



# **EVALUACIÓN DE SORBENTES DE MODO MIXTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS EN MUESTRAS DE AGUAS MEDIOAMBIENTALES**

MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS APLICADAS  
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CURSO ACADÉMICO 2023-2024

**JULIMAR BALLADARES PINEDA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

TUTORIZADO POR:  
ROSA MARIA MARCÉ  
NÚRIA FONTANALS

TARRAGONA, 27 DE JUNIO DE 2024

## ÍNDICE

1. Introducción .....	1
1.1 Contexto medioambiental .....	1
1.2 Compuestos farmacéuticos.....	3
1.3 Técnicas para la determinación de fármacos en aguas.....	7
2. Objetivos .....	11
3. Reactivos, materiales e instrumentación.....	11
3.1 Reactivos y materiales.....	11
3.2 Muestras y conservación.....	12
3.3 Instrumentos .....	12
3.4 Extracción en fase sólida.....	13
4. Parte experimental y resultados .....	15
4.1 Optimización y validación del método cromatográfico .....	15
4.2 Optimización del SPE .....	15
4.2.1 pH de la muestra .....	16
4.2.2 Condiciones de elución.....	17
4.2.3 Volumen de muestra.....	18
4.2.4 Condiciones de lavado.....	19
4.3 Sorbente HXLPP-WAX/WCX.....	19
4.4 Análisis de muestras medioambientales.....	22
5. Conclusiones .....	23
6. Referencias.....	24

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer a las personas más importantes en mi vida que son mi papá, mi mamá y mi hermano que aun que están lejos de mí en estos momentos han sido un pilar fundamental de apoyo y cariño durante todo este proceso. Agradecer sin duda a mis tutoras la Dra. Rosa Maria Marcé y la Dra. Núria Fontanals por su guía y sus enseñanzas, así como a la Universitat Rovira i Virgili por abrirme las puertas de su institución y permitirme aprender cada día más junto a mis compañeros del grupo de investigación CROMA.

## **1. Introducción**

### **1.1 Contexto medioambiental**

En la sociedad actual los avances médicos y el desarrollo de nuevos y mejorados medicamentos juegan un papel indispensable que contribuye a mejorar la calidad de vida de las personas y a combatir innumerables patologías. La demanda cada vez mayor de productos farmacéuticos ha hecho que la oferta disponible en el mercado sea muy amplia y la mayoría de veces de fácil acceso. Pero esto no solo ha traído beneficios, puesto que tanto el uso en ascenso como el uso inadecuado de los fármacos genera consecuencias invisibles a simple vista pero muy graves a efectos medioambientales y sanitarios [1-3].

Para comprender cómo el consumo de medicamentos puede representar un riesgo para los ecosistemas y para los propios seres humanos es necesario saber que parte de los medicamentos que consumimos se excretan del cuerpo a través de la orina o heces, muchos de ellos prácticamente sin sufrir degradación o cambios en su estructura, y otros en forma de metabolitos activos que mantienen sus propiedades farmacológicas [1].

De esta manera llegan a las aguas residuales del sistema de alcantarillado que posteriormente serán tratadas en las plantas depuradoras de aguas. A pesar de la utilización de procesos de tratamiento físicos, químicos y/o biológicos del agua las técnicas actuales no son capaces de remover por completo los residuos de productos farmacéuticos, es así que pequeñas cantidades de estos fármacos a niveles de trazas llegan a las aguas medioambientales y permanecen un tiempo determinado en función de sus características físico-químicas y factores ambientales. Los compuestos más hidrofílicos tienen mayor persistencia que los lipofílicos debido a su afinidad por el agua, además factores como la temperatura y pH del agua y la radiación solar que reciban influye en el proceso de degradación de los metabolitos activos causando que permanezcan más o menos tiempo en el medioambiente [1, 2].

La lista de los efectos negativos es larga, por ejemplo, se ha demostrado que su presencia en ecosistemas acuáticos puede causar toxicidad por acumulación en diversas especies marinas y de agua dulce, así mismo, en aguas residuales pequeñas concentraciones de antibióticos favorecen el desarrollo de bacterias con resistencia a los antibióticos y la transferencia de genes resistentes a antibióticos, sin mencionar que muchos de ellos son disruptores endocrinos [1].

Si bien los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas son las principales fuentes de contaminación de las aguas medioambientales, no son las únicas. El sector ganadero es un importante contaminante que expulsa a los ríos y lagos desechos de medicamentos veterinarios, además los residuos de los vertederos también pueden llegar a contaminar aguas superficiales y subterráneas cercanas [1, 3].

La presencia de medicamentos en el medioambiente está estrechamente ligada a las tendencias de consumo de cada región en particular. En España, para el año 2022 el V estudio de Salud y Estilo de Vida de Aegon mostró que los analgésicos y los antiinflamatorios no esteroideos (del inglés NSAIDs) son los grupos de mayor consumo y así mismo lo ratifica el informe anual del sistema nacional de salud del 2023 [4, 5].

Debido al auge que ha tenido en la comunidad científica la problemática de la contaminación ambiental provocada por fármacos se ha evidenciado extensamente sobre los riesgos de su presencia en el medioambiente acuático y en consecuencia se los ha catalogado bajo el término de contaminantes de interés emergentes [2] y aunque no existe una normativa que defina límites máximos de su concentración en aguas, sin duda tanto organizaciones a nivel europeo como nacional han puesto su atención en dicha problemática, de manera que la Comisión Europea ha incluido a varios compuestos farmacéuticos en la lista de vigilancia de la Directiva Marco del Agua [6], bajo la cual todos los países miembros (incluido España) se comprometen a monitorizar la presencia de dichos compuestos en aguas superficiales con el objetivo de determinar si se deben o no incluir en la lista de Sustancias Prioritarias de la Comisión Europea.

