



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.

Análisis y Control Químicos.

**Análisis de contaminantes emergentes en productos de valorización
procedentes de biomasa algal**

***Autor:** Ariadna Calvo Tejo*

***Tutor/es:** Juan José Jiménez Sevilla / Rebeca López-Serna*

Índice

Resumen.....	3
Abstract	3
1. Introducción:	4
1.1 Residuos de drogas en purines porcinos. Problemática y soluciones.	4
1.2 Composición de los purines:	8
1.3 Compuestos a estudiar:	9
1.4 Métodos de análisis:	18
1.5 Valorización de subproductos:.....	22
2. Objetivos:	24
3. Métodos experimentales.	25
3.1. Material y reactivos	25
3.2 Hidrolizados:	27
3.3 Filtración:	28
3.4 Extracción en fase sólida.....	29
3.5. Elución y evaporación.	31
3.6 Determinación mediante UHPLC-MS/MS	33
4. Resultados y discusión.....	39
4.1 Diseño de experimentos	39
4.2 Líneas de calibrado.....	42
4.2.1 Identificación y cuantificación de los compuestos presentes en la muestra:	42
4.2.2 Líneas de calibrado matriz-patrón:.....	44
4.2.3 Comparación de pendientes.....	46
4.2.4 Influencia de la matriz y recuperación absoluta:.....	47
5. Conclusiones.....	54
6. Bibliografía:.....	55

Resumen:

El uso de fotobiorreactores con biomasa algal está siendo ensayado para la depuración de aguas residuales ganaderas, principalmente de granjas porcinas. Para que este proceso de depuración sea viable económicamente se pretende obtener productos de valor añadido de la biomasa algal que crece en los fotobiorreactores; en particular se están realizando hidrólisis enzimáticas de la biomasa alga para obtener hidrolizados ricos en proteína. Dichas aguas residuales pueden contener residuos de drogas veterinarias y contaminantes medioambientales por lo que es de interés disponer de métodos de análisis de estos compuestos en los hidrolizados para conocer su posible presencia. De este modo, en este trabajo se ha estudiado la posibilidad de efectuar una extracción en fase sólida de diversas drogas y microcontaminantes en muestras de hidrolizado enzimático para su posterior detección mediante UHPLC con detección de espectrometría de masas en tándem. Mediante un diseño de experimentos se ha evaluado la influencia de 4 parámetros de operación de la extracción en fase sólida: el pH de la muestra, la presencia de AEDT en la muestra, el volumen de elución y el disolvente de elución. El pH de la muestra y el disolvente de elución han resultado ser los parámetros más influyentes. También se han establecido la repetitividad y los intervalos de concentración para una calibración lineal y los límites de detección y cuantificación a dos pHs de trabajo: pH 6 y pH 8, ya que al pH más adecuado para la mayoría de los compuestos (pH 8) aparece un precipitado de difícil filtración.

Abstract:

The use of photobioreactors is being studied to purificate the livestock waste water, mainly from pig farms. This process will be economically able if it is posible to obtain value products from the algal biomass that is growing in the photobioreactors; particularly, an enzymatic hydrolysis is being conduct on algal biomass to obtain protein-rich hydrolysates. The water waste may contain veterinary drugs and environmental pollutants, therefore, is vital to have an analysis method for this compounds that allow to know if they are present in the sample. Thus, in this work the possibility of a solid-phase extracción of multiple drugs and micro-pollutants is studied in enzymatic hydrolysates samples for their ulterior detection by UHPLC with triple quadrupole. By a experimental design is evaluated the influence of four parameters of the solid-phase extraction: sample pH, presence of EDTA in the sample, elution volumen and solvent for the elution. Furthermore, the concentration ranges for linear calibration and limits of detection and quantification are established for two pH: 6 and 8 due to, althpugh, the pH 8 is more adequate for most of the compounds, a precipitate appears that makes the filtration harder.

1. Introducción:

1.1 Residuos de drogas en purines porcinos. Problemática y soluciones.

Una de las fuentes económicas más importantes es la ganadería, la cual permite obtener carne y diversos productos derivados de los animales como leche, huevos, cuero o lana. La ganadería española, tal y como muestra en el siguiente gráfico de efectivos de las diferentes categorías de ganado porcino a noviembre de 2016 por Comunidades Autónomas¹, es una parte importante de la industria.

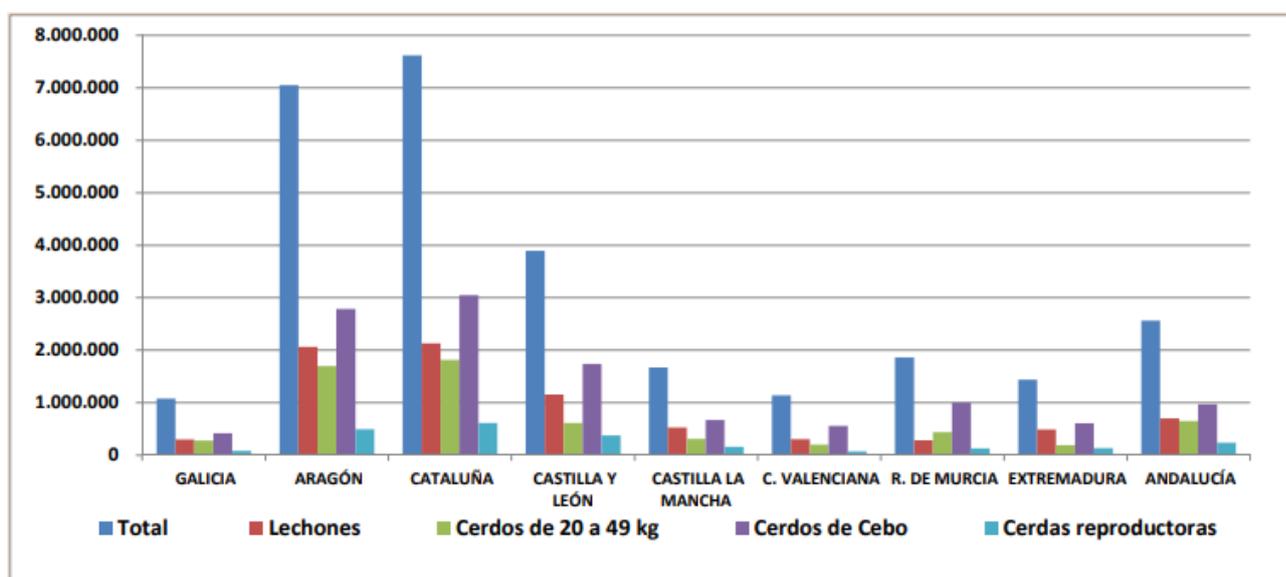


Figura 1. Gráfico de la ganadería porcina en las comunidades autónomas indicando el número de cerdos en cada comunidad y según el tipo.

Como se puede observar en la figura 1 hay un elevado número de animales, esta intensificación de la actividad agraria favorece el desarrollo económico, pero puede alterar el equilibrio entre los sistemas agrícola y ganadero y causar impactos significativos sobre el medio ambiente, ya que un aspecto importante a considerar son los vertidos provenientes de la ganadería. Durante la cría de estos animales son necesarios productos veterinarios, como antibióticos, los cuales no pueden ser desechados a las aguas ya que supondría la contaminación de estas, dando lugar a un riesgo ambiental. Centrándonos en la cría de porcinos, son necesarios también medicamentos veterinarios (veterinary medicinal products, VMPs) y biocidas empleados en la desinfección de establos, que son expulsados en los excrementos junto con compuestos metabolizados, componiendo, junto las aguas residuales

procedentes del lavado y restos de alimentos, los denominados purines, de naturaleza semilíquida. No todos los cerdos reciben los mismos fármacos, los destinados para la cría requieren altas dosis de hierro, así como otros fármacos, mientras que los cerdos de cebo se les proporciona más medicamentos. Las grandes dosis son necesarias debido a que asimilan muy poca cantidad, por lo que en los purines se encuentran en grandes cantidades del orden de mg/Kg(L) de ahí que contaminan suelos suponiendo un problema.

Una solución a la problemática mencionada consiste en emplearlos para obtener biogás. De esta forma, se puede conseguir una fuente de energía renovable que puede ser empleada en diversas aplicaciones energéticas como eléctrica, térmica o carburante siendo posible su almacenamiento para posterior uso. El biogás se obtiene a partir de un proceso de digestión anaerobia, es decir, en ausencia de oxígeno, fermentando el purín en cámaras denominadas biodigestores empleando distintos tipos de bacterias con dos fases consecutivas principales: una de acidificación de la materia orgánica del biodigestor llamada digestato y otra en la que el material orgánico se transforma en gas metano gracias a los microorganismos. Los biodigestores están cerrados herméticamente por lo que no se producen emisiones a la atmósfera de ningún tipo. El proceso dura aproximadamente treinta días dando como resultado, gas metano (60%), dióxido de carbono (35%) y otros gases (5%) en consecuencia es necesario un proceso de depuración para obtener el biogás, un combustible limpio dando lugar a menos dióxido de carbono que el metano que producirían los purines al aire libre, por lo que se reduce el efecto invernadero. Por otro lado, queda un abono líquido y compost orgánico ya que el nitrógeno se convierte en amoníaco y nitratos. A pesar de todo lo mencionado, no hay muchas plantas instaladas en España actualmente².



Figura 2. Planta de biogás en Lorca, Murcia³.

Otra alternativa, más comúnmente usada, consiste en almacenar estos purines empleados como abonos en tierra de labrado y dehesas. Esta solución radica en tratarlo para obtener dos fases: una líquida, que se puede emplear para el riego de campos y otra sólida, acumulable como estiércol dando lugar al purín sólido. El purín puede ser un abono ya que presenta una composición rica en nutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio junto con otros como el calcio, magnesio, sodio o azufre e incluso hierro.

Tradicionalmente se almacena el purín en balsas provocando ocupación de superficie, su consecuente desbordamiento lo que conlleva sanciones, paralización de la actividad y contaminación, entre otros problemas. Sin embargo, ante el gran número de granjas y debido a los componentes mencionados anteriormente, al ser vertidos a la tierra podrían acumularse en ella y en aguas, así como aguas subterráneas, afectando a la calidad del suelo y agua⁴.

Otro aspecto importante que considerar del almacenamiento en balsas del purín es la alta emisión de gases metano y butano que conlleva, así como la formación de nitrosamina a partir de amonio y nitratos presentes en el purín. Esto supone no solo un importante riesgo medioambiental, el metano atrapa el calor en la atmósfera contribuyendo al cambio climático, produciéndose además compuestos cancerígenos, las nitrosaminas⁵.

Se han probado métodos convencionales como la absorción u oxidación con el objetivo de eliminar los compuestos derivados de los fármacos, sin embargo, debido a la incertidumbre acerca de la toxicidad de los productos restantes, la necesidad de obtener más datos analíticos y su alto coste se han buscado otras alternativas. Una de estas alternativas consiste en procesos basados en algas y bacterias que son de menor coste, efectivos y ecológicos. Este proceso consiste en depurar los residuos mediante algas, siendo este proceso ya aplicado a aguas residuales en depuradoras aumentando el tiempo de retención de lodos mejorando la penetración de la luz y controlando las variaciones de pH, oxígeno disuelto y temperatura, obteniéndose la eliminación de los fármacos de las aguas⁶. Teniendo esto presente se busca aplicar esta metodología a la problemática de los purines.

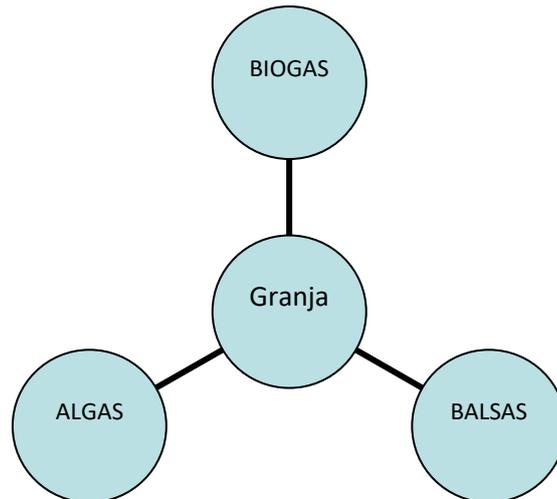


Figura 3. Opciones de usos de los purines.

