A ESTUDIAR

- AAF. Acetaminofeno
- AAS. Ácido Acetilsalicílico
- ACF. Ácido Clofíbrico
- AHB. Ácido 4-hidroxibenzoico
- AMO. Amoxicilina
- AND. Ácido Nalidíxico
- APR. Apramicina
- ASC. Ácido Salicílico
- ATN. Atenolol
- ATV. Atorvastatina
- ATZ. Atrazina
- BZQ. 1,4-Benzoquinona
- BPA. Bisfenol A
- CAF. Cafeína
- CBM. Carbamazepina
- CIP. Ciprofloxacino
- CRT. Crotamitón
- CTM. Claritromicina
- DAN. Danofloxacino
- DCF. Diclofenaco
- DEET. N,N-dietil-meta-toluamida
- DEX. Dexametasona
- DOX. Doxiciclina
- E1. Estrona (E1)
- E2. 17- β -Estradiol (E2)
- EE2. 17- α -Etinilestradiol (EE2)
- ENR. Enrofloxacino
- EPR. Etilparabeno
- ERY. Eritromicina
- FEN. Fenbendazol
- FLO. Florfenicol
- GEM. Gemfibrozilo
- IBP. Ibuprofeno
- IOH. Iohexol
- LEV. Levofloxacino
- MAR. Marbofloxacino
- MPR. Metilparabeno
- MTN. Metronidazol
- NNF. 4-nonilfenol
- NOR. Norfloxacina
- NPX. Naproxeno
- OFL. Ofloxacino
- OTC. Oxitetraciclina
- PEN. Penicilina G
- PGT. Progesterona
- PPN. Propranolol
- PPR. Propilparabeno
- SDD. Sulfadimidina
- SDZ. Sulfadiazina
- SMX. Sulfametoxazol
- SMZ. Sulfametizol
- SPD. Sulfapiridina
- STZ. Sulfatiazol
- TCS. Triclosan
- TIA. Tiamulina
- TMP. Trimetoprima
- TOP. 4-terc-octilfenol
- TTC. Tetraciclina
- TYL. Tilosina

RESUMEN

En este trabajo se pretende poner a punto y validar un método de análisis multirresiduo de drogas de uso veterinario y humano en muestras de purín bruto porcino. De esta manera, se estudia la repercusión de varios parámetros de operación (tipo y cantidad de adsorbente, pH de la muestra, porcentaje relativo de agua-metanol y cantidad de AEDT) en un procedimiento de tratamiento de muestra basado en una extracción sólido-líquido (SLE) seguido de una extracción en fase sólida (SPE). Después de un diseño de experimentos, se propuso un procedimiento de tratamiento de muestra que consistía en la extracción de la muestra mediante agitación ultrasónica con una mezcla agua-metanol (10:90), en presencia de 0.1g de alúmina activada como adsorbente y añadiendo AEDT en concentración 0.4% (v/v), seguida de una etapa de limpieza empleando cartuchos Oasis HLB y la concentración de los extractos por evaporación bajo una corriente de N₂. El método de análisis se ha validado, intralaboratorio, para la determinación de 50 drogas, mediante un equipo de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (UHPLC-MS/MS), con analizador QqQ. El método de análisis se ha aplicado a dos muestras de purín bruto de diferente consistencia detectándose la presencia de drogas de uso veterinario y no veterinario. Finalmente, se ha separado por centrifugación, y analizado individualmente, las fases sólida y líquida de una de las muestras de purín bruto y se ha realizado un balance de materia.

ABSTRACT

This work aims to implement and validate a multi-waste method of analysis of veterinary and human drugs in raw swine manure samples. In this way, the impact of various operating parameters (type and amount of adsorbent, sample pH, relative percentage of water-methanol and amount of AEDT) was studied on a sample treatment procedure based on solid-liquid extraction (SLE) followed by solid phase extraction (SPE). After an experiment design, a sample treatment procedure consisting of the extraction of the sample by ultrasonic agitation with a water-methanol mixture (10:90) was proposed, in the presence of 0.1g of activated alumina as an adsorbent and adding AEDT in concentration 0.4% (v/v), followed by a cleaning stage using Oasis HLB cartridges and the concentration of evaporation extracts under a N₂ current. The analysis method was validated, intralaboratory, for the determination of 50 drugs, using a liquid chromatography equipment coupled to a tandem mass spectrometer (UHPLC-MS/MS), with QqQ analyzer. The method of analysis was applied to two samples of raw swine manure of different consistency detecting the presence of veterinary and non-

veterinary drugs. Finally, the solid and liquid phases of one of the raw swine samples was separated by centrifugation and analyzed individually, and a material balance was carried out.

2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el sector porcino ha experimentado un gran aumento en censos, producción y número de explotaciones, debido en parte al alza de los comercios exteriores (*Figura 1*).

A nivel mundial, China es el mayor productor de carne de cerdo, seguido de la Unión Europea (UE). España ha logrado ser el segundo mayor exportador porcino de la UE con un 19% de las toneladas producidas (datos 2018, Fuente: EUROSTAT y SG Análisis, Coordinación y Estadística, MAPA), por detrás de Alemania con un 22.4% de la producción de la UE, siendo así la cuarta potencia productora del mundo (Porcino, n.d.).

En lo referente a la economía española, la industria porcina desempeña un importante papel, ya que representa el 14% del Producto Interior Bruto Industrial y constituye el 12.7% de la Producción Final Agraria y el 36.4% de la Producción Final Ganadera (Pesca, n.d.).

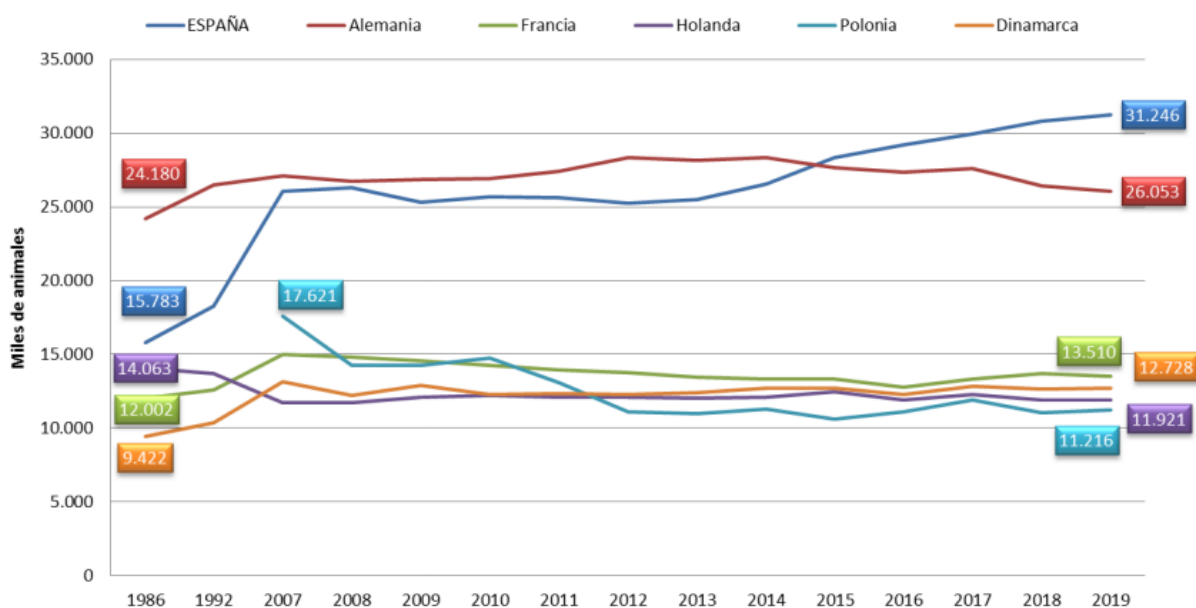


Figura 1-*Evolución del censo porcino en la UE (Fuente: EUROSTAT y MAPA)*

Por otro lado, la industria porcina en España ha experimentado un gran aumento en casi todas las Comunidades Autónomas, observándose durante 2019 un gran incremento de censo en comunidades como Galicia, Castilla y León, Cataluña y Aragón. Como puede observarse en la *Figura 2*, la distribución del sector según el censo de cerdos por comunidad autónoma se concentra en Cataluña, Aragón, Castilla y León, Castilla-La Mancha, Andalucía y la Región de Murcia (MAPA (Ministerio de Agricultura y Alimentación), 2020).

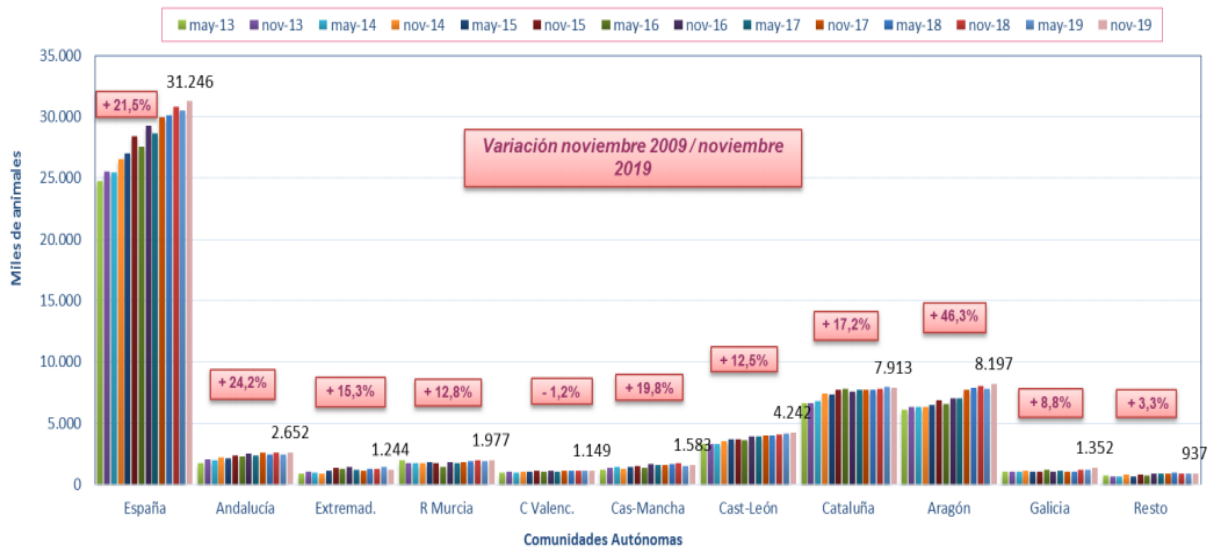


Figura 2-Encuestas de ganado porcino en España: Evolución por comunidades en los últimos años (Fuente: EUROSTAT y MAPA)

El Sector Primario, al que pertenece la ganadería, ha crecido enormemente durante estos últimos años, lo que ha ocasionado una industrialización y explotación intensiva localizada. La intensificación de este tipo de industrias ha generado múltiples beneficios, como la concentración de las explotaciones en regiones muy concretas, que suponen a su vez una mayor concentración de residuos ganaderos en dichas zonas, así como un aumento en la eficacia productiva del ganado. Así se consigue una disminución de las cantidades de restos originados por unidad producida y se mejora la comercialización de los productos.

A pesar de ello, gran parte de la población se opone a la construcción de nuevas granjas debido principalmente al aspecto ambiental, asociado en mayor medida al especial cuidado que requiere la gestión de los residuos ganaderos que se producen. Uno de los principales problemas que genera este tipo de industria es que los purines producidos no tienen un área territorial donde puedan ser aplicados o bien vertidos, de manera que se rompe el equilibrio existente entre la ganadería y la agricultura y hace surgir el problema de la contaminación.

2.1. EL PROBLEMA MEDIOAMBIENTAL Y LOS CONTAMINANTES EMERGENTES

El purín porcino (bruto) es el resultado de los residuos orgánicos que se producen en las explotaciones ganaderas y está formado por dos fases: una líquida que contiene la orina

del cerdo y el agua de lavado y otra sólida compuesta por los excrementos animales, restos de alimentos y el material vegetal fibroso que cubre el suelo.

En lo que respecta a la composición química del purín, la mayoría de los purines tienen características comunes que pueden variar de una especie a otra como se puede observar en la *Tabla 1*: hasta un 90% del total de purín puede llegar a ser agua, un 2-4% es materia seca, el contenido de materia orgánica es de 1-3%, nitrógeno total (0.2-0.4%), fósforo total (0.07-0.10%) y potasio (0.09-0.14%), entre otros componentes. Además de estas características, cabe destacar el alto contenido en macro y micronutrientes que presentan los purines y su capacidad tampón (los purines tienen la capacidad de mantener el pH aunque se adicionen pequeñas cantidades de ácidos o bases fuertes) (Gómez Garrido, 2014).

Tabla 1- Características físico-químicas de diferentes tipos de purines de cerdo

(Fuente: Sánchez y González)

Parámetro	Maternidad (n=64)		Cebo (n=52)		Ciclo Cerrado (n=35)	
	Media	%	Media	%	Media	%
Conductividad eléctrica, CE (S m ⁻¹)	1.24		1.33		1.86	
Densidad (g cm ⁻³)	1.01		1.02		1.02	
pH (1:2)	7.7		7.5		7.5	
Cenizas (g kg ⁻¹)	7.0	0.7	9.0	0.9	11.6	1.2
Materia seca (g kg ⁻¹)	21.4	2.1	36.1	3.6	42.5	4.3
Materia húmeda (g kg ⁻¹)	979	98	964	96	957	96
Materia orgánica (g kg ⁻¹)	14.4	1.4	27.0	2.7	31.8	3.2
Cloruros (g kg ⁻¹)	0.87	0.09	0.76	0.08	1.07	0.11
Nitrógeno amoniacal, N-NH ₄ ⁺ (g kg ⁻¹)	1.5	0.2	1.7	0.2	2.4	0.2
Nitrógeno inorgánico, Ninorg (g kg ⁻¹)	2.1	0.2	2.5	0.2	3.3	0.3
Nitrógeno orgánico, Norg (g kg ⁻¹)	0.7	0.1	0.7	0.1	0.9	0.1
Nitrógeno total Kjeldhal, NTK (g kg ⁻¹)	2.6	0.3	3.1	0.3	4.1	0.4
Fósforo inorgánico, Pinorg (g kg ⁻¹)	0.51	0.05	0.67	0.07	0.83	0.08
Fósforo inorgánico, Porg (g kg ⁻¹)	0.12	0.01	0.11	0.01	0.18	0.02
Fósforo total, Ptot (g kg ⁻¹)	0.69	0.07	0.77	0.08	0.99	0.10
C/N total	2.8		4.6		3.9	
C/N orgánico	20.6		28.6		27.1	
Potasio, K (g kg ⁻¹)	0.86	0.09	0.75	0.07	1.37	0.14

Tabla 1, continuación

Parámetro	Maternidad (n=64)		Cebo (n=52)		Ciclo Cerrado (n=35)	
	Media	%	Media	%	Media	%
Magnesio, Mg (g kg ⁻¹)	0.17	0.02	0.23	0.02	0.28	0.03
Calcio, Ca (g kg ⁻¹)	0.80	0.08	1.21	0.12	1.41	0.14
Sodio, Na (g kg ⁻¹)	0.21	0.02	0.23	0.02	0.26	0.03
Zinc, Zn (mg kg ⁻¹)	19.7	0.002	24.9	0.002	30.6	0.003
Cobre, Cu (mg kg ⁻¹)	8.9	0.001	13.3	0.001	18.6	0.002
Plomo, Pb (mg kg ⁻¹)	0.19	0.000	0.32	0.000	0.40	0.000
Molibdeno, Mo (mg kg ⁻¹)	0.18	0.000	0.35	0.000	0.39	0.000
Aluminio, Al (mg kg ⁻¹)	18.9	0.002	36.9	0.004	56.3	0.006
Manganeso, Mn (mg kg ⁻¹)	8.3	0.001	12.7	0.001	17.0	0.002
Hierro, Fe (mg kg ⁻¹)	9.8	0.006	81.5	0.008	89.4	0.009

A pesar de estas características comunes, la composición de los purines puede ser muy heterogénea entre distintas explotaciones porcinas, viéndose afectada principalmente por los siguientes factores: categoría y procedencia del cerdo (como se vio anteriormente), la clase de alimentación, la infraestructura y el sistema de lavado de la granja, el tipo de almacenamiento del purín, la estación climatológica, la localización geográfica, etc.

Como ejemplo de lo anterior, la *Tabla 2* muestra las diferencias entre la composición de purines sólidos y líquidos para España en particular y para el conjunto de la UE. Dentro de los componentes del purín, el nitrógeno puede aparecer en varias formas minerales y orgánicas, que difieren en la tasa de mineralización. Como se indicó, el purín también presenta entre sus componentes fósforo (60-80% del total) en forma mineral que se encuentra como fosfato bicálcico, compuesto con un comportamiento agronómico similar al de fósforo que aparece en los fertilizantes minerales (se trata de la forma más habitual en que precipita el fósforo en presencia de magnesio y amonio, también conocido como estruvita). El potasio de los purines se encuentra en forma de sales, que son fácilmente asimilables por las plantas, por lo que se puede considerar que tiene la misma eficacia que los fertilizantes minerales. De los elementos traza presentes en los purines destacan el cobre y el zinc, que son incluidos en la alimentación de los cerdos como factores de crecimiento y son raramente asimilados por el ganado (Valdecantos et al., 2002).

Tabla 2- Composición típica de purines en la Unión Europea y en España (Fuente: European Commission - DG ENV, 2001a, y Hall, 1999)

	UNIÓN EUROPEA		ESPAÑA
	Purines sólidos	Purines líquidos	Purines líquidos
Sólidos (%)	25	1-18	5-7
Materia Orgánica (%)	16.0	3.4-7.0	
DBO (mg L⁻¹)	-	-	5000-25000
NTK (%)	0.5-0.7	0.2-1.6	
N-NH₄⁺ (%)	0.07-0.25	0.21-0.36	0.30-0.50
P₂O₅ (%)	0.10-0.76	0.10-1.20	0.10-0.30
K₂O (%)	0.4	0.2-0.9	0.10-0.30
CaO (%)	0.60	0.14-0.67	
MgO (%)	0.25	0.05-0.18	
Na₂O (%)	-	0.08-0.09	
Cd (mg/L p.s.)	0.7	0.2-0.5	
Cr (mg/L p.s.)	1.9	2.4-18.0	
Cu (mg/L p.s.)	346	180-574	333-666
Hg (mg/L p.s.)	-	0.05	
Ni (mg/L p.s.)	5.0	3.2-17.0	
Pb (mg/L p.s.)	2.8	<1.0-12.0	
Zn (mg/L p.s.)	387	403-919	333-666
Se (mg/L p.s.)	-	0.6	

Una parte de los residuos ganaderos que se producen en las granjas se sigue empleando actualmente como fertilizante para tierras de cultivo cercanas. Sin embargo, la intensificación de este tipo de industrias y el alto poder contaminante de los purines está produciendo numerosos problemas medioambientales en suelo, agua y aire, ya que estos residuos se acumulan en zonas muy localizadas donde producción ganadera es elevada. Los principales problemas que se originan del empleo directo de purines sobre el suelo son:

- La generación de malos olores y emisión de amoníaco, metano y óxidos de nitrógeno (N₂O y NO), además de otros gases de efecto invernadero, por descomposición de la materia orgánica al almacenar los purines en balsas impermeabilizadas.
- La acidificación (NH₃, S₂O y NO_x) de suelos, aguas superficiales y subterráneas.
- La contaminación de acuíferos y aguas superficiales por el nitrato producido durante la oxidación del nitrógeno. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), no es aconsejable el consumo de agua con más de 25 mg L⁻¹ en nitratos. Además, la infiltración de nitratos, fosfatos y otros compuestos en aguas subterráneas pueden conducir a la eutrofización, es decir, el incremento de las sustancias nutritivas de un

ecosistema acuático, lo que origina una proliferación descontrolada de algas fitoplanctónicas.

- La acumulación de metales pesados como el Cu y Zn, introducidos en la alimentación del animal, puede resultar tóxica e interferir en el desarrollo de las plantas cuando se acumulan en cantidades elevadas.

La manera actual de gestión de los residuos no permite asegurar totalmente la inexistencia de contaminantes en las tierras de cultivo, por lo que cada vez es más necesaria la investigación y desarrollo de nuevos métodos de tratamiento de purines que permitan administrar los residuos producidos de una manera sostenible técnica, económica y medioambientalmente (Redondo, 2015).

Es por todo ello que cada vez se está endureciendo más la normativa medioambiental vigente en relación con la gestión de residuos porcinos. Ejemplo de esto es la Directiva 96/61/CE del Consejo de 24 de septiembre de 1996 relativa a la prevención y al control integrado de la contaminación (IPCC), así como sus sucesivas actualizaciones desde su aprobación, que reúnen los principales factores sobre contaminación, valores límite umbrales de emisión de contaminantes y fuentes responsables (Europeo et al., 2018). Por otro lado, en la Directiva europea 91/676/CEE del Consejo de 12 de diciembre de 1991 relativa a la protección de aguas contra la contaminación producida por los nitratos utilizados en la agricultura, se reúne un conjunto de estrategias de actuación para prevenir y reducir la contaminación por nitratos de origen agrario. A pesar de que este decreto no solo aborda la contaminación producida por las explotaciones porcinas, sí que es una de las industrias más contaminantes (European Union, 1991). Entre los aspectos legislativos más importantes relacionados con el tratamiento de subproductos de origen animal también hay que destacar:

- Reglamento (UE) N.º 790/2010 de la Comisión, de 7 de septiembre de 2010, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano.
- Directiva 2002/33/CE del Parlamento Europeo y el Consejo, de 21 de octubre de 2002, por la que se modifican las Directivas 90/425/CEE y 92/118/CEE en lo que respecta a las condiciones sanitarias de los subproductos animales.
- Reglamento (CE) N.º 1576/2007 de la Comisión, de 21 de diciembre de 2007, en lo que se refiere a los métodos de eliminación o a la utilización de subproductos animales.

El uso de medicamentos en los cerdos como recurso veterinario para el tratamiento de sus enfermedades y el control de los ciclos reproductivos, así como razones de mejora de rendimiento cárnico, supone otra limitación a la hora de utilizar y almacenar los purines. Estos fármacos se suministran al ganado por medio de los alimentos y el agua, o por otras vías, como la inyección. Después de su administración, una fracción significativa de estos medicamentos veterinarios son mal absorbidos por el animal, ya que se estima que entre un 30-90% de los fármacos administrados se excretan en su forma original sin cambios o en metabolitos activos (epímeros o isómeros) de la especie parental. De manera que si estos purines se extienden por el suelo dándoles uso como fertilizante, pueden llegar a acumularse en los suelos, ser transferidos a las aguas subterráneas y entrar en la cadena trófica, suponiendo una fuente importante de contaminación para el medio ambiente. Con frecuencia han aparecido elevadas concentraciones de antibióticos en el purín de cerdo que pueden alcanzar niveles de hasta 200 mg kg^{-1} o L^{-1} (Kumar et al., 2005) cuando las concentraciones de antibióticos en el estiércol están entre 1 y 10 mg kg^{-1} o L^{-1} . Sin embargo, no se puede concluir si esta gran variación en las concentraciones detectadas y la excreción de antibióticos por los cerdos es debida a diferencias individuales con respecto al metabolismo de los antibióticos o al empleo de métodos inadecuados de extracción y cuantificación (Massé et al., 2014).

Además, la acumulación de estos restos de antibióticos en el medio ambiente puede conducir a la difusión de genes y bacterias resistentes a los antibióticos (ARGs), motivo por el cual los medicamentos cada vez se vuelven más ineficaces para combatir las enfermedades infecciosas, lo que puede suponer una amenaza para la salud pública, siendo necesario encontrar nuevos fármacos que sean efectivos (Allen et al., 2010).