Actualmente, en la lista de vigilancia constan fármacos como el propranolol, trimetoprim y venlafaxina [7]. Así mismo, el Real decreto 3/2023 [8] por el que se establecen los criterios de calidad de las aguas de consumo en España, agregó a la lista de observación el diclofenaco, nonilfenol, azitromicina y el 17  $\beta$ -Estradiol debido a la creciente preocupación de sus riesgos para la salud pública. En cuanto al control de las aguas residuales, se prevé que para este año 2024 se publique la nueva Directiva de aguas residuales de la Comisión Europea que promete ser más exigente en cuanto a la eliminación de contaminantes provenientes de los productos farmacéuticos y hará un seguimiento exhaustivo sobre la resistencia a antibióticos [9].

## 1.2 Compuestos farmacéuticos

Como ya se mencionó anteriormente, existe una extensa evidencia científica que demuestra la presencia de fármacos en aguas de diferentes orígenes en todo el mundo, así como una variedad de familias farmacológicas encontradas que van desde los más comunes como los analgésicos hasta opioides o sedantes.

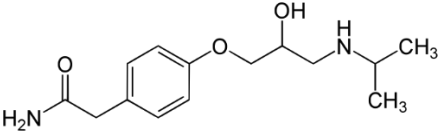
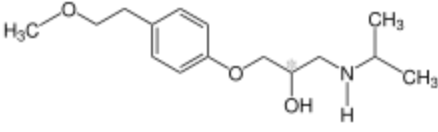
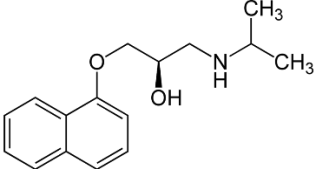
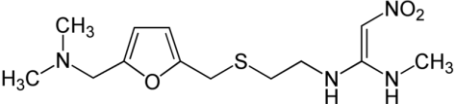
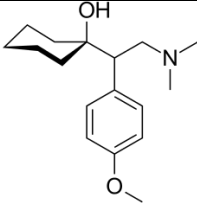
A nivel europeo, Fekadu et al. [1] en una revisión menciona que los diez fármacos detectados más frecuentemente en las aguas superficiales son el trimetoprim, sulfametoxazol, diclofenaco, venlafaxina, naproxeno, paracetamol, ibuprofeno, ketoprofeno, carbamacepina y la claritromicina, además destaca que en España el valsartán es el medicamento que se encuentra en el puesto número 1 de concentraciones máximas.

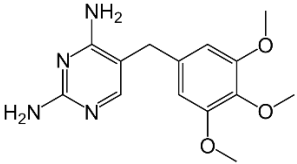
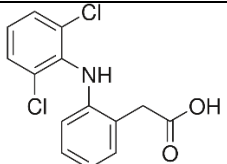
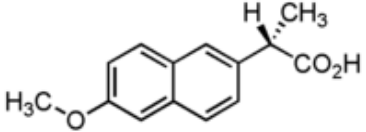
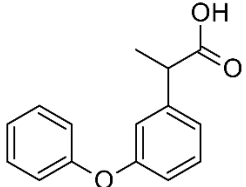
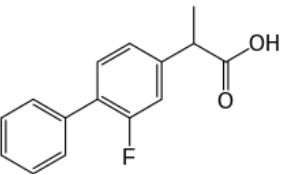
Más cerca, en la zona de Cataluña se realizó un monitoreo de 37 compuestos farmacéuticos en las aguas residuales de entrada provenientes de dos plantas de tratamiento de aguas situadas en Barcelona y Girona, confirmando la presencia de todos los compuestos objetivo pertenecientes a diversas familias farmacológicas entre ellas los NSAIDs, diuréticos, antibióticos, antihipertensivos, opioides, antidepresivos, sedantes, beta bloqueantes, hipolipemiantes y antagonistas H<sub>2</sub>. De todos ellos, el valsartán, naproxeno, ibuprofeno y acetaminofén se encontraron en las concentraciones más altas (7-209 ug/L) [10].

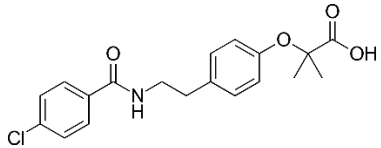
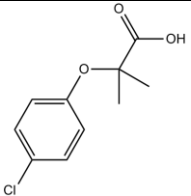
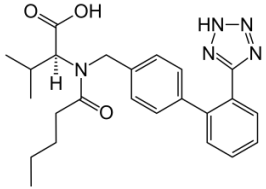
En adición a esto, en España diversas investigaciones [11-15] aseveran que los NSAIDs y los reguladores de lípidos son los compuestos más detectados debido a que tiene una alta demanda de consumo entre la población, el primer grupo por ser la primera elección para calmar el dolor y la inflamación, y el segundo por sus propiedades terapéuticas que ayudan a reducir los niveles de colesterol y triglicéridos.

En base a estos estudios se han seleccionado siete familias farmacológicas de interés y uno o varios compuestos pertenecientes a cada familia para realizar el estudio sobre la determinación de fármacos en aguas medioambientales, en la Tabla 1 se clasifican a los compuestos en básicos o ácidos en función de sus características y se muestra la información relativa a sus propiedades químicas y su familia.

**Tabla 1. Fármacos determinados agrupados por familia farmacológica**

Compuestos básicos					
Fármacos	Familia farmacológica	Código ATC	Número CAS	pK <sub>a</sub>	Estructura química
<b>Atenolol</b> (ATE)	Betabloqueantes	C07AB03	29122-68-7	9.6	
<b>Metoprolol</b> (MTO)	Betabloqueantes	C07AB02	37350-58-6	9.7	
<b>Propranolol</b> (PRO)	Betabloqueantes	C07AA05	525-66-6	9.4	
<b>Ranitidina</b> (RAN)	Antagonista H2	A02BA02	66357-59-3	8.2	
<b>Venlafaxina</b> (VEN)	Antidepresivo	N06AX16	93413-69-5	10.1	