Con esta metodología presente se han desarrollado fotobiorreactores experimentales para la depuración de purines. La figura 4 muestra el esquema de funcionamiento de un reactor, en el que se introducen los residuos de purín porcino. Las algas empleadas son principalmente algas *chlorella vulgaris*.

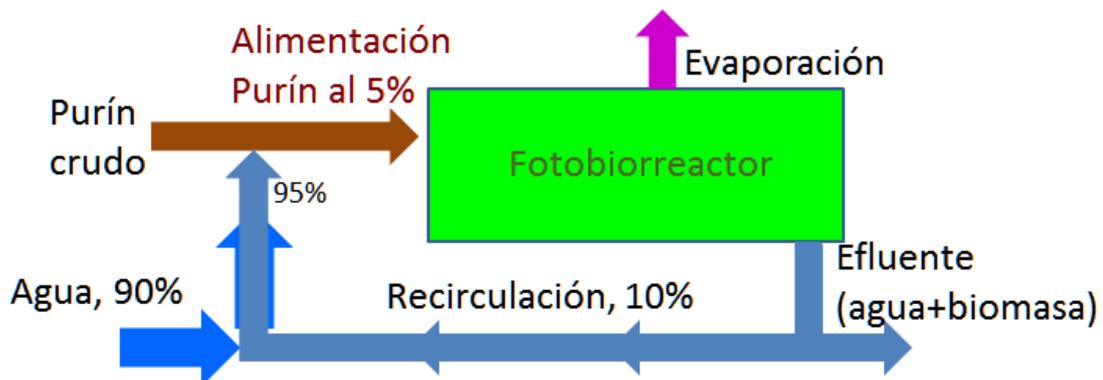


Figura 4. Esquema del reactor experimental para depuración de purines.

El purín bruto es diluido con líquido de recirculación y agua para obtener el influente al reactor con purín al 5%, siendo necesario reponer el agua que se pierde debido a la evaporación ya que le da directamente el sol. El tiempo de retención hidráulico de la alimentación suele ser de escasos días dando lugar a un efluente depurado que contiene biomasa y agua, parte es recirculada para diluir purín bruto de la alimentación.

1.2 Composición de los purines:

Como ya se ha mencionado, los purines líquidos presentan una mezcla de orines, heces y agua usada para limpiar los establos, sin embargo, también muestran un 5 o 10% de materia seca, cuanto más contenido en materia seca presente, mayor número de zonas de sorción muestra.

Además de lo mentado presentan drogas veterinarias, entre ellas antibióticos empleados en la cría de animales para tratamiento de infecciones. Tras su ingesta, se excretan grandes fracciones, entre 30-90%, dependiendo de la farmacocinética de cada compuesto, a través de la orina o heces. El uso de estos fármacos en la ganadería puede provocar la selección de bacterias resistentes en el intestino del animal, que a partir de entonces podrían ser excretados. La resistencia bacteriana se ha convertido en un problema mundial, con un número creciente de patógenos bacterianos que muestran resistencia a múltiples fármacos. Con la acumulación de estos residuos que presentan antibióticos en los que con una pequeña cantidad de ellos pueden suponer un impacto importante al medio ambiente⁷.

Mayormente los purines contienen tetraciclinas, que se transforman en epímeros, isómeros y compuestos anhidro, sulfadiazinas, fluoroquinolonas y clortetraciclinas. Su transformación es debida a diversos factores como componentes de la matriz, temperatura, pH, microbiología y condiciones de oxígeno. Respecto del último factor esta transformación puede ser aerobio o anaerobia siendo más rápida la primera. Su nivel de oxígeno disponible se encuentra afectado por el almacenamiento de los purines ya que si es almacenada en tanques cerrados no dispondrá de oxígeno dándose condiciones anaerobias mientras que, en las balsas al estar abiertas al aire libre, dispone de oxígeno siendo condiciones aerobias, aunque, las capas más profundas pueden no disponer de oxígeno⁸.

En la actualidad no hay un protocolo estandarizado para el examen que permita establecer la transformación de los fármacos. Debido a la falta de sustancias de referencia, los productos de transformación pueden ser determinados únicamente a nivel cualitativo.

1.3 Compuestos a estudiar:

Medicamentos como antibióticos son usados en los animales para prevenir y tratar enfermedades e incluso para mejorar su desarrollo, tras su uso acaban en los purines.

Los medicamentos empleados y que van a ser analizados en los purines son los siguientes.

Tabla 1. Medicamentos analizados en los purines.

	CEC	Clase terapéutica
1	Penicilina G	Antibiótico
2	Amoxicilina	
3	Doxiciclina	
4	Tetraciclina	
5	Oxitetraciclina	
6	Danofloxacina	
7	Enrofloxacina	
8	Marbofloxacina	
9	Ciprofloxacina	
10	Ofloxacina	
11	Levofloxacina	
12	Norfloxacina	
13	Ácido nalidíxico	
14	Sulfadimidina	
15	Sulfadiazina	
16	Sulfametoxazol	
17	Sulfametizol	
18	Sulfatiazol	
19	Sulfapiridina	
20	Tilosina	
21	Eritromicina	
22	Claritromicina	
23	Apramicina	
24	Tiamulina	
25	Florfenicol	
26	Trimetoprima	

EXPERIMENTAL

27	Metronidazol	
28	Triclosan	
29	Dexametasona	Analgésico/Antiinflamatorio
30	Diclofenaco	
31	Naproxeno	
32	Ibuprofeno	
33	Ácido salicílico	
34	Acetaminofeno	
35	1,4-Benzoquinona	
36	Ácido acetilsalicílico	
37	Ácido clofíbrico	Reguladores de lípidos
38	Clofibrato	
39	Atorvastatina	
40	Gemfibrozil	
41	Propranolol	Fármacos cardiovasculares
42	Atenolol	
43	Carbamazepina	Fármacos psiquiátricos
44	Fenbendazol	Antiparásitos
45	Progesterona	Hormonas
46	17-alfa-Etinilestradiol (EE2)	
47	17-beta-estradiol (E2)	
48	Estrona (E1)	
49	Iohexol	agente de contraste en rayos X
50	DEET	Repelente de insectos
51	Atrazina	Pesticidas
52	Metil parabeno	Conservantes
53	Etil Parabeno	
54	Propil Parabeno	
55	Ácido 4-Hidroxibenzoico	
56	4-terc-octilfenol	Surfactantes
57	4-Nonilfenol	
58	Cafeína	Estimulante
59	Crotamitón	Fármaco antipicor

A continuación, se comentará en mayor profundidad para una mejor comprensión las principales clases terapéuticas.

→Tetraciclinas⁹:

Obtenidos de cultivos de *streptomyces*, un grupo de bacterias gram positivas, constituyen un grupo de antibióticos y derivados semisintéticos. Presentan una estructura de anillos de seis eslabones concatenados, uno de ellos es un benceno, con numerosos grupos cetona y alcohol junto con otros grupos funcionales como un grupo amino y otro grupo amida. Se emplean para infecciones causadas por clamidia, micoplasma o rickettsia. Su actividad consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas mediante su unión en el ribosoma 30 y 50, complejos supramoleculares de ácido ribonucleico y proteínas ribosómicas presente en todas las células encargados de hacer posible la expresión de los genes. Son estables en disoluciones ácidas y se unen a iones di y trivalentes.

Dentro de este grupo tenemos:

- Oxitetraciclina: Constituida por un grupo amino secundario en el primer anillo, un hidroxilo en el segundo y un grupo metilo junto con un hidroxilo en el tercero. Su acción consiste en inhibir la síntesis de proteínas aplicándose al tratamiento de clamidia, micoplasma y problemas respiratorios como rinitis o neumonía.

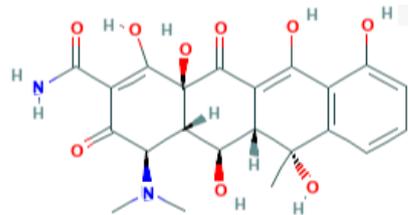


Figura 5. Estructura de la oxitetraciclina.

- Tetraciclina: Presenta un grupo metilo y un grupo hidroxilo en el tercer anillo a diferencia del resto de tetraciclinas. Se obtiene como derivado de la *Streptomyces aureofaciens* o producida de forma semisintética a partir de la oxitetraciclina. Se comercializa para el tratamiento de la clamidia, gonorrea, malaria, etc.

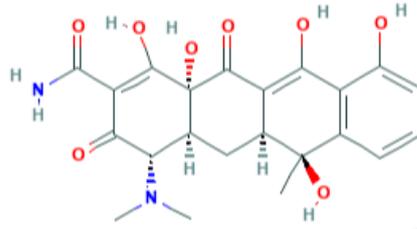


Figura 6. Estructura de la tetraciclina.

- Doxitetraciclina: Presenta un grupo hidroxilo en el segundo anillo y un grupo metilo en el tercero. Se obtiene también derivado de la oxitetraciclina empleándose para el tratamiento de infecciones debidas a ántrax, clamidia, anaplasmosis y malaria.

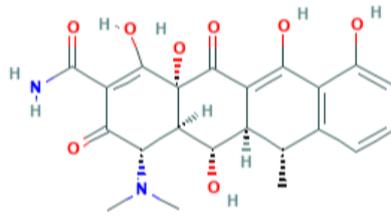


Figura 7. Estructura de la doxitetraciclina.

→Quinolonas¹⁰:

Constituidos por un anillo de quinolona con diversos sustituyentes como ciclopropil o fluorofenil en la posición C1, en la C6 está presente un flúor y en la C8 un halógeno, metoxi o un tercer anillo. Este grupo de antibióticos matan o inhiben el crecimiento bacteriano al actuar sobre dos enzimas, la topoisomerasa IV y la ADN girasa, impidiendo la reparación de ADN.

Dentro de este grupo tenemos:

- Ciprofloxacina: Metabolito de la enrofloxacina comercializado como hidrocloreto de ciprofloxacina. Presenta un grupo flúor en la posición C6 del núcleo de quinolona, un grupo piperazinil en la posición C7 además de un grupo ciclopropil en C1. Debido a su actividad antibacteriana se emplea para tratamientos contra infecciones del tracto urinario, sinusitis y pequeñas infecciones respiratorias.

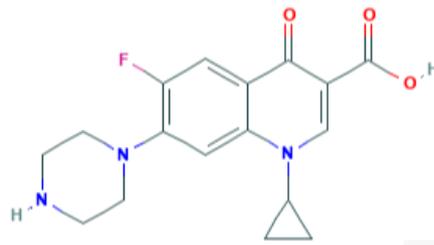


Figura 8. Estructura de la ciprofloxacina.

- Enrofloxacin: Presenta un grupo flúor en la posición C6 del núcleo de quinolona, un grupo piperazinil en C7 con un metilo en posición para y un grupo ciclopropil en C1. Inhibe la ADN girasa ihibiendo la síntesis de ADN y ARN bacteriano. Se emplea para infecciones de piel y de tejido blando.

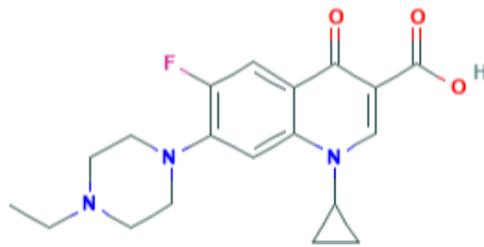


Figura 9. Estructura de la enrofloxacin.

- Danofloxacin: Su estructura presenta un grupo flúor en C6 del núcleo de quinolona y un grupo ciclopropil en C1, la diferencia con los anteriores radica en un grupo piperazinil en C7 con un metilo en posición para con un puente entre C1 y C4. Se usa para infecciones por Escherichia coli, salmonela o estafilococos entre otros.

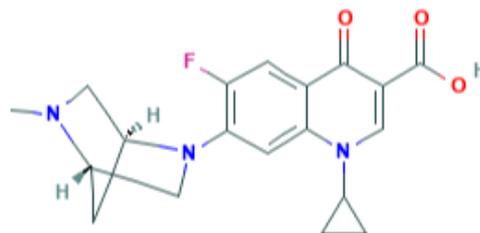


Figura 10. Estructura de la danofloxacin.

→Sulfonamidas¹¹:

Constituidos por un anillo de benceno con un grupo sulfonamida y una amina primaria en posición para. Son derivados sintéticos de la p-aminobencenosulfonamida, insolubles en agua y baja acidez en presencia de sales básicas. Su actividad antibacteriana se emplea para infecciones por profilaxis, infecciones del tracto urinario, artritis reumatoide, toxoplasmosis y malaria entre otros.