Una gran parte de estos contaminantes orgánicos quedan fuera del control regulatorio, ya que suelen presentarse disueltos o en suspensión a bajos niveles de concentración en el medio y hay un desconocimiento de sus efectos a largo plazo sobre la salud pública y el medio ambiente. Por ello, sería fundamental entender los patrones de uso de estos fármacos en las industrias ganaderas para así poder evaluar la contaminación que originan.

Para referirse a estos compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya concentración en el medio es muy baja pero suficiente como para detectarlos y que, además, pueden producir un impacto ecológico y sobre la salud, apareció el término de contaminantes emergentes. Recientemente, la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) ha sugerido

reemplazar este término por el de contaminantes de interés emergente (CECs), el cual se define, según la Directiva 2013/39/UE, como “*contaminantes que en la actualidad no están incluidos en los programas de seguimiento sistemático en la Unión, pero que suponen un importante riesgo, lo cual exige su regulación, dependiendo de sus posibles efectos ecotoxicológicos y toxicológicos, y de sus niveles en el medio acuático*” (Barrena Medina, 2013). Esta directiva reemplaza a la Directiva Marco del Agua 2000/60/EC y a la Environmental Quality Standards Directive en cuanto a los contaminantes principales en lo relativo a la política de aguas e incrementa la lista a 45 contaminantes prioritarios, de los cuales 21 son considerados nocivos. La EPA de EE.UU., Emerging Contaminants Workgroup, elaboró una lista de CECs en la que aparecían varios subgrupos de compuestos (Beaman et al., 2008):

- Contaminantes orgánicos persistentes (POPs) como éteres de difenilo polibromados o ácidos orgánicos perfluorados.
- Productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), donde se incluyen antibióticos de uso humano, como antidepresivos, medicamentos de venta libre (como ibuprofeno), bactericidas (como triclosan), protectores solares, almizcles sintéticos, etc.
- Fármacos veterinarios como antimicrobianos, antibióticos, antifúngicos, potenciadores del crecimiento y hormonas.
- Sustancias químicas que alteran el sistema endocrino (EDCs), donde se incluyen estrógenos sintéticos (como el 17- α -etinilestradiol), andrógenos (como la trembolona), estrógenos de origen natural (como el 17- β -estradiol), así como otras sustancias que originan cambios hormonales en organismos acuáticos (pesticidas organoclorados, alquilfenoles).
- Nanomateriales como nanotubos de carbono o partículas de dióxido de titanio.

En 2013, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) publicó los resultados sobre el consumo de antibióticos correspondiente al año 2011 en el ámbito veterinario en 25 países (*Figura 3*) así como en el ámbito nacional. En torno al 80% del consumo total de estos fármacos se reparte entre las tetraciclinas (37%), penicilinas (23%), sulfonamidas (11%), macrólidos (8%) y fluoroquinolonas (1.6%) (Muñoz et al., 2013).

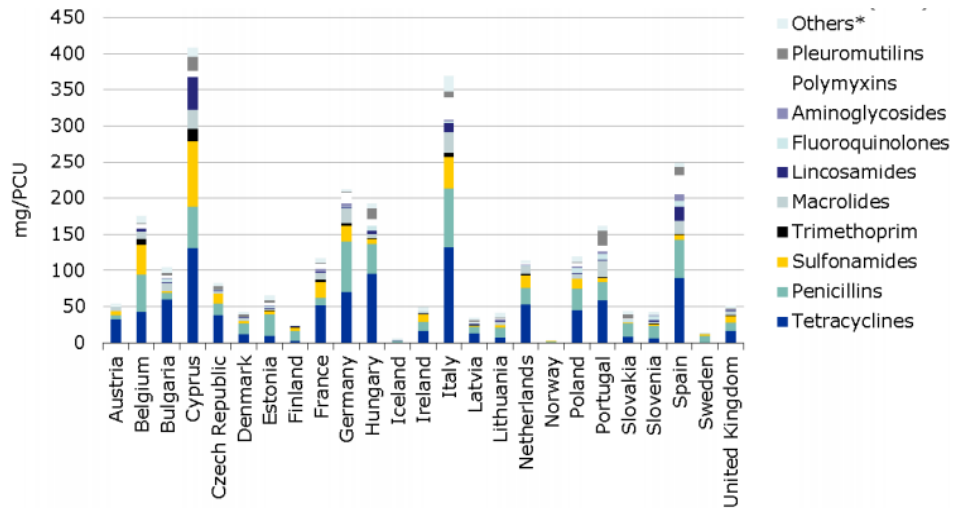


Figura 3-Consumo de las distintas clases de fármacos en ganado, en mg por unidad de corrección de la población (mg/PCU) por país, para 25 países en 2011 (Fuente: Muñoz et al., 2013).

En el ámbito nacional, también puede observarse en la *Figura 4* que los fármacos veterinarios más consumidos en el año 2011 fueron las tetraciclinas, penicilinas y macrólidos.

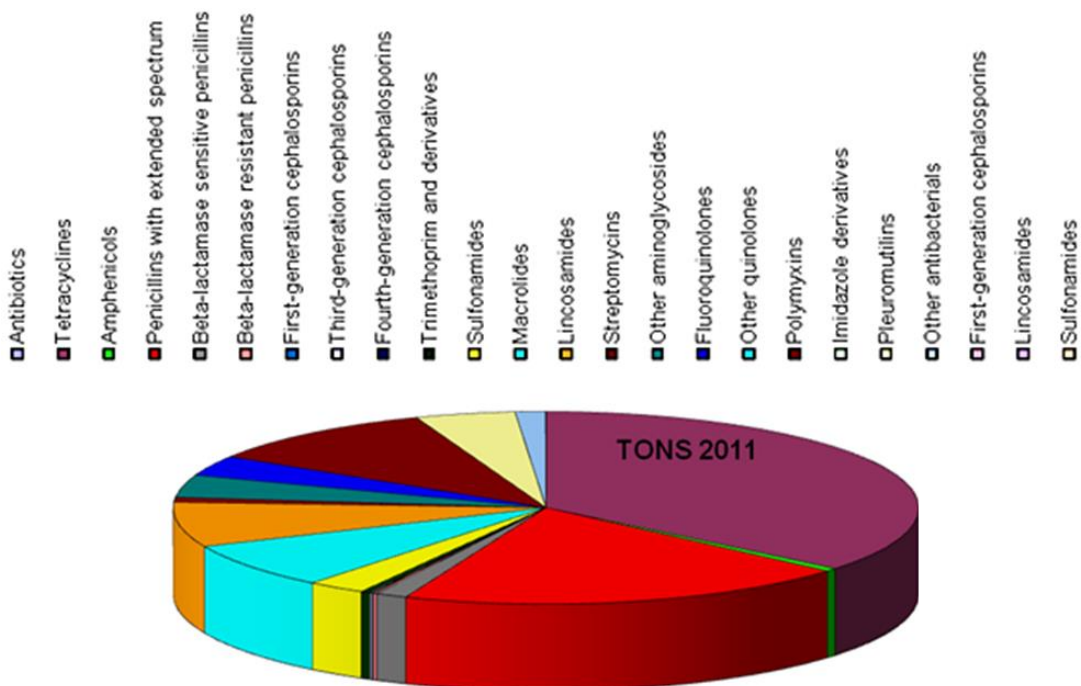


Figura 4-Consumo de las distintas clases de fármacos en ganado en España en 2011 (Fuente: Muñoz et al., 2013).

La toxicidad de los CECs está siendo en la actualidad de gran preocupación ya que este tipo de sustancias presentan una elevada resistencia a la degradación. Se trata de

sustancias con propiedades mucho más hidrófobas que otros compuestos químicos naturales, lo cual los permiten acumularse en los tejidos ricos en lípidos y ser dinámicos a través de la cadena alimentaria. De entre todas las sustancias englobadas en el término de CECs, los que mayor preocupación e interés suscitan son los antibióticos. La mayoría de las investigaciones realizadas en purines porcinos se focalizan más en el análisis de tetraciclinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas debido al mayor número de métodos analíticos disponibles y a que es más frecuente encontrarlos en este tipo de muestras como muestran la *Tabla 3* y la *Tabla 4*.

Tabla 3 - Concentraciones de fármacos en estiércol de cerdo según Referencias

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
TTCs	TTC	98.2 mg/L	[14]
	OTC	354.0 mg/L	
	CTC	139.4 mg/L	
	DOX	37.2 mg/L	
SAs	SDZ	7.1 mg/L	[15]
TTCs		30 mg/kg	
SAs		2 mg/kg	
TTCs	TTC	8-460 µg/kg	[16]
	OTC	27.5-110 µg/kg	
	DOX	1.6-400.5 µg/kg	
SAs	SDD	0.5-447.5 µg/kg	
	SMX	ND	
MLs	TYL	1.2-447 µg/kg	
	ERY	ND	
PMs	TIA	0.7-59.2 µg/kg	
FQs	ENR	2-162 µg/kg	
	CIP	1.4-33.3 µg/kg	
	NOR	ND	

En la *Tabla 3* se observa que por lo general las TTCs son los medicamentos que aparecen con mayor frecuencia y en mayores concentraciones en los purines porcinos, probablemente debido a su elevado consumo en aditivos para piensos como se explicó anteriormente en la *Figura 3* y la *Figura 4*. Además de TTCs, se encontraron otros fármacos en menores concentraciones pertenecientes a la familia de las FQs, como el CIP y el ENR, y de las SAs.

Tabla 4-Niveles de residuos antibióticos (ng/mL) en muestras de aguas residuales de 10 granjas porcinas (Fuente: Wang et al., 2019).

Familia	Analitos	N.º granja de cerdos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SAs	SDZ	87.5	1.34	N.D.	N.D.	N.D.	0.181	0.141	N.D.	N.D.	N.D.
	STZ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	SMX	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	SFZ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	SM2	0.804	14.0	64.1	1.13	1.39	1.38	1.33	1.28	N.D.	1.21
	SMM	128	126	166	126	123	129	123	125	N.D.	131
	TMP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	893	0.203	16.0	0.842	8.38	N.D.
	SQX	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	SDX	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FQs	NOR	N.D.	0.416	N.D.	N.D.	0.551	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	CIP	N.D.	5.39	10.4	0.574	1230	5.31	N.D.	N.D.	0.743	N.D.
	PEF	N.D.	0.127	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	LOM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	DAN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	ENR	N.D.	9.70	43.2	0.117	1793	12.8	N.D.	0.301	1.67	0.174
	OFL	N.D.	10.1	30.1	0.223	608	N.D.	59.1	N.D.	1.46	N.D.
	MAR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	ORB	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
LAs	LIN	19.4	128	247	9.02	2.11	234	206	11.5	1.91	447
TTCs	DOX	4.34	14.8	4.35	3.17	16.5	4.26	2.70	2.86	N.D.	2.74
	TTC	N.D.	159	1.70	0.0560	40.4	2.18	8.81	0.113	N.D.	<LOQ
	OTC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	14.4	N.D.
	CTC	N.D.	32.0	N.D.	1.25	5.90	1.65	19.0	N.D.	N.D.	1.19
MLs	ERY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	JOS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	ROX	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	TYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Atendiendo ahora a la *Tabla 4*, se puede ver como los niveles más elevados aparecen para la SMM, mientras que los más bajos se encuentra para el NOR, aunque la mayoría de los compuestos no son detectados (N.D.) o se encuentran por debajo del LOQ. Hay que destacar también la gran dispersión que existe entre los resultados para cada compuesto dentro de la misma muestra obtenida de la misma granja, detectándose, por ejemplo, grandes concentraciones de ENR y CIP en la muestra 5.

Cuando el purín entra en contacto con el agua supone un problema para el medio ambiente y para la salud. Una de las fuentes primarias de entrada de los CECs al medioambiente son los efluentes y fangos de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), ya que al ser liberados al medioambiente ambiente, los CECs pueden retornar a los humanos, a través de la cadena alimentaria o del agua potable (Arbeláez Salazar, 2015). La *Figura 5* muestra ejemplos de posibles fuentes de emisión y destino de los CECs. Aunque en

las EDARs se lleve a cabo un tratamiento exhaustivo y permitan convertir las aguas residuales en potables, no es suficiente para la eliminación de los CECs, ya que fueron diseñadas principalmente para eliminar sin esfuerzo el carbono, el fósforo, las sustancias nitrogenadas y microbios, que aparecen constantemente en estas EDARs en concentraciones de $\mu\text{g L}^{-1}$.

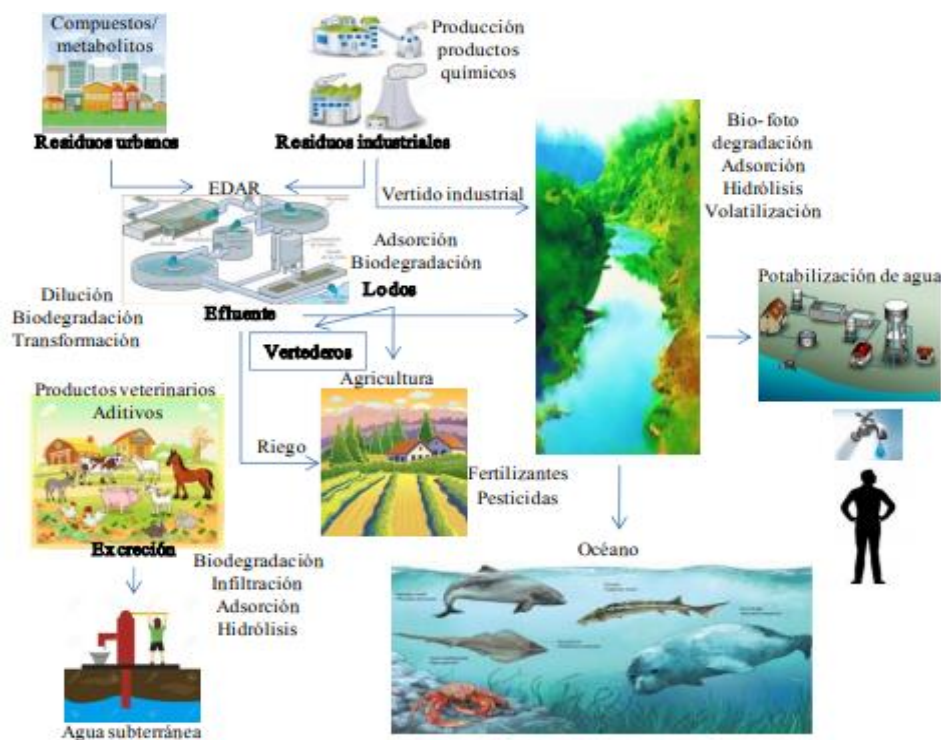


Figura 5- Fuentes de emisión y destino de los CECs (Fuente: Arbeláez Salazar, 2015).

Por lo que estos CECs se van acumulando hasta alcanzar niveles extremadamente elevados para el consumo humano y el medioambiente que pueden originar algunos efectos perjudiciales como los que se muestran en la *Tabla 5* (Gogoi et al., 2018). Por todo ello, es necesario poner a punto nuevos métodos analíticos para su determinación y cuantificación así como nuevos métodos de tratamiento (Yadav et al., 2021).

Tabla 5- Principales efectos ambientales estudiados causados por algunos CECs (Fuente: Gogoi et al., 2018).

Compuesto	Efecto adverso
PEN, SAs, TTCs	Resistencia entre patógenos bacterianos, lo que produce una alteración de la comunidad microbiana en la naturaleza, afectando a la cadena alimentaria superior.
ROX, CTM, TYL	Inhibición del crecimiento de algas (<i>Pseudokirchneriellasubcapitata</i>)
CAF	Alteración endocrina de peces de colores (<i>Carassiusauratus</i>)
DCF	Lesiones renales y alteraciones branquiales de la trucha arco iris (<i>Oncorhynchusmykiss</i>)

Tabla 5, continuación.

Compuesto	Efecto adverso
CBM	Estrés oxidativo de la trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
GEM	Inhibición del crecimiento de algas (<i>Anabaena sp.</i>)
PPN	Reducción de huevos viables de medaka japonesa (<i>Oryzias latipes</i>)
TCS	Inhibición del crecimiento de algas (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)
BPA	Efectos estrogénicos y hormonales que aumentan el riesgo de cáncer de mama en humanos. También puede actuar como antiandrógeno, causando efectos secundarios feminizantes en los hombres.
E1, E2 y EE2	Feminización en peces.

2.2. TRATAMIENTO Y DEPURACIÓN DE PURINES

A la hora de desarrollar métodos de tratamiento de purines se debe pensar en un método que permita su aplicación directa como fertilizantes agrícolas, donde haya niveles equilibrados de nutrientes, N, P y K, sin que lleguen a producirse vertidos descontrolados, lo cual podría llegar a originar deterioros en las aguas y en la calidad de los fertilizantes. Los métodos de tratamiento empleados actualmente consisten en una serie de procesos que modifican las propiedades físicas y/o químicas de los purines.

En las granjas pequeñas, tradicionalmente se emplean balsas impermeabilizadas en las que se evapora el agua de forma natural para después poder aplicar el producto directamente sobre el terreno. Sin embargo, esta alternativa solo es sostenible si la aplicación del purín se realiza en las cantidades y periodos adecuados.

En las granjas más grandes, se lleva a cabo otro tipo de tratamientos que casi siempre comienzan con una separación mecánica de las fase sólida y líquida (Redondo, 2015). A continuación se nombran alguna de las principales técnicas de separación de fases sólido-líquido en los purines (MAPA, 2015):

- Separación mecánica por rejilla, por prensa de tornillo, por tamizado, por filtro prensa, por centrifugación, por decantación natural...
- Coagulación-floculación: pretratamientos químicos que permiten la separación de las fases por modificación de las propiedades de sus partículas (ya sea por agregación, sedimentación y/o flotación).

- Separación por filtro de tambor: es el filtro más aplicado. Permite separar las fracciones sólida y líquida por filtración a través de un tambor rotatorio (*Figura 6*).

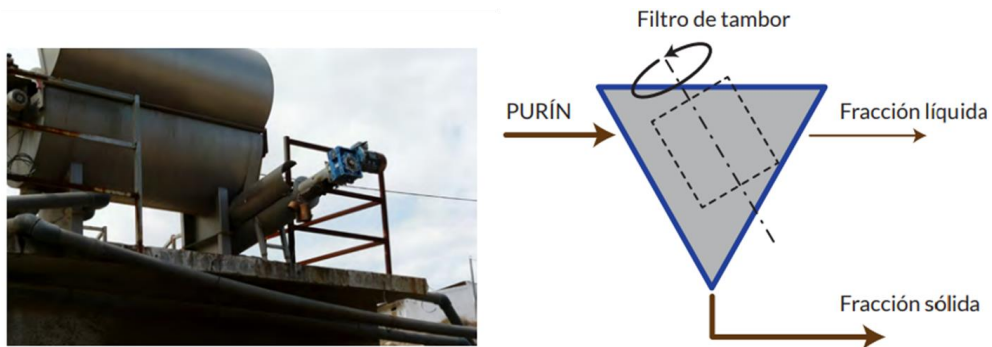


Figura 6- Separación por filtro de tambor (*Fuente: MAPA, 2015*)

Posteriormente, la fracción sólida se almacena mientras que la fracción líquida se envía a otra fosa para eliminar los lodos por sedimentación. Estos lodos se almacenan junto con la parte sólida y el resto líquido se mantiene en un depósito hasta el momento adecuado del reciclado de ambas fracciones. Realizadas estas operaciones previas, estos residuos pueden someterse a tratamientos que los convierten en productos útiles para otros procesos. Estos tratamientos son principalmente procesos biológicos anaerobios, aeróbicos (compostaje) y proceso de lodos activados (Agencia Extremeña de la Energía, 2010).

El proceso de fermentación anaerobia se lleva a cabo en un biodigestor (*Figura 7*) en el cual se produce la descomposición del purín en ausencia de oxígeno. Este proceso se divide en varias etapas (desintegración, hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis), cuyo objetivo es la producción de energía (biogás), por degradación de la materia orgánica debido a la acción de microorganismos, y por otro lado, la transformación del purín en un producto final, digestato o biol, con unas propiedades fisicoquímicas que valorizan su uso agrícola como fertilizante. La digestión anaeróbica es probablemente el proceso más empleado debido a su capacidad de recuperación de energía. Hay dos tipos de plantas que llevan a cabo este tipo de procesos:

- Plantas mesofílicas: trabajan a temperaturas de aproximadamente 37°C con una variaciones de hasta 2°C.
- Plantas termofílicas: trabajan a temperaturas de aproximadamente 52°C, pero sólo pueden variar hasta 0.5°C.

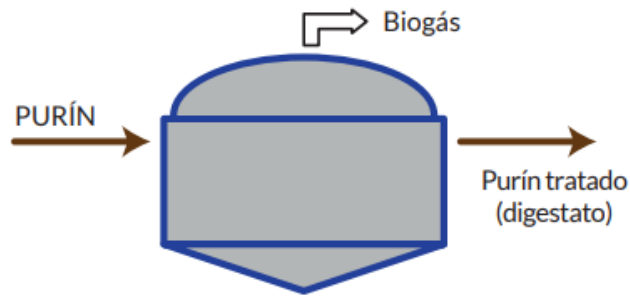


Figura 7- Esquema del proceso de degradación anaerobia (Fuente: MAPA, 2015).

El proceso de compostaje consiste en una degradación aeróbica (en presencia de oxígeno) de carácter termofílico y estabilización del sustrato orgánico. En este proceso se generan como subproductos calor, vapor de agua y dióxido de carbono. El compost es el producto orgánico que se obtiene de este proceso, y se caracteriza por poseer un peso y volumen mucho más bajo que el purín inicial (debido a la evaporación del agua durante el proceso), conservando el máximo porcentaje de los nutrientes del producto inicial sin tratar. El producto final es rico en humus y puede emplearse como fertilizante (MAPA, 2015)

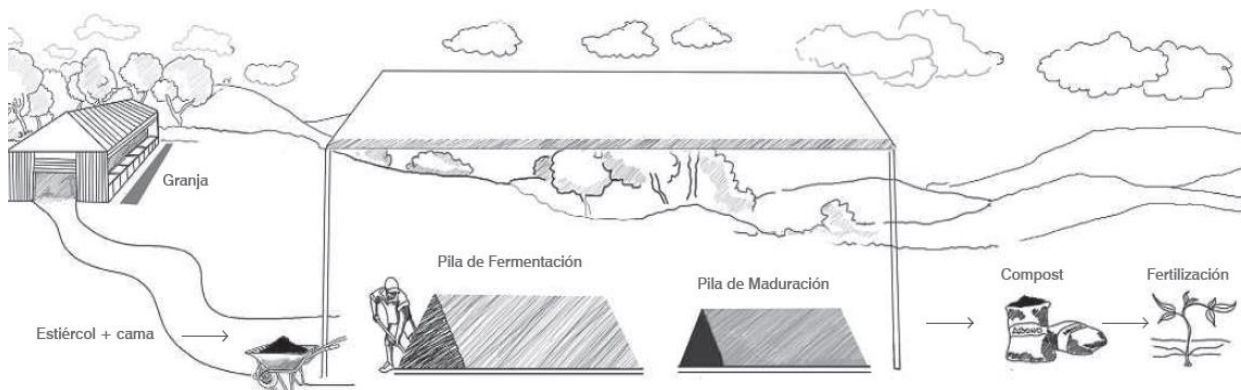


Figura 8-Esquema general del proceso de compostaje (Fuente: Gallo & Bustamante, 2012).

El proceso de lodos activados emplea un sistema de aireación difusa o mecánica del purín que se encuentra dentro de un reactor aerobio, en el cual se lleva a cabo reacción en presencia de oxígeno y en donde se generan lodos activados, que son los que depuran el purín. En los lodos generados se debe separar la fracción sólida y la líquida en un decantador o sedimentador, de manera que los sólidos secos se emplean como abono y los líquidos purificados se liberan en las fuentes de agua.