<b>Trimetoprim (TRI)</b>	Antibiótico	J01EA01	738-70-5	7.1	
<b>Compuestos ácidos</b>					
<b>Diclofenaco (DICLO)</b>	NSAIDs	M02AA15	15307-86-5	4.1	
<b>Naproxeno (NPX)</b>	NSAIDs	M01AE02	22204-53-1	4.1	
<b>Fenoprofeno (FEN)</b>	NSAIDs	M01AE05	31879-05-7	4.5	
<b>Flurbiprofeno (FLB)</b>	NSAIDs	R02AX01	5104-49-4	4.4	

<b>Bezafibrato (BEZ)</b>	Reguladores de lípidos	C10AB02	41859-67-0	3.8	
<b>Ácido clofibrático* (CLO)</b>	Reguladores de lípidos	C10AB01	882-09-7	3.2	
<b>Valsartán (VAL)</b>	Antihipertensivos	C09CA03	137862-53-4	3.6	

*El número CAS de cada fármaco se obtuvo de la página PubChem. El valor de  $pK_a$  de cada fármaco se obtuvo de la página PubChem, excepto para el CLO, BEZ y FLB que fueron obtenidos de Drugbank. El código ATC de todos los fármacos se obtuvieron de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. \*Es un metabolito del clofibrato.*

### **1.3 Técnicas para la determinación de fármacos en aguas**

En los últimos años los métodos analíticos desarrollados para la determinación de fármacos en matrices acuosas se han basado principalmente en la cromatografía de líquidos (LC) o de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) pues al tratarse de analitos que se encuentran a concentraciones muy bajas la espectrometría de masas o masas en tándem aportan la selectividad y sensibilidad pertinentes para su cuantificación. Sin embargo, la LC se ha abierto paso por sus ventajas frente al GC ya que para determinar fármacos por GC es imprescindible un paso previo de derivatización por lo general con reacciones de sililación, lo que supone un procedimiento largo, laborioso y costoso, además al analizar este tipo de muestras por GC que utiliza altas temperaturas los analitos termolábiles se degradan así como tampoco es una técnica adecuada para aquellos fármacos que no son volátiles [16-18].

En consecuencia, debido a que los fármacos presentes en matrices acuosas son compuestos polares su análisis por LC ha mejorado progresivamente, utilizando detectores como el ultravioleta-visible (UV) [19-21] o de fluorescencia (FLR) [19] aprovechando las propiedades químicas de cada familia farmacológica, y a MS o MS/MS con resultados excelentes [22-25]. Se han logrado separaciones más rápidas con cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) pero la LC convencional sigue siendo una opción muy adecuada y más asequible [16].

Aunque la selección adecuada del método cromatográfico juega un papel fundamental para lograr la determinación de estos compuestos, también es necesario un proceso de tratamiento de muestra que permita eliminar interferentes y concentrar los analitos de matrices complejas como los son las muestras medioambientales, pues suelen contener muchos otros componentes orgánicos que dificultan su identificación y cuantificación.




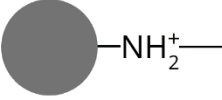
Para este fin varias técnicas de tratamiento de muestras han sido empleadas, técnicas convencionales como la extracción líquido-líquido (LLE) aún son usadas pero con menor frecuencia, debido a que son menos selectivas al momento de extraer varios grupos de compuestos, conlleva un alto consumo de disolventes orgánicos que en ocasiones pueden ser tóxicos y además suelen necesitar un paso posterior de limpieza y concentración para lograr límites de detección y cuantificación más bajos [26].

Aun así, se reporta la aplicación de LLE para la extracción de fármacos seleccionados en muestras de aguas medioambientales [27]. Por otro lado, técnicas más actuales que buscan disminuir al máximo posible el uso de disolventes orgánicos han incursionado en el campo de la determinación de fármacos en aguas, entre ellas se encuentran las técnicas de microextracción con sus diferentes variantes: microextracción líquido-líquido, microextracción por membrana y microextracción dispersiva líquido-líquido, microextracción en una sola gota [26]. En un estudio realizado por Kannouma se utilizó la microextracción líquido-líquido para extraer antivirales de muestras de agua medioambiental, usando una mezcla de solventes [28]. Todas estas técnicas mejoran notablemente la preconcentración de los compuestos objetivo sin necesidad de evaporar el disolvente.

La extracción en fase sólida (SPE) es la más usada con diferencia porque permite extraer, limpiar y preconcentrar en una sola técnica, pero la verdadera ventaja que ofrece esta técnica es la gran variedad de sorbentes disponibles para rangos más amplios o concretos de compuestos. La SPE ha sido aplicada con éxito en múltiples estudios medioambientales ya sea on-line u off-line [18]. Una variante de la SPE es la microextracción en fase sólida que también se ha aplicado por Wang et al. [29] para la determinación de fármacos reguladores de lípidos y antihipertensivos en aguas de mar y río, en esta ocasión con una fibra polimérica. En la misma línea, la extracción por sorción en barra de agitación (SBSE) con diferentes tipos de recubrimientos se ha reportado para la determinación de 6 fármacos ácidos en aguas ambientales [31, 31].

Actualmente, los sorbentes a base de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) se usan con gran frecuencia para la extracción de analitos polares como los que se pueden encontrar en las muestras acuosas, ya que por lo general han demostrado tener un mejor rendimiento en comparación con los sorbentes a base de sílica (como los C18). En el mercado actual hay muchas opciones de sorbentes poliméricos (PS-DVB) que se diferencian en características, por mencionar algunas, como la porosidad o el área superficial [32]. Entre sus múltiples aplicaciones se han usado sorbentes de PS-DVB para la extracción de drogas ilegales [33], fármacos beta-bloqueantes y beta-agonistas [34] de aguas medioambientales.

En este ámbito, dos tipos de sorbentes destacan como los más utilizados, los de fase reversa con balance hidrofílico y lipofílico (como el Oasis HLB y Strata-X) capaces de retener una amplia gama de moléculas tanto polares como apolares, y los sorbentes iónicos de modo mixto que poseen un sitio activo con intercambio catiónico o aniónico que permiten una mayor selectividad para compuestos que son ionizables [18, 35]. Según el grupo de intercambio iónico que poseen se clasifican en catiónico fuerte (SCX), catiónico débil (WCX) aniónico fuerte (SAX) o aniónico débil (WAX) [35] (Figura 1).