Dentro de este grupo tenemos:

- Sulfametoxazol: Es un isoxazol con un metilo en la posición C4 y un 4-aminobencenosulfonamido en C3. Se emplea como tratamiento para infecciones urinarias, de piel y tejidos blandos, neumonía o infecciones articulares o abdominales.

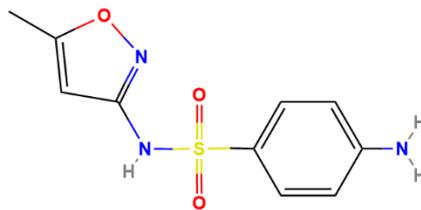


Figura 11. Estructura del sulfametoxazol.

- Sulfadiazina: Constituida por una pirimidina con un sustituyente en la posición C4 de p-aminobencenosulfonamida. Se emplea junto con trimetoprima ya que su eficacia en solitario no ha sido comprobada.

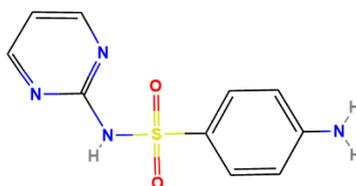


Figura 12. Estructura de la sulfadiazina.

- Sulfatiazol: Es un antibiótico el cual debido a su toxicidad ha sido reemplazado por otros medicamentos menos tóxicos, pero se sigue empleando para infecciones vaginales y

desinfección de aguas. Presenta un 1,3-tiazol con un grupo 4-aminobencensulfonamida en la posición C2.

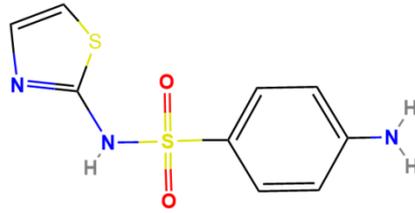


Figura 13. Estructura del sulfatiazol.

- Sulfametizol: Presenta un núcleo 1,3,4-tiadiazol con un metilo en el carbono 5 y un grupo 4-aminobencensulfonamido en C4. Se emplea para tratamiento de infecciones urinarias principalmente.

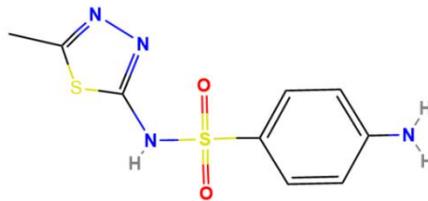


Figura 14. Estructura del sulfametizol.

- Sulfadimidina: Constituido por una pirimidina con un metilo en C4 y C6, además de un grupo 4-aminobencensulfonamida en C2. Se emplea para combatir enfermedades respiratorias como la bronquitis e infecciones urinarias y prostatitis.

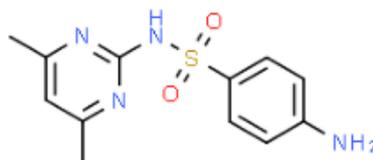


Figura 15. Estructura de la sulfadimidina.

→**Tiamulina**¹²:

Su estructura consta de un éster carboxílico, una cetona cíclica, una amina terciaria, un alcohol secundario, un sulfuro, un diterpenoide tetracíclico y un derivado semisintético. Es un antibacteriano que inhibe la síntesis de proteínas en los ribosomas. Se emplea para la disentería porcina, la neumonía e infecciones de micoplasma.

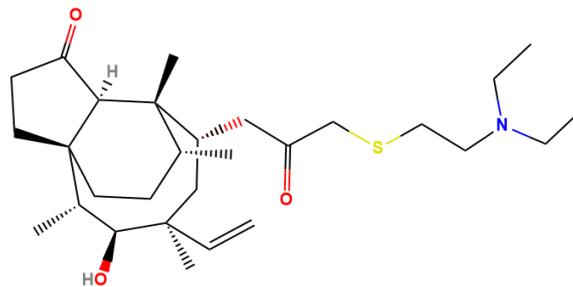


Figura 16. Estructura de la tiamulina.

→**Trimetoprima**¹³:

Su estructura consiste en restos de pirimidina 2,4-diamina y 1,2,3-trimetoxibenceno unidos mediante un puente metileno. Permite inhibir la enzima dihidrofolato reductasa empleada como tratamiento para múltiples infecciones.

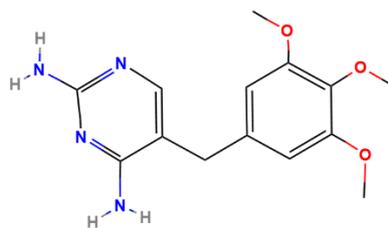


Figura 17. Estructura de la trimetoprima.

→**Florfenicol**¹⁴:

Es una carboxamida que muestra múltiples halógenos, junto con un grupo amida y un alcohol además de un sulfuro. Permite inhibir la síntesis de proteínas empleándose para infecciones de tipo respiratorio.

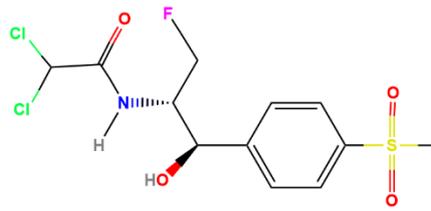


Figura 18. Estructura del florfenicol.

→**Fenbendazol**¹⁵:

En su estructura está presente un amino en la posición C2 y un fenilsulfanediilo en C5. Su acción antiparasitaria se debe a que produce la degeneración de los microtúbulos de los parásitos al bloquear de forma irreversible la absorción de la glucosa, lo que conlleva al agotamiento de sus reservas dando muerte al parásito. Se emplea para parásitos del tipo helmítico como la toxacara o el toxacaris.

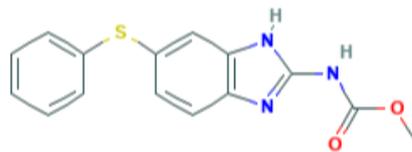


Figura 19. Estructura del febendazol.

→**Dexametasona**¹⁶:

Presenta esteroideos con veintiún átomos de carbono con diversos grupos funcionales como tres grupos hidroxilo, un flúor, tres metilos y dos cetonas. Inhiben las células inflamatorias suprimiendo los mediadores, presentando también acción inmunodepresora.

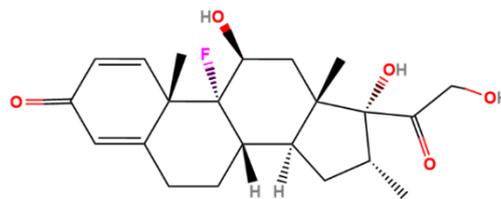


Figura 20. Estructura de la dexametasona.

1.4 Métodos de análisis:

Para el análisis de drogas veterinarias se parte de biomasa algal a tratar. Las algas están constituidas por lípidos, proteínas, carbohidratos y humedad, a las cuales, sometiéndolas a diversos análisis, se puede medir su contenido en proteínas, lípidos, ceniza, carbohidratos y humedad. Sin embargo, no hay un método estandarizado para el análisis de biomasa algal, por lo que el desarrollo de un método es crucial.

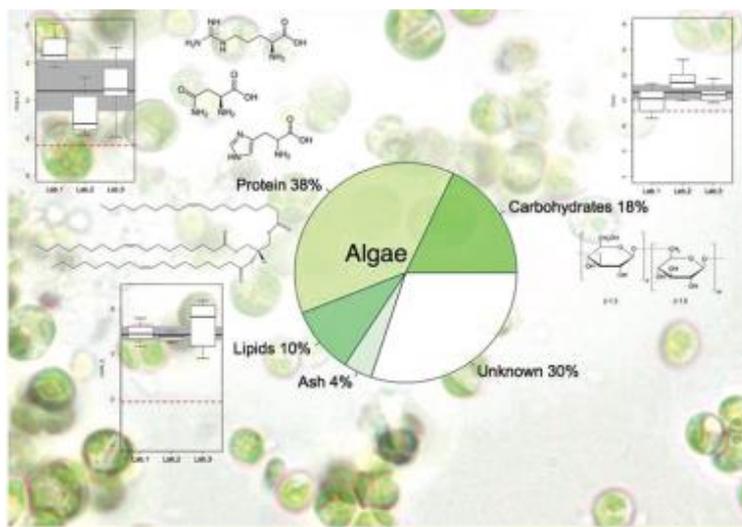


Figura 21. Composición de las algas.

Se han publicado diversos métodos para el análisis de drogas veterinarias en diversas muestras de fotorreactores, no sólo muestras de algas. Es necesario generar datos de alta calidad sobre la biomasa algal junto con medidas de control para garantizar coherencia de los datos generados¹⁷.

Si se realiza una revisión bibliográfica acerca de los métodos empleados para la determinación de drogas veterinarias en diversas matrices como aguas o purines se observa que se han optado por diferentes vías como, por ejemplo, extracción sólido-líquido con agitación mediante ultrasonidos¹⁸ o microondas¹⁹, que se acompañan de determinaciones mediante cromatografía de líquidos acoplado con masas, validándose habitualmente los métodos²⁰.

Debe indicarse también que además de la presencia de drogas de uso veterinario en los purines y en la biomasa crecida a partir de ellos, no debe descartarse la posible presencia de otros contaminantes emergentes como son las drogas de uso farmacéutico humano y

productos conservantes, entre otros. Por este motivo, en este trabajo se intentará desarrollar un método de análisis multirresiduo para contaminantes emergentes de distinto origen.

Para muestras de algas, a pesar de haber múltiples estudios acerca de su tratamiento, el análisis posterior no se centra en la determinación de los antibióticos en esa matriz, sino en la acuosa.

En este trabajo se las someterá a una hidrolisis enzimática en la cual se obtienen los azúcares, grasas, proteínas y otros componentes. Quedándonos solo con el líquido, se mide el pH y se filtra previamente para evitar obstruir los cartuchos para someterla después a una SPE.

A continuación, se procede a explicar en mayor profundidad estas técnicas.

SPE:

La extracción en fase sólida, SPE, consiste en un método que permite la limpieza de muestras y mejora de la sensibilidad analítica, selectividad o ambas, consiguiendo incluso concentrar analitos que se encuentran como trazas. Consiste en la transferencia del analito o analitos de una muestra en estado líquido a un sorbente sólido, seguido de una elución. El proceso de forma genérica es el siguiente:

- Acondicionamiento:

Se pasa un disolvente adecuado o disolución se pasa por el sorbente para activar sus grupos funcionales eliminando el exceso.

- Carga:

Se introduce un volumen definido de muestra en contacto con el sorbente y el analito o especies que pueden interferir quedan retenidas en él.

- Lavado:

Una solución de lavado retira la muestra residual del volumen vacío del sorbente.

- Elución:

El eluyente fluye a través del sorbente liberando el analito/s. Si se realiza en un menor volumen, permitiría obtenerlos de forma concentrada.

El denominado sorbente se encuentra en unos cartuchos de pequeño tamaño con un exterior de polipropileno o vidrio y un relleno cuya naturaleza depende del analito de interés, pudiendo ser polar o apolar incluso un intercambiador iónico, si se desea retener el analito se producen interacciones de Van der Waals o en el caso de disponer de grupos polares se pueden producir interacciones por puentes de hidrógeno o dipolo-dipolo. El sorbente está formado por partículas de pequeño tamaño, aunque superior al relleno de las columnas cromatográficas, almacenadas entre dos discos que actúan como filtros.

La muestra fluye por el sorbente mediante un vacío diferencial obtenido por aplicación de una presión mediante un gas inerte sobre la parte superior del cartucho o por la parte inferior²¹.

HPLC:

High-performance liquid chromatography, HPLC, cromatografía de líquidos de alta resolución es un tipo de cromatografía en la cual está presente una fase móvil y una fase estacionaria que constituye la columna con un relleno finamente dividido que permite separar analitos según sus propiedades.

En este TFM se empleó una cromatografía de reparto en la cual se produce una interacción entre el analito y la fase estacionaria. El fundamento de esta técnica consiste en la distinta interacción de los analitos con el sorbente, al aplicar una determinada presión se obtiene un flujo que arrastrará los analitos que interaccionarán de diferente manera con el sorbente dependiendo de la fuerza de la interacción de los analitos con el sorbente.