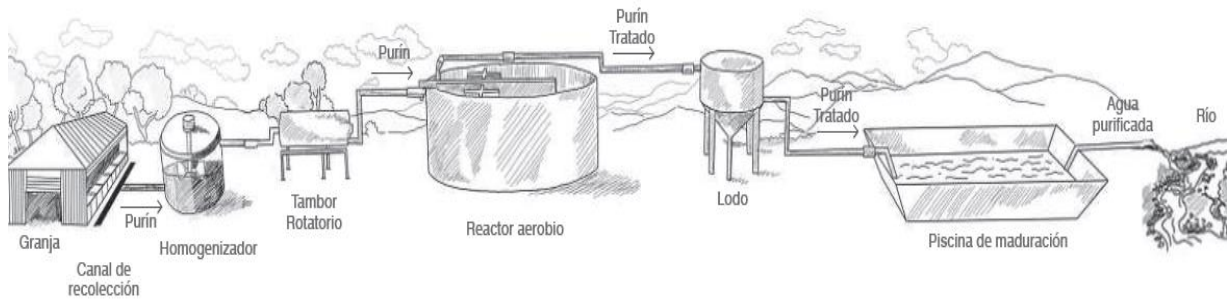


Figura 9- Esquema general del proceso de lodos activados (Fuente: Gallo & Bustamante, 2012).

Todos los tratamientos mencionados anteriormente permiten dar una utilidad a los residuos porcinos revalorizándolos, lo cual ha suscitado el interés del sector privado. Este hecho ha conducido a la implantación de grandes plantas depuradoras de purines por todo el territorio nacional.

Por otro lado, estos métodos de tratamiento tan solo contemplan una disminución de los niveles de nitratos, fosfatos y materia orgánica en los residuos ganaderos, no son totalmente efectivos para la eliminación de fármacos veterinarios. Además, suponen un alto coste, una elevada huella de carbono y algunos pueden modificar los CECs originales, dando lugar a sustancias más tóxicas. Por lo tanto, es necesario implantar nuevos métodos más avanzados para el tratamiento de purines que permitan eliminar los CECs (Gogoi et al., 2018).

En la actualidad, se emplean costosas técnicas físico-químicas para eliminar los fármacos de las aguas residuales, destacando las tecnologías de tratamiento en procesos de oxidación avanzados (AOP) como la oxidación de Fenton, la ozonización, la electroquímica, la fotocatalisis, la sonocatálisis o la sonofotocatálisis. De todos estos procesos, caben destacar las irradiaciones ultrasónicas y ultravioleta (UV) debido a su fácil operación y su gran aplicabilidad contra varios contaminantes. Estas técnicas emplean la alta reactividad de los radicales hidroxilo para oxidar progresivamente compuestos orgánicos a productos inocuos (Kanakaraju et al., 2018 ; Yap et al., 2019). Recientemente han comenzado a estudiarse nuevas técnicas que emplean microorganismos fototróficos, más concretamente la simbiosis de algas y bacterias. Esta técnica permite una eliminación eficiente de materia orgánica, nutrientes, metales pesados y patógenos, debido a su metabolismo dual autótrofo y heterótrofo (López-Serna et al., 2019). La depuración de los purines con microalgas crecidas en reactores (biomasa) permite obtener biocombustibles, disminuir los niveles de CO₂, tratar aguas residuales, e incluso disminuir la concentración de las drogas veterinarias. Esto es

gracias a todos los procesos que tienen lugar en los reactores: biodegradación, fotodegradación, volatilización y absorción a la biomasa algal.

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Una revisión bibliográfica acerca de los métodos empleados para la determinación de CECs en muestras como el purín, mostró el empleo de una gran variedad de técnicas. Sin embargo, todas las publicaciones distinguían dos etapas fundamentales en el método: un tratamiento de la muestra, que abarca la mayor parte del proceso, y un análisis cromatográfico posterior, que es un proceso más rápido que permite analizar compuestos con diferentes propiedades químicas a la vez que se encuentran en la misma muestra. El tratamiento de muestra incluye a su vez dos procesos en el caso de muestras sólidas, uno primero de extracción sólido-líquido (SLE) y otro a continuación de limpieza y concentración de la muestra. En el caso de las muestras líquidas, solo se lleva a cabo la limpieza y concentración de la muestra. Este proceso inicial de tratamiento de muestra es indispensable ya que los analitos que se van a determinar están generalmente en bajas concentraciones en matrices complejas, las cuales suelen estar presentes durante todo el proceso analítico (Abril et al., 2018; Yan et al., 2014; Ho et al., 2012; Pérez-Lemus et al., 2020).

La extracción sólido-líquido es utilizada normalmente en el tratamiento de muestras sólidas, eliminando y separando los analitos de interés de interferentes que podrían ocasionar problemas en las posteriores etapas del análisis. En la *Figura 10* aparecen algunas de las técnicas de extracción que más aparecen en las publicaciones científicas, comparando su uso en distintos periodos de tiempo. La mayoría de los procedimientos de extracción que aparecen se basan fundamentalmente en la extracción asistida por ultrasonido (UAE), que supone en torno al 49% del total de técnicas de extracción que se suelen emplear, seguida de la extracción líquida presurizada, PLE (Nieto et al., 2010), que supone el 19% y la extracción asistida por microondas, MAE (Lu et al., 2018), que es el 9%. Recientemente, se han citado en algunas investigaciones nuevas metodologías de extracción como alternativa a las nombradas anteriormente. Entre estas nuevas metodologías de extracción se encuentran el método de matriz de dispersión en fase sólida (MSPD) o QuEChERS (Peysson & Vulliet, 2013; Cerqueira et al., 2014), cuyo objetivo es mejorar la sensibilidad y selectividad de la extracción, ya que el aislamiento y la purificación se combinan en un solo paso,

disminuyendo las posibles fuentes de error (Pérez-Lemus et al., 2019; Dorival-García et al., 2013).

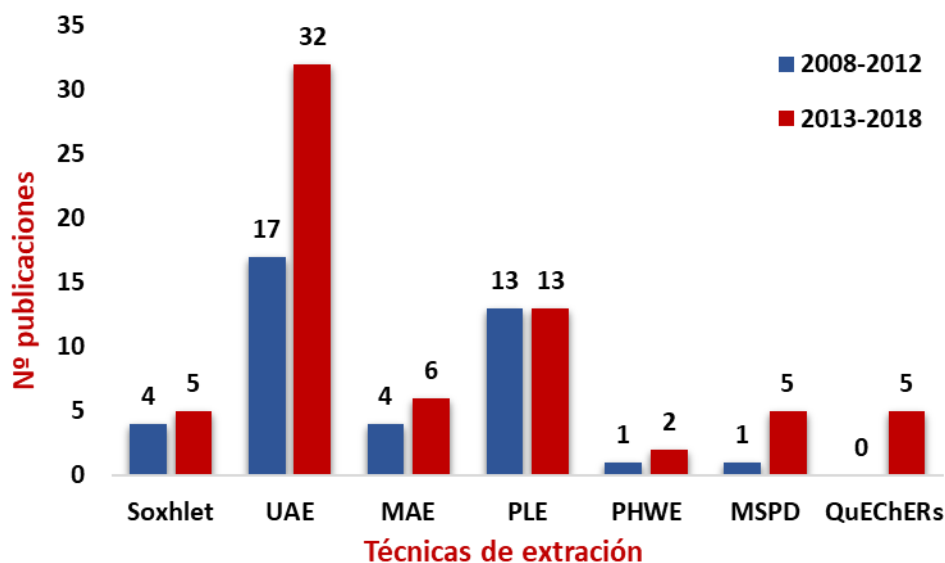


Figura 10- Comparación de las técnicas de extracción nombradas en las publicaciones científicas entre 2008 -2012 y entre 2013-2018 (Fuente: Pérez-Lemus et al., 2019).

Normalmente suele emplearse MeOH en distintos porcentajes con agua como disolvente de extracción ya que la mayoría de los CECs tienen una polaridad media-alta (Pérez-Lemus et al., 2020). Además, algunos autores consideran que la adición de AEDT favorece la extracción de tetraciclinas, quinolonas y macrólidos al evitar la formación de complejos entre estos compuestos y los cationes calcio y magnesio de las muestras (Martínez-Carballo et al., 2007; Mirzaei et al., 2017).

La mayoría de las técnicas de extracción no son lo suficientemente selectivas y se necesita una etapa de limpieza o 'clean-up' posterior (Zuloaga et al., 2012). Aunque puede haber interferencias en cualquier etapa del proceso analítico, el análisis instrumental por cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas es especialmente sensible a los efectos de la matriz. Este paso es necesario para reducir la materia coextraída que no tiene interés analítico. Casi el 60% de las publicaciones revisadas emplearon como etapa de limpieza la extracción en fase sólida, SPE (Ho et al., 2012; Lu et al., 2018), tanto en fase normal como en fase inversa, como se muestra en la *Figura 11*. Sólo algunos artículos emplean otros agentes de limpieza como florisil, sílice o MgSO₄. Sin embargo, la cromatografía de permeación en gel (GPC) o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC),

también se ha utilizado para purificar contaminantes orgánicos. En gran parte de los estudios revisados que empleaban este método, la limpieza se realizó mediante GPC en combinación con SPE en fase normal (Chiu et al., 2009).

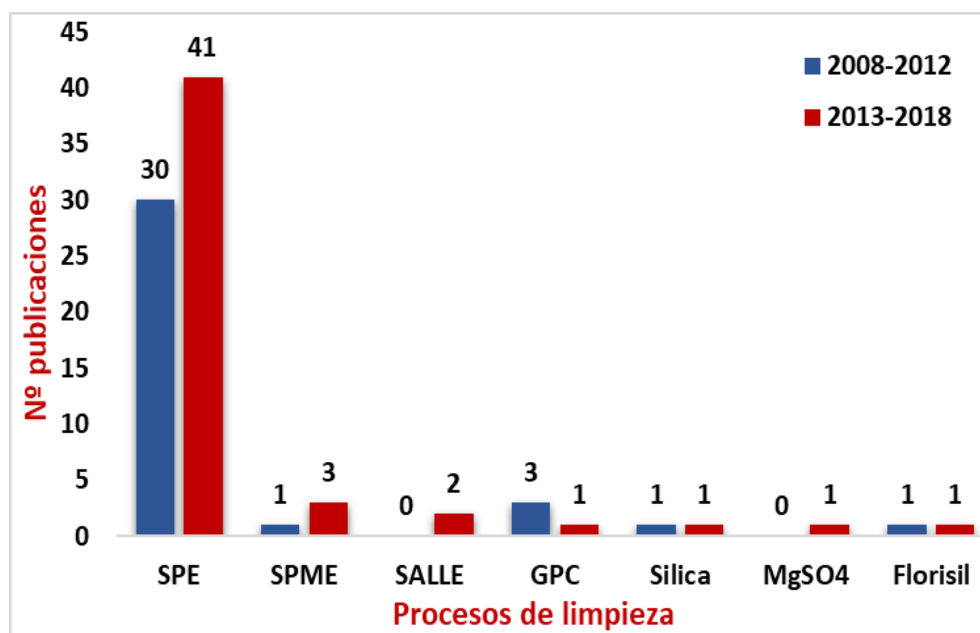


Figura 11- Comparación de las técnicas de limpieza nombradas en las publicaciones científicas entre 2008 -2012 y entre 2013-2018 (Fuente: Pérez-Lemus et al., 2019).

El análisis instrumental de los CECs en purines se basa principalmente en la separación cromatográfica acoplada a espectrometría de masas. La mayoría de los CECs son sustancias polares con limitaciones de volatilidad como para llevar a cabo el análisis por cromatografía de gases (GC), lo cual puede solventarse empleando procesos de derivatización. Normalmente el análisis por GC se encuentra acoplado a detectores de espectrometría de masas, en modalidad simple (MS) o en tándem (MS/MS) (Pérez-Lemus et al., 2020).

No obstante, la cromatografía de líquidos (LC) se ha convertido en la técnica más popular (73%) en la determinación de CECs en matrices ambientales, lo cual puede deberse a que permite analizar un mayor rango de compuestos sin derivatización previa (Ho et al., 2012; Chiu et al., 2009). El 63% de las revisiones empleaban MS/MS con analizador QqQ, aunque recientemente está surgiendo un creciente interés por analizadores como Q-TOF, debido a las mejoras en el rango dinámico y la sensibilidad de TOF. Dentro de la LC, algunos trabajos emplearon HPLC y otros UHPLC, cuya principal diferencia reside en que en UHPLC el diámetro de las partículas de la columna es relativamente más pequeño, lo que mejora la eficacia de la separación, obteniéndose picos más estrechos y límites de detección ligeramente

inferiores. Sin embargo, al aumentar la presión del sistema, son necesarias bombas especialmente adaptadas para ello (Wang et al., 2019; Shao et al., 2007).

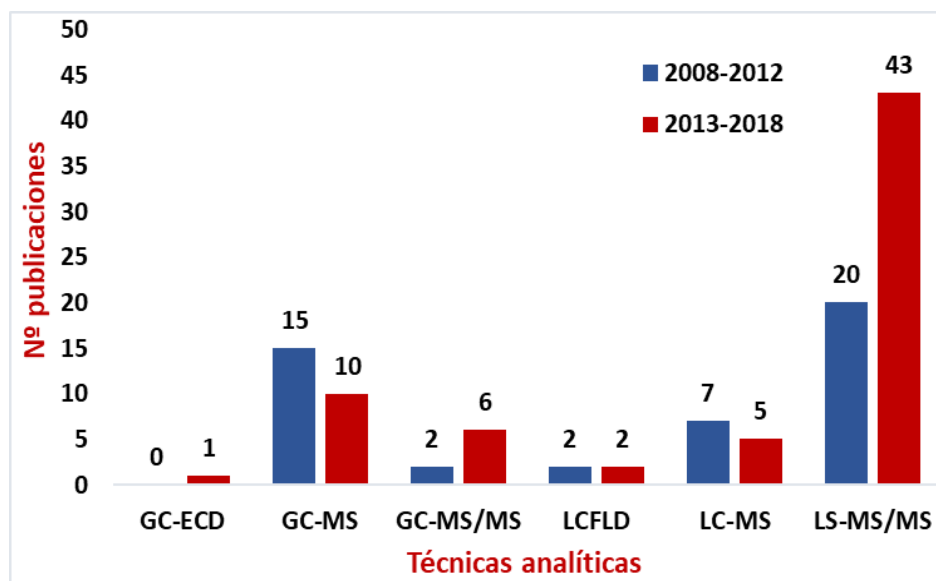


Figura 12- Comparación de las técnicas de análisis instrumental nombradas en las publicaciones científicas entre 2008 -2012 y entre 2013-2018 (Fuente: Pérez-Lemus et al., 2019).

En este trabajo se trata por primera vez de desarrollar un método de análisis de muestras de purín bruto sin previa separación de sus fases para analizarlas por separado, empleando como método de extracción la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), con la cual se pretende la solubilización de los analitos de interés de la fracción sólida hacia el disolvente, que en este caso será metanol con un porcentaje determinado de agua. También se empleó un adsorbente, para lograr una mayor adsorción de la matriz para que interfiera en menor cuantía en el análisis de los analitos de interés. Además, se ha optimizado el pH de extracción y la necesidad o no de añadir AEDT para mejorar la eficacia de la extracción. Tras la extracción, se llevó a cabo el proceso de limpieza-concentración mediante extracción en fase sólida (SPE). Como sorbente se utilizaron cartuchos de fase inversa Oasis HLB, sorbente polimérico universal de fase inversa muy hidrofílico que permite la extracción de compuestos ácidos, básicos y neutros en distintas matrices. La SPE consta generalmente de cuatro etapas:

- Activación del cartucho: consta a su vez de dos etapas: solvatación de los puntos activos con MeOH y equilibración del sorbente con agua miliQ.
- Elución de la muestra: se hace pasar la muestra por el sorbente para retener los analitos de interés y eliminar los compuestos coextraídos de la matriz.
- Lavado del cartucho: se eliminan posibles interferentes que hayan podido quedar retenidos junto con los analitos, empleando una mezcla metanol-agua al 5%.

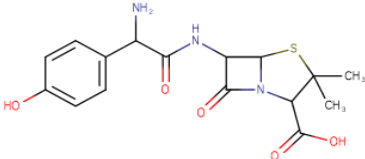
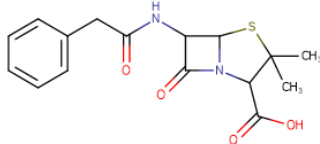
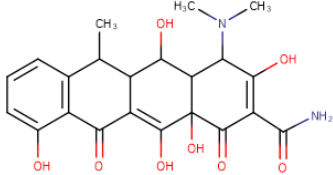
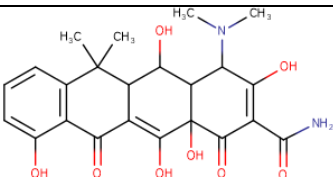
- Elución: se deposita un disolvente (en este caso AcN) en el cartucho para minimizar la interacción analito-adsorbente y eluir los analitos de interés.

Una vez realizada la SPE, se llevó a cabo una etapa de preconcentración mediante la eliminación del eluyente por evaporación empleando una corriente de un gas inerte (nitrógeno). Este paso incluye una primera evaporación, seguida de una redisolución con metanol y otra evaporación posterior. Antes del análisis instrumental, es necesaria una nueva redisolución de la muestra en fase móvil y posterior filtración hacia viales cromatográficos ámbar que protegen al extracto de la radiación solar. La determinación de las drogas veterinarias se realiza mediante UHPLC en fase inversa, con columnas de ODS, y con fases móviles MeOH-H₂O en modo gradiente. Como detector se utiliza un equipo de espectrometría de masas con analizador QqQ.

2.4. COMPUESTOS ESTUDIADOS

En la *Tabla 6* se realiza una clasificación de los 59 CECs estudiados en este trabajo agrupados en primer lugar por categorías terapéuticas y en segundo lugar por familias. También se muestra su fórmula molecular, su estructura, y se incluyen los valores de su peso molecular (PM), pK_a^1 y $\log P^2$, a 25°C, según datos obtenidos de la base de datos Scifinder. El conocimiento de los valores de pK_a y $\log P$ ofrece una información preliminar útil a la hora de elegir algunas condiciones en el tratamiento de la muestra. Los valores de pK_a dan una idea de la acidez de los compuestos a estudiar, de manera que un pK_a pequeño está relacionado a un ácido más fuerte y un pK_a grande, a un ácido más débil, o una base más fuerte. Por otro lado, los valores de $\log P$, donde P es el coeficiente de reparto, dan idea del carácter más hidrófobo o hidrófilo de los compuestos, por lo que de que los compuestos con mayores valores de $\log P$ presentarán un carácter más hidrófobo, mientras que los tengan valores de $\log P$ menores serán más hidrófilos. Sin embargo, estos valores no son suficientes para predecir el comportamiento real de estos microcontaminantes en las distintas fases de la muestra, ya que no consideran la presencia de otros fenómenos que se dan a la vez (estabilidad química, dilución). Caben destacar también algunas características generales de las principales familias de compuestos a estudiar. Por ejemplo, los β -lactámicos son compuestos polares y sensibles a ácidos y bases, las tetraciclinas se degradan a pH extremo, las fluoroquinolonas tienden a ser adsorbidos por la matriz sólida, las sulfonamidas se disuelven fácilmente en disolventes polares y los macrólidos son poco solubles en agua.

Tabla 6- Los 59 CECs estudiados en este trabajo

Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Antibióticos	β-lactámicos	AMO	365.4	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S		Más ácido: 2.44 Más básico: 7.14	0.883
		PEN	334.39	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S		Más ácido: -1.32 Más básico: 2.45	1.918
	Tetraciclinas	DOX	444.43	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈		Más ácido: 4.50 Más básico: 10.84	1.777
		OTC	460.43	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉		Más ácido: 4.50 Más básico: 10.80	0.479

¹ pka = -log ka, siendo ka la constante de disociación ácida

$$\log P_{\text{octanol-agua}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{agua}}} \right)$$

²

Tabla 6, continuación

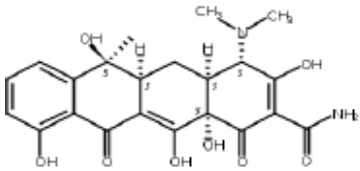
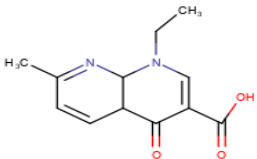
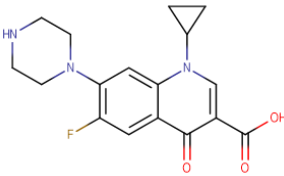
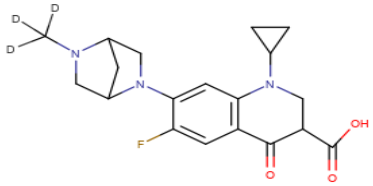
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C	
Antibióticos	Tetraciclinas	TTC	444.43	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈		Más ácido: 4.50 Más básico: 11.02	0.617	
	Quinolonas	AND	232.24	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃		Más ácido: 3.45 Más básico: 6.12	0.025	
		Fluoroquinolonas (subfamilia quinolonas):						
		CIP	331.34	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃		Más ácido: 6.43 Más básico: 8.68	1.625	
DAN	357.38	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃		Más ácido: 6.43 Más básico: 9.00	1.811			

Tabla 6, continuación

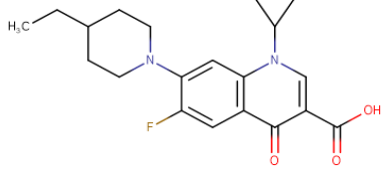
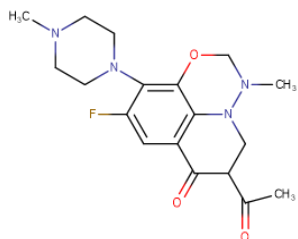
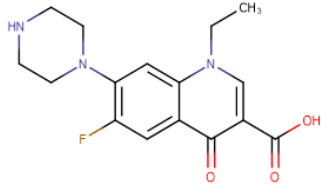
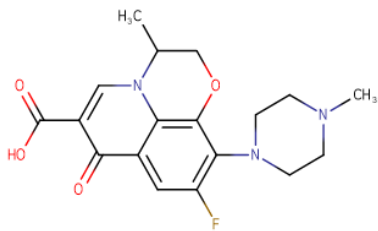
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Antibióticos	Quinolonas	ENR	359.39	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃		Más ácido: 6.43 Más básico: 7.76	2.306
		MAR	362.36	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄		Más ácido: 6.02 Más básico: 7.34	-0.641
		NOR	319.33	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃		Más ácido: 0.16 Más básico: 8.68	1.744
		LEV	361.37	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄		Más ácido: 5.19 Más básico: 7.37	1.855

Tabla 6, continuación

Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Antibióticos	Quinolonas	OFL	361.37	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄		Más ácido: 5.19 Más básico: 7.37	1.855
	Sulfonamidas	SDD	278.33	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S		Más ácido: 1.69 Más básico: 7.89	0.296
		SDZ	250.28	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S		Más ácido: 1 Más básico: 6.81	-0.074
		SMX	253.28	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S		Más ácido: 1.39 Más básico: 5.81	0.659

Tabla 6, continuación

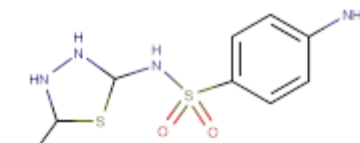
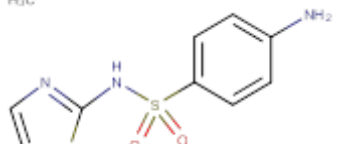
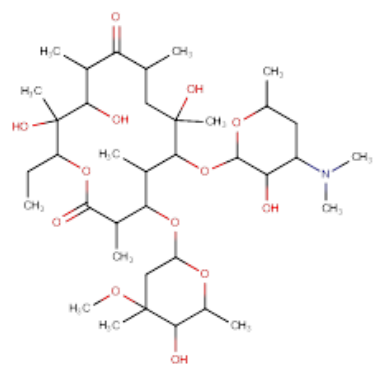
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Antibióticos	Sulfonamidas	SMZ	270.33	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂		Más ácido: 2.07 Más básico: 5.51	0.52
		STZ	255.32	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂		Más ácido: 2.19 Más básico: 7.24	0.05
	Macrólidos	ERY	733.93	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃		Más ácido: 8.16 Más básico: 13.09	1.909