<b>SCX</b> 	<b>WCX</b> 
<b>SAX</b> 	<b>WAX</b> 

**Figura 1.** Tipos de sorbentes de intercambio iónico según su grupo funcional.

Algunos ejemplos de trabajos que utilizan sorbentes de balance hidrofílico y lipofílico incluyen un estudio de Tegegne et al. [36] donde identificaron y cuantificaron trimetoprim, albendazol y cafeína en muestras de agua de influente y efluente de plantas de tratamiento empleando extracción en fase sólida con un cartucho Oasis HLB seguido de HPLC-DAD. De igual modo, en Italia se determinaron más de 10 compuestos farmacéuticos, entre ellos fenoprofeno y ácido clofíbrico, en aguas residuales y aguas de río aplicando SPE con Strata-X seguido de HPLC-UV-FLR [19].

En cuanto a los sorbentes iónicos de modo mixto, también han tenido gran aplicabilidad por ejemplo en la extracción de fármacos sartanes de agua de río y agua de depuradora con

sorbentes WAX [25]. Así mismo, una revisión muestra que en varios estudios se han usado los cartuchos SCX para la determinación de drogas ilícitas y fármacos en matrices como acuosas como agua de río, agua superficial y aguas de depuradora [35].

Otro tipo de sorbentes para SPE, mucho menos usados por no ser comercializados, son los zwitteriónicos de modo mixto, que combinan en un solo cartucho interacciones de fase reversa, aniónicas y catiónicas. Su esqueleto suele ser polimérico o a base de sílica, este último permite, con relativa facilidad, introducir al sorbente una gran variedad de grupos funcionales debido a la reactividad de los grupos silanol [23, 37].

Hay diferentes combinaciones de grupos funcionales en los sorbentes zwitteriónicos, por ejemplo, en un estudio realizado por Moral et al. [38] sintetizó un sorbente a base de sílica funcionalizado con grupos de intercambio catiónico y aniónico fuerte para la extracción de fármacos en muestras de agua de río y aguas residuales de salida. En otro trabajo, Nadal et al. [39] sintetizaron dos sorbentes zwitteriónicos en una base polimérica, el primero de ellos con un grupo catiónico fuerte y aniónico débil y el segundo con un grupo catiónico débil y aniónico fuerte para la determinación de fármacos ácidos y básicos en muestras de agua medioambientales.

En otro ejemplo, se obtuvieron recuperaciones cercanas al 100% al emplear un sorbente zwitterionico de sílica modificada con grupos de intercambio catiónico y aniónico débil, los compuestos objetivo fueron un grupo de fármacos que incluyen el naproxeno y el alprenolol, que fueron extraídos de muestras de suero sanguíneo [40]. Los materiales zwitteriónicos han aparecido hace relativamente poco tiempo, pero han demostrado ser muy efectivos en matrices complejas cuando el protocolo de SPE se optimiza en cuanto a condiciones de pH, carga, lavado y elución para aprovechar al máximo su potencial.

En el presente estudio se optimizaron las condiciones de carga, lavado y elución de SPE de cuatro sorbentes comerciales de intercambio iónico (SAX, WAX, WCX, SCX) para la extracción de un grupo de fármacos ácidos y básicos de una matriz acuosa, en base a ello se propone un protocolo de SPE para un nuevo material zwitteriónico, previamente sintetizado “in-house” por el grupo de investigación CROMA de la Universitat Rovira i Virgili (URV), a

base de microesferas de polímero altamente entrecruzado funcionalizado con sarcosina que le otorgan propiedades de intercambio catiónico y aniónico débil.

## **2. Objetivos**

El objetivo general de este estudio es evaluar el potencial uso de sorbentes de modo mixto para la extracción de fármacos de muestras de aguas medioambientales y posteriormente ser determinados por cromatografía de líquidos y detector de diodos en fila. Los objetivos más específicos que se han planteado son optimizar las condiciones de un protocolo de SPE para cada uno de los sorbentes de intercambio iónico de modo mixto, así como evaluar un protocolo de SPE para el nuevo sorbente zwitteriónico HXLPP-WAX/WCX y aplicar el método a muestras de agua de efluente de depuradora y agua de río.

## **3. Reactivos, materiales e instrumentación**

### **3.1 Reactivos y materiales**

Para este estudio se seleccionaron 13 compuestos farmacéuticos, que incluyen 6 fármacos básicos, atenolol (ATE), ranitidina (RAN), trimetoprim (TRI), metoprolol (MET), venlafaxina (VEN) y propranolol (PRO), y además 7 fármacos ácidos, diclofenaco (DICLO), naproxeno (NPX), bezafibrato (BEZ), valsartán (VAL), fenoprofeno (FEN), flurbiprofeno (FLB) y ácido clofíbrico (CLO). Todas las soluciones patrón de los fármacos de estudio fueron adquiridas en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) cuya pureza es superior al 96%.