La columna puede presentar diversa naturaleza, en este caso es octadecilsilano, por lo tanto, es una fase estacionaria apolar que interacciona con analitos apolares o poco polares. Al ser la fase estacionaria apolar, la fase móvil se emplea una mezcla de disolventes que presenta una fracción polar y otra apolar realizándose un gradiente en la composición para ir aumentando la fracción más adecuada para conseguir la elución de los analitos que interaccionen con mayor fuerza en la fase estacionaria²¹.

LC-MS:

Para la técnica explicada anteriormente se suele acoplar tras la cromatografía un equipo de espectrometría de masas. Esto permite el análisis cualitativo y/o cuantitativo mediante la clasificación de los iones tras la salida de la columna cromatográfica en función de su velocidad o relación masa/carga para su posterior detección y conversión a señal eléctrica que permita procesarla mediante un dispositivo como un ordenador.

Comienza con la generación de iones produciéndose primero la ionización de la molécula. Si el ion molecular se fragmenta, identificando estos fragmentos se podría realizar una identificación de estos componentes.

Para el empleado en este TFM, como fuente de iones se usa ionización por electrospray, ESI, la cual aplica un potencial a pequeñas gotas de disolvente que contiene los analitos generados mediante un nebulizador produciendo los iones, con un gas de secado se retira el disolvente, tras la formación de los iones se dirigen a un analizador un triple cuadrupolo que consta de dos cuadrupolos y una celda de colisión. Estos cuadrupolos son barras metálicas que actúan como electrodos sobre los cuales se aplica un potencial y una corriente alterna. Aquellos iones que presenten la relación carga/masa seleccionada podrán recorrer toda la trayectoria mientras que los demás iones sufrirán desviaciones no llegando hasta el final. Después se encuentra la celda de colisión donde el ion molecular elegido se le hace colisionar con un gas inerte de alta energía que fragmentará este ion molecular. A continuación, se dirige al tercer cuadrupolo que selecciona de nuevo uno de los fragmentos que llegará al detector, en este caso, un tubo fotomultiplicador, constituido por dínodos de alta energía, al impactar el ion provoca la emisión de electrones que son captados por los siguientes dínodos emitiendo más electrones generando un efecto cascada que dará lugar a una corriente eléctrica.

Gracias al triple cuadrupolo es posible realizar el seguimiento de dos fragmentos distintos de la molécula inicial, lo que permite realizar su cuantificación e identificación²¹.

1.5 Valorización de subproductos:

Finalizado el proceso de purificación de los purines, las algas empleadas pueden ser reutilizadas para obtener productos comerciales útiles.

Hay que recordar que estas algas han estado en contacto con purines que además de contener los contaminantes emergentes también presentan bacterias por lo tanto requiere de una limpieza y purificación previa para garantizar la nula presencia de dichos contaminantes. Una vez limpio hay diversas alternativas, se presentan a continuación:

1. Debido a su contenido proteico es posible su uso es farmacia ya que pueden presentar pigmentos como ficobiliproteínas que presentan un importante papel en funciones biológicas debido a sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antiangiogénicas y neuroprotectoras. Además, presenta propiedades físicas únicas como alta fluorescencia con gran fotoestabilidad adecuado para investigación clínica y biología molecular.

Otro uso debido a su contenido proteico es como comida de peces. Es posible la sustitución parcial del alimento para peces por microalgas para proporcionar vitaminas de origen proteico y contenidos esenciales de ácidos grasos para peces cultivados, especialmente en regiones tropicales donde las microalgas se encuentran en abundantes cantidades²².

2. Dado que contiene también glúcidos se puede usar para producir biocombustible como bioetanol. La utilización de biomasa algal para la producción de bioetanol está adquiriendo atención debido a muchos factores, incluida la alta eficiencia biomasa, mejor variedad de algas, presencia de composición extensa de almidón y carbohidratos, estructuras de pared celular delgadas y altas tasas fotosintéticas de los organismos. En diferentes países, la producción se realiza mediante fermentación a gran escala de cultivos agrícolas azucarados y almidonados. La biomasa agrícola se suele triturar, y luego el almidón presente en los cultivos se convierte en azúcares con la ayuda de diferentes enzimas, levadura (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*), ácido y álcalis²³.

3. El contenido en lípidos es aprovechable para complementos a la dieta. Las microalgas pueden producir varios tipos de lípidos: triacilgliceroles, fosfolípidos, glicolípidos o fitoesteroles, que contienen ácidos grasos que van de C12 a C24, a menudo con monoinsaturados y poliinsaturados ácidos grasos C16 y C18. El contenido de lípidos en las microalgas varía del 20% al 50% del peso seco. Estos lípidos se pueden utilizar para el almacenamiento de energía, como sustratos de energía, como componentes estructurales de las membranas celulares y para procesos metabólicos. También, dado que el cuerpo humano no puede producir algunos ácidos grasos esenciales, deben obtenerse de los alimentos o utilizando diversos aditivos alimentarios, a menudo obtenidos del pescado y el aceite de pescado. Sin embargo, debido al creciente interés en el mundo moderno por las dietas vegetarianas y veganas, las microalgas pueden convertirse en una fuente alternativa de estos suplementos nutricionales²⁴.
4. Los pigmentos que contiene el alga son aprovechables para cosmética o alimentación. Las microalgas contienen varios tipos de pigmentos: carotenoides (color naranja), xantofilas (amarillentos), ficobilinas (color rojo o azul) y clorofilas (color verde). Esto permite una gran variedad de aplicaciones, por ejemplo, los carotenoides de microalgas también se pueden usar como moléculas antioxidantes que pueden atrapar los radicales libres, protegiendo así las células y los tejidos del daño oxidativo, incluida la prevención del deterioro oxidativo de los productos alimenticios²⁴.

Por lo tanto, de esta forma se consigue la limpieza de purines empleando microfotoreactores en los cuales sus algas pueden ser aprovechadas como productos comerciales rentabilizando económicamente el proceso dando lugar a un gran número de posibilidades altamente beneficiosas.

2. Objetivos:

Siguiendo los métodos de análisis habituales en la bibliografía para la determinación de drogas en muestras líquidas mediante una extracción en fase sólida los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Conocer la influencia de 4 parámetros de operación de la extracción en fase sólida mediante la realización de un diseño de experimentos: presencia inicial o no de AEDT, pH de la muestra, disolvente de elución y volumen de eluyente empleado.
- Seleccionar los parámetros de operación que maximizan la respuesta de los analitos.
- Establecer determinadas características analíticas básicas del método de análisis propuesto: límites de detección, cuantificación y linealidad.
- Conocer la posible presencia de drogas, y su nivel de concentración, en hidrolizados enzimáticos de biomasa algal.

3. Métodos experimentales.

3.1. Material y reactivos

Durante la preparación de muestra se utilizan los siguientes materiales y reactivos:

→ Materiales:

- Tubos de centrifuga de 250 ml, polipropileno.
- Filtros para filtrar por esterilización de 0.45 y 0.7 μ .
- Botes cilíndricos con tapón de rosca y obturador, plástico.
- Equipo para esterilización por filtración.
- Espátula.
- Pinzas metálicas.
- Gradilla para viales de 2 ml.
- Cajas para viales de 2 ml, de cartón y plástico, congelables.
- Vaso de precipitados de 100ml.
- Matraces aforados de vidrio de 10, 25, 100 ml.
- Jeringas de 2ml, plástico.
- Filtros de jeringa de 0.22 μ m de tamaño de poro.
- Probeta de 50 ml.
- Cartuchos de extracción en fase sólida OASIS HLB, 60 mg.
- Viales de 6 ml para extracción SPE.
- Micropipeta.
- Pipeta pasteur.
- Viales de vidrio para cromatografía de 2 ml, con tapones roscados.
- Botes de vidrio de 100 ml con tapón de rosca.

→ Reactivos:

Los reactivos utilizados durante la preparación de muestras fueron:

- Agua ultrapura MilliQ.
- AEDT (sal tetrasódica) de la marca Sigma-Aldrich.
- Metanol calidad HPLC (MeOH) de la marca Labkem.
- Acetonitrilo calidad HPLC de la marca Labkem.
- Ácido clorhídrico.

EXPERIMENTAL

- Hidróxido sódico.

Respecto a los fármacos patrón se utilizaron patrones analíticos de alta pureza, superior al 98-99% en la mayoría de los casos. Todos ellos pertenecientes a la marca Sigma-Aldrich.

→Equipos:

- Vortex.
- Ultrasonidos, Sonorex Digitex Bandelin.
- Centrífuga, ThermoCientific Legnt RT+.
- Manifold de extracción en fase sólida.
- Bomba de Vacío.
- Evaporador de nitrógeno, Organomation N-Evap 11250.

A continuación, se va a describir el trabajo experimental realizado en el laboratorio.

3.2 Hidrolizados:

Se partió de algas alimentadas con aguas residuales de purines provenientes de la estación experimental de Las Palmerillas, Almería. Estas algas presentan alto contenido en proteínas, pero pocos lípidos.



Figura 22. Fotobiorreactor.

La muestra fue recibida en forma liofilizada, a la cual se le desea someter a una hidrólisis enzimática para liberar las proteínas, siendo necesario conocer los residuos de drogas veterinarias. Para ello:

1. Se pesó 16.3g de muestra y se disolvieron en 250ml de agua Milli-Q, de esta forma se obtiene una concentración de 58.29g/L teniéndose en cuenta que a pesar de estar las algas liofilizadas contienen un 10% de agua.
2. Se añade 0.125g de la proteasa protamex.
3. Se realiza la sonicación con ultrasonidos a 60% de amperaje, 1200w, durante 30 minutos.
4. Después se centrifuga 10 minutos a 10000rpm a 4°C.
5. Se decanta, almacenándose la fase líquida a -20°C en congelador y la fase sólida también a la misma temperatura. La fase líquida contiene mayormente fármacos y proteínas ya que gracias a la hidrólisis se ha conseguido romper las células de las algas mientras que la fase sólida contiene las algas con una menor cantidad de proteínas. Se almacena en botes cilíndricos de plástico con tapa de rosca y obturador.

3.3 Filtración:

Las muestras de hidrolizado líquidas se encuentran congeladas a -20°C , por lo que previo a la filtración se deben de descongelar en la cámara fría el día antes. Al inicio es un líquido opaco verdoso.

Con la muestra ya descongelada, se procede a su filtración y debido a la naturaleza de la muestra se realiza simultáneamente una esterilización por filtración.

Para ello se lleva a cabo el montaje que se compone de un Kitasato, un adaptador de goma, la plataforma metálica que soporta la frita sobre la que se coloca el filtro y encima el embudo, todo ello fijado con una pinza de sujeción y unido a la bomba mediante una goma con filtro.



Figura 23. Equipo para la filtración y esterilización.

Primero se va a emplear un filtro de tamaño de poro de $0.7\mu\text{m}$ de fibras de vidrio. Al filtrar se añade poco a poco ya que tras añadir aproximadamente 70-90ml se obstruye el filtro por lo que se debe cambiar por otro.

Tras pasar toda la muestra se repite el proceso, pero con filtro de tamaño de poro de 0.45μ de Nylon. También se produce la obstrucción por lo que se debe sustituir el filtro.

El líquido ahora presenta un tono amarillo anaranjado y es translucido. El volumen apenas varía.

Una vez se ha filtrado la muestra se almacena en botes de plástico cilíndricos con tapa de rosca y obturador.

Se vuelve a congelar para su conservación a -20°C .

La muestra desde su descongelación se cubre con papel albal ya que nuestros analitos se degradan con la luz.

3.4 Extracción en fase sólida

De nuevo se debe descongelar la muestra y si se observa que presenta materia en suspensión se puede volver a filtrar con filtros de tamaño de poro de 0.7μ , para evitar obstruir los cartuchos de la extracción.

Previo a la extracción se va a ajustar el pH, para ello con agitación constante y vigorosa se mide de forma continua el pH con pHmetro mientras se añade con micropipeta gota a gota una disolución de HCl o NaOH.



Figura 24. Ajuste de pH.

En la tabla 2 se muestra el pH de partida, pH final y cantidad empleada de base o ácido en la preparación de los experimentos.