Tabla 6, continuación

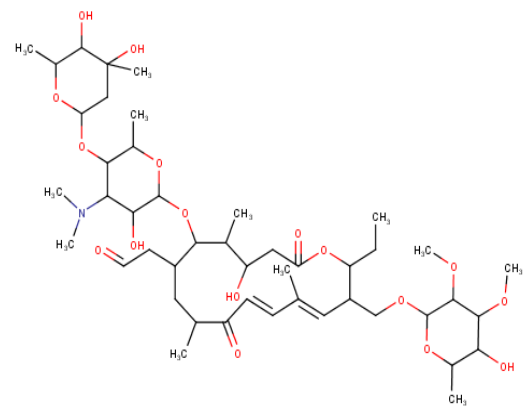
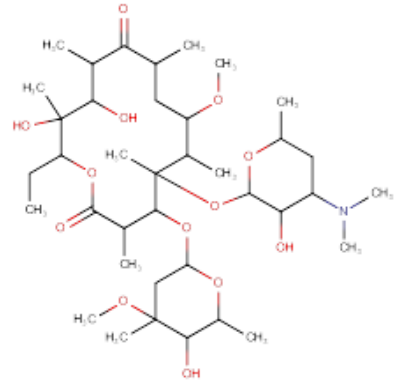
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Antibióticos	Macrólidos	TYL	916.1	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇		Más ácido: 7.39 Más básico: 13.06	0.628
		CTM	747.95	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃		Más ácido: 8.16 Más básico: 13.08	2.805

Tabla 6, continuación

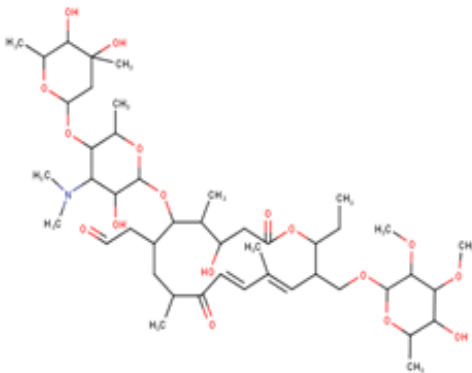
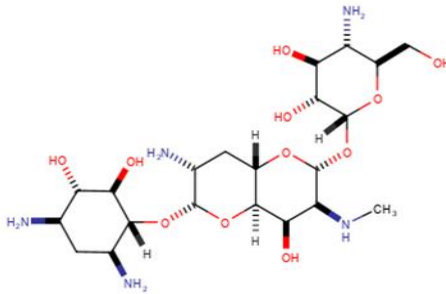
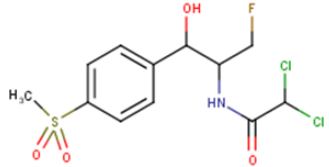
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Antibióticos	Pleuromutilinas	TIA	493.74	C ₂₈ H ₄₇ NO ₄ S		Más ácido: 9.74 Más básico: 14.65	4.38
	Aminoglucósidos	APR	539.58	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₁₁		Más ácido: 9.48 Más básico: 12.91	-3.427
	Fenicoles	FLO	358.21	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ FNO ₄ S		Más ácido: -1.79 Más básico: 10.73	1.175

Tabla 6, continuación

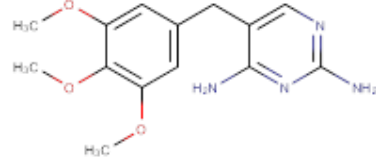
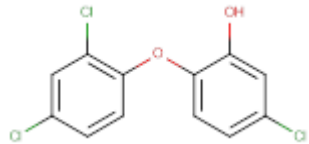
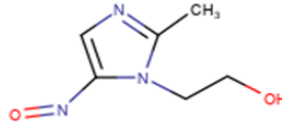
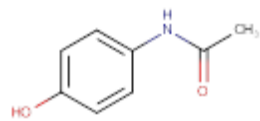
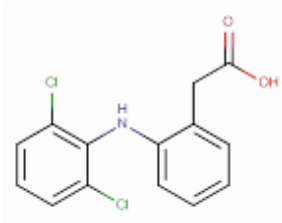
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Antibióticos	Diaminopirimidinas	TMP	290.32	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃		Más básico: 7.04	0.594
	Antimicrobianos/ Antiprotozoario	TCS	289.54	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂		Más ácido: 7.80	5.343
		MTN (nitroimidazoles)	171.15	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃		Más ácido: 2.58 Más básico: 14.44	-0.135
Analgésicos / Antiinflamatorios	Analgésicos	AAF	151.16	C ₈ H ₉ NO ₂		Más ácido: 1.72 Más básico: 9.86	0.475
	AINE (Anti-inflamatorios no esteroides)	DCF	296.15	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂		Más ácido: -2.26 Más básico: 4.18	4.548

Tabla 6, continuación

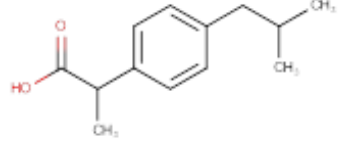
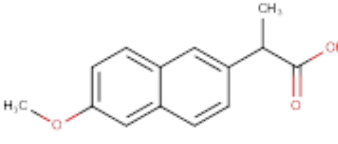
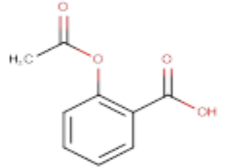
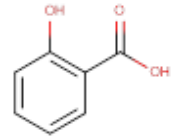
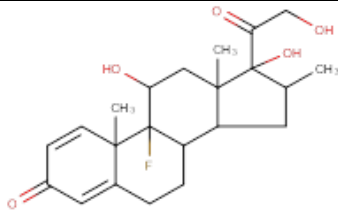
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C	
Analgésicos / Antinflamatorios	AINE (Anti-inflamatorios no esteroides)	IBP	206.28	C ₁₃ H ₁₈ O ₂		Más ácido: 4.41	3.502	
		NPX	230.26	C ₁₄ H ₁₄ O ₃		Más ácido: 4.84	2.876	
		Salicilatos (subfamilia AINE):						
		AAS	180.16	C ₉ H ₈ O ₄		Más ácido: 3.48	1.399	
	ASC	138.12	C ₇ H ₆ O ₃		Más ácido: 3.01	2.011		
Corticoesteroide		DEX	392.46	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅		Más ácido: 12.13	2.033	

Tabla 6, continuación

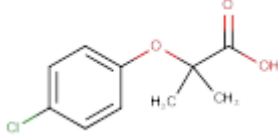
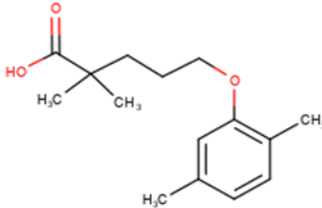
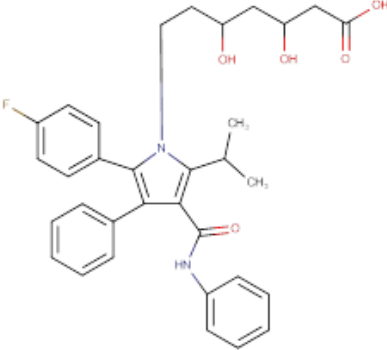
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Reguladores de lípidos	Principio activo de fibratos	ACF	214.65	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃		Más ácido: 3.18	2.425
	Fibratos	GEM	250.33	C ₁₅ H ₂₂ O ₃		Más ácido: 4.75	4.302
	Estatinas	ATV	558.64	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅		Más ácido: 0.38 Más básico: 4.29	3.846

Tabla 6, continuación

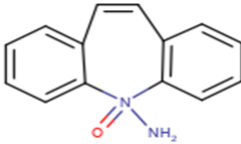
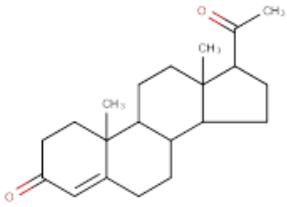
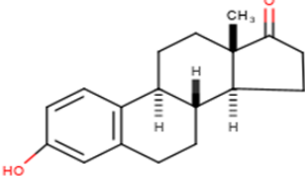
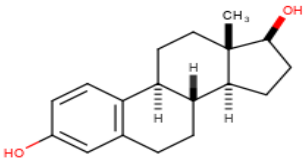
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Medicamentos psiquiátricos/ anticonvulsantes		CBM	236.27	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O		Más ácido: -0.49 Más básico: 13.94	1.895
Hormonas	Hormonas naturales	PGT	341.46	C ₂₁ H ₃₀ O ₂			3.827
		E1	270.37	C ₁₈ H ₂₂ O ₂		Más ácido: 10.25	3.624
		E2	272.38	C ₁₈ H ₂₄ O ₂		Más ácido: 10.27	4.146

Tabla 6, continuación

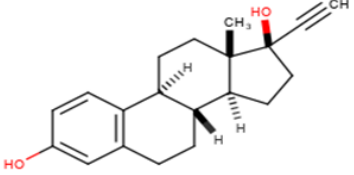
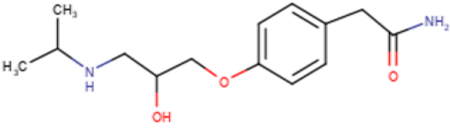
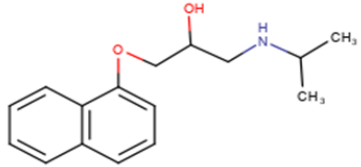
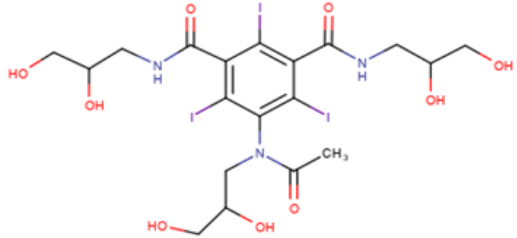
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Hormonas	Hormonas sintéticas	EE2	296.4	C ₂₀ H ₂₄ O ₂		Más ácido: 10.24	4.106
β-bloqueantes	Medicamentos cardiovasculares	ATN	266.34	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃		Más ácido: 9.43 Más básico: 13.88	0.335
		PPN	259.34	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂		Más ácido: 9.50 Más básico: 13.84	2.9
Agente de contraste radiológico		IOH	821.14	C ₁₉ H ₂₆ I ₃ N ₃ O ₉		Más ácido: -2.72 Más básico: 11.35	-2.921

Tabla 6, continuación

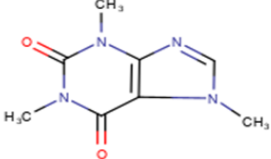
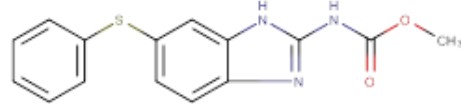
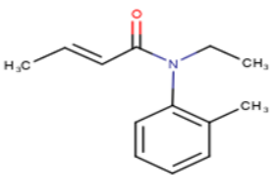
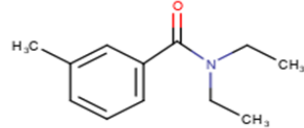
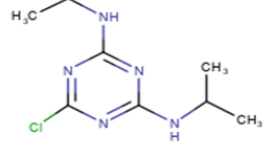
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Estimulante		CAF	194.19	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂		Más básico: 0.52	-0.628
Antiparásitos	Bencimidazoles	FEN	299.35	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S		Más ácido: 5.25 Más básico: 10.80	2.364
		CRT	203.28	C ₁₃ H ₁₇ NO		Más básico: 1.14	2.464
Repelente de insectos		DEET	191.27	C ₁₂ H ₁₇ NO		Más básico: -1.37	2.419
Herbicida		ATZ	215.68	C ₈ H ₁₄ ClN ₅		Más básico: 2.27	2.636

Tabla 6, continuación

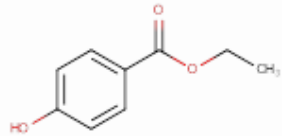
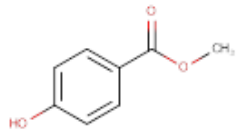
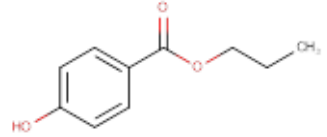
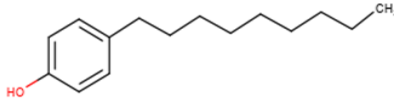
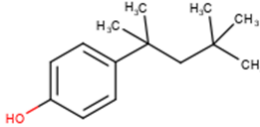
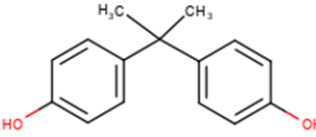
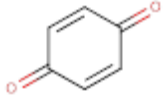
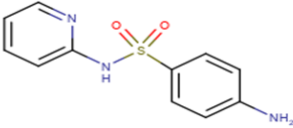
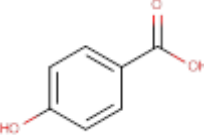
Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Conservante	Parabenos	EPR	166.17	C ₉ H ₁₀ O ₃		Más ácido: 8.31	2.391
		MPR	152.15	C ₈ H ₈ O ₃		Más ácido: 8.31	1.882
		PPR	180.2	C ₁₀ H ₁₂ O ₃		Más ácido: 8.23	2.901
Tensioactivos	Alquilfenoles	NNF	220.35	C ₁₅ H ₂₄ O		Más ácido: 10.15	6.142
		TOP	206.32	C ₁₄ H ₂₂ O		Más ácido: 10.15	5.18
Plastificantes		BPA	228.29	C ₁₅ H ₁₆ O ₂		Más ácido: 10.29	3.641

Tabla 6, continuación

Clasificación terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura	pka ¹ a 25°C	log P ² a 25°C
Precursores de otros compuestos	p-quinonas	BZQ	108.09	C ₆ H ₄ O ₂			0.394
		SPD	249.29	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S		Más ácido: 2.13 Más básico: 8.54	0.469
		AHB	138.12	C ₇ H ₆ O ₃		Más ácido: 4.57	1.401

3. **OBJETIVOS**

Se pretenden lograr cuatro objetivos:

1. Optimizar un método de preparación de muestra para la determinación de drogas de diferentes propiedades químicas en muestras de purín bruto porcino.
2. Validar el método de análisis propuesto para 50 microcontaminantes en muestras de purín bruto, atendiendo a las características analíticas básicas.
3. Conocer el nivel de concentración de cada una de las drogas en muestras de purín bruto centrifugada.
4. Realizar un balance de materia al contenido de cada droga en una muestra de purín bruto sin centrifugar, verificando si el contenido determinado en el purín bruto se corresponde con el contenido determinado individualmente en la fase sólida y líquida de ese purín.

4. EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

En la *Tabla 7* se muestra una lista del material y reactivos de uso general empleados en la realización de la parte experimental del estudio y en la *Tabla 8* los patrones deuterados empleados.

Tabla 7- *Material y reactivos empleados*

Material	Reactivos
Tubos Falcon de 50 mL de polietileno	Agua miliQ, Waters
Gradilla para tubos Falcon, tubos SPE y viales de 2 mL	Metanol pureza HPLC, Labbox
Viales de 2 mL ámbar	Acetonitrilo pureza HPLC, Labbox
Viales de 2 mL transparentes	Acetona, Labbox
Tapones roscados para viales de 2 mL	EtOH, Labbox
Capilares de 100-200 µl	Agua tipo II, Waters
Puntas de plástico para micropipetas	Alúmina, óxido de aluminio (Al ₂ O ₃), Scharlau
Micropipetas de 100 y 500 µl y 5ml	Octadecilsilano (ODS, C18), Scharlau
Cajas congelables de cartón para viales de 2 mL de y de tubos de centrifuga	AEDT, sal disódica, Sigma-Aldrich
Jeringas desechables de plástico de 10 y 2 mL	Ácido fórmico grado HPLC, Labbox
Aguja estéril para jeringas y evaporador	Ácido clorhídrico 2M, Labbox
Agujas de metal para el evaporador	Patrones de las 59 drogas, pureza cromatográfica (Sigma-Aldrich)
Pipetas Pasteur de vidrio	
Tetina de goma para Pipeta Pasteur	
Filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro de teflón	
Filtros de jeringa de 0,7 µm de tamaño de poro de PTFE	
Jeringas Hamilton de 1 y 5 mL	
Matraces aforados de 10, 100, 1000 mL	
Frasco graduado de borosilicato de vidrio transparente de 100 y 1000mL	
Cartuchos Oasis HLB de 3ml y 60 mg de adsorbente, Waters	
Matraz Kitasato y gomas	
Bomba de vacío	
Tubos conectores de plástico	
Tubos SPE de 6mL	
Bala de nitrógeno seco	
Vidrio de reloj	
Frascos de plástico para muestras	
Espátula	

Tabla 8- Lista de los 16 patrones deuterados empleados de pureza cromatográfica

Patrones deuterados	
Danofloxacino-d3, Sigma-Aldrich	Naproxeno-d3, TRC
Enrofloxacina-d5, Sigma-Aldrich	Bisfenol A-d8, LGC-Standards
Ciprofloxacino-d8, Sigma-Aldrich	Ibuprofeno-d3, TRC
Sulfadimidina-d4, TRC	Ácido salicílico-d4, TRC
Sulfadiacina-d4, TRC	Ácido clofibrico-d4, LGC-Standards
Sulfametoxazol-d4, TRC	Metilparabeno-d4, LGC-Standards
Triclosan-d3, TRC	Etilparabeno-d5, LGC-Standards
Diclofenaco-d4, TRC	Propilparabeno-d7, TRC

En la *Tabla 9* se recogen todos los equipos instrumentales utilizados.

Tabla 9- Equipos utilizados

Equipos
Ultrasonidos, Sonorex Digitex Bandelin
pH-metro, Crison
Balanza analítica, Mettler Toledo
Centrífuga, Thermo Cientific Legent RT+
Mezclador Vortex, Thermo Cientific
Manifold de extracción en fase sólida
Estufa
Congelador a -20 y -80°C
Evaporador de nitrógeno, Organomation N-Evap 11250
Cromatografía/espectrometría de masas en tándem: - UHPLC ExionLC AD con inyector automático - Espectrómetro de masas SCIEX 6500+

4.2. PREPARACIÓN DE PATRONES Y LÍNEAS DE CALIBRADO

Para la preparación de las líneas de calibrado, primero se prepararon las siguientes disoluciones:

- Disoluciones de patrones normales que contienen los 59 CECs en MeOH: A partir de disoluciones individuales de 1000 mg/L de cada uno de los 59 CECs a estudiar, se preparó una disolución SS de 20 mg/L (tanto de AND como de SPD no se dispone de disoluciones de 1000 mg/L, solo de 5 mg/L, por lo que se añadió posteriormente en la disolución T). Para ello, se tomaron 200 µL de cada disolución individual y se llevaron a un matraz de 10 mL, enrasando con MeOH. Posteriormente, a partir de esta disolución SS, mediante una dilución 1:10 de esta, se obtuvo una disolución SS^I de 2 mg/L. A continuación, se preparó la

disolución T de 0.5 mg/L, tomando 2.5 mL de la disolución SS^I, 1 mL del patrón individual de AND de 5 mg/L, 1 mL del patrón individual de SPD de 5 mg/L y se enrasó a 10 mg/L con MeOH. Los sucesivos patrones individuales menos concentrados se prepararon realizando diluciones 1:10, tomando 1 mL de la disolución normal previamente más concentrada y enrasando a 10 mL con MeOH. En este trabajo se prepararon también por este método las siguientes disoluciones de menos concentración: T^I (0.05mg/L), T^{II} (0.005mg/L), T^{III} (0.0005mg/L), T^{IV} (0.00005mg/L). Estas disoluciones se emplearon en el dopado de las muestras.

- Disoluciones de patrones normales que contienen los 59 CECs en fase móvil (FM, 0.1% FA en MeOH-agua 5-95%): Estas disoluciones fueron empleadas para construir una recta de calibrado en fase móvil que se inyectó siempre en el equipo instrumental junto con las muestras a analizar. Para ello se toma 1 mL de la disolución SS en MeOH y se enrasa a 10 mL con fase móvil obteniendo la disolución SS^I en fase móvil. El resto de las disoluciones se prepararán igual que en el caso de las disoluciones normales en MeOH pero enrasando con fase móvil.
- Disoluciones de patrón interno deuterados: Se dispone de disoluciones individuales de 1000 mg/L de 16 patrones internos deuterados (véase en la *Tabla 8*). Como en el caso de los patrones normales, primero se tomaron con capilar 200 µL de cada disolución y se enrasó en un matraz aforado de 10mL con MeOH obteniéndose una disolución iSS de 20 mg/L en MeOH. A partir de la disolución iSS por dilución 1:10 y enrasando con MeOH se preparó una disolución iSS^I de 2 mg/L en MeOH. Por último, de esta disolución se tomaron 2.5mL, se llevaron a un matraz de 10 mL y se enrasó con MeOH, obteniéndose una disolución C de 0.5 mg/L .

Cuando se prepararon todas estas disoluciones, se guardaron en el congelador a -80°C en una caja de cartón congelable, para protegerles de la luz y evitar la degradación de los CECs, ya que algunos compuestos como las tetraciclinas son especialmente fotosensibles.

A continuación, se preparó la recta de calibrado en fase móvil en viales cromatográficos ámbar de 2 mL a partir de las disoluciones de patrones normales que contienen los 59 CECs en fase móvil previamente preparadas. Las cantidades a añadir en cada punto de esta recta así como su concentración final se muestran en la *Tabla 10*. Esta recta de calibrado permitió cubrir para la mayoría de los compuestos de interés todo el rango de concentraciones estudiadas, 0.005-400 ppb.

Tabla 10- Preparación recta de calibrado en fase móvil

Nombre	DI-1	DI-2	DI-3	DI-4	DI-5	DI-6	DI-7	DI-8	DI-9	DI-10	DI-11	DI-12
[] (mg/L)	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50	100	200	400
Vd.stock en FM (mL)	100 (T ^{IV})	200 (T ^{IV})	100 (T ^{III})	200 (T ^{III})	100 (T ^{II})	200 (T ^{II})	100 (T ^I)	200 (T ^I)	100 (T)	200 (T)	100 (SS ^I)	200 (SS ^I)
V _{FM} (mL)	900	800	900	800	900	800	900	800	900	800	900	800

Tras la optimización de algunos parámetros experimentales, se aplicó el correspondiente tratamiento de muestra y análisis instrumental (que se describirán posteriormente en los apartados 4.3 y 4.4., respectivamente), obteniéndose los cromatogramas de los extractos. Las áreas de pico de los analitos en estos extractos se emplearon primero para calcular las concentraciones de drogas presentes en las muestras reales usadas para la validación del método de análisis, para lo que se doparon alícuotas de muestra con cantidades crecientes de droga y se aplicó el método de calibración adiciones patrón (MAP), representando los áreas de pico frente a la concentración de patrón añadida. Posteriormente se obtuvieron las líneas de calibrado matriz-patrón (MP), donde se representaron el área de pico frente a la concentración total en la muestra. Estas líneas de calibrado MP se emplearon para verificar el rango de linealidad, y estimar el porcentaje de recuperación, repetitividad, y los límites de detección y cuantificación de las drogas.