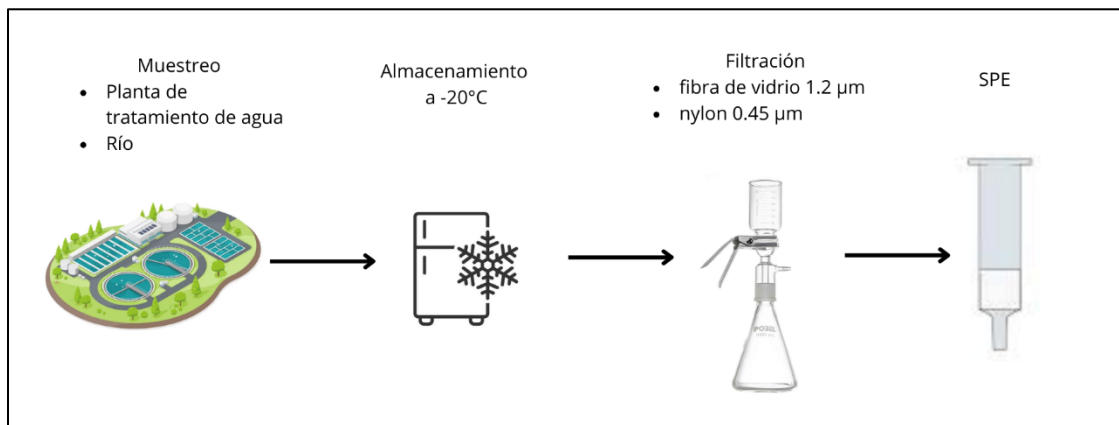
Acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) ambos de grado de pureza HPLC fueron comprados a Sigma Aldrich, los reactivos ácido acético (AcOH) y ácido fórmico (FA) de pureza  $\geq 99\%$  se adquirieron de J.T. Baker (Deventer, Países bajos). Por su parte, el ácido clorhídrico (HCl) fue comprado a Scharlab (Barcelona, España) y el hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) se obtuvo de Sigma Aldrich, mientras que el agua ultrapura se obtuvo usando un sistema Milli-Q (Veolia, San Cugat del Vallés, España).

Soluciones patrón individual de cada fármaco fueron preparadas en metanol (MeOH) a una concentración de 1000 mg/L y se almacenaron bajo congelación a  $-20^\circ\text{C}$ . A partir de estos patrones se prepararon soluciones de trabajo, una que contenía todos los compuestos ácidos y otra solo de compuestos básicos, menos concentradas a 100 mg/L diluidas en una mezcla de

MeOH y agua ultrapura (50/50 v/v) que fueron envasadas en frascos pequeños color ámbar y almacenados en refrigeración a 4°C.

### 3.2 Muestras y conservación

El procedimiento optimizado de SPE fue aplicado a muestras medioambientales de aguas residuales obtenidas de una planta de tratamiento de aguas residuales situada en Tarragona y agua proveniente del río Ebro. Las muestras se almacenaron en garrafas a -20°C hasta que fueron analizadas. Previamente al proceso de extracción se filtraron usando un filtro de membrana de fibra de vidrio de 1.2 µm provisto por Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA) y luego a través de un filtro de nylon de 0.45 µm adquirido en Thomas Scientific (Swendesboro, NJ, USA).



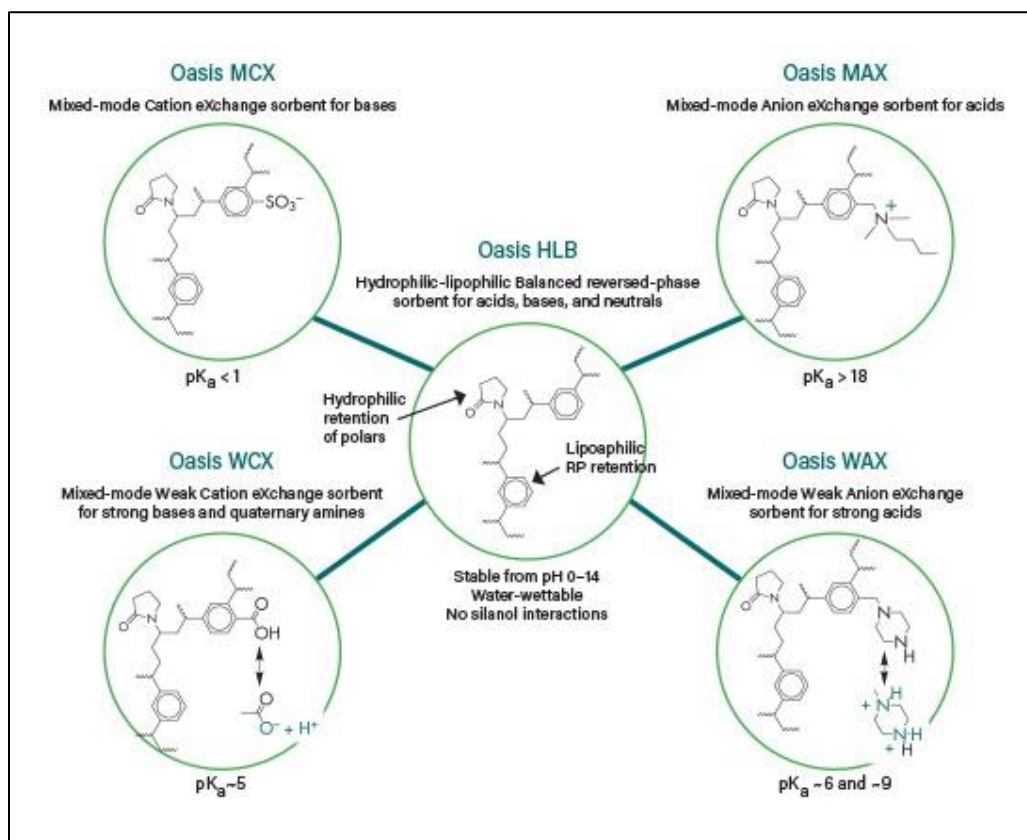
*Figura 2. Esquema del proceso de tratamiento de muestra*

### 3.3 Instrumentos

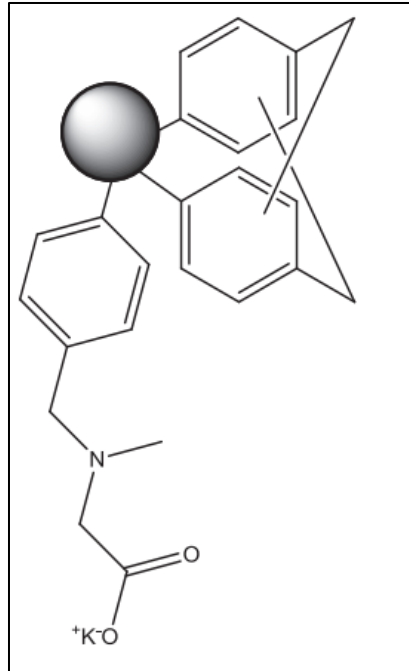
En cuanto al instrumento cromatográfico empleado, se usó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 UHPLC (Santa Clara, CA, USA). El equipo Agilent 1200 UHPLC está equipado con cinco módulos: un inyector automático, una bomba cuaternaria, un desgasificador, el compartimiento de la columna y el detector DAD. Para lograr la separación cromatográfica se usó una columna C18 Luna Omega (150 x 3.0 mm x 5 µm) de Phenomenex (Torrance, USA)