Tabla 2. Ajuste de pH

pH de partida	pH objetivo	pH obtenido	Ácido o base	Cantidad	Observaciones
6.40	5.5	5.57	Ácido-HCl 0,5M	0.8ml	-
6.37	3	3.10	Ácido-HCl 0,5M	5.7ml	Tornó a un tono más pardo
6.28	8	8.01	Base-NaOH 0,5M	10.9ml	Surge un precipitado fino verde

EXPERIMENTAL

Cabe mencionar que para el pH 8, fue necesario volver a filtrar tras el ajuste de pH con un filtro de 0.7µm debido a que, si no es así, se obstruyen los cartuchos en la extracción en fase sólida. Tras filtrar el pH baja hasta 7.91.



Figura 25. Precipitado verde tras ajuste de pH a 8.

Una vez ajustado el pH, se preparan las muestras para la extracción en fase sólida.

De forma general, se añade 50ml de muestra a un frasco de vidrio de 100ml. Para ciertos experimentos se requiere añadir 0.5 ml o 1 mL de AEDT al 5%, por lo que se vierte 0.5ml de agua Milli-Q y 0.5ml de AEDT al 5% en agua Milli-Q en el primer supuesto; en el caso de no añadir AEDT se introduce 1ml de agua Milli-Q para mantener siempre el volumen constante en las pruebas del diseño de experimentos.

Las muestras se dopan con un patrón que contiene los 60 fármacos para conseguir la concentración deseada en las muestras.

Se homogeneiza con una ligera agitación y se lleva a la extracción en fase sólida.



Figura 26. Extracción en fase sólida.

Para ello primero se activan los cartuchos con 3ml de metanol y 3ml de agua Milli-Q. Se introduce la muestra y se lava con 3ml de 5% de metanol en agua.

EXPERIMENTAL

Una vez el proceso ha finalizado se pueden guardar los cartuchos en papel de aluminio y congelarlos a -20°C para su posterior elución.

Para la extracción se emplearon cartuchos OASIS HLB con capacidad de 3ml y 60mg de adsorbente.

3.5. Elución y evaporación.

Una vez obtenidos los cartuchos se sacan del congelador la mañana que vayan a ser eluidos, esto debe hacerse lo primero para que se vayan atemperando. Mientras se prepara todo lo necesario para la elución.

Se cogen tantos viales de 6ml con rosca y tapón como cartuchos haya. Se colocan en el interior de la pecera con una gradilla, debajo del manifold, previamente rotulados y tapado con celo para evitar que se borren.

En los cartuchos se ha ensayado la elución con acetonitrilo y metanol además de la cantidad de volumen, por lo que según esté indicado se añade una determinada cantidad del disolvente. Se deja caer por gravedad sin dejar que se seque la primera vez y la segunda de nuevo por gravedad.



Figura 27. Elución de los cartuchos.

Se observa que la elución con acetonitrilo da un color amarillo translucido mientras que con metanol el color es pardo.

Finalizado el proceso se saca la gradilla, se tapan los tubos con sus tapones y se lleva al frigorífico para evitar la degradación de los analitos.

Tras realizar la limpieza del equipo se trasladan los tubos al evaporador bajo corriente de nitrógeno, se quitan los tapones y se colocan en el equipo comprobando anteriormente que hay suficiente agua como para que cubra la parte inferior de los tubos. Se colocan las agujas metálicas en su

EXPERIMENTAL

posición y colocan con la rosca blanca en la posición adecuada a 1cm del líquido del tubo. Se enciende la temperatura y se sitúa en low, ya que la temperatura sube rápido hay que controlar que no suba de 30°C.

Se abre la bala de nitrógeno, se regula el flujo y se abre la primera llave metálica del evaporador. Se regula el flujo con el manómetro hasta que sale una corriente de gas por la aguja suficiente como para que se vea una burbuja en el líquido y que no esté a borbotones, debe de ser fluido. Se abren las demás llaves que tengan un tubo en su posición y se regula el flujo hasta que estén todas de forma similar. Todo esto se realiza con la campana extractora en funcionamiento y con la guillotina bajada salvo cuando se va a recolocar algún tubo.



Figura 28. Evaporación.

El proceso es largo y hay que controlar que a medida que el nivel del líquido del tubo va bajando ir subiendo el tubo para mantener ese 1cm de separación.

Una vez evaporado el extracto se sacan los tubos, se vuelven a colocar en la gradilla y se tapan con su correspondiente tapón.

Para cada muestra se emplea una pipeta Pasteur, se añade medio mililitro de metanol con pipeta con cuidado para que no toque el tubo y no se contamine. Con la pipeta Pasteur se coge el metanol y se pasa por las paredes seis veces y se traslada a un vial se repite el proceso un total de tres veces. Estos viales se colocan en un soporte para que puedan ser colocados en el evaporador. Se repite el proceso y se va colocando el soporte a medida que el nivel del líquido baja. Debido a que tenemos menos volumen el proceso es un poco más rápido. Cuando finaliza se tapan los viales con su tapón, se colocan en una gradilla y se guarda en el congelador.

3.6 Determinación mediante UHPLC-MS/MS

El equipo usado para la determinación cromatográfica es un UHPLC ExionLC aD acoplado a un detector de masas de triple cuadrupolo 6500+ de la marca SCIEX.



Figura 29. Equipo usado en la determinación cromatográfica.

Los parámetros cromatográficos seleccionados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cromatográficos

Columna	EVO-C18 (Phenomenex)
	Longitud: 5 cm
	Diámetro interno: 2.1 mm
	Tamaño de partícula: 1.7 μm
Fase móvil	Mezcla: Agua/metanol al 0.1% en ácido fórmico
	Gradiente de fase móvil de: <ul style="list-style-type: none"> - Inicialmente MeOH al 5% durante 1min - Aumento del MeOH al 95% en 2min - Porcentaje constante durante 3min - Disminución del MeOH al 5% en 4min (para reequilibrar el sistema) - Tiempo total de reequilibrio: 4min
	Flujo: 0.5mL/min
	Temperatura de operación: 40°C
	Volumen de inyección: 10 μL

El sistema empleado de espectrometría de masas que se ha utilizado está formado por:

→Sistema de introducción de muestra: capilar de nebulización.

EXPERIMENTAL

→Fuente de ionización: por la cual se forman los iones gaseosos de los analitos y compuestos coextraídos, aquí se ha utilizado una ionización blanda de tipo electrospray en modo positivo y negativo con las siguientes condiciones de trabajo:

- 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.

→Analizador de masas: encargado de separar los iones con diferente relación de masa/carga (m/z) aplicando un ultra alto vacío con el fin de evitar colisiones de los iones del analito con otras partículas gaseosas. En este caso se ha utilizado un triple cuadrupolo (QQQ) ya que se trata de un espectrómetro de masas en tándem. En el primer cuadrupolo se selecciona el pseudoion molecular que se fragmente en el segundo cuadrupolo mediante una energía de colisión aplicada por el gas N₂ en condiciones de alta energía. Esto permite monitorizar dos de las transiciones (ion padre-fragmento) que son característicos de cada compuesto, siendo normalmente la primera transición la más intensa. Las transiciones seguidas para cada analito y los voltajes de operación individualizados se muestran en la Tabla 4.

→Detector: permite detectar el ion de interés y proporciona una señal eléctrica proporcional a la concentración del compuesto.

Tabla 4. Tiempos de retención (RT), transiciones seguidas (m/z) y voltajes aplicados en el espectrómetro de masas para cada compuesto y transición.

RT (min)	Compuesto	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
0.64	Amoxicillin 1	365.9	348.9	26	13	28
	Amoxicillin 2		114.2	26	29	12
0.8	Atenolol 1	267.1	145.1	11	33	24
	Atenolol 2		190.3	11	29	4
0.91	Metronidazole 1	172.0	128.4	41	21	6
	Metronidazole 2		82.1	41	35	14
1.13	Acetaminophen 1	151.9	110.0	61	23	16
	Acetaminophen 2		108.9	61	55	14

EXPERIMENTAL

1.15	Iohexol 1	821.8	804.1	126	33	26
	Iohexol 2		602.8	126	43	46
1.5	Sulfadiazine 1	251.0	155.9	71	23	20
	Sulfadiazine 2		108.2	71	31	12
1.84	Sulfathiazole 1	255.9	155.9	96	21	8
	Sulfathiazole 2		108.1	96	33	12
1.93	Sulfapyridine 1	250.1	156.1	61	23	10
	Sulfapyridine 2		108.1	61	35	12
2.18	Trimethoprim 1	291.0	230.1	51	33	18
	Trimethoprim 2		261.1	51	35	16
2.77	Marbofloxacin 1	362.9	320.1	66	23	24
	Marbofloxacin 2		326.7	66	25	24
3.3	Tetracycline 1	445.0	410.2	51	27	32
	Tetracycline 2		427.1	51	19	32
3.57	Apramycin 1	271.0	156.1	50	20	19
	Apramycin 2		180.0	50	40	19
3.61	Sulfamethizole 1	270.9	156.1	31	21	10
	Sulfamethizole 2		108.1	31	35	12
3.64	Oxytetracycline 1	460.9	426.1	151	27	30
	Oxitetracycline 2		442.9	151	19	32
3.68	Caffeine 1	195.0	137.9	71	27	18
	Caffeine 2		110.6	71	31	16
3.76	Sulfadimidine 1	278.9	186.7	86	25	22
	Sulfadimidine 2		124.1	86	33	6
3.82	Ofloxacin 1	362.0	318.3	86	29	26
	Ofloxacin 2		261.1	86	37	14
3.9	Levofloxacin 1	362.0	318.1		27	20
	Levofloxacin 2		261.0		37	24

EXPERIMENTAL

3.93	Norfloxacin 1	320.1	276.2	96	27	18
	Norfloxacin 2		233.1	96	37	16
4.04	Ciprofloxacin 1	332.0	313.9	31	29	38
	Ciprofloxacin 2		231.1	31	57	16
4.15	Sulfamethoxazole 1	253.9	156.2	66	23	24
	Sulfamethoxazole 2		108.0	66	33	16
4.16	Danofloxacin 1	357.9	340.1	86	33	24
	Danofloxacin 2		314.1	86	27	38
4.18	Enrofloxacin 1	359.9	316.2	91	29	38
	Enrofloxacin 2		341.9	91	33	38
4.18	Florfenicol 1	357.8	339.9	66	13	24
	Florfenicol 2		241.3	66	25	14
4.43	4-Hydroxybenzoic acid 1	136.8	92.8	-5	-16	-15
	4-Hydroxybenzoic acid 2		64.9	-5	-40	-13
4.42	Salicylic acid 1	136.9	93.5	-40	-22	-15
	Salicylic acid 2		94.7	-40	-38	-33
4.46	Bisphenol A 1	227.0	227.1	-60	-14	-15
	Bisphenol A 2		211.1	-60	-26	-13
4.47	Propanolol 1	260.1	183.1	66	25	12
	Propanolol 2		116.1	66	25	8
4.48	Methylparaben 1	152.9	120.9	66	21	14
	Methylparaben 2		108.9	66	15	30
4.52	Doxycycline 1	444.9	427.9	111	27	34
	Doxycycline 2		410.1	111	37	36
4.72	Tiamulin 1	494.1	192.2	51	29	10
	Tiamulin 2		119.7	51	59	12
4.79	Tylosin 1	916.2	772.3	156	43	36
	Tylosin 2		174.1	156	51	10

EXPERIMENTAL

4.84	Ethylparaben 1	164.9	136.9	-35	-20	-11
	Ethylparaben 2		136.8	-35	-20	-13
4.86	Nalidixic acid 1	233.1	187.1	21	37	18
	Nalidixic acid 2		159.9	21	45	18
4.92	Clarithromycin 1	748.3	590.2	96	25	40
	Clarithromycin 2		157.9	96	41	26
4.93	Carbamazepine 1	237.0	194.2	66	29	12
	Carbamazepine 2		193.3	66	47	6
4.98	Penicillin G 1	334.9	160.0	111	23	18
	Penicillin G 2		176.6	111	19	16
5.02	Atrazine 1	216.0	173.9	71	25	22
	Atrazine 2		103.9	71	41	16
5.03	DEET 1	192.0	119.3	56	23	10
	DEET 2		90.3	56	41	10
5.03	Propylparaben 1	178.9	137.1	-60	-20	-13
	Propylparaben 2		136.1	-60	-24	-7
5.06	Erythromycin 1	734.2	576.1	46	25	36
	Erythromycin 2		157.8	46	37	22
5.06	Dexamethasone 1	392.9	355.1	41	19	20
	Dexamethasone 2		147.3	41	39	10
5.13	4-nonylphenol 1	219.1	132.9	-65	-42	-7
	4-nonylphenol 2		117.0	-65	-80	-13
5.14	Clofibric acid 1	212.9	127.1	-35	-24	-15
	Clofibric acid 2		85.0	-35	-14	-9
5.14	Naproxen 1	231.1	185.1	56	21	12
	Naproxen 2		170.5	56	37	10
5.14	Fenbendazol 1	299.9	268.1	96	29	22
	Fenbendazol 2		159.9	96	49	10