4.3. PREPARACIÓN DE MUESTRA

4.3.1. Purín bruto

A continuación, se describirá el método propuesto para el tratamiento de muestra llevado a cabo para el análisis de los microcontaminantes. Más adelante, en el apartado de *Resultados y discusión*, se detallarán algunos de los trabajos experimentales previos en los que se fundamentó esta propuesta metodológica.

El tratamiento de muestra se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid y se divide en dos etapas principales: extracción y limpieza de la muestra. Tras el tratamiento de muestra se lleva a cabo el análisis instrumental. En la *Figura 13* se esquematiza el proceso de tratamiento seguido que se desarrolla posteriormente.

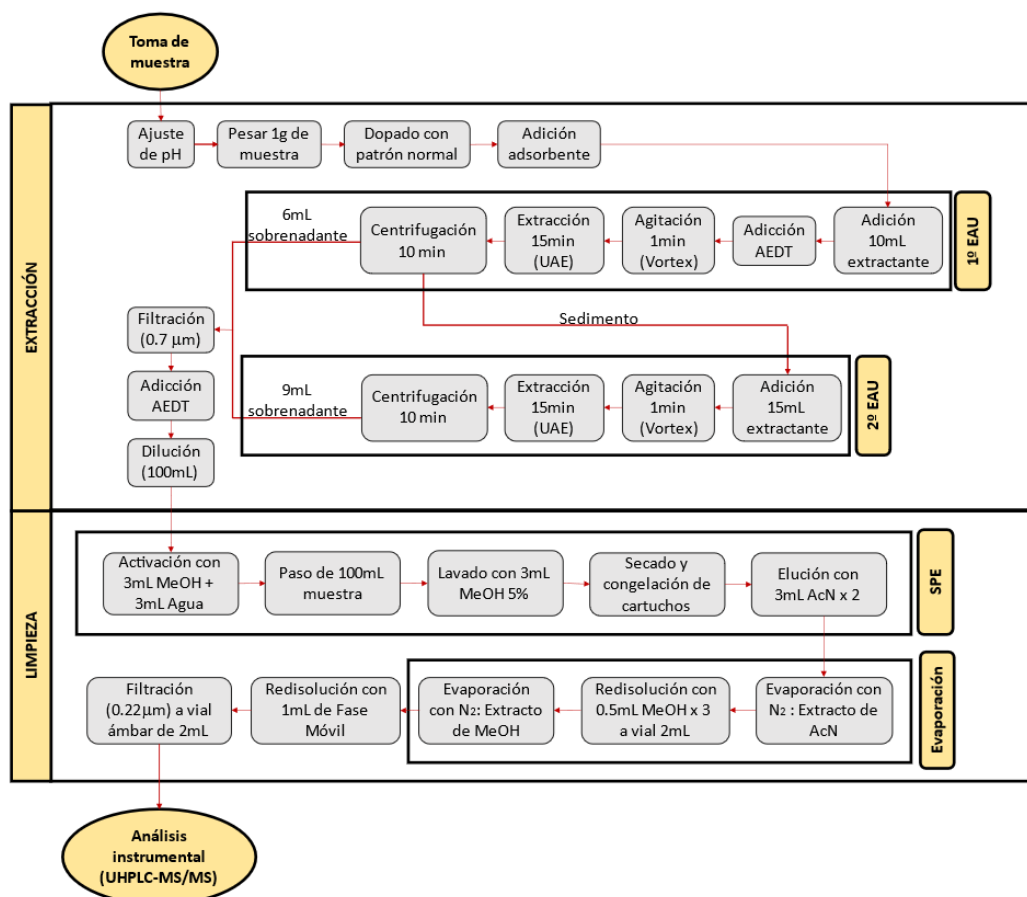


Figura 13- Esquema del proceso de tratamiento de muestra

Las muestras empleadas en este trabajo proceden de una explotación ganadera de Cantalejo en Segovia. El purín llega al laboratorio en forma de líquido con sólidos en suspensión y se conserva en congelador a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis. El tratamiento de muestra llevado a cabo consiste en una extracción asistida por ultrasonidos seguida de una extracción en fase sólida. A continuación, se detallan los pasos seguidos en el método finalmente propuesto para el análisis de purín bruto.

4.3.1.1. Etapa de extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos (UAE)

- 1) Agitar bien la suspensión. Con ayuda de un pH-metro y una disolución de HCl 0.5M, preparada previamente, se ajusta la muestra a $\text{pH}=3$ (añadiendo un volumen aproximado de 12 mL de esa disolución de HCl). A continuación, se pesa en la balanza analítica 1g de muestra en un tubo Falcon de polietileno de 50mL.
- 2) Dopar las muestras con el correspondiente volumen de patrón normal en cada caso, con ayuda de un capilar. Cuando se realizó el estudio para la optimización de los factores experimentales, se dopó la muestra con 0.5mL de la disolución SS^I para todas las muestras.

- 3) Dopar las muestras con 100 μL de la disolución iSS¹ de 2 mg/L de patrón interno. Durante el tratamiento de muestra para la optimización de factores no se doparon las muestras con patrones internos.
- 4) Añadir 0.1 g de alúmina activada. La alúmina se activa calentándola durante 24h en la estufa a 120°C y dejándola atemperar después en el desecador. Tanto la cantidad como el tipo de adsorbente fueron optimizados tras considerar como adsorbentes ODS, alúmina y una mezcla de ambos y una cantidad de alúmina de 0.1, 0.2 y 0.3g.
- 5) A continuación, se realizan dos extracciones asistidas por ultrasonidos. Para la primera extracción, añadir 10 mL del extractante, que consiste en una mezcla MeOH-H₂O (10:90), al tubo Falcon que contiene la muestra. El porcentaje MeOH-H₂O ha sido optimizado tras estudiar su efecto a distintas concentraciones: 10, 15, 20% de MeOH en H₂O.
- 6) Añadir 1 mL (0.4%) de una disolución de AEDT-H₂O (5:95). El volumen de esta disolución ha sido previamente optimizado también.
- 7) Agitar todos los tubos Falcon durante 1 minuto en un Vortex.
- 8) Poner durante 15 minutos los tubos en un baño de ultrasonidos a 25°C.
- 9) Centrifugar las muestras durante 10 minutos a 10000 rpm.
- 10) Extraer 6 mL del líquido sobrenadante con una jeringa desechable de plástico con una aguja.
- 11) Retirar la aguja de la jeringa y colocar un filtro de 0.7 μm de tamaño de poro de PTFE para filtrar los 6 mL, que son llevados a un matraz aforado de 100 mL previamente etiquetado.
- 12) Para la segunda extracción, añadir 15 mL de la mezcla MeOH-H₂O (10:90) al mismo tubo Falcon, esta vez sin añadir AEDT.
- 13) De nuevo, agitar los tubos en el Vortex durante 1 minuto.
- 14) Poner durante 15 minutos los tubos en un baño de ultrasonidos a 25°C.
- 15) Centrifugar las muestras durante 10 minutos a 10000 rpm.
- 16) Extraer 9 mL del líquido sobrenadante con una jeringa desechable de plástico con una aguja.
- 17) Retirar la aguja de la jeringa y colocar un filtro de 0.7 μm de tamaño de poro de PTFE para filtrar los 9 mL, que son llevados al mismo matraz aforado de 100 mL donde se recogieron los 6mL de la primera extracción.
- 18) Añadir 2 mL de disolución de AEDT al 5% y enrasar con agua miliQ a 100mL.

4.3.1.2. Etapa de limpieza o 'clean-up' mediante SPE



Figura 14- *Equipo empleado para la SPE*

- 1) Activación del sorbente: añadir 3mL de MeOH a cada cartucho con una micropipeta y dejar que el líquido pase a través de cartucho por gravedad (sin vacío). Cerrar las llaves justo antes de que los cartuchos se queden secos, intentando enrasar con el líquido a la altura del sorbente.
- 2) Equilibración del sorbente: añadir 3mL de agua miliQ a cada cartucho con una micropipeta y dejar que el líquido pase a través de cartucho por gravedad y volver a cerrar las llaves enrasando.
- 3) Elución de la muestra: conectar cada cartucho a cada frasco con las disoluciones de las muestras mediante tubos conectores. A continuación, encender el sistema de vacío y pasar por los cartuchos la disolución con las muestras, donde van a quedar retenidos los analitos de interés. Cuando todas las disoluciones hayan pasado a través del cartucho, se retiran los tubos de los cartuchos.
- 4) Lavado del cartucho: añadir 3mL de MeOH-H₂O (5:95) a cada cartucho con una micropipeta y dejar que el líquido pase a través de cartucho por gravedad. Se añadió el líquido por las paredes del cartucho para limpiar posibles restos de analito adheridos a ella.
- 5) Secado del cartucho: conectar el sistema de vacío y eluir hasta sequedad durante aproximadamente 20 minutos.
- 6) Congelar los cartuchos hasta el día que se vayan a eluir los compuestos.
- 7) Elución de los analitos: añadir 3 mL de AcN a cada cartucho, recogiendo los analitos en tubos SPE de cristal, colocados debajo del cartucho correspondiente. Dejar que el líquido pase a través de cartucho por gravedad, enrasando al final. El proceso se repite con otros 3mL de AcN.
- 8) Evaporar el líquido de los tubos de SPE en un evaporador de N₂ con un baño de agua a una temperatura máxima de 30°C hasta sequedad.

- 9) Redisolución con MeOH y transferencia al vial: verter en el tubo de SPE seco 0.5 mL de MeOH. Con una pipeta Pasteur, recoger el líquido del tubo y se hace resbalar por las paredes del tubo 6 veces para que se redisuuelva todo el contenido. Tras estas 6 redisoluciones, verter ese líquido a un vial de vidrio transparente de 2 mL. Este proceso se repite dos veces más con otros 0.5 mL de MeOH cada vez.
- 10) Evaporar de nuevo en el evaporador de N₂ con un baño de agua a una temperatura máxima de 30°C hasta sequedad.
- 11) Congelar los viales con los extractos secos hasta el día de inyección de las muestras en el equipo cromatográfico.
- 12) Redisolución con fase móvil: el día que se vayan a inyectar las muestras, añadir a los viales incoloros 1 mL de fase móvil, MeOH-H₂O (5:95) al 0,1% en ácido fórmico. Recoger el contenido del vial con una jeringa acoplada a una aguja, retirar la aguja de la jeringa y colocar un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro de teflón. Se hace pasar el líquido a través del filtro y se lleva a un vial ámbar de 2 mL, el cual se inyecta en el UHPLC-MS/MS.

4.3.2. Fases sólidas y líquidas del purín

Las fases sólidas y líquidas del purín bruto se separaron mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 min y se determinó en ellas también su contenido en drogas para realizar un posterior balance de materia.

La determinación de las drogas en la fase sólida se realizó después de una preparación de muestra similar a la descrita para el purín bruto del apartado 4.3.1., mediante una extracción sólido-líquido (SLE) con agua-metanol, si bien en este caso se tomaba una cantidad de muestra de 0.3 g de fase sólida liofilizada, se añadía 0.3 g de alúmina activada como medio de limpieza, no se ajustaba el pH de la muestra ni se añadía 1 mL de AEDT en la primera extracción por ultrasonidos (M. Argüeso et al., 2021). Las muestras se doparon con 200 µL de disolución de patrón deuterado iSS^I de 2 mg/L.

El análisis de la fase líquida se realizó mediante una extracción en fase sólida sobre cartuchos Oasis HLB, previa filtración por filtros de 0.7 y 0.4 µm, y adición de AEDT y los correspondientes patrones, siguiendo también un procedimiento similar al descrito en la extracción en fase sólida del extracto de purín bruto diluido (apartado 4.3.1.2). En esta caso 5 mL de la fase líquida del purín eran diluidos a 100 mL para realizar dicha extracción (López-Serna et al., 2019). Las muestras se doparon con 100 µL de disolución de patrón deuterado C de 0.5 mg/L.

4.3. DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL MEDIANTE UHPLC-MS

Los analitos de los extractos fueron determinados mediante cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS). La separación cromatográfica fue llevada a cabo en un UHPLC Sciex Exion equipado con una columna Phenomenex de fase inversa Kinetex EVO-C18 (2,1 mm × 50 mm, tamaño de partícula 1,7 µm).

La fase móvil consistió en una mezcla MeOH-H₂O al 0.1% en FA en modo gradiente para realizar la separación. El porcentaje de MeOH inicial fue del 5% durante 1 minuto, tras el cual se aumentó hasta un 95% en MeOH durante 2 minutos, y después se mantuvo constante durante 3 minutos. Transcurridos estos 5 minutos, se redujo el porcentaje de MeOH al 5%, para reequilibrar el sistema, durante 4 minutos, antes de la inyección de una nueva muestra, en volúmenes de inyección de 10 µl. El caudal de fase móvil fue de 0.5 mL min⁻¹, a una temperatura de operación de 40°C.

La detección y cuantificación de las drogas veterinarias en los extractos se realizó mediante espectrometría de masas, con analizador triple cuadrupolo (QqQ) Sciex 6500+. El sistema de espectrometría de masas empleado contiene un capilar de nebulización como sistema de introducción de muestra. Como fuente de ionización se empleó una fuente blanda tipo electrospray (ESI), tanto en modo positivo como negativo, en la cual se va a formar un aerosol donde están tanto los analitos como el disolvente. En el capilar de ionización se aplica un potencial eléctrico. A su vez, está entrando un gas de secado (nitrógeno) que va a eliminar el disolvente. Las condiciones de trabajo en la fuente ESI fueron las siguientes:

- Flujo de N₂ (gas de nebulización): 45 unidades
- Capilar de ionización o voltaje del electrodo: 4500V
- Gas cortina (N₂): 35 unidades
- Gas de secado: 45 unidades
- Temperatura del gas de secado: 400°C

El siguiente componente del espectrómetro de masas es el analizador, en el cual se van a separar los iones en función de su relación masa/carga (m/z) empleando un ultra alto vacío para evitar colisiones entre los iones de analitos y otras partículas gaseosas. En este trabajo se ha empleado un triple cuadrupolo (QqQ). En el primer cuadrupolo (Q) se seleccionó el pseudoión molecular de cada compuesto, eliminando los demás iones generados en la fuente. En la celda de colisión (q), este ion se fragmenta mediante colisión con gas inerte (nitrógeno) en condiciones de alta energía para monitorizar dos de las transiciones (ion padre-fragmento) características para cada compuesto, siendo normalmente la primera transición la más intensa (en negrita en la *Tabla 10*), que es la que se empleó en la mayoría de los casos para cuantificar. La segunda transición sirve para

confirmar la identificación del compuesto. El tiempo de retención en ambas transiciones debe ser idéntico ya que el ion padre es el mismo.

El último elemento del espectrómetro de masas es el detector, que permite detectar el ión de interés proporcionando una señal eléctrica proporcional a la concentración del compuesto. Para la adquisición de datos se ha utilizado el software SciexOS.

En la *Tabla 11* se muestran diferentes parámetros de operación del triple cuadrupolo como son la masa del pseudoión molecular ($Q1$), la masa del fragmento ($Q3$), el potencial de entrada al espectrómetro de masas (DP), la energía de colisión para la fragmentación al pseudoión molecular (EC) y el potencial de salida de la celda de colisión (CXP) que focaliza los iones antes de su entrada al $Q3$. El voltaje EP para la colimación inicial de los iones se ha mantenido constante a 10V y el tiempo de observación para cada transición ha sido de 7ms.

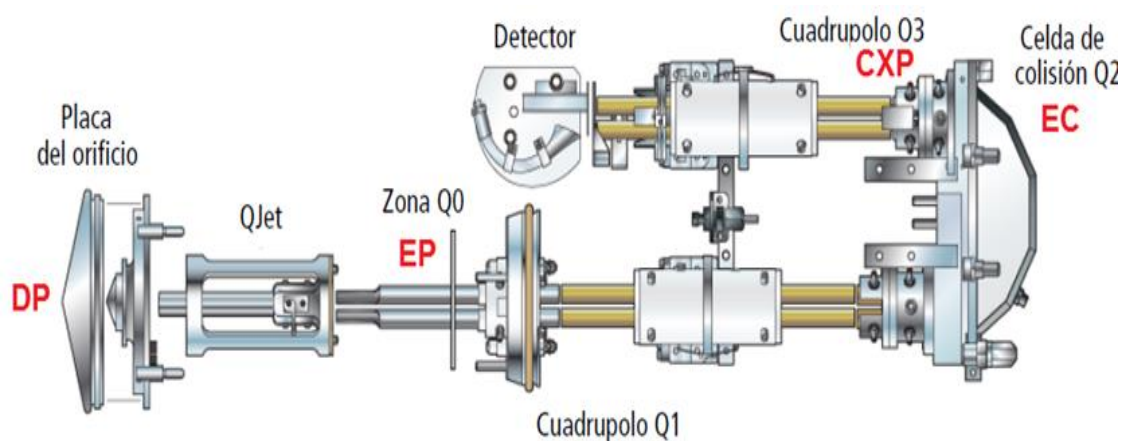


Figura 15-Esquema del sistema de espectrometría de masas en tándem

Tabla 11- Tiempo de retención (RT , min), transiciones seguidas (m/z) y voltajes (DP , EC y CXP , en voltios) aplicados a ciertos parámetros de operación. $Q1$: masa del pseudoión molecular. $Q3$: masa del fragmento.

RT (min)	Compuestos	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (voltios)	EC (voltios)	CXP (voltios)
0.54	AMO 1	365.9	348.9	26	13	28
	AMO 2	365.9	114.0	26	29	12
0.52	ATN 1	267.1	145.1	11	33	24
	ATN 2	267.1	190.3	11	29	4
0.72	MTN 1	172.0	128.0	41	21	6
	MTN 2	172.0	82.0	41	35	14
0.83	AAF 1	152.0	110.0	61	23	16
	AAF 2	152.0	108.9	61	55	14
0.72	IOH 1	821.8	804.0	126	33	26
	IOH 2	821.8	602.8	126	43	46

Tabla 11, continuación

RT (min)	Compuestos	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (voltios)	EC(voltios)	CXP (voltios)
1.05	SDZ 1	251.0	155.9	71	23	20
	SDZ 2	251.0	108.0	71	31	12
1.35	STZ 1	256.0	155.9	96	21	8
	STZ 2	256.0	108.1	96	33	12
1.42	SPD 1	250.1	156.1	61	23	10
	SPD 2	250.1	108.1	61	35	12
1.64	TMP 1	291.0	230.1	51	33	18
	TMP 2	291.0	261.1	51	35	16
2.22	MAR 1	362.9	320.1	66	23	24
	MAR 2	362.9	326.7	66	25	24
2.73	TTC 1	445.0	410.0	51	27	32
	TTC 2	445.0	427.1	51	19	32
3.04	APR 1	271.0	156.0	50	20	19
	APR 2	271.0	180.0	50	40	19
3.03	SMZ 1	270.9	156.0	31	21	10
	SMZ 2	270.9	108.1	31	35	12
3.00	OTC 1	461.0	426.1	151	27	30
	OTC 2	461.0	442.9	151	19	32
3.06	CAF 1	195.0	137.9	71	27	18
	CAF 2	195.0	110.0	71	31	16
3.19	SDD 1	279.0	186.0	86	25	22
	SDD 2	279.0	124.1	86	33	6
3.22	OFL 1	362.0	318.0	86	29	26
	OFL 2	362.0	261.1	86	37	14
3.23	LEV 1	362.0	318.1	6	27	20
	LEV 2	362.0	261.0	6	37	24
3.31	NOR 1	320.1	276.2	96	27	18
	NOR 2	320.1	233.1	96	37	16
3.55	CIP 1	332.0	313.9	31	29	38
	CIP 2	332.0	231.1	31	57	16
3.66	SMX 1	254.0	156.0	66	23	24
	SMX 2	254.0	108.0	66	33	16
3.76	DAN 1	358.0	340.1	86	33	24
	DAN 2	358.0	314.1	86	27	38
3.73	ENR 1	360.0	316.0	91	29	38
	ENR 2	360.0	341.9	91	33	38
3.68	FLO 1	357.8	339.9	66	13	24
	FLO 2	357.8	241.0	66	25	14
3.94	AHB 1	136.8	92.8	-5	-16	-15
	AHB 2	136.8	64.9	-5	-40	-13
3.96	ASC 1	136.9	93.0	-40	-22	-15
	ASC 2	136.9	94.7	-40	-38	-33

Tabla 11, continuación

RT (min)	Compuestos	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (voltios)	EC (voltios)	CXP (voltios)
4.19	BPA 1	227.0	227.1	-60	-14	-15
	BPA 2	227.0	211.1	-60	-26	-13
4.06	PPN 1	260.1	183.1	66	25	12
	PPN 2	260.1	116.1	66	25	8
4.06	MPR 1	153.0	120.9	66	21	14
	MPR 2	153.0	108.9	66	15	30
4.13	DOX 1	445.0	427.9	111	27	34
	DOX 2	445.0	410.1	111	37	36
4.37	TIA 1	494.1	192.2	51	29	10
	TIA 2	494.1	119.0	51	59	12
4.46	TYL 1	916.2	772.3	156	43	36
	TYL 2	916.2	174.1	156	51	10
4.47	EPR 1	165.0	136.9	-35	-20	-11
	EPR 2	165.0	136.0	-35	-20	-13
4.51	AND 1	233.1	187.1	21	37	18
	AND 2	233.1	159.0	21	45	18
4.57	CTM 1	748.3	590.2	96	25	40
	CTM 2	748.3	157.9	96	41	26
4.59	CBM 1	237.0	194.2	66	29	12
	CBM 2	237.0	193.2	66	47	6
4.11	PEN 1	334.9	160.0	111	23	18
	PEN 2	334.9	176.0	111	19	16
4.68	ATZ 1	216.0	173.9	71	25	22
	ATZ 2	216.0	103.9	71	41	16
4.71	DEET 1	192.1	119.3	56	23	10
	DEET 2	192.1	90.9	56	41	10
4.70	PPR 1	178.9	137.1	-60	-20	-13
	PPR 2	178.9	136.1	-60	-24	-7
4.43	ERY 1	734.2	576.1	46	25	36
	ERY 2	734.2	157.8	46	37	22
4.75	DEX 1	392.9	355.1	41	19	20
	DEX 2	392.9	147.0	41	39	10
5.62	NNF 1	219.1	132.9	-65	-42	-7
	NNF 2	219.1	117.0	-65	-80	-13
4.81	ACF 1	212.9	127.1	-35	-24	-15
	ACF 2	212.9	85.0	-35	-14	-9
4.84	NPX 1	231.1	185.1	56	21	12
	NPX 2	231.1	170.0	56	37	10
4.83	FEN 1	300.0	268.1	96	29	22
	FEN 2	300.0	159.0	96	49	10
4.95	TOP 1	205.0	205.1	-200	-14	-19
	TOP 2	205.0	148.0	-200	-26	-7

Tabla 11, continuación

RT (min)	Compuestos	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (voltios)	EC (voltios)	CXP (voltios)
5.04	ATV 1	559.2	440.2	26	33	38
	ATV 2	559.2	250.1	26	59	18
5.09	DCF 1	293.9	250.0	-10	-18	-7
	DCF 2	293.9	214.1	-10	-28	-9
5.10	IBP 1	205.0	159.1	-35	-10	-15
	IBP 2	205.0	160.9	-35	-12	-21
5.13	PGT 1	315.1	109.0	141	31	10
	PGT 2	315.1	297.2	141	23	28
5.24	TCS 1	286.8	286.9	-90	-6	-17
	TCS 2	286.8	141.8	-90	-48	-15
4.90	E1 1	271.1	253.3	101	19	10
	E1 2	271.1	133.1	101	35	12
4.90	E2 1	273.0	255.0	46	17	14
	E2 2	273.1	107.0	61	41	14
4.93	EE2 1	297.1	107.0	81	33	12
	EE2 2	297.1	77.1	71	79	10
4.86	CRT 1	204.1	69.0	61	35	12
	CRT 2	204.1	136.0	61	27	14
5.22	GEM 1	249.0	121.0	-5	-30	-7
	GEM 2	249.0	127.0	-85	-14	-5
5.66	AAS 1	181.1	160.9	71	17	14
	AAS 2	181.1	125.1	71	19	16
5.13	BZQ 1	109.0	80.9	121	19	4
	BZQ 2	109.0	53.3	121	29	12
1.05	SDZ-d4	255.1	160.0	51	23	16
3.19	SDD-d4	283.1	186.0	61	25	20
3.55	CIP-d8	340.1	322.1	46	31	20
3.66	SMX-d4	258.1	160.1	41	23	10
3.76	DAN-d3	361.1	343.1	66	35	20
3.73	ENR-d5	364.9	321.0	91	29	20
3.96	ASC-d4	140.9	97.0	-30	-22	-5
4.47	EPR-d5	169.9	137.9	-45	-20	-7
4.70	PPR-d7	186.0	136.1	-45	-24	-9
4.81	ACF-d4	216.9	130.8	-5	-28	-13
4.84	NPX-d3	234.1	188.1	41	21	10
5.09	DCF-d4	298.1	254.0	-5	-18	-31
5.10	IBP-d3	208.0	161.1	-15	-12	-17
5.24	TCS-d3	289.9	289.9	-5	-6	-21
4.19	BPA-d8	235.1	235.0	-55	-16	-15
4.06	MPR-d4	157.0	125.1	81	23	12

De cada una de las dos transiciones monitorizadas se escoge la que presenta áreas de pico más intensas para integrar los cromatogramas y realizar los calibrados y cuantificaciones, empleando la otra transición para confirmar la identidad del analito. Normalmente la transición más intensa es la primera, pero hay casos como el de OFL, CTM, DEET, EE2 y CRT donde la segunda transición presenta picos cromatográficos más intensos que son los que se usan para cuantificar.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta analítica está directamente relacionada con la tasa de recuperación de los analitos tras el tratamiento de muestra y está afectada por el efecto matriz que influye especialmente en la ionización electrospray, suprimiendo generalmente la formación de iones. Por ello es importante buscar unas condiciones que favorezcan la extracción selectiva de los analitos en la muestra y reduzcan la involucración de la matriz. Tras la consulta de publicaciones científicas relacionadas con investigaciones similares con el presente trabajo, se identificaron cuatro parámetros y condiciones experimentales significativos. De este modo, se estudió la influencia de estos parámetros de la etapa de preparación de muestra siguiendo el método de tratamiento propuesto en el apartado 4.3.1 de este trabajo. Su optimización se dividió en dos etapas:

- Comparación del tipo de adsorbente de limpieza.
- Diseño experimental para optimizar el pH de la muestra, el contenido de MeOH en el extractante durante las dos UAE, la cantidad de agente de limpieza y el contenido de agente complejante (AEDT) a añadir en la primera UAE.