### 3.4 Extracción en fase sólida

Los cartuchos comerciales de extracción en fase sólida con sorbentes de intercambio iónico que se usaron en el estudio (Figura 3) fueron el Oasis MCX, Oasis WCX de intercambio catiónico, Oasis WAX y Oasis SAX de intercambio aniónico. Todos ellos de 150 mg de sorbente y 6 mL de capacidad que fueron suministrados por Waters Corporation (Milford, MA, USA). Por su parte, el nuevo material zwitteriónico llamado HXLPP-WAX/WCX ha sido sintetizado in-house previamente por el grupo de investigación CROMA de la URV (Figura 4).



*Figura 3. Estructura química de los cartuchos Oasis.*



**Figura 4.** Estructura química del sorbente HXLPP-WAX/WCX.

Una vez seleccionados los cartuchos, la extracción en fase sólida se llevó a cabo usando un equipo Vacuum Manifold (colector de vacío) (Figura 5) de la casa Supelco (Bellefonte, PA, USA) y los extractos obtenidos se llevaron a sequedad con un concentrador centrífugo de vacío MiVac-Duo (GeneVac, Ipswich, UK).



**Figura 5.** Sistema vacuum manifold usado para SPE.

## 4. Parte experimental y resultados

### 4.1 Optimización y validación del método cromatográfico

Como se menciona en el apartado anterior, se utilizó cromatografía de líquidos con detector DAD para realizar los análisis correspondientes a la optimización de las condiciones del SPE y el análisis de las muestras de agua medioambiental. Para ello, todas las condiciones del método cromatográfico se basaron en un estudio anterior de Moral et al. [38] que estudiaba los mismos compuestos, al cual se le hicieron ligeras modificaciones.

Se preparó una fase móvil que consiste en agua ultrapura a pH 3 (HCl) (fase A) y acetonitrilo (fase B), con el siguiente programa de gradiente: se inicia con 5% de fase B y se aumenta progresivamente hasta el 40% al llegar al minuto 10, luego en el minuto 14 se alcanza el 45% de fase B para terminar con el 100% en el minuto 19. Esto se mantiene hasta el minuto 21 y se regresa el sistema a condiciones iniciales de 5% de fase B en el minuto 23 sosteniéndolo hasta el minuto 28. El flujo se fijó en 0.4 mL/min, el volumen de inyección en 20  $\mu$ L y la temperatura de la columna en 30°C. Todos los compuestos fueron medidos a 210 nm. Como se puede ver en la Figura 6, con estas condiciones cromatográficas se logró la separación en un tiempo de análisis menor a 21 minutos, los seis fármacos básicos corresponden a los primeros picos que eluyen entre el minuto 6 y 13, mientras que los fármacos básicos eluyen a partir del minuto 17.5 aproximadamente. En la Tabla 2 se detallan los tiempos de retención de cada analito.

El rango de linealidad instrumental para los 13 compuestos fue de 0.5 mg/L a 20 mg/L, con  $R^2$  mayores a 0.995 excepto para ATE que fue de 0.992. Los límites de cuantificación (LOQ) instrumentales fueron de 0.5 mg/L para todos los analitos, y los límites de detección (LOD) instrumentales fueron de 0.1 mg/L. Se obtuvo un valor de RSD < 20% para el parámetro de repetibilidad.

### 4.2 Optimización del SPE

En este estudio se usaron cartuchos con sorbentes de intercambio iónico de modo mixto de diferente naturaleza para extraer un grupo de fármacos ácidos y básicos dando un total de 13 compuestos. Para la SPE, las condiciones iniciales para todos los sorbentes fueron, un volumen de carga de 10 mL a diferentes pH para cada cartucho, lavado con 1 mL de MeOH, una elución ácida para los cartuchos Oasis WCX y Oasis MAX, y una elución básica para los cartuchos Oasis MCX, Oasis WAX y el sorbente HXLPP-WAX/WCX. En un principio la elución se

dividió en dos fracciones de 5 mL cada una, pero para todos ensayos se estableció que con la primera fracción era suficiente para recuperar cuantitativamente los compuestos. Los experimentos para la optimización se llevaron a cabo con soluciones patrón de agua ultrapura fortificadas en un rango de 0.004 a 1 mg/L, y se recogieron las fracciones de lavado y elución llevándolas a sequedad para luego reconstituirlas en 1 mL de fase móvil (agua/MeOH 95/5 v/v).

En primer lugar se realizó la optimización de los parámetros de SPE para los cuatro cartuchos comerciales Oasis de modo mixto, para conocer más a fondo su funcionamiento y a partir de ello se seleccionaron las condiciones más idóneas de SPE para evaluar el sorbente zwitteriónico HXLPP-WAX/WCX. Los parámetros que se optimizaron en el protocolo de SPE fueron el pH y volumen de la carga, volumen de lavado, tipo de solvente y volumen de elución.