EXPERIMENTAL

5.25	Octylphenol 1	204.9	205.1	-200	-14	-19
	Octylphenol 2		148.3	-200	-26	-7
5.32	Atorvastatin 1	559.2	440.2	26	33	38
	Atorvastatin 2		250.1	26	59	18
5.37	Diclofenac 1	293.9	250.3	-10	-18	-7
	Diclofenac 2		214.1	-10	-28	-9
5.37	Ibuprofen 1	205.0	159.1	-35	-10	-15
	Ibuprofen 2		160.9	-35	-12	-21
5.38	Clofibrate 1	243.0	169.4	86	17	22
	Clofibrate 2		197.2	86	13	10
5.39	Progesterone 1	315.1	109.2	141	31	10
	Progesterone 2		297.2	141	23	28
5.5	Triclosan 1	286.8	286.9	-90	-6	-17
	Triclosan 2		141.8	-90	-48	-15
5.54	Estrone (E1) 1	271.1	253.3	101	19	10
	Estrone (E1) 2		133.1	101	35	12
5.55	β -Estradiol (E2) 1	273.0	255.0	46	17	14
	β -Estradiol (E2) 2	273.1	107.8	61	41	14
5.56	17- α -Ethinylestradiol 1	297.1	107.7	81	33	12
	17- α -Ethinylestradiol 2	297.1	77.1	71	79	10
5.63	Crotamiton 1	204.1	69.4	61	35	12
	Crotamiton 2		136.1	61	27	14
5.9	Gemfibrozil 1	248.9	121.0	-5	-30	-7
	Gemfibrozil 2		127.5	-85	-14	-5
5.84	Acetylsalicylic acid 1	181.1	160.9	71	17	14
	Acetylsalicylic acid 2		125.1	71	19	16
5.95	1,4-Benzoquinone 1	109.0	80.9	121	19	4
	1,4-Benzoquinone 2		53.3	121	29	12

4. Resultados y discusión.

4.1 Diseño de experimentos

Para poder establecer los parámetros de extracción que maximizan la señal se realizó un diseño de experimentos para el análisis de sesenta fármacos en hidrolizados de biomasa algal en el cual se estudiarán los siguientes factores (parámetros factores) con sus respectivos niveles:

- Influencia del AEDT: Se añade 1ml de AEDT o en su ausencia 1ml de agua Milli-Q para mantener el volumen constante. Para el 0.05% (punto central) se añadió 0.5ml de AEDT y 0.5ml de agua Milli-Q.
- pH de la muestra: 3, 5.5 y 8.
- Disolvente empleado: Metanol o acetonitrilo.
- Volumen de elución: 4ml (2mlx2), 5ml (3ml+2ml), 6ml (3mlx2).

Para cada experimento se emplearon 50ml de hidrolizado algal, se añadió el agua Milli-Q o AEDT según indicase, se dopó con 100µl de una disolución de patrones de 1000ng/L y se realiza el método explicado considerando los distintos niveles de cada factor y realizándose una réplica.

Se establecieron en la siguiente tabla los diseños a realizar, para una fácil comprensión se ordenaron según el pH.

Tabla 5. Experimentos para el diseño.

N.º experimento	Vol. elución (mL)	pH	Disolvente	%AEDT
1	6	8	MeOH	0
2	6	8	ACN	0.1
3	6	8	MeOH	0
4	6	8	ACN	0.1
5	4	8	MeOH	0.1
6	4	8	ACN	0
7	4	8	ACN	0
8	4	8	MeOH	0.1
9	5	5,5	ACN	0.05
10	5	5,5	MeOH	0.05
11	5	5,5	MeOH	0.05

EXPERIMENTAL

12	5	5,5	ACN	0.05
13	5	5,5	ACN	0.05
14	5	5,5	MeOH	0.05
15	5	5,5	MeOH	0.05
16	5	5,5	ACN	0.05
17	4	3	MeOH	0
18	4	3	ACN	0.1
19	6	3	MeOH	0.1
20	6	3	ACN	0
21	4	3	MeOH	0
22	4	3	ACN	0.1
23	6	3	MeOH	0.1
24	6	3	ACN	0

Realizada la experimentación se obtienen los correspondientes cromatogramas. Se recogen las áreas para cada fármaco en cada cromatograma y esta información se lleva al programa Statgraphics para realizar el diseño de experimentos de media fracción, 2^{4-1} con cuatro puntos centrales y una réplica, estudiándose las interacciones de dos factores.

Se adjuntan los resultados en la tabla 6.

Los resultados obtenidos muestran que para la mayoría de los compuestos es preferible para una mayor señal pH 8, el AEDT no influye significativamente al igual que el volumen de elución, pero sí el disolvente siendo preferible el acetonitrilo y eligiendo cuatro mililitros lo cual supone menor gasto y tiempo durante la evaporación.

Tabla 6. Resultado diseño de experimentos.

COMPUESTO	Factores				Interacciones		
	A: Volumen elución (ml)	B: pH	C: Disolvente	D: %AEDT	AB +CD	AC +BD	AD+BC
Penicilina G	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacina	-	-	-	-	-	-	-
Danofloxacina	-	-	-	-	-	-	-
Sulfatiazol	-	0.0008(+)	0.0060(ACN)	-	-	-	0.0356(+)
Sulfametoxazol	-	-	-	-	-	-	-
Tilosina	-	-	-	-	-	-	-
Tiamulina	-	0.0160(+)	0.0132(ACN)	-	-	-	-
Trimetoprima	-	0.0194(+)	-	-	-	-	-
Florfenicol	-	-	-	-	-	-	-
Fenbendazol	-	0.0011(+)	0.0006(ACN)	-	-	-	0.0024(+)
Metilparabeno	-	-	-	-	-	-	-
Carbamezapina	-	-	0.0190(ACN)	-	-	-	-
Propanolol	-	-	0.0385(ACN)	-	-	-	-
Sulfapiridina	-	0.0001(+)	0.0173(ACN)	-	-	-	-
Ofloxacina	-	-	-	-	-	-	-
Ácido nalidixico	-	-	-	-	-	-	-
Claritromicina	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	-	0.01458(+)	-	-	-	-	-
Levofloxacina	-	-	-	-	-	-	-
Atorvastatina	-	-	-	-	-	-	-
Cafeína	-	0.0035(+)	0.0101(ACN)	-	-	-	-
Atrazina	-	0.0170(+)	0.0472(ACN)	-	-	-	-
DEET	-	0.0058(+)	0.0098(ACN)	-	-	-	-
Crotamiton	-	0.0164(+)	-	-	-	-	-
Etilparabeno	-	-	0.0321(ACN)	-	-	-	-
Ácido salicílico	-	<0.0001 (-)	-	-	-	-	-
Gemfibrozil	-	-	0.0436(ACN)	-	-	-	-

4.2 Líneas de calibrado

Tras la selección de los parámetros que permiten obtener la máxima respuesta se va a realizar un calibrado matriz-patrón dopando porciones de muestra con cantidades crecientes de los compuestos y usando los extractos como patrones de calibración, e incluyendo un blanco. Al mismo tiempo, si se detecta el compuesto en el blanco se podrá hacer un método de adiciones patrón (MAP) que nos permita cuantificar los analitos en la muestra real considerando el efecto matriz.

Dado que, en las condiciones óptimas de extracción, pH 8, el proceso de filtración es más largo y tedioso se obtendrán también las líneas de calibrado a pH 6 para comparar los resultados.

4.2.1 Identificación y cuantificación de los compuestos presentes en la muestra:

Dado que se han analizado muestras reales en las que no es posible obtener la matriz libre de residuos, se ha identificado los compuestos presentes en la muestra y determinado su concentración mediante el método de adiciones patrón, representando el área de pico frente a la concentración añadida.

Para el método de adiciones patrón se dopó 50 ml de muestra con concentraciones crecientes de la disolución patrón.

Tabla 7. Dopado para el MAP.

Muestra	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Concentración del patrón (ppm)	0.5	0.5	0.5	0.05	0.05	0.05	0.005	0.005	0.0005
Volumen del patrón (ml)	0.300	0.200	0.100	0.500	0.200	0.100	0.200	0.100	0.400
Concentración del líquido (ng/L)	3000	2000	1000	500	200	100	20	10	4

Tras el análisis de los cromatogramas se llega a la conclusión de que sólo se ha encontrado el insecticida DEET en los ensayos realizados a pH 6 y 8.

Por lo tanto:

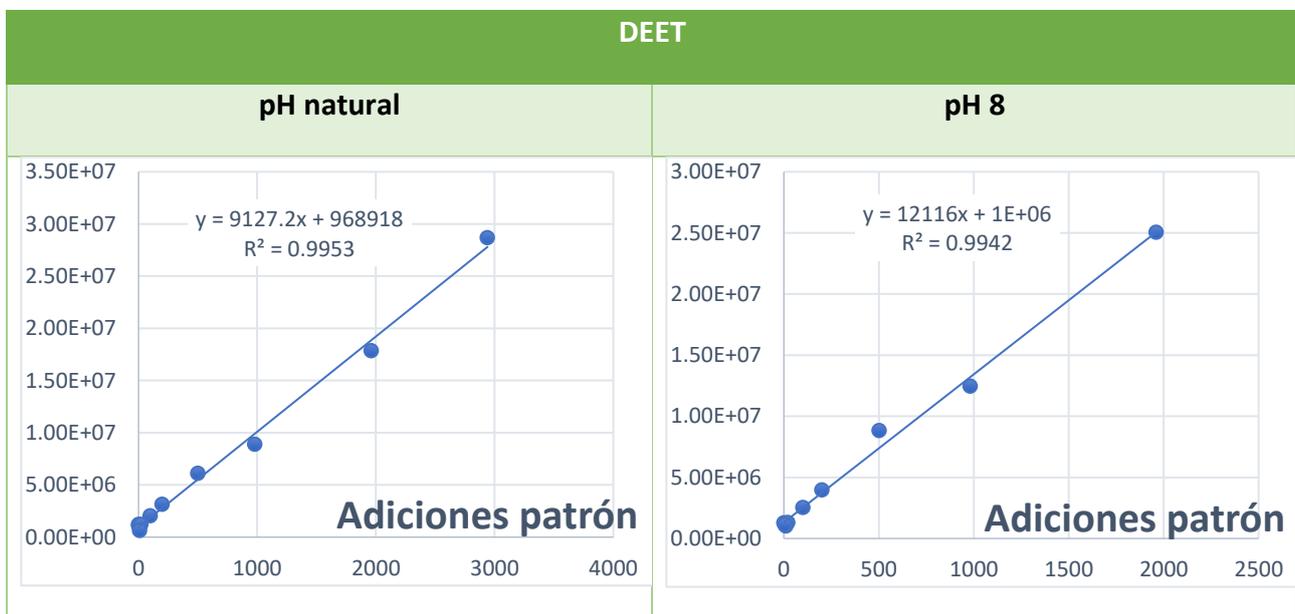
DEET

pH 6: 106 ± 70 ng/L

pH 8: 108 ± 55 ng/L

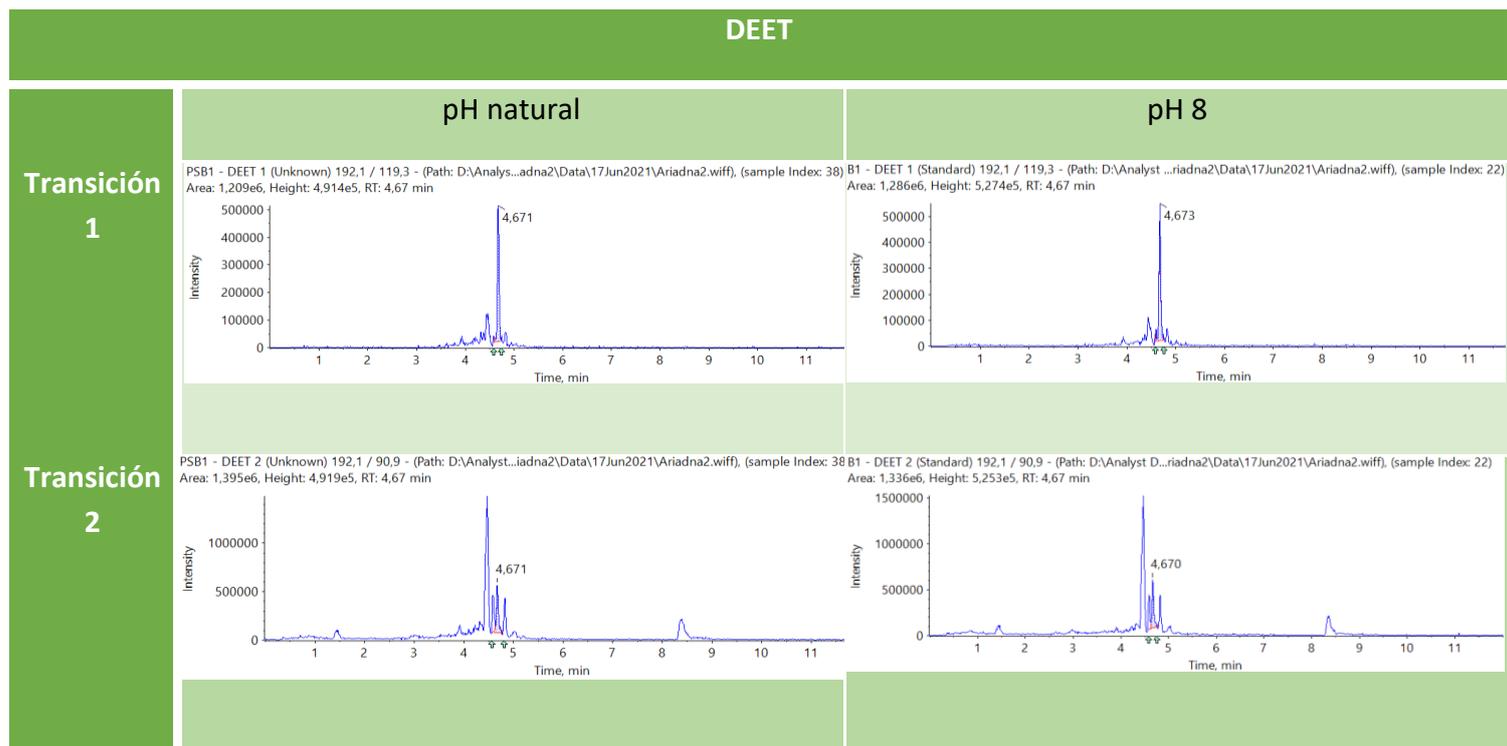
Resultados obtenidos de las calibrados que se muestran a continuación:

Tabla 8. Rectas de calibrado adiciones patrón para ambos pH.



Junto con los cromatogramas para el DEET a pH natural y pH 8.

Tabla 9. Cromatogramas DEET a ambos pH.



4.2.2 Líneas de calibrado matriz-patrón:

Se ha realizado un calibrado matriz-patrón (área de pico frente a concentraciones totales en muestra) para estimar varios parámetros básicos del método de análisis. Por concentración total en la muestra se entiende la suma de la concentración propia de la muestra más la concentración añadida en el procedimiento de adiciones patrón, y que en este caso sólo afecta al DEET.

Para cada pH se muestra una tabla que representa los parámetros de validación obtenidos mediante el calibrado matriz-patrón.

- pH natural

Tabla 10. Parámetros de validación obtenidos mediante el calibrado matriz-patrón a pH 6.

Compuesto	R ²	Rango lineal (ng/L)	Ordenada	Pendiente	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
Penicilina	0.987	440-2640	80905	20	191	638
Enrofloxacin	0.989	500-3000	-254514	1201	208	694
Danofloxacin	0.996	980-2940	-403800	1136	275	916
Sulfatiazol	0.992	9.8-2940	54513	1170	29	97
Sulfametoxazol	0.997	196-2940	57788	1098	46	152
Tilosina	0.998	85-2550	-3250	536	20	66
Tiamulina	0.998	3.2-2382	448878	18837	1	3

EXPERIMENTAL

Trimetoprima	0.997	4-2970	534118	15608	1.1	3
Florfenicol	0.997	499-2994	204493	409	277	924
Fenbendazol	0.999	98-2940	-11599	1406	17	56
Metilparabeno	0.968	500-3000	5813.6	237	128	427
Carbamezapina	0.991	10-3000	-114926	13850	2	8
Propanolol	0.990	100-2000	-57122	2716	21	69
Sulfapiridina	0.993	218.5-3300	80006	711	87	291
Ofloxacin	0.999	661.5-3960	304689	1384	130	432
Ácido nalidixico	0.991	122.5-3675	113202	1614	62	208
Claritromicina	0.996	3.9-2940	-39037	10821	1	3
Eritromicina	0.964	200-2940	10357	99	103	345
Levofloxacin	0.986	19.6-2940	207433	2157.2	5	16
Atorvastatina	0.990	200-3000	-14898	193	34	102
Cafeína	0.990	3.9-2940	127985	991	29	98
Atrazina	0.995	20-3000	77972	5161	7	23
DEET	0.995	9.8-2940	-90634	9169	3.1	9.5
Crotamitón	0.994	9.8-2940	-29363	1985.5	6	20
Etilparabeno	0.985	200-3000	4351.2	35.1	64	198
Ácido salicílico	0.055	4-3000	373415	-43.5	0	1
Gemfibrozil	0.993	980-2940	-5043.3	32.9	242	826

A pH 6 se han detectado 27 compuestos. Sus límites de detección varían entre 1 y 277 ng/L siendo el límite de detección medio de 79 ng/L.

- **pH 8**

Tabla 11. Parámetros de validación obtenidos mediante el calibrado matriz-patrón a pH 8.

Compuesto	R ²	Rango lineal (ng/L)	Ordenada	Pendiente	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
Danofloxacin	0.934	196-2940	244888	79	123	408
Sulfatiazol	0.983	196-2940	139735	718	48	159
Sulfametoxazol	0.997	490-1960	42650	241	152	480
Tilosina	0.993	85-850	685	265	29	81
Tiamulina	0.996	3.2-1588	690972	25345	0.9	3
Trimetoprima	0.994	4-1980	754217	12876	1	4
Florfenicol	0.896	20-1996	312050	379	125	450
Fenbendazol	0.998	98-2940	126792	1340	11	36
Metilparabeno	0.994	100-3000	51118	217	43	91
Carbamezapina	0.996	4-2000	493424	13926	2	7
Propanolol	0.994	88-1760	130349	2521	18	59
Sulfapiridina	0.995	110-3300	125503	722	35	100
Ofloxacin	0.938	1320-3960	772800	113	140	468
Ácido nalidixico	0.890	610-3660	95168	217	206	685
Claritromicina	0.998	3.9-2940	412249	11923	1.2	4
Eritromicina	0.943	196-1960	33396	195	64	213
Levofloxacin	0.796	490-2940	360814	435	87	289
Atorvastatina	0.932	200-3000	24016	31	100	333

EXPERIMENTAL

Atrazina	0.999	10-2000	464854	7708	1	9
DEET	0.994	4-1960	5475	12113	1	4
Crotamitón	0.997	9.8-2940	137244	2310	3	11
Etilparabeno	0.995	200-3000	13821	36	136	455
Propilparabeno	0.871	500-3000	3959	14	175	582
Triclosan	0.886	20-3000	0	3800	4	13
Gemfibrozil	0.891	980-2940	16627	22	403	1342

A pH 8 se han detectado 25 compuestos. Sus límites de detección varían entre 1 y 403 ng/L, y el límite de detección medio es 88 ng/L.

4.2.3 Comparación de pendientes.

La matriz provoca un efecto denominado supresión de iones en la ionización por electrospray, cuanto mayor sea este efecto la señal disminuirá y la pendiente será menor, por lo tanto, cuanto menor sea la pendiente mayor es la influencia de la matriz. La matriz también puede afectar a la eficacia de la extracción en fase sólida. Por ello se va a proceder a la comparación de pendientes permitiendo estudiar la influencia de la matriz en la cuantificación de los analitos.

Tabla 12. Comparación de pendientes. Nivel de significación $p=0.05$

Compuesto	Pendiente pH 6	Pendiente pH 8	Homogeneidad de varianzas	t calculado	t crítico	Diferencia significativa
Danofloxacina	1136	79	Sí	14.4	12.4	Sí
Sulfatiazol	1170	718	Sí	6.6	2.3	Sí
Sulfametoxazol	1098	-106	Sí	5.6	2.8	Sí
Tilosina	536	265	Sí	6.7	2.5	Sí
Tiamulina	18837	25345	Sí	8.7	2.2	Sí
Trimetoprima	14608	12876	Sí	3.2	2.2	Sí
Florfenicol	409	379	Sí	0.3	3.2	No
Fenbendazol	1406	1340	Sí	1.9	2.3	No
Metilparabeno	237	217	Sí	0.8	2.5	No
Carbamezapina	13850	13926	Sí	0.1	2.4	No
Propanolol	2716	2521	Sí	1.0	2.4	No
Sulfapiridina	711	722	Sí	0.3	2.4	No
Ofloxacina	1384	113	Sí	35.9	32	Sí
Ácido nalidixico	1614	217	Sí	12.7	2.4	Sí
Claritromicina	10821	11923	Sí	3.6	2.4	Sí
Eritromicina	99	195	Sí	3.2	2.6	Sí
Levofloxacina	2157	435	Sí	8.6	2.4	Sí
Atorvastatina	193	31	Sí	13.5	2.4	Sí
Atrazina	5161	7708	Sí	13.4	2.6	Sí
DEET	9169	12113	Sí	6.1	2.2	Sí
Crotamiton	1986	2310	Sí	4.4	2.2	Sí
Etilparabeno	35	36	Sí	0.8	6.7	No

Gemfibrozil	32.9	22.4	Sí	1.3	4.3	No
--------------------	------	------	----	-----	-----	----

Se han detectado 23 compuestos a ambos pHs. Después de una prueba t de comparación de pendientes, se comprueba que existen diferencias significativas ($p=0.05$) en el valor de las pendientes para 15 compuestos. De estos 15 compuestos la pendiente del calibrado es superior a pH 6 para 9 compuestos mientras que para los otros 6 compuestos la pendiente del calibrado matriz patrón es mayor a pH 8.

4.2.4 Influencia de la matriz y recuperación absoluta:

Para el estudio de la influencia de la matriz y las recuperaciones absolutas se analizaron 6 muestras de hidrolizado dopadas con 2000 ng/L, todas las muestras fueron sometidas al proceso de análisis descrito a pH 6 y utilizado en este trabajo, sin embargo, tres de las seis muestras de hidrolizado algal no fueron dopadas al principio del análisis sino que fueron dopadas a posteriori en la redisolución previa a su análisis por UHPLC-MS/MS de manera que la concentración en el extracto fuera 100 $\mu\text{g/L}$, concentración que se obtendría en el supuesto de una recuperación del 100%. De esta forma, junto con la inyección de un patrón de la concentración esperada, 100 $\mu\text{g/L}$, se podrá determinar la diferencia de señal debido a la influencia de la matriz en la SPE, en la ESI, la recuperación absoluta de hidrolizado y la diferencia de señal debido a la SPE y la ESI.

Se muestra en la siguiente tabla 13 los experimentos realizados.

Tabla 13. Experimentos realizados para el estudio de la influencia de matriz y las recuperaciones absolutas.

Tipo de muestra	Hidrolizado	Hidrolizado	Patrón de 100 $\mu\text{g/L}$
Cantidad	50ml	50ml	1ml
Tratamiento	Dopado en la redisolución	Dopado antes de análisis	Sin tratamiento de muestra

Inicialmente se determina el promedio de las áreas de los picos y la desviación estándar relativa en porcentaje, %RSD. Se adjuntan los resultados obtenidos en la tabla 14. El porcentaje de RSD permite describir la repetitividad del procedimiento.