Para ambas etapas, el área del pico se utilizó como variables de respuesta. Aunque también se realizaron los estudios de optimización para las relaciones S/N para cada compuesto y adsorbente, se escogieron solo las áreas de pico como variables de respuesta ya que el software de análisis empleado no siempre calcula coherentemente las relaciones S/N.

Tanto en los estudios previos como en el diseño experimental, las muestras se doparon con 1000 ng g^{-1} de cada analito, lo cual se logró añadiendo $500 \text{ }\mu\text{L}$ de una disolución SS^1 en MeOH de 2 mg L^{-1} .

5.1. ESTUDIOS PREVIOS (COMPARACIÓN DE ADSORBENTES)

En primer lugar, se estudió el tipo de adsorbente de limpieza, realizando experimentos por sextuplicado para cada uno de los tres adsorbentes probados y comparando las áreas de pico obtenidas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, realizado en Excel. El método de tratamiento de muestra descrito en el apartado 4.3.1 sirvió como punto de partida y solo se modificó el adsorbente añadido en cada caso. Una vez optimizado un parámetro, en este caso el tipo de adsorbente de limpieza, el método se actualizó en consecuencia.

Tras revisar algunas publicaciones relacionadas (Pérez-Lemus et al., 2020; Wang et al., 2020), se decidió estudiar el efecto de tres adsorbentes como agente de limpieza empleado en la UAE inicial: alúmina activada (Al_2O_3), ODS y una mezcla en proporciones iguales de ambos

adsorbentes en una cantidad de 0.2 g (0.1g + 0.1g en la mezcla). La *Tabla 12* muestra los valores medios de áreas de pico obtenidos para cada uno de los compuestos y adsorbentes y los resultados obtenidos tras el análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 12- Resultados obtenidos del ANOVA para cada uno de los 59 CECs con el fin de seleccionar el adsorbente más adecuado considerando el área del pico como variable de respuesta (n=6)

Compuesto	p-valor*	Valor medio de áreas de pico		
		ODS	Alúmina	Alúmina + ODS
PEN	0.0023	1579650	<u>2614833</u>	1010950
OTC	0.0012	<u>9368500</u>	5133167	2160550
DOX	0.025	<u>79936667</u>	<u>66115000</u>	53893333
TTC	0.021	<u>6169000</u>	<u>5013167</u>	4073333
MAR	0.00026	<u>12992667</u>	<u>10731333</u>	4969000
ENR	<0.0001	13819833	<u>28428333</u>	6588000
DAN	<0.0001	<u>24601667</u>	<u>19815000</u>	8262833
SDZ	<0.0001	<u>20950000</u>	16571667	7832833
STZ	<0.0001	<u>76271667</u>	<u>64583333</u>	31960000
SMZ	<0.0001	<u>77346667</u>	<u>65641667</u>	29150000
SDD	0.0011	<u>108893333</u>	<u>104366667</u>	63071667
SMX	<0.0001	<u>73266667</u>	56526667	37323333
TYL	<0.0001	644330	<u>25213333</u>	674383
TIA	<0.0001	11716667	<u>253616667</u>	15633167
APR	<0.0001	<u>17690000</u>	<u>20066667</u>	6214500
TMP	<0.0001	105841667	<u>227133333</u>	76101667
FLO	<0.0001	4685167	<u>5382667</u>	3872333
FEN	<0.0001	9363667	<u>61566667</u>	12395500
DEX	<0.0001	987733	<u>13883333</u>	954317
PGT	<0.0001	622033	<u>17616667</u>	847283
MPR	0.65	6857000	8155000	7203333
AAF	<0.0001	<u>16420000</u>	12336667	6132833
CBM	<0.0001	298783333	<u>558283333</u>	290683333
PPN	<0.0001	1786767	<u>85060000</u>	2625083
MTN	<0.0001	<u>22173333</u>	<u>19681667</u>	6227000
OFL	0.00032	<u>78546667</u>	<u>85603333</u>	31181667
NPX	0.68	41400000	38228333	37266667
CTM	<0.0001	4125833	<u>192250000</u>	7223333
ERY	<0.0001	146530	<u>6504333</u>	226628
AAS	0.0020	<u>591517</u>	<u>515683</u>	211493
LEV	0.00018	<u>107290000</u>	<u>127720000</u>	44215000
NOR	<0.0001	<u>4478667</u>	<u>3246833</u>	1401633
ATV	<0.0001	4320333	<u>163966667</u>	6805333
ATN	0.00011	<u>4645667</u>	<u>4711667</u>	927833
CAF	<0.0001	<u>125805000</u>	<u>130178333</u>	39703333
ATZ	<0.0001	236883333	<u>493166667</u>	240650000
IOH	<0.0001	<u>519333</u>	<u>621817</u>	255150

Tabla 12, continuación.

Compuesto	p-valor*	Valor medio de áreas de pico		
		ODS	Alúmina	Alúmina + ODS
DEET	<0.0001	154116667	<u>447433333</u>	153300000
CIP	0.0034	<u>17561667</u>	<u>14670000</u>	8229000
EE2	0.033	<u>3542500</u>	2625167	2967667
CRT	<0.0001	26690000	<u>271433333</u>	33895000
E1	<0.0001	2283667	<u>13670000</u>	2327000
EPR	0.0030	2312667	<u>3504500</u>	2189333
PPR	<0.0001	1262667	<u>3080333</u>	1254900
DCF	0.0029	1967667	<u>2807500</u>	1778333
IBP	0.49	278167	249667	244517
ASC	<0.0001	<u>43305000</u>	33733333	19360000
ACF	0.17	28141667	26138333	22606667
AHB	<0.0001	<u>51883333</u>	41675000	23108333
GEM	<0.0001	2606667	<u>9461833</u>	2789833

*p>0.05 : no hay diferencia significativa, los valores medios son similares.

** En negrita: adsorbentes más adecuados en función de las mayores respuestas obtenidas

De los 59 compuestos analizados, no se detectó respuesta en los cromatogramas de los extractos para 9 de ellos (AMO, AND, BPA, BZQ, E2, NNF, SPD, TCS y TOP), lo que sugiere que el método de análisis ensayado no es útil para estos 9 compuestos. Lo mismo ocurrió en el diseño de experimentos, el análisis de purín bruto y el balance de materia posterior para la muestra de purín sin centrifugar, por lo que no se mencionará ya a estos compuestos.

Para los 50 compuestos restantes se observó que la respuesta era significativamente diferente ($p < 0.05$) según el adsorbente en 46 casos. De estos últimos, el uso de alúmina proporcionaba las mayores respuestas para 22 compuestos mientras que el ODS era preferible para 7 compuestos; también se observó para 17 compuestos que el uso de ODS o alúmina era la alternativa más adecuada siendo las respuestas obtenidas con esos adsorbentes significativamente superiores a las obtenidas con la mezcla de adsorbentes, mezcla que no resultó ser una buena opción para ninguna de las drogas estudiadas según los datos obtenidos. Por lo tanto, se eligió la alúmina activada como el agente de limpieza optimizado a partir de ese momento.

5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL (OPTIMIZACIÓN DE FACTORES EXPERIMENTALES)

Una vez elegida la alúmina activada como adsorbente después del estudio previo, se llevó a cabo un diseño experimental factorial fraccionado replicado de 2^{k-1} con tres puntos centrales. Para ello, se realizaron 22 experimentos para conocer la influencia de 4 parámetros de operación: el pH de la muestra (nivel bajo: 3; nivel alto: 8), el contenido de MeOH en el extractante durante la extracción UAE (nivel bajo: 10% MeOH; nivel alto: 20% MeOH), la cantidad de alúmina como

agente de limpieza (nivel bajo: 0.1g de alúmina; nivel alto: 0.3g de alúmina) y el contenido de AEDT como agente complejante a añadir en la UAE (nivel bajo: 0% AEDT; nivel alto: 0.4% AEDT). Los 22 experimentos resultantes, cuyas condiciones analíticas se reúnen en la *Tabla 13*, se realizaron aleatoriamente.

Tabla 13- *Matriz de experimentación del diseño*

Experimento	%MeOH	pH	Cantidad alúmina (g)	%AEDT
1	10	3	0.1	0.0
2	20	8	0.1	0.0
3	20	8	0.3	0.4
4	15	5.5	0.2	0.2
5	10	3	0.3	0.4
6	15	5.5	0.2	0.2
7	10	8	0.3	0.0
8	10	8	0.1	0.4
9	15	5.5	0.2	0.2
10	20	3	0.1	0.4
11	20	3	0.3	0.0
12	10	3	0.1	0.0
13	20	8	0.1	0.0
14	20	8	0.3	0.4
15	15	5.5	0.2	0.2
16	10	3	0.3	0.4
17	15	5.5	0.2	0.2
18	10	8	0.3	0.0
19	10	8	0.1	0.4
20	15	5.5	0.2	0.2
21	20	3	0.1	0.4
22	20	3	0.3	0.0

Procesados los cromatogramas resultantes de estos 22 experimentos, se utilizó el software Statgraphics para procesar los datos experimentales adquiridos y averiguar la influencia potencial de algunos parámetros de operación.

Se estudió el efecto de estos factores principales y de las interacciones entre ellos. En la *Tabla 14* se recogen los valores del estadístico $R^2(\%)$ que indica la bondad del ajuste del modelo matemático y los efectos estudiados que resultan estadísticamente significativos, al nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).

Tabla 14- Estadísticos R^2 y p -valores de los efectos significativos encontrados en el diseño experimental empleando en todos los casos el área del pico como variable de respuesta.

Compuesto	R^2 (%)	Factores				Interacciones		
		A: %MeOH	B: pH	C: Cantidad Alúmina (g)	D: %AEDT	AB+CD	AC+BD	AD+BC
PEN	67.74	--	0.00070 (-)	--	--	--	--	--
OTC	72.74	--	--	--	0.00010 (+)	--	--	--
DOX	70.71	--	--	--	0.00020 (+)	--	--	--
TTC	67.20	--	--	--	0.00040 (+)	--	--	--
MAR	65.83	--	--	0.0059 (-)	--	--	0.0055 (-)	--
ENR	73.19	--	0.0011 (-)	0.025 (-)	--	--	0.012 (-)	--
DAN	78.13	--	0.00010 (-)	0.014 (-)	--	--	--	--
SDZ	32.23	--	--	--	--	--	--	--
STZ	34.34	--	--	--	--	--	--	--
SMZ	43.80	--	--	--	--	--	--	--
SDD	63.51	--	--	--	--	--	--	0.042 (-)
SMX	84.19	--	--	0.044 (+)	0.018 (+)	--	0.033 (-)	0.037 (-)
TYL	22.40	--	--	--	--	--	--	--
TIA	45.80	--	--	--	--	--	--	--
APR	30.85	--	--	--	--	--	--	--
TMP	55.63	--	--	--	--	--	--	--
FLO	55.86	--	0.0070 (-)	--	--	--	--	--
FEN	60.38	--	--	--	--	--	0.026 (-)	--
DEX	76.03	--	--	0.025 (+)	--	--	--	0.040 (-)
PGT	61.14	--	0.015 (-)	--	--	--	--	--
MPR	54.99	--	0.0079 (+)	--	--	--	--	--
AAF	60.91	--	--	--	--	--	--	--
CBM	35.72	--	--	--	--	--	--	--
PPN	71.44	--	0.00010 (-)	--	--	--	--	--
MTN	75.42	--	0.0033 (+)	--	--	--	--	--
OFL	79.12	--	0.00080 (-)	0.0033 (-)	--	--	0.0055 (-)	--
NPX	81.04	--	0.014 (-)	0.018 (+)	--	--	--	0.0079 (-)
CTM	67.25	--	--	--	--	--	0.036 (-)	--

Tabla 14, continuación

Compuesto	R ² (%)	Factores				Interacciones		
		A: %MeOH	B: pH	C: Cantidad Alúmina (g)	D: %AEDT	AB+CD	AC+BD	AD+BC
ERY	78.30	--	0.015 (-)	--	--	--	0.043 (-)	--
AAS	30.15	--	--	--	--	--	--	--
LEV	61.81	--	0.017 (-)	0.025 (-)	--	--	0.042 (-)	--
NOR	76.96	--	0.00020 (-)	0.011 (-)	--	--	--	--
ATV	71.56	--	0.0015 (+)	--	0.035 (+)	--	0.018 (-)	--
ATN	88.29	--	<0.0001 (+)	--	--	--	--	--
CAF	57.76	--	0.017 (+)	--	--	--	--	--
ATZ	19.88	--	--	--	--	--	--	--
IOH	62.01	0.044 (-)	--	--	--	--	--	--
DEET	77.05	--	0.040 (+)	--	--	--	--	--
CIP	74.79	--	0.00050 (-)	0.013 (-)	--	--	--	--
EE2	64.26	--	0.0052 (+)	0.028 (-)	--	--	--	--
CRT	70.59	--	--	--	--	--	--	--
E1	63.48	--	--	--	--	--	--	0.044 (-)
EPR	51.03	--	--	--	--	--	--	--
PPR	32.70	--	--	--	--	--	--	--
DCF	43.90	--	--	--	--	--	--	--
IBP	70.38	--	--	--	--	--	--	--
ASC	85.13	--	<0.0001 (-)	0.016 (-)	0.041 (+)	--	--	0.020 (+)
ACF	82.22	--	0.023 (-)	0.0023 (+)	--	--	--	0.024 (-)
AHB	86.08	--	<0.0001 (-)	0.011 (-)	0.033 (+)	--	0.042 (-)	0.015 (+)
GEM	73.72	--	0.026 (+)	--	--	--	0.011 (-)	--

En la *Figura 16* se muestran los efectos estandarizados, diagramas de Pareto, para algunos de los CECs estudiados (TTC, SDD, TYL, IBP). En estos diagramas de Pareto estandarizados cada efecto es transformado a un estadístico-t dividiéndolo entre su error estándar. Esta estandarización de efectos es representada gráficamente en orden decreciente de la magnitud absoluta. El color de las barras muestra si un efecto es positivo o negativo, es decir, si la variable de respuesta aumentaba al aumentar la cantidad o porcentaje del factor o viceversa. La línea sobre el gráfico determina si un efecto es estadísticamente significativo en un nivel de significancia especificado, en este caso del 5% , es decir, un efecto será estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$.

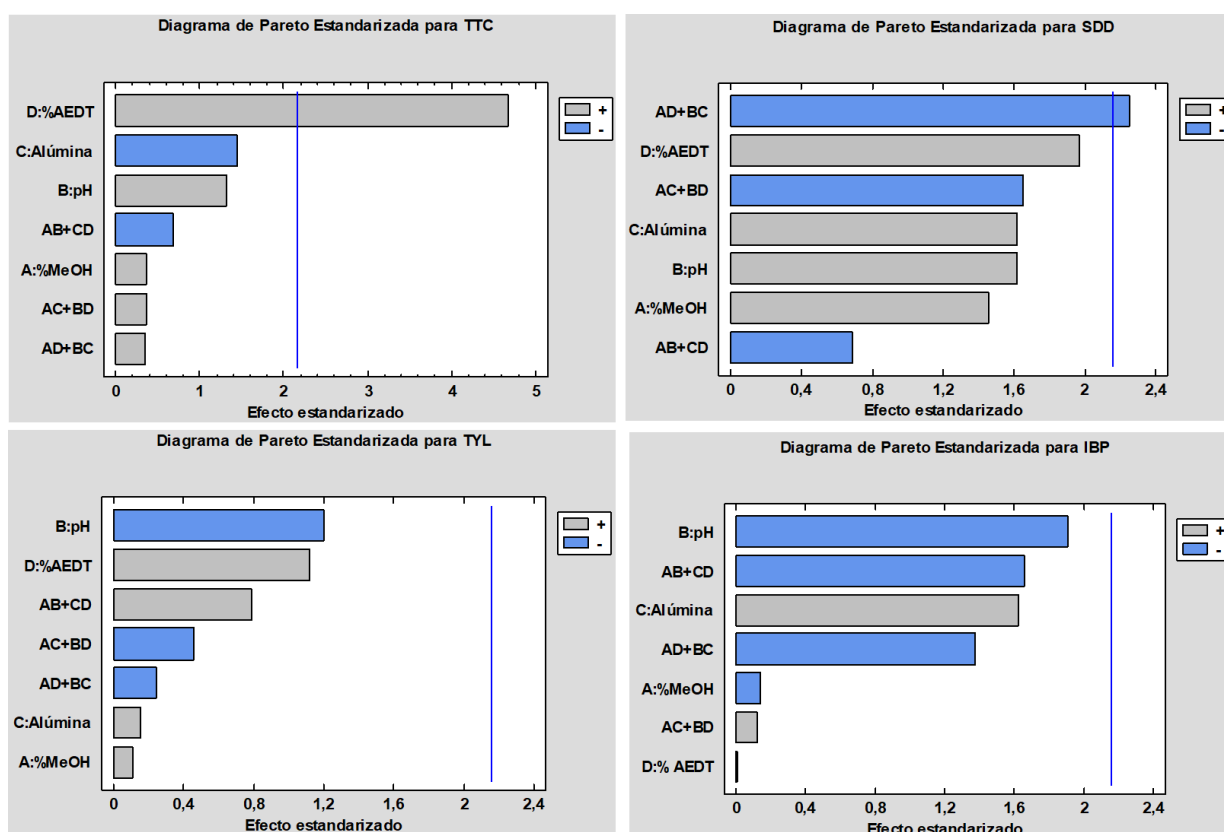


Figura 16-Efectos significativos en algunos CECs estudiados (TTC, SDD, TYL, IBP)

Atendiendo a la significancia de los factores principales se pueden deducir los valores óptimos de estos parámetros de operación:

- El %MeOH (A) no afecta significativamente ($p < 0.05$) a las áreas de pico salvo para el IOH, en cuyo caso el efecto era negativo. Esto significa que sus áreas de pico disminuyen cuando el %MeOH aumenta. Por lo tanto, se decidió emplear solo un 10% de MeOH en el disolvente extractante del método final, para fomentar la extracción de IOH.
- El pH (B) resultó ser un factor significativo para 23 de los compuestos analizados. Para 15 de estos compuestos el efecto fue negativo mientras que para los otros 8 el efecto resultó ser

positivo. Esto significa que para una mayor parte de los compuestos sus áreas de pico disminuyen cuando el pH aumenta, por lo que se decidió ajustar el pH de la muestra a 3.

- La cantidad de alúmina (C) tiene efecto estadísticamente significativo para 14 de los analitos, siendo negativo para todos los compuestos excepto para SMX, DEX, NPX y ACF, en cuyo caso el efecto fue positivo. Por lo tanto, se seleccionó la adición de 0,1 g de alúmina (nivel bajo).
- El %AEDT (D) afectó significativamente en el análisis de 7 de los CECs estudiados, siendo en todos los casos este efecto positivo. Por lo que se decidió añadir AEDT en alta concentración (1 mL, equivalente a una concentración del 0.4%).

Para establecer estos valores óptimos no se han tenido en cuenta las interacciones de segundo orden dada la confusión de efectos del diseño realizado y los valores contrapuestos observados.

5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA UNA MUESTRA DE PURÍN BRUTO

Tras la optimización de estos cuatro factores experimentales, se obtuvieron los calibrados matriz-patrón (MP) de acuerdo con lo indicado en el apartado 4.2 siguiendo el tratamiento de muestra del apartado 4.3.1.

Como se están analizando muestras reales en donde no es posible tener la matriz libre de residuos de drogas, se empleó en primer lugar el método de calibración adiciones patrón (MAP), para calcular la concentración de drogas presente inicialmente en las muestras sin dopar. Ello se logró al representar el área de pico frente a la concentración de patrón añadida expresada como masa/cantidad de muestra (ng/g). A continuación se llevó a cabo el calibrado matriz-patrón (MP) para la validación del método. En este calibrado matriz-patrón se representa el área de pico frente a la concentración total en la muestra, entendiendo como tal la suma de la concentración de droga propia de la muestra y de la concentración añadida al dopar cada alícuota. En el presente trabajo, se consideraron seis parámetros de validación: rango lineal, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), sensibilidad, recuperación y precisión. La determinación de la recuperación y la precisión se llevó a cabo por quintuplicado (n=5) a un nivel alto y otro bajo de concentración, similares a los esperados en muestras reales. El nivel alto de concentración se corresponde aproximadamente con una concentración (del orden de 2800 ng/g) que es un 36% inferior a la mayor concentración de la línea de calibrado, mientras el nivel bajo se corresponde con una concentración (del orden de 190 ng/g) que es aproximadamente un 2.5% de la concentración más alta del calibrado.

5.3.1. Método de adiciones patrón

El contenido de cada una de las drogas de interés se determinó mediante el MAP, con líneas de calibrado de 2 blancos (alícuotas de muestra sin dopar) y 10 patrones (alícuotas de muestra dopadas con cantidades crecientes de analitos). Los resultados del análisis de las muestras de purín bruto se muestran en la *Tabla 15*.