#### **4.2.1 pH de la muestra**

Al tratarse de cartuchos de intercambio iónico es imperante que el primer parámetro a optimizar sea el pH de la muestra pues es el que va a promover las interacciones iónicas entre los analitos y el sorbente. Los cartuchos Oasis MCX y Oasis MAX, que son de intercambio catiónico y aniónico fuerte respectivamente, tienen grupos funcionales que permanecen siempre cargados (ver Figura 3), es así que se seleccionó un pH al cual los compuestos objetivos estén ionizados, para ello se tomó en cuenta el  $pK_a$  de cada compuesto (Tabla 1). Para el cartucho Oasis MCX el pH inicial seleccionado fue de 3, a este pH los compuestos básicos están cargados positivamente y se lograron retener eficazmente sin pérdidas durante la carga obteniendo unas %R superiores al 80%. En cambio, para el cartucho Oasis MAX cuyos compuestos objetivo son los fármacos ácidos se seleccionó un pH neutro inicial que estuviera entre 6-7 logrando así obtener recuperaciones entorno al 50-90%.

Para los cartuchos Oasis WCX y Oasis WAX, de intercambio catiónico y aniónico débil respectivamente, se consideró el  $pK_a$  del sorbente y de los compuestos objetivo para determinar un pH inicial. En el caso del cartucho Oasis WCX el  $pK_a$  del grupo funcional carboxílico está alrededor de 5, para activar las interacciones catiónicas necesitaríamos un pH superior al  $pK_a$  del sorbente pero menor al  $pK_a$  de los fármacos básicos. De tal manera, a pH 6 se lograron obtener recuperaciones entorno al 70 y 100% de todos los compuestos básicos, esto es porque a ese pH se desprotona el grupo carboxilo del sorbente y se protonan los analitos permitiendo

que establezcan interacciones iónicas. Un mecanismo similar sucede con el cartucho Oasis WCX que tiene un grupo amino con un  $pK_a$  alrededor de 6 por lo que necesita un pH menor para activar el sorbente, pero al mismo tiempo el pH debe ser mayor al  $pK_a$  de los analitos ácidos. Con esto en mente, se estableció el pH de la muestra en 5 y se lograron retener los fármacos ácidos recuperándolos cuantitativamente en la elución con recuperaciones superiores al 80%. Los valores de pH establecidos son similares a los que se recomiendan en artículos de revisión [41] y han sido utilizados por otros autores [25, 35] con ligeras modificaciones en dependencia del  $pK_a$  de los analitos.

#### **4.2.2 Condiciones de elución**

Las condiciones de elución seleccionadas para los cuatro cartuchos Oasis son recomendadas por Fontanals et al. [41] en su trabajo en el que proponen un protocolo estándar para la extracción en SPE con sorbentes de intercambio iónico de modo mixto de matrices medioambientales complejas. En base a ello, para los cartuchos Oasis MCX y Oasis WAX se probó una elución básica, dividida en dos fracciones de 5 mL cada una, con una solución de  $NH_4OH$  al 5% en MeOH para el cartucho Oasis MCX y la misma solución, pero al 2% para el cartucho Oasis WAX. Con estas condiciones de elución se lograron recuperar cuantitativamente los analitos objetivo en la primera fracción de la elución por lo que se fijó el volumen de solvente en 5 mL.

Los mismos solventes de elución se emplearon en dos estudios [42, 25] relativos a la extracción de fármacos de aguas medioambientales mediante SPE con cartuchos WAX donde también empleó una solución de  $NH_4OH$  al 2% en MeOH. En el caso del cartucho de intercambio catiónico fuerte (MCX) al hacer pasar una solución básica se neutralizan tanto el sorbente como los compuestos básicos que se encuentran retenidos a él lo que hace que se rompan las interacciones catiónicas y podamos recuperarlos en la elución. El mecanismo que ocurre en el cartucho de intercambio aniónico débil (WAX) es que al hacer pasar una solución básica se desprotona el grupo amino del sorbente lo que rompe la interacción aniónica con los analitos ácidos que se mantienen en su forma ionizada debido a que el pH del medio sigue siendo mayor a su  $pK_a$ .

Similar a lo anterior, para los cartuchos Oasis WCX y MAX se aplicó una elución ácida en dos fracciones de 5 mL cada una. Para el sorbente de intercambio catiónico débil (WCX) se utilizó

una solución al 5% de AcOH en MeOH obteniendo recuperaciones mayores al 80% para todos los analitos básicos, excepto para RAN que fue de 67%, en los primeros 5 mL. Por su parte, para el sorbente de intercambio aniónico fuerte (MAX) inicialmente se probó una solución ácida de HCl al 1% en MeOH pero las recuperaciones obtenidas de los analitos ácidos eran menores al 30% (ver Figura 7), se sospechaba que el medio no era lo suficientemente ácido por lo que se decidió aumentar la concentración de HCl al 3%. Aun así, las %R seguían por debajo del 40%, entonces se sustituyó el ácido inorgánico por un ácido orgánico, en este caso AcOH al 5% en MeOH

Con este cambio se alcanzaron recuperaciones más satisfactorias, de entre 65 y 90% en la primera fracción de la elución, sin embargo, el compuesto CLO tenía la %R más baja posiblemente porque es el analito con el valor de  $pK_a$  más bajo ( $pK_a=3.1$ ) y necesitaba un medio más ácido para eluir. Para ello, probamos una elución con una solución de AcOH al 10% en MeOH pero no hubieron mejoras significativas para este compuesto y algunos otros redujeron su %R.

Es así que para ambos cartuchos (WCX y MAX) se decidió mantener la elución con 5 mL de AcOH al 5% en MeOH. La recuperación de los compuestos básicos con el cartucho de intercambio catiónico débil es posible gracias a que al pasar una solución acidificada se neutraliza el grupo carboxílico del sorbente rompiendo las interacciones catiónicas con los analitos, mientras que con la misma solución ácida en el sorbente de intercambio aniónico fuerte se neutralizan los compuestos ácidos.