Tabla 14. Áreas de pico y repetitividad obtenida en los experimentos, n=3

Analito	Extractos hidrolizados dopados en la redisolución		Extractos hidrolizados	
	Media	%RSD	Media	%RSD
Penicilina	834733	6	132533	6
Oxitetraciclina	4863000	3	77313	10
Doxiciclina	32030000	3	1295000	21
Tetraciclina	1362333	4	0	-
Marbofloxacina	35866667	3	1250000	14
Enrofloxacina	138533333	12	17063333	4
Danofloxacina	169833333	10	12166667	13
Sulfadiacina	1699000	17	78267	25
Sulfatiazol	8932667	8	1467933	25
Sulfametizol	38200000	14	1564333	25
Sulfadimidina	59856667	4	7304000	9
Sulfametoxazol	62550000	5	9613333	10
Tilosina	7138333	8	1327333	4
Tiamulina	65370000	3	48723333	8
Apramicina	18980000	25	818067	7
Trimetoprima	4220233	10	8090667	24
Florfenicol	1128000	11	94033	23
Fenbendazol	2269333	10	1661667	4
Dexametasona	134383	10	105940	29
Progesterona	396467	17	229400	8
Metilparabeno	771200	9	179733	9

EXPERIMENTAL

Acetaminofeno	6672667	10	2990333	10
Carbamezapina	20340000	15	11683333	4
Propanolol	57093333	5	17283333	12
Sulfapiridina	23573333	26	4089333	20
Metronidazol	12840000	30	34033	17
Ofloxacina	1654533	22	959800	16
Ácido nalidixico	14996667	5	2594000	3
Naproxeno	325333	10	278997	22
Claritromicina	30480000	4	20510000	10
Eritromicina	529167	9	294167	13
Ácido acetilsalicílico	6826500	17	6458200	17
Clofibrato	300603	7	504800	13
Levofloxacina	7936000	6	363000	12
Norfloxacina	13209967	8	839733	2
Benzoquinona	287733	7	446100	14
Atorvastatina	2501667	6	452800	17
Atenolol	7918667	14	11333	14
Cafeína	17680000	35	988600	25
Atracina	7848667	24	5388667	9
Iohexol	15020	17	0	-
DEET	16353333	13	9548000	13
Ciprofloxacina	66616667	6	3192667	8
B-Estradiol	9486667	2	8683000	6
Etinilestradiol	894100	21	1338600	12
Crotamiton	846867	12	1116533	7

Estrona	399133	10	141870	29
Etilparabeno	130200	16	116540	15
Diclofenaco	227400	12	166133	13
Ibuprofeno	94513	5	81797	11
Ácido salicílico	87400000	2	1643333	13
Ácido clofíbrico	229833	13	10980	14
Bisfenol A 50pp	2064000	12	2106100	8
Triclosan	20086667	19	21050000	10
Octilfenol	72697	8	53567	11
Nonilfenol	69323	7	61463	29
Ácido hidroxibenzoico	119800000	5	2071667	16
Gemfibrozil	163733	16	86233	24

Resulta coherente obtener las áreas mayores en las muestras dopadas en la redisolución que las que han sufrido todo el proceso. La repetitividad del análisis es generalmente inferior al 20% (n=3).

En la Tabla 15 se muestra la disminución de la señal debida a la SPE comparando las áreas obtenidas de los extractos normales con aquellas obtenidas al dopar en la redisolución de los extractos. Se calcula el porcentaje de disminución de la señal como:

$$\frac{\Delta \text{área}}{\text{área redisueltos}} \times 100$$

La disminución de señal debido a la supresión de iones en ESI se calcula mediante la comparación de áreas entre los extractos de hidrolizados dopados en la etapa de redisolución del extracto y el área de los patrones de 100 µg/L.

EXPERIMENTAL

La recuperación absoluta obtenida en el análisis de hidrolizados se calcula mediante la comparación del área entre los extractos de hidrolizados dopados al principio y el área media del patrón de 100 µg/L, calculando su porcentaje como

$$\frac{\Delta \text{área}}{\text{área patrón}} \times 100$$

Tabla 15. Recuperaciones absolutas y disminución de la señal debido a la influencia de la matriz

Analito	Disminución de la señal, SPE (%)	Disminución de la señal, ESI (%)	Recuperación absoluta, (%)
Penicilina	-84	53	76
Oxitetraciclina	-98	2646	56
Doxiciclina	-96	164	89
Tetraciclina	--	1123	--
Marbofloxacina	-97	54	95
Enrofloxacina	-88	8	87
Danofloxacina	-93	-9	94
Sulfadiacina	-95	-92	100
Sulfatiazol	-84	-83	97
Sulfametizol	-96	-45	98
Sulfadimidina	-88	-22	90
Sulfametoxazol	-85	59	76
Tilosina	-81	466	5
Tiamulina	-25	-47	60
Apramicina	-96	30	94
Trimetoprima	92	-92	86
Florfenicol	-92	-67	97

EXPERIMENTAL

Fenbendazol	-27	-100	100
Dexametasona	-21	-98	98
Progesterona	-42	-99	100
Metilparabeno	-77	-66	92
Acetaminofeno	-55	-90	96
Carbamezapina	-43	-90	94
Propanolol	-70	-39	82
Sulfapiridina	-83	-60	93
Metronidazol	-100	-51	100
Ofloxacina	-42	-98	99
Ácido nalidixico	-83	-92	99
Naproxeno	-14	-100	100
Claritromicina	-33	169	81
Eritromicina	-44	-67	82
Levofloxacina	-95	-93	100
Norfloxacina	-94	-31	96
Benzoquinona	55	-50	22
Atorvastatina	-82	-97	99
Atenolol	-100	-80	100
Cafeína	-94	5	94
Atracina	-31	-97	98
Iohexol	--	-100	--
DEET	-42	-95	97
Ciprofloxacina	-95	-53	98
Crotamiton	32	-99	99
Estrona	-64	-89	96

Etilparabeno	-10	-100	100
Propilparabeno	3	-100	100
Diclofenaco	-27	-97	98
Ibuprofeno	-13	-83	85
Ácido salicílico	-98	262	93
Ácido clofíbrico	-95	-99	100
Bisfenol A	--	44	--
Bisfenol A 50pp	2	-511	50
Octilfenol	-26	-92	94
Nonilfenol	-11	-97	97
Ácido hidroxibenzoico	-98	341	92
Gemfibrozil	-47	-99	100

--: sin datos.

Se observa que la etapa de preparación de muestra que consiste en una extracción en fase sólida disminuye la señal, en ocasiones en porcentajes muy elevados del orden del 90%. La influencia de la matriz en la señal del espectrómetro de masas consiste generalmente en disminuir la señal (porcentajes negativos en la Tabla 15), sin embargo, se observa que para algunos compuestos se produce un aumento de la señal (porcentaje positivo) en cuyo caso la presencia de la matriz favorece la generación de iones en la interfase electrospray.

Las recuperaciones absolutas de las drogas que tienen en cuenta de forma global los fenómenos anteriores (preparación de muestra y respuesta en el espectrómetro de masas) varían entre el 30 y el 99%, siendo generalmente inferiores al 20%.

5. Conclusiones

- Se han determinado 27 compuestos en hidrolizados líquidos de biomasa algal con elevados contenidos en proteínas mediante extracción en fase sólida y posterior determinación mediante cromatografía de líquidos con detección espectrométrica de masas.
- Según un diseño de experimentos, la presencia de AEDT o no, y el volumen de elución de los cartuchos de extracción Oasis HLB, 4 ó 6 mL, no son parámetros de operación relevantes.
- La elución de los cartuchos de extracción con acetonitrilo en lugar de metanol, y el ajuste del pH de la muestra a 8 en lugar de trabajar al pH natural de los extractos (pH=6) son preferibles para aumentar las respuestas analíticas.
- Los compuestos que se detectan a pH 6 y pH 8 son diferentes. Los límites de detección varían entre 1 y 403 ng/L.
- Los intervalos de linealidad de los calibrados matriz-patrón abarcan en general concentraciones desde 100 ng/L, o inferiores, hasta 2500-3000 ng/L. La repetitividad del análisis expresada como RDS% es habitualmente inferior al 20% (n=3).
- 23 compuestos se han detectado simultáneamente a pH 6 y pH 8. Para 15 de ellos la pendiente del calibrado era significativamente diferente según el pH de trabajo.
- El insecticida DEET es el único contaminante emergente detectado y cuantificado en los hidrolizados.

6. Bibliografía:

1. https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/informeporcino2016_tcm30-437410.pdf
2. https://www.3tres3.com/articulos/biogas-los-purines-tambien-dan-dinero-1-2_39768/
3. <https://biovec.net/plantas%20de%20biogas/planta-de-biogas-galivi-solar/> (Imagen)
4. <https://www.cyclucid.com/referencias/agroalimentaria/purines-de-cerdo-y-vacuno/>
5. https://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote_Nitrosamine-impurities/es/#:~:text=Las%20nitrosaminas%2C%20o%2C%20m%C3%A1s%20correctamente,cancer%C3%ADgenas%20para%20el%20ser%20humano
6. R. López-Serna, E. Posadas, P. A. García-Encina, y R. Muñoz, *Sci. Total Environ.*, **2019**, 662, 32–40.
7. L.J.M. Jansen, *Chemosphere*, M. G. M. van de Schans, D. de Boer, I. E. A. Bongers, H. Schmitt, P. Hoeksma y B. J. A. berendsen, *Chemosphere*, **2019**, 224, 544-553.
8. M. Wohde, S. Berkner, T. Junker, S Konradi, L. Schwarz y R. A. Düring, *Environ Sci Eur*, **2016**, 28:23.
9. AHFS, **2010**, *Drug information*. Editorial Staff. ; M. Papich, **2016**, *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. 4a edn. Saunders.
10. European Medicines Agency, **2007**, committee for medicinal products for veterinary use (cvmp) public statement on the use of (fluoro)quinolones in food-producing animals in the european union: development of resistance and impact on human and animal health draft reflection paper agreed by; C. Fookes, **2018**, <https://www.drugs.com/drug-class/quinolones.html>; B. Kocsis, J. Domokos, D. Szabo, **2016**, *Ann Clin Microbiol Antimicro*, 15, 34.
11. National center for biotechnology information, **2005**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfathiazole>; K. N. Woodward, in *Ency. Food Sci. Nut.*, **2003**, 249–254.
12. G. Nahler, *Dic. Pharm. Med.*, **2009**, 44, 32–32.
13. AHFS, **2010**, *Drug information*. Editorial Staff. ; M. Papich, **2016**, *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. 4a edn. Saunders.
14. AHFS, **2010**, *Drug information*. Editorial Staff. ; M. Papich, **2016**, *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. 4a edn. Saunders.

15. AHFS, **2010**, *Drug information*. Editorial Staff. ; M. Papich, **2016**, *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. 4a edn. Saunders.
16. AHFS, **2010**, *Drug information*. Editorial Staff. ; M. Papich, **2016**, *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. 4a edn. Saunders.
17. L. Laurens, T. Dempster, H. Jones, E. Wolfrum, S. Van Wychen, J. S. P. McAllister, M. Rencenberger, K. J. Parchert, y L. Gloe, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 1897-1887.
18. A. García-Valcárcel y J. L. Tadeo, *J. Sep. Sci.*, **2013**, *36(15)*, 2507–2513.
19. X. Hu, Y. Luo y Q. Zhou, *Chromatographia*, **2010**, *71(3–4)*, 217–223.
20. L.J.M. Jansen, Chemosphere, M. G. M. van de Schans, D. de Boer, I. E. A. Bongers, H. Schmitt, P. Hoeksma y B. J. A. berendsen, *Chemosphere*, **2019**, *224*, 544-553.
21. D. Skoog, D. West, F. Holler y S. Crouch, *Fundamental of analytial chemistry*. 8th edn., **2005**, Thomson Learning. ; D. Skoog, F. Holler y S. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. 6a., **2007**, Cenage Learning.; *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, **2006**, John Wiley & Sons, Ltd.
22. T. Chiong, C. Acquah, S.Y. Lau, E.H. Khor, M.K. Danquah, *Protein Byprod*, **2016**, *capitulo 12*, 213-234.
23. M. Bhattacharya , S. Goswami, *Biocatal Agric Biotechnol*, **2020**, *25*, 101580.
24. V. Dolganyuk, D. Belova, O. Babich, A. Prosekov, S. Ivanova, D. Katserov, N. Patyukov y S. Sukhikh, *Biomolecules*, **2020**, *10*, 1153.