Tabla 15- Concentraciones de las drogas en el purín bruto obtenidas mediante el MAP

Compuesto	Concentración (ng/g)	Compuesto	Concentración (ng/g)
PEN	-- ⁽¹⁾	OFL	59
OTC	21	NPX	104
DOX	1969	CTM	--
TTC	--	ERY	--
MAR	128	AAS	--
ENR	125	LEV	96
DAN	47	NOR	--
SDZ	16	ATV	--
STZ	--	ATN	--
SMZ	--	CAF	41
SDD	--	ATZ	--
SMX	--	IOH	--
TYL	--	DEET	75
TIA	84	CIP	--
APR	--	EE2	3869
TMP	310	CRT	--
FLO	365	E1	--
FEN	43	EPR	--
DEX	50	PPR	--
PGT	--	DCF	42
MPR	72	IBP	--
AAF	100	ASC	--
CBM	15	ACF	183
PPN	204	AHB	15906
MTN	--	GEM	--

⁽¹⁾-- : no detectado

De los 50 compuestos para los que el método ha funcionado, solo se ha observado la presencia de 24 de estos compuestos en los extractos de purín bruto sin dopar (blanco, habiéndose determinado su concentración como se muestra la *Tabla 15*). Esto indica que la muestra sin dopar contiene esa cantidad de antibiótico.

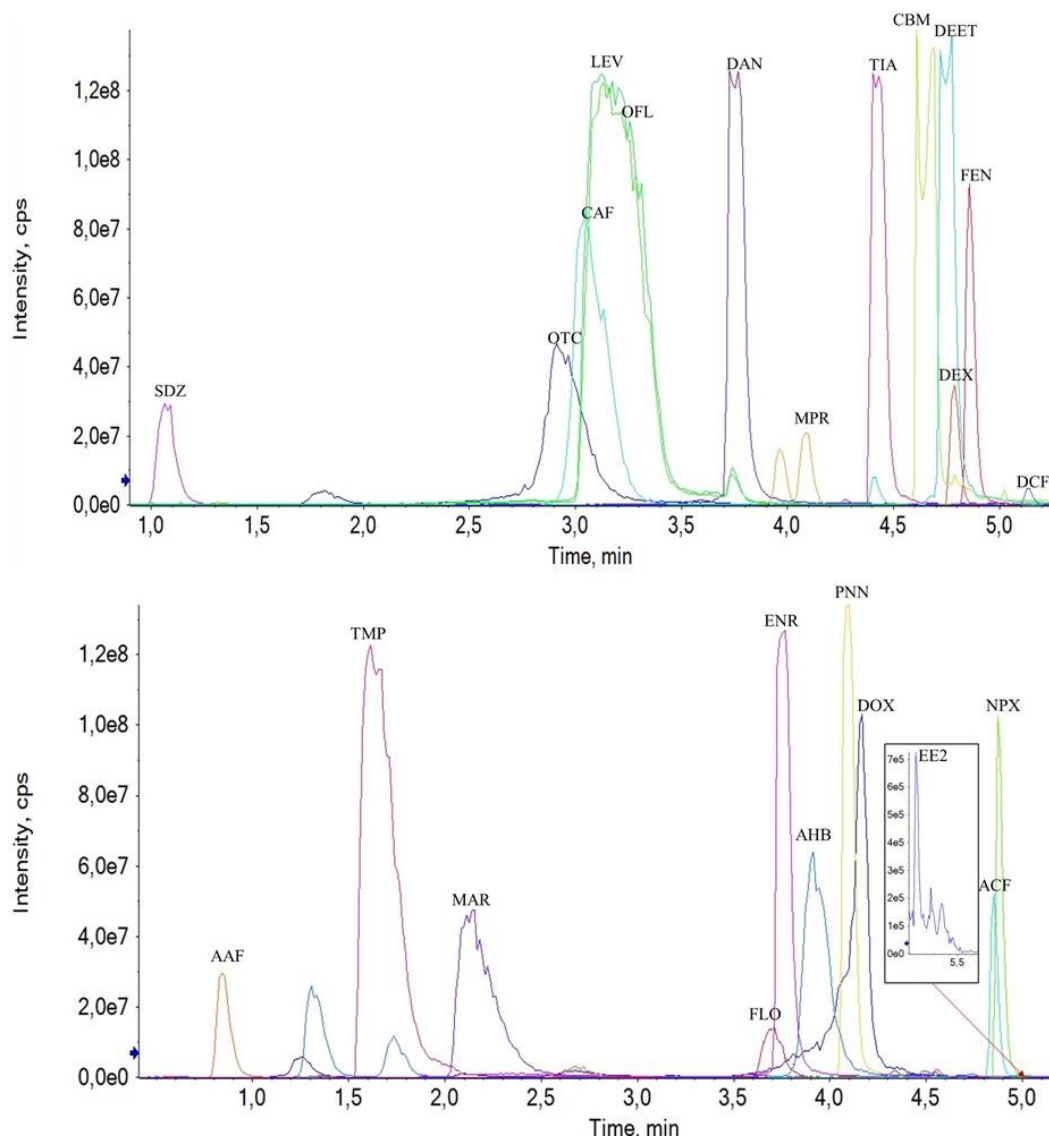


Figura 17- XIC de los 24 fármacos cuantificados mediante el MAP. Muestra de purín bruto dopada a 8000 ng/g.

En los cromatogramas de iones extraídos (XIC) de la *Figura 17*, se observan los picos cromatográficos de los 24 fármacos analizados y cuantificados en una muestra de purín dopada a 8000 ng/g.

5.3.2. Calibrado matriz-patrón

Una vez calculada la concentración de cada droga veterinaria presente en la muestra, se recalculó la misma para obtener las líneas de calibrado matriz-patrón. De esta forma se obtuvieron los parámetros de validación del método de análisis propuesto: sensibilidad (pendiente), límites de cuantificación (LOQ), detección (LOD) y rango lineal. En la *Tabla 16* se muestran, además de estos parámetros de validación, la ordenada y el coeficiente de determinación (R^2).

Tabla 16- *Parámetros de validación obtenidos mediante calibrado matriz-patrón.*

Compuesto	R²	Rango lineal (ng/g)	Ordenada	Pendiente	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
PEN	0.986	7-5137	75871	1748	2	7
OTC*	0.978	29-4891	104864	56889	0.3	1.2
DOX*	0.994	1977-6776	1838970	61050	2	6
TTC	0.966	8-5127	-448809	54081	0.1	0.3
MAR*	0.970	137-7791	967994	71235	0.2	0.7
ENR*	0.996	135-7945	3569959	85821	2	5
DAN*	0.997	57-5770	1207025	101813	1	3
SDZ*	0.989	25-7757	60007	21524	0.2	0.7
STZ	0.988	9-7663	9988199	88125	0.06	0.20
SMZ	0.958	9-7663	-5192907	88524	0.07	0.22
SDD	0.972	10-7819	11389432	61681	0.1	0.3
SMX	0.999	9-7663	684288	90178	0.1	0.3
TYL	0.954	8-6651	2518615	16131	0.07	0.24
TIA*	0.960	92-1612	8634495	205632	1	2
APR	0.963	9-5547	5268656	34413	0.07	0.24
TMP*	0.986	319-8051	19845456	172870	0.7	2.2
FLO*	0.995	374-8170	-249821	12147	3	10
FEN*	0.973	52-5765	252251	22887	1	4
DEX*	0.981	60-7713	169795	12879	3	9
PGT	0.978	10-5781	2057775	12303	0.3	1.0
MPR*	0.995	81-7891	-382714	9852	3	9
AAF*	0.998	109-7841	472919	18411	2	6
CBM*	0.983	24-390	15475939	1195846	0.05	0.16
PPN*	0.994	213-7060	4381222	79534	0.7	2.3
MTN	0.997	10-7741	3784698	39816	0.6	2.0
OFL*	0.992	68-7722	5187802	258842	0.2	0.6
NPX*	0.995	113-7923	852552	33468	3	9
CTM	0.967	10-1905	29390998	202183	0.1	0.2
ERY	0.998	9-7663	-50308	6186	1	3
AAS	0.946	1907-7741	3845	10	193	642
LEV*	0.991	106-7759	9464514	282628	0.2	0.8
NOR	0.974	9-7663	-2398499	32116	1	4
ATV	0.946	4-3612	-2127320	79405	0.1	0.5
ATN	0.996	9-7663	10313	510	3	9
CAF*	0.989	51-7743	1379606	114427	0.1	0.4
ATZ	0.979	10-1918	24473790	242998	0.1	0.4
IOH	0.997	9-7624	46695	575	1	4
DEET*	0.976	84-1963	10499385	277515	1	2
CIP	0.992	10-7780	-7051285	105627	0.4	1.4
EE2*	0.992	7704-11532	-1398791	342	229	764
CRT	0.998	9-365	-1001671	289112	0.1	0.3
E1	0.939	195-7741	1295075	1597	32	106
EPR	0.986	10-7819	213756	1690	2	6
PPR	0.994	10-7819	157525	1509	1	3
DCF*	0.991	51-7321	3449	1807	4	13

Tabla 16, continuación.

Compuesto	R²	Rango lineal (ng/g)	Ordenada	Pendiente	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
IBP	0.991	193-7663	49061	166	14	46
ASC	0.908	1907-7741	187478283	26715	572	1907
ACF*	0.988	192-7768	1043703	19007	1	4
AHB*	0.976	16001-23647	-20779652	24317	25	84
GEM	0.998	9-7663	-134709	5250	1	3
*Compuestos que aparecen en la muestra de purín bruto (blanco)						

La sensibilidad se define como la pendiente del intervalo lineal de la línea de calibrado, es decir, el cambio en la respuesta (área del pico) obtenida frente por el correspondiente cambio en el estímulo (concentración total de la muestra).

El coeficiente de determinación (R^2) refleja la bondad del ajuste del modelo lineal a la variable que se pretende explicar (en este caso el área del pico), variando ente 0 y 1. De manera que cuanto más cercano sea este valor a 1, mejor será el ajuste lineal del método porque explica en mayor porcentaje la varianza de los datos. En general, la mayoría de los compuestos presentan un R^2 elevado, variando en general entre 0.960-0.998, excepto para 6 compuestos donde R^2 era menor de 0,960, lo cual indica un buen ajuste al modelo lineal para la mayoría de los compuestos analizados después de la preparación de muestra realizada. Por otro lado, el rango lineal se define como el intervalo de concentraciones para las que se ha demostrado que el método sigue un comportamiento lineal, es decir, intervalo de concentraciones para el cual la señal (área del pico) es proporcional a la concentración. Este rango lineal se considera habitualmente desde la concentración mínima que se puede determinar (LOQ) hasta el límite superior de concentración en el que se mantiene la relación de linealidad, si bien en este trabajo se ha verificado la linealidad desde concentraciones habitualmente superiores por dos motivos: por la presencia inicial del analito en la muestra de purín y por la obtención de LOQs por debajo de la concentraciones de dopado ensayadas.

El LOD es la cantidad mínima de compuesto que proporciona una señal perfectamente diferenciable del ruido de fondo, mientras que el LOQ es la cantidad mínima de compuesto que se puede determinar con exactitud, y se calculan comúnmente como 3 o 10 veces la relación S/N, respectivamente. Esta relación S/N ha sido calculado por el software en los cromatogramas de extractos de muestras dopadas con pequeñas concentraciones. Tal y como se puede observar en la *Tabla 16* los LOD y LOQ son muy variados; los LOD aparecen entre valores de 0.05-4 ng/g salvo para 6 compuestos detectados en relativamente altas concentraciones mientras que los LOQ varían entre 0.016 y 13 ng/g, excepto para los 6 compuestos nombrados anteriormente. Los valores más

bajos de LOD y LOQ corresponden con la CBM mientras que los más altos se encuentran para la ASC. Cabe esperar estas grandes diferencias de unos compuestos a otros al tratarse de un método multiresiduo que incluye drogas con diferentes grupos funcionales y diferentes propiedades físico-químicas.

A continuación, se representan gráficamente en la *Figura 18* y *Figura 19* dos de las líneas de calibrado matriz-patrón, correspondientes a NPX y ACF donde se representa el área de los picos de los extractos frente a la concentración total de la muestra que se ha recalculado.

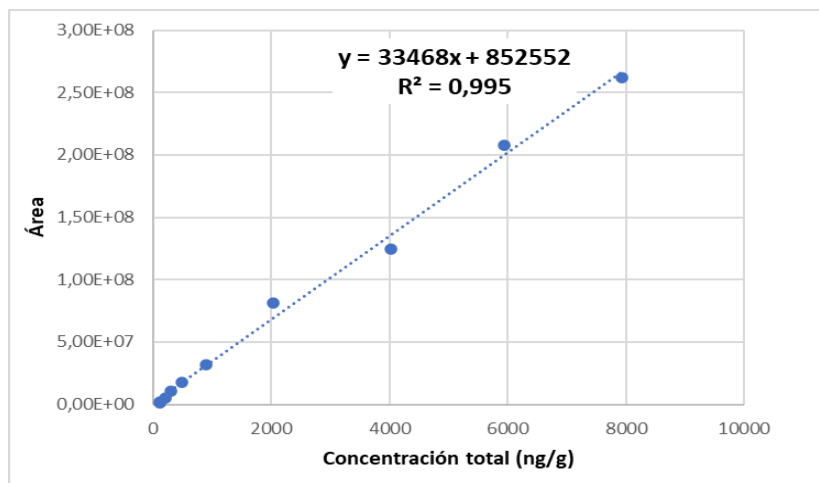


Figura 18-Calibrado matriz-patrón para el naproxeno (NPX)

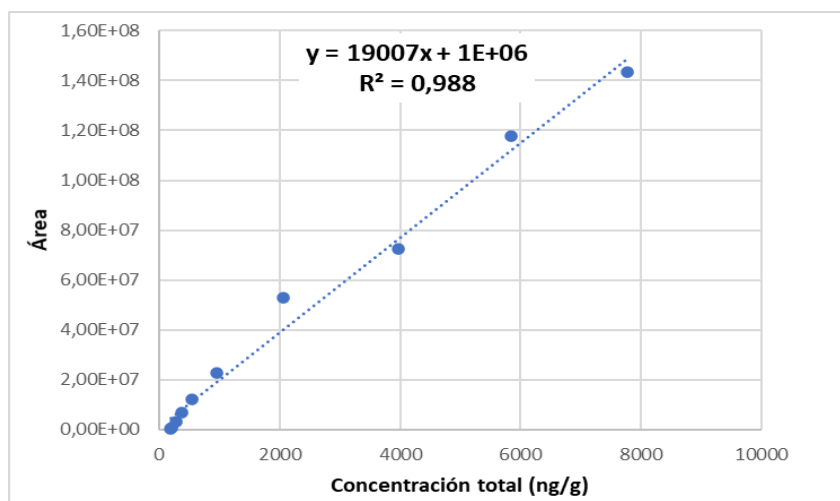


Figura 17-Calibrado matriz-patrón para el ácido clofibrico (ACF)

5.3.3. Recuperación y precisión

En la determinación de los dos últimos parámetros de validación (recuperación y precisión) se analizaron 5 réplicas (n=5) a un nivel alto y otro bajo de concentración de dopado, como se

muestra en la *Tabla 17*. Como se indicó al inicio del apartado, para el nivel alto de concentración se dopó con una concentración del orden de 2800 ng/g mientras que para el nivel bajo de concentración se dopó con aproximadamente 190 ng/g.

Tabla 17-Recuperación relativa (%) y desviación estándar relativa (%DER) para dos niveles de concentración (n=5)

Compuesto	Nivel alto de concentración (n=5)		Nivel bajo de concentración (n=5)	
	Recuperación Relativa(%)	DER(%)	Recuperación Relativa(%)	DER(%)
PEN	106	9	95	13
OTC	114	10	86	11
DOX	113	8	103	10
TTC	127	6	97	15
MAR	113	9	88	6
ENR	143	10	93	11
DAN	138	10	99	16
SDZ	114	3	93	6
STZ	126	5	86	14
SMZ	140	7	180	7
SDD	129	4	99	7
SMX	115	6	90	8
TYL	119	8	122	16
TIA	84	6	109	15
APR	155	7	86	22
TMP	137	2	105	11
FLO	114	8	92	13
FEN	119	5	113	9
DEX	131	7	117	4
PGT	138	5	105	16
MPR	129	4	106	6
AAF	117	4	71	9
CBM	-- ⁽¹⁾	--	105	5
PPN	149	5	99	9
MTN	122	8	55	31
OFL	129	11	99	6
NPX	124	4	102	3
CTM	--	--	89	15
ERY	103	10	92	11
AAS	--	--	--	--
LEV	134	11	91	5
NOR	99	6	92	6
ATV	108	7	200	14
ATN	109	27	91	12
CAF	137	5	95	13

Tabla 17, continuación

Compuesto	Nivel alto de concentración (n=5)		Nivel bajo de concentración (n=5)	
	Recuperación Relativa(%)	DER(%)	Recuperación Relativa(%)	DER(%)
ATZ	--	--	98	4
IOH	107	13	38	32
DEET	--	--	98	6
CIP	119	12	98	14
EE2	--	--	--	--
CRT	--	--	91	10
E1	107	10	--	--
EPR	126	7	75	18
PPR	128	4	103	8
DCF	99	7	95	13
IBP	131	4	--	--
ASC	--	--	--	--
ACF	131	4	74	6
AHB	100	6	92	9
GEM	100	6	120	20

(1)--: sin datos

La precisión del método, repetitividad en este caso, es la medida de la dispersión de los valores observados y se calculó mediante la desviación estándar relativa, DER (%), para 5 réplicas de muestras (n=5) dopadas a los dos niveles de concentración. De manera que cuanto más dispersos están los valores, mayor es la %DER. Generalmente, se consideran aceptables valores de %DER inferiores al 20%. Para niveles altos de concentración se obtuvieron mejores resultados de precisión que para niveles de concentración menores, ya que a altas concentraciones solo se obtuvieron resultados algo peores para la ATV (%DER=27). A bajos niveles de concentración la precisión fue algo peor, destacando los valores obtenidos para la APR (22%), MTN (31%), IOH (32%) y GEM (20%). La mayoría de los compuestos presentaban una buena repetitividad, con porcentajes de DER inferiores al 20%.

Las tasas de recuperación relativa (%) deberían encontrarse en torno al 100% debido a que se está utilizando un calibrado matriz-patrón realizado con extractos de muestra dopada para la cuantificación, corrigiendo de esta manera la influencia de la matriz de la muestra en el proceso de extracción, y sobre todo en la fuente de ionización del MS. A niveles altos de concentración las recuperaciones varían en un rango de 99-149%. A bajos niveles de concentración se obtienen menores recuperaciones que en el caso anterior (71-120%) y, además como se indicó anteriormente, la precisión, en conjunto, parece ser peor. A estos niveles de concentración, el MTN y IOH

presentan valores de recuperación bastante bajos (55% y 38%, respectivamente) presentando también una mala repetitividad (31% y 32%, respectivamente).

5.4. BALANCE DE MATERIA PARA UNA MUESTRA DE PURÍN SIN CENTRIFUGAR

Se realizaron por duplicado calibrados mediante el MAP para determinar el contenido de cada una de las drogas de interés en la fase líquida, sólida y en la muestra sin separación previa (purín bruto). La muestra a analizar consistía en purín sin centrifugar procedente de la misma granja y tomada al mismo tiempo que la muestra de purín centrifugada para la que se validó previamente el método de análisis. Cada una de las líneas de calibrado estaba constituida por un blanco (alícuotas de muestra sin dopar) y 4 patrones (alícuotas de muestra dopadas con cantidades crecientes de analitos). Los cuatro patrones que se utilizaron en las líneas de calibrado se doparon con patrones normales para obtener muestras con una concentración que fuese el 50%, 25%, 10% y 5% de la concentración máxima del rango de calibrado de cada una de las fases en cada caso. También se doparon las muestras con patrones deuterados, siguiendo para cada caso el procedimiento de muestra propuesto en los apartados 4.3.1 (purín bruto) y 4.3.2 (fase sólida y líquida). Previamente, se determinó la densidad de la fase líquida (1.02 g/mL), el porcentaje de humedad de la fase sólida separada y liofilizada (78%), el porcentaje de sólido (7%) y el porcentaje de líquido (93%) de la muestra bruta, que fueron necesarios para el tratamiento de datos posterior. En la *Tabla 18* se muestran las concentraciones en ng/g resultantes del análisis de las distintas fases del purín, la suma de las concentraciones de ambas fases, la concentración del purín bruto en general y el porcentaje de droga distribuida entre la fase líquida y sólida. Todas las concentraciones y porcentajes han sido calculados a partir de la media de los resultados obtenidos al realizar calibrados por duplicado.

Tabla 18- Concentraciones de las drogas en el purín sin centrifugar obtenidas mediante el MAP y porcentaje de cada droga en las distintas fases.

Compuesto	Concentración en fase sólida liofilizada (ng/g)	Concentración en fase líquida (ng/g)	Concentración en fase líquida + fase sólida (ng/g)	%Compuesto en fase sólida	%Compuesto en fase líquida	Concentración purín bruto (ng/g)
PEN	-- ⁽¹⁾	--	--	--	--	--
OTC	169	18	29	43	57	21
DOX	344	34	56	45	55	1434
TTC	--	--	--	--	--	--
MAR	553	70	106	39	61	124
ENR	35	0.1	3	96	4	20
DAN	326	1	25	95	5	47
SDZ	130	12	21	46	54	65
STZ	--	--	--	--	--	--
SMZ	--	--	--	--	--	--
SDD	--	--	--	--	--	--
SMX	--	--	--	--	--	--
TYL	--	3	3	0	100	--
TIA	--	0.2	0.2	0	100	1
APR	--	--	--	--	--	--
TMP	--	--	--	--	--	--
FLO	278	9	28	72	28	72
FEN	--	--	--	--	--	--
DEX	--	--	--	--	--	--
PGT	274	66	82	25	75	44
MPR	84	--	6	100	0	6
AAF	178	9	21	62	38	70
CBM	21	0.3	2	85	15	13
PPN	110	2	10	81	19	23
MTN	--	--	--	--	--	--

Tabla 18, continuación

Compuesto	Concentración en fase sólida liofilizada (ng/g)	Concentración en fase líquida (ng/g)	Concentración en fase líquida + fase sólida (ng/g)	%Compuesto en fase sólida	%Compuesto en fase líquida	Concentración purín bruto (ng/g)
OFL	5	0.5	1	45	55	7
NPX	454	34	65	52	48	72
CTM	42	1	4	84	16	38
ERY	--	--	--	--	--	--
AAS	--	--	--	--	--	--
LEV	155	23	33	35	65	15
NOR	--	--	--	--	--	--
ATV	--	--	--	--	--	--
ATN	--	--	--	--	--	--
CAF	15	1	2	47	53	6
ATZ	--	--	--	--	--	--
AOH	--	--	--	--	--	--
DEET	28	1	3	71	29	4
CIP	44	0.4	4	91	9	24
EE2	5454	102	497	81	19	1974
CRT	8	1	1	53	47	17
E1	3052	24	248	91	9	231
EPR	--	--	--	--	--	--
PPR	--	--	--	--	--	--
DCF	--	--	--	--	--	--
IBP	--	--	--	--	--	--
ASC	8392	0	620	100	0	6475
ACF	52	2	6	65	35	13
AHB	3288	5	248	98	2	17742
GEM	--	--	--	--	--	--

⁽¹⁾--: no detectado

En el caso de la muestra de purín sin centrifugar, de los 50 compuestos para los que el método ha funcionado, solo se ha observado la presencia de 24 de estos compuestos en los extractos de purín bruto, en las fases sólidas y líquidas sin dopar, habiéndose determinado su concentración como se muestra la *Tabla 18*. Esto indica que la muestra real, sin dopar, contiene esa cantidad de antibiótico. Además, en el caso de la TIA y TYL solo se observa su presencia en la fase líquida y en el purín bruto, mientras que el MPR solo se observa en fase sólida y purín bruto.

A continuación, se representan gráficamente en la *Figura 20*, *Figura 21* y *Figura 22* tres líneas de calibrado obtenidas por el MAP para el AAF, correspondientes a uno de los dos calibrados obtenidos para el purín bruto, la fase líquida y la fase sólida. En estos calibrados se representa el área de los picos de los extractos frente a la concentración a la cual se ha dopado la muestra con patrones normales.

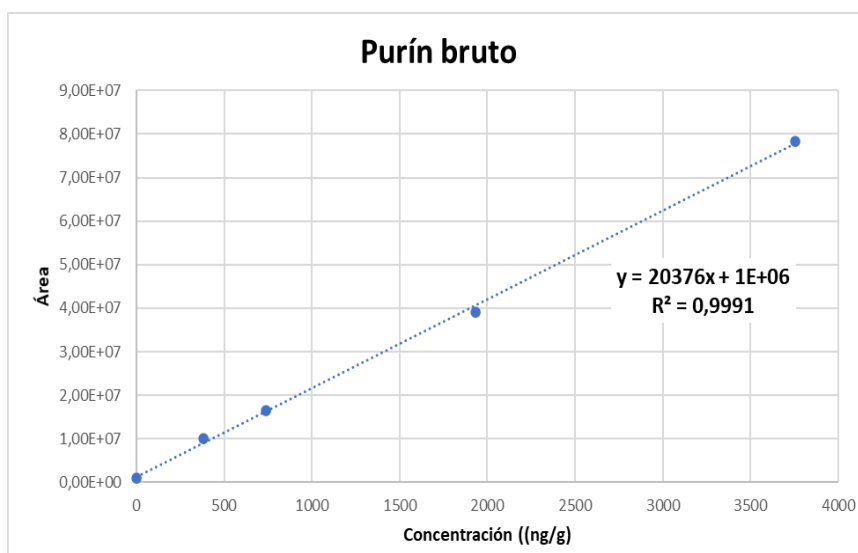


Figura 20- Método de adiciones patrón en un extracto de purín bruto sin centrifugar para el acetaminofeno (AAF)

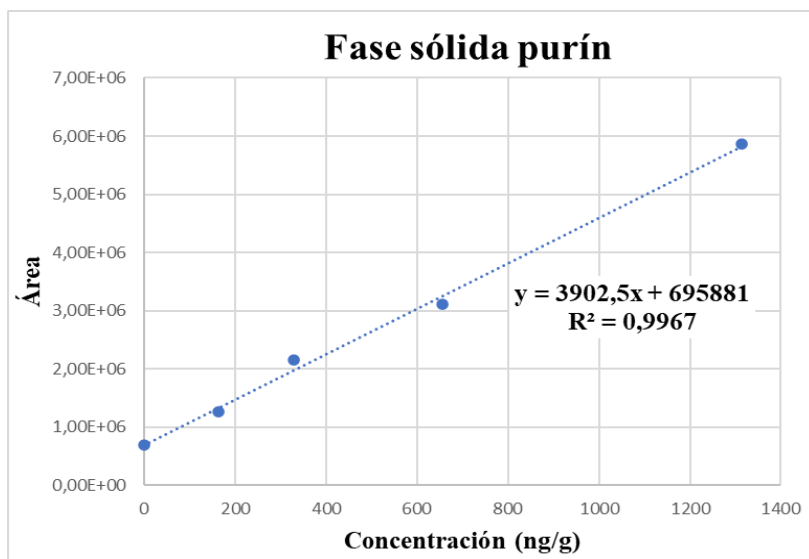


Figura 21- Método de adiciones patrón en la fase sólida del purín bruto sin centrifugar para el acetaminofeno (AAF)

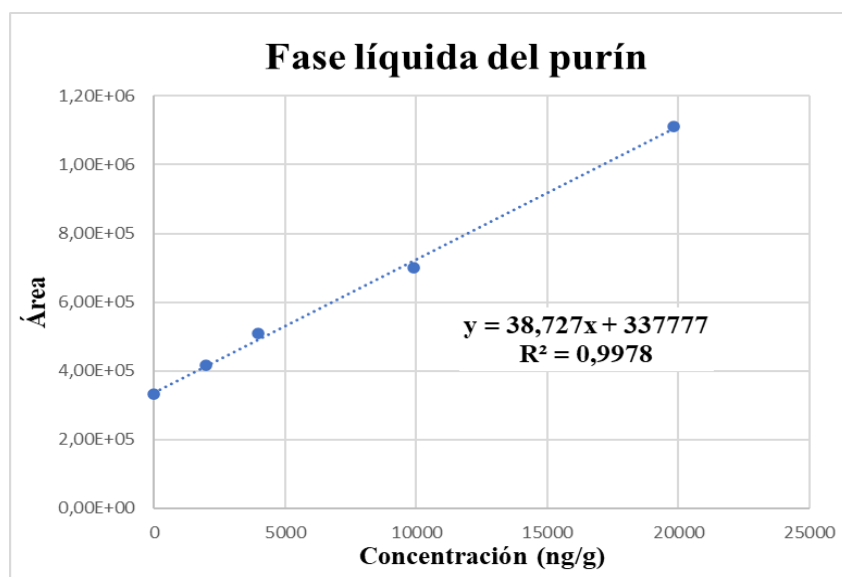


Figura 22- Método de adiciones patrón en la fase líquida del purín bruto sin centrifugar para el acetaminofeno (AAF)

En todos los compuestos se observa que la concentración en el purín bruto es superior a la suma de las concentraciones de la fase líquida y sólida. Esto podría deberse a que la separación de ambas fases implicaría más procesos de tratamiento de muestra en los que podría perderse parte de los compuestos. Por lo tanto, la validación de un método como el que se ha presentado a lo largo del presente trabajo que permita el análisis del purín bruto como un todo, sin previa separación de fases y posterior análisis de las fases por separado, podría reducir la pérdida de los analitos así como disminuir el tiempo y recursos necesario para el análisis de este tipo de muestras.

En la muestra de purín bruto centrifugado con la que se validó el método de análisis se detectaron 24 compuestos, 13 de ellos se encuentran entre los principios activos de muchos de los fármacos autorizados y comercializados para su suministro al ganado porcino (OTC, DOX, MAR, ENR, DAN, TIA, TMP, FLO, FEN, DEX, AAF, SDZ, DCF) según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (CIMA Vet. Centro de Información de Medicamentos Para Veterinaria). El resto de los compuestos encontrados en los extractos de purín bruto constituyen un conjunto de microcontaminantes que son en su mayoría principio activos de fármacos autorizados y comercializados en humanos (CBM, PPN, OFL, NPX, LEV, CAF, EE2) u otras especies animales (CBM, OFL), conservantes empleados en cosméticos, alimentos o fármacos (MPR), compuestos que se encuentran en los repelentes de insectos (DEET), reguladores de lípidos (ACF) y precursores de parabenos (AHB).

En el caso de la muestra de purín sin centrifugar, 13 de los compuestos detectados se encuentran entre los principios activos de muchos de los fármacos autorizados y comercializados para su suministro al ganado porcino (OTC, DOX, MAR, ENR, DAN, TIA, TYL, FLO, AAF, SDZ, ASC). El resto de los compuestos encontrados en los extractos de purín bruto constituyen también un conjunto de microcontaminantes que son en su mayoría principios activos de fármacos autorizados y comercializados en humanos (CBM, PPN, OFL, PGT, NPX, LEV, CAF, EE2, CTM, CIP) u otras especies animales (CBM, OFL, PGT), conservantes empleados en cosméticos, alimentos o fármacos (MPR), compuestos que se encuentran en los repelentes de insectos (DEET), reguladores de lípidos (ACF), precursores de parabenos (AHB), agentes antiparasitarios (CRT) y hormonas (E1).

En general, la mayoría de los compuestos detectados en ambas muestras de purín, tanto centrifugada como sin centrifugar, coinciden, ya que ambas muestras proceden de la misma granja y fueron recogidas al mismo tiempo. Sin embargo, alguno de los compuestos aparece en una de las muestras mientras que en la otra no y sus concentraciones son en la mayoría de los casos poco comparables. Esto podría deberse a los distintos métodos de limpieza y centrifugación llevados a cabo en la granja para una y otra muestra antes de la toma de muestra, sin descartarse una posible variación temporal en la composición de los residuos generados.

Aunque la mayoría de los compuestos detectados en las muestras son fármacos veterinarios destinados al ganado porcino, muchos otros no lo son y a pesar de que su procedencia se desconoce con exactitud, como se explicó en el apartado 2.1, existen muchas maneras en las que los CECs pueden ser incorporados en la cadena trófica, como por ejemplo su posible presencia en las aguas de limpieza de las instalaciones, agua de bebida y piensos animales y restos vegetales de las camas.

6. CONCLUSIONES

- La utilización de alúmina activada en una extracción en fase sólida dispersiva usada como medio de limpieza en la extracción inicial es preferible al uso de octadecilsilano o la mezcla octadecilsilano-alúmina para obtener respuestas cromatográficas más intensas de un mayor número de analitos en el análisis multiresiduo de drogas en purín bruto.
- De acuerdo con un diseño de experimentos, el pH y las cantidades de alúmina y AEDT presentes en la extracción inicial son los parámetros de operación que influyen de forma significativa en las áreas de pico integradas para un mayor número de compuestos. El incremento de porcentaje de metanol desde 10 a 20% en la mezcla extractante agua-metanol es un factor menos crítico.
- Para el análisis de drogas en una cantidad de muestra de 1 g de purín bruto las condiciones óptimas de extracción consisten en la utilización de una mezcla agua-metanol 90:10 (v/v) a pH 3 en presencia de AEDT al 0.4 % (v/v), añadiendo 0.1 g de alúmina activada.
- El método de análisis se ha validado intralaboratorio para 50 de los 59 compuestos inicialmente ensayados. Los límites de detección son del orden de 0.05-4 ng/g salvo para 6 compuestos detectados en relativamente altas concentraciones. Los rangos de linealidad abarcan hasta 7000 ng/g, o concentraciones más altas, salvo para dos compuestos cuyo rango de linealidad es muy reducido.
- Para niveles de concentración del orden de 190 y 2800 ng/g la precisión del análisis es aceptable para la mayoría de las drogas, obteniéndose una repetitividad, expresada como desviación típica relativa, inferior al 20% (n=5) generalmente. Las tasas de recuperación relativas a un calibrado matriz-patrón varían entre 71 y 149% (n=5).
- Se han detectado más de 20 drogas en dos muestras de purín, en concentraciones que comprenden, aproximadamente, desde 1 a miles de ng por g de purín bruto. De los compuestos detectados, muchos de ellos son claramente principios activos veterinarios de uso autorizado en la ganadería porcina mientras que los demás compuestos encontrados son drogas prescritas para la salud humana u otros animales además de un conservante, un repelente de insectos, un regulador de lípidos, un precursor de parabenos y un agente antiparasitario y una hormona (estos dos últimos presentes solo en la muestra de purín sin centrifugar).

- Al analizar por separado la fase sólida y líquida de un purín bruto y realizar después un balance de materia se ha observado que la concentración de los compuestos determinada en el purín bruto como un todo es superior a la suma de las concentraciones halladas en la fase líquida y sólida que se analizan por separado.

7. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Abril, C., Santos, J. L., Malvar, J. L., Martín, J., Aparicio, I., & Alonso, E. (2018). *Determination of perfluorinated compounds, bisphenol A, anionic surfactants and personal care products in digested sludge, compost and soil by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1576, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.028>
2. Agencia Extremeña de la Energía. (2010). *Los residuos ganaderos.* Agenex, 12–19. <https://www.agenex.net/images/stories/deptos/los-residuos-ganaderos.pdf>
3. Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). *Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments.* Nature Reviews Microbiology, 8(4), 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
4. Arbeláez Salazar, P. A. (2015). *Contaminantes emergentes en aguas residuales y de río y fangos de depuradora.* 450
5. Barrena Medina, A. (2013). *Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas* (DOUE L 226, de 24 de agosto de 2013). Actualidad Jurídica Ambiental, 2013(28), 22–23. Punto 26.
6. Beaman, J., Co-chair, W., Eignor, D., & Huff, L. (2008). *AQUATIC LIFE CRITERIA FOR CONTAMINANTS OF EMERGING CONCERN Prepared by the.*
7. Cerqueira, M. B. R., Guilherme, J. R., Caldas, S. S., Martins, M. L., Zanella, R., & Primel, E. G. (2014). *Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS.* Chemosphere, 107, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.026>
8. Chen Y., Zhang H., Luo Y., Song J. *Occurrence and assessment of veterinary antibiotics in swine manures: A case study in east china.* Chin. Sci. Bull. 2012;57:606–614. doi: 10.1007/s11434-011-4830-3.
9. Chiu, T. Y., Koh, Y. K. K., Paterakis, N., Boobis, A. R., Cartmell, E., Richards, K. H., Lester, J. N., & Scrimshaw, M. D. (2009). *The significance of sample mass in the analysis of steroid estrogens in sewage sludges and the derivation of partition coefficients in wastewaters.* Journal of Chromatography A, 1216(24), 4923–4926. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.019>

10. CIMAVet. Centro de información de medicamentos para veterinaria. (n.d.). Retrieved May 20, 2021, from <https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/home.html>
11. Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Camino-Sánchez, F. J., Navalón, A., & Vílchez, J. L. (2013). *Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Comparison of the efficiency of three extraction techniques*. *Talanta*, 106, 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.080>
12. European Union. (1991). *Council Directive of 12th December 1991 concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources (91/676/EEC)*. Official Journal of the European Communities, No L 375/1(3), 1–8.
13. Europeo, E. L. P., Consejo, E. L., Uni, D. E. L. A., Europeo, P., Oficial, D., & Europeo, P. (2018). *(Texto pertinente a efectos del EEE) 21.12.2018. 2018(2), 210–230*.
14. Gallo, P., & Bustamante, J. C. (2012). *Manual de alternativas de tratamiento de purines porcinos*. Primera Edición, Diciembre 2012, Quito – Ecuador.
15. Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Tushara Chaminda, G. G., An, A. K., & Kumar, M. (2018). *Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review*. *Groundwater for Sustainable Development*, 6(December 2017), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>
16. Gómez Garrido, M. (2014). *Efectos ambientales de la valorización agronómica de purines de ganado porcino : dinámica del nitrógeno en el sistema suelo-agua-planta*. 261. <http://hdl.handle.net/10317/4080>
17. Guo C., Wang M., Xiao H., Huai B., Wang F., Pan G., Liao X., Liu Y. *Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B*, Elsevier. Mayo del 2016. Páginas 110-118.
18. Ho, Y. B., Zakaria, M. P., Latif, P. A., & Saari, N. (2012). *Simultaneous determination of veterinary antibiotics and hormone in broiler manure, soil and manure compost by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1262, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.024>

19. Jacobsen A.M., Halling-Sørensen B. *Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal. Bioanal. Chem. 2006;384:1164–1174. doi: 10.1007/s00216-005-0261-9.
20. Kanakaraju, D., Glass, B. D., & Oelgemöller, M. (2018). *Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review*. Journal of Environmental Management, 219, 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.103>
21. Kumar, K., C. Gupta, S., Chander, Y., & Singh, A. K. (2005). *Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment*. Advances in Agronomy, 87(December), 1–54. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)87001-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)87001-4)
22. López-Serna, R., García, D., Bolado, S., Jiménez, J. J., Lai, F. Y., Golovko, O., Gago-Ferrero, P., Ahrens, L., Wiberg, K., & Muñoz, R. (2019). *Photobioreactors based on microalgae-bacteria and purple phototrophic bacteria consortia: A promising technology to reduce the load of veterinary drugs from piggery wastewater*. Science of the Total Environment, 692, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.126>
23. Lu, X. feng, Zhou, Y., Zhang, J., & Ren, Y. peng. (2018). *Determination of fluoroquinolones in cattle manure-based biogas residue by ultrasonic-enhanced microwave-assisted extraction followed by online solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1086(January), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.029>
24. MAPA (Ministerio de Agricultura y Alimentación). (2020). Dirección General De Producciones Y Mercados Agrarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 77. <http://publicacionesoficiales.boe.es/>
25. MAPA. (2015). *Evaluación de técnicas de gestión de deyecciones en ganadería*. Mapa, 114.
26. M. Argüeso, S. Bolado, J.J. Jiménez, R. López-Serna. *Determination of antibiotics and other veterinary drugs in the solid phase of pig manure*. Chemosphere 275 (2021) 130039.
27. Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., & Gans, O. (2007). *Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria*. Environmental Pollution, 148(2), 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.035>

28. Massé, D. I., Saady, N. M. C., & Gilbert, Y. (2014). *Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: An overview*. *Animals*, 4(2), 146–163. <https://doi.org/10.3390/ani4020146>
29. Mirzaei, R., Yunesian, M., Nasser, S., Gholami, M., Jalilzadeh, E., Shoeibi, S., Bidshahi, H. S., & Mesdaghinia, A. (2017). *An optimized SPE-LC-MS/MS method for antibiotics residue analysis in ground, surface and treated water samples by response surface methodology-central composite design*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40201-017-0282-2>
30. Muñoz C., Grave K., Torren-Edo J., Muller A., David Mackay D. (2013). *Principales Resultados 2015 Proyecto ESVAC 2009-2013*. https://www.aemps.gob.es/laAEMPS/eventos/AEMPS/2013/docs/J-plan-resistencias-antimicrobianas/p_Cristina_M-Uantibioticos.pdf?x54046
31. Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., & Marcé, R. M. (2010). *Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge*. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 752–764. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.014>
32. Pérez-Lemus, N., López-Serna, R., Pérez-Elvira, S. I., & Barrado, E. (2019). *Analytical methodologies for the determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage sludge: A critical review*. *Analytica Chimica Acta*, 1083, 19–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.044>
33. Pérez-Lemus, N., López-Serna, R., Pérez-Elvira, S. I., & Barrado, E. (2020). *Sample pre-treatment and analytical methodology for the simultaneous determination of pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge*. *Chemosphere*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127273>
34. Pesca, D. E. A. Y. (n.d). *Modelo de informe de riesgos ambientales tipo (mirat) para el sector de la fundación*. https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/responsabilidad-mediambiental/mirat_porcino_web_completo_tcm30-512275.pdf
35. Peysson, W., & Vulliet, E. (2013). *Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by*

- analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1290, 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.057>
36. Porcino. (n.d.). Retrieved January 31, 2021, from <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/default.aspx>
37. Redondo, L. B. (2015). *Análisis y caracterización de purines para la obtención de estruvita y biogás*.
38. Shao, B., Jia, X., Wu, Y., Hu, J., Tu, X., & Zhang, J. (2007). *Multi-class confirmatory method for analyzing trace levels of tetracycline and quinolone antibiotics in pig tissues by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Rapid communications in mass spectrometry : RCM, 21(21), 3487–3496. <https://doi.org/10.1002/rcm.3236>
39. Valdecantos, A., Fuentes, D., Cortina, J., & Casanova, G. (2002). *Liquid manures utilization. Requirements for their agricultural and forest use*. Porci, 71(January), 43–56.
40. Wang, Z., Wang, X. Y., Tian, H., Wei, Q. H., Liu, B. S., Bao, G. M., Liao, M. L., Peng, J. L., Huang, X. Q., & Wang, L. Q. (2019). *High through-put determination of 28 veterinary antibiotic residues in swine wastewater by one-step dispersive solid phase extraction sample cleanup coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Chemosphere, 230, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.047>
41. Yadav, D., S, R., Verma, P., Singh, P., Devi, P., Kumar, P., Mustansar Hussain, C., Gaurav, G. K., & Sathish Kumar, K. (2021). *Environmental and Health Impacts of Contaminants of Emerging Concerns: Recent Treatment Challenges and Approaches*. Chemosphere, 129492. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129492>
42. Yan, Q., Gao, X., Huang, L., Gan, X. M., Zhang, Y. X., Chen, Y. P., Peng, X. Y., & Guo, J. S. (2014). *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the largest municipal wastewater treatment plant in Southwest China: Mass balance analysis and consumption back-calculated model*. Chemosphere, 99, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.062>
43. Yap, H. C., Pang, Y. L., Lim, S., Abdullah, A. Z., Ong, H. C., & Wu, C. H. (2019). *A comprehensive review on state-of-the-art photo-, sono-, and sonophotocatalytic treatments to*

degrade emerging contaminants. International Journal of Environmental Science and Technology, 16(1), 601–628. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1961-y>

44. Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., & Prieto, A. (2012). *Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review*. Analytica Chimica Acta, 736, 7–29. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.016>

8. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

LISTA DE TABLAS

TABLA	TÍTULO
1	Características físico-químicas de diferentes tipos de purines de cerdo
2	Composición típica de purines en la Unión Europea y en España
3	Concentraciones de fármacos en estiércol de cerdo según Referencias
4	Niveles de residuos antibióticos (ng/mL) en muestras de aguas residuales de 10 granjas porcinas
5	Principales efectos ambientales estudiados causados por algunos CECs
6	Los 59 CECs estudiados en este trabajo
7	Material y reactivos empleados
8	Lista de los 16 patrones deuterados empleados de pureza cromatográfica
9	Equipos utilizados
10	Preparación recta de calibrado en fase móvil
11	Tiempo de retención (RT, min), transiciones seguidas (m/z) y voltajes (DP, EC y CXP, en voltios) aplicados a ciertos parámetros de operación. Q1: masa del pseudoión molecular. Q3: masa del fragmento.
12	Resultados obtenidos del ANOVA para cada uno de los 59 CECs con el fin de seleccionar el adsorbente más adecuado considerando el área del pico como variable de respuesta (n=6)
13	Matriz de experimentación del diseño
14	Estadísticos R ² y p-valores de los efectos significativos encontrados en el diseño experimental empleando en todos los casos el área del pico como variable de respuesta.
15	Concentraciones de las drogas en el purín bruto obtenidas mediante el MAP
16	Parámetros de validación obtenidos mediante calibrado matriz-patrón
17	Recuperación relativa (%) y desviación estándar relativa (%DER) para dos niveles de concentración (n=5)
18	Concentraciones de las drogas en el purín sin centrifugar obtenidas mediante el MAP y porcentaje de cada droga en las distintas fases

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO
1	Evolución del censo porcino en la UE
2	Encuestas de ganado porcino en España: Evolución por comunidades en los últimos años
3	Consumo de las distintas clases de fármacos en ganado, en mg por unidad de corrección de la población (mg/PCU) por país, para 25 países en 2011
4	Consumo de las distintas clases de fármacos en ganado en España en 2011
5	Fuentes de emisión y destino de los CECs
6	Separación por filtro de tambor
7	Esquema del proceso de degradación anaerobia
8	Esquema general del proceso de compostaje
9	Esquema general del proceso de lodos activados
10	Comparación de las técnicas de extracción nombradas en las publicaciones científicas entre 2008 -2012 y entre 2013-2018
11	Comparación de las técnicas de limpieza nombradas en las publicaciones científicas entre 2008 -2012 y entre 2013-2018
12	Comparación de las técnicas de análisis instrumental nombradas en las publicaciones científicas entre 2008 -2012 y entre 2013-2018
13	Esquema del proceso de tratamiento de muestra
14	Equipo empleado para la SPE
15	Esquema del sistema de espectrometría de masas en tándem
16	Efectos significativos en algunos CECs estudiados (TTC, SDD, TYL, IBP)
17	XIC de los 24 fármacos cuantificados mediante el MAP. Muestra de purín bruto dopada a 8000 ng/g.
18	Calibrado matriz-patrón para el naproxeno (NPX)
19	Calibrado matriz-patrón para el ácido clofíbrico (ACF)
20	Método de adiciones patrón en un extracto de purín bruto sin centrifugar para el acetaminofeno (AAF)
21	Método de adiciones patrón en la fase sólida del purín bruto sin centrifugar para el acetaminofeno (AAF)
22	Método de adiciones patrón en la fase sólida del purín bruto sin centrifugar para el acetaminofeno (AAF)