#### **4.2.3 Volumen de muestra**

Para conocer más sobre los efectos del volumen de carga se probaron volúmenes desde 10 mL a 250 mL para los cartuchos Oasis. En la Tabla 3 se puede observar que al cargar 10 o 25 mL las recuperaciones en todos los cartuchos se mantenían prácticamente iguales con %R entre 66 y 110% al cargar un volumen de 25 mL. Cuando aumentamos a 100 mL se registraron ligeras disminuciones en algunos compuestos, pero no mayores a un 5%, excepto para el cartucho Oasis WCX que es el único que mostró una disminución del 13 y 20% en RAN y TRI respectivamente. Mientras que, al cargar 250 mL las diferencias se mantuvieron mínimas, excepto para el cartucho Oasis MAX para el cual las %R pasaron de 69-92% (con 100 mL) a 48-90% (con 250 mL). Dados estos resultados, se estableció el volumen de carga en 250 mL

para todos los cartuchos Oasis de intercambio iónico de modo mixto. Alcanzar volúmenes altos de carga es importante para lograr un mayor enriquecimiento de los analitos en el extracto final puesto que suelen encontrarse a bajas concentraciones en las muestras medioambientales, de esta manera logramos mejorar el rendimiento de la extracción.

#### **4.2.4 Condiciones de lavado**

La optimización de las condiciones de lavado tiene como objetivo lograr una limpieza efectiva de las posibles interferencias presentes en la matriz a la vez que mantener una buena recuperación de los analitos de interés. Para ello, primero se seleccionó el MeOH como disolvente de lavado para los cuatro cartuchos Oasis (MCX, WCX, MAX, WAX) puesto que lo más recomendable según varios estudios y revisiones [16, 19, 35] es emplear una mezcla de agua y algún disolvente orgánico para un lavado poco agresivo o preferiblemente un solvente orgánico puro para un lavado más efectivo de los compuestos unidos por interacciones no iónicas, lo cual ayuda a mejorar la selectividad del método. En base a ello, se empezó con un volumen bajo de lavado, de 1 mL para asegurarnos de no tener pérdida de analitos.

Se observó que se obtenían buenas recuperaciones para todos los cartuchos, pero en la fracción de la elución aún se encontraban restos de compuestos ácidos en los cartuchos de intercambio catiónico y restos de compuestos básicos en los cartuchos de intercambio aniónico. Por eso, para mejorar la selectividad se aumentó el volumen de lavado a 5 mL, y como se observa en la Figura 8 se lograron mantener buenos valores de recuperación y eliminar sustancialmente los compuestos no deseados.

En la Tabla 4 se recogen todas las condiciones optimizadas de la SPE para cada uno de los cartuchos Oasis, y a continuación (Tabla 5) las recuperaciones obtenidas bajo el protocolo de SPE óptimo.

### **4.3 Sorbente HXLPP-WAX/WCX**

Ya que el sorbente zwitteriónico HXLPP-WAX/WCX tiene propiedades de intercambio aniónico y catiónico débil creímos que lo más conveniente era primero conocer a fondo el funcionamiento de los cartuchos comerciales de intercambio iónico de modo mixto para tener

una perspectiva más clara al momento de establecer un protocolo de SPE adecuado. Así que, una vez optimizados los procedimientos de SPE para los cartuchos Oasis se continuó con los parámetros del nuevo sorbente tomando en cuenta las condiciones iniciales mencionadas en el apartado 4.2. La selección del pH de la muestra para el cartucho HXLPP-WAX/WCX fue más compleja que para los cartuchos anteriores, pues en este caso los compuestos objetivos son todos los fármacos tanto ácidos como básicos y llegar a un compromiso para ionizar ambos tipos de compuestos a la vez que activar los grupos funcionales amino y carboxilo (débiles) conlleva un análisis experimental más amplio.

Para tener una noción más detallada sobre las propiedades del sorbente y los mecanismos de retención se probaron diferentes valores de pH, empezando con pH 5, 6 y 7. A pH 6 se logró ionizar a todos los analitos (según su pKa) pero parece ser que solo se activa el mecanismo WCX del sorbente y no el WAX ya que observamos pérdida de los fármacos ácidos durante la carga. Por su parte, las %R de los básicos en el extracto de la elución van de 23-46% y de los ácidos por debajo del 30%. Los mismos valores de recuperación se obtuvieron a pH 7, en cambio a pH 5 las %R de los fármacos básicos son ligeramente mayores (43-74%) pero los 7 compuestos ácidos se pierden durante el subsecuente lavado con MeOH.

Para obtener más información sobre el comportamiento de los analitos y el sorbente a diferentes pH se probó la carga a pH 3 y 9. En el primer caso, a pH 3, tras recolectar las fracciones de carga y lavado se deduce que el grupo funcional carboxilo del sorbente no se logró ionizar por tanto el mecanismo WCX está desactivado y no se retienen los compuestos básicos por interacciones iónicas. Por lo contrario, el mecanismo WAX posiblemente sí está activado pero los analitos ácidos no están cargados ya que son ácidos débiles y este pH está por debajo de su pKa (3.2 - 4.5), lo cual explica que en el lavado se pierda entre el 30-75% de compuestos ácidos y básicos.

Sorprendentemente, al cargar a pH 9 se lograron retener ambos grupos de fármacos con %R entre el 44 y 70% para los analitos básicos y 40 y 83% para los ácidos, aunque el restante se pierde durante el lavado con metanol. Esto sugiere que una parte de los analitos se retienen por interacciones hidrofóbicas y por eso se eliminan con la fracción de lavado. Y es que, aunque a pH 9 se asegure que los analitos ácidos estén desprotonados, el carácter WAX del sorbente

estaría desactivado por lo que no se logran reterner por interacciones aniónicas. Por su parte, el mecanismo WCX del sorbente sí se activa a pH 9 pero no se protonan los compuestos básicos.

Para asegurar que los analitos se retengan por interacciones iónicas un requisito imprescindible es activar el carácter WCX y WAX del sorbente al mismo tiempo, pero los resultados insinúan que esto no se ha logrado en la práctica. Lo mismo se reportó en otro estudio que empleaba un sorbente zwitteriónico de iguales características [41], lo cual se atribuyó a que los grupos amino del sorbente son menos básicos de lo esperado debido al efecto inductivo negativo de los grupos carboxilo. El pH de la carga para el sorbente zwitteriónico se estableció en 9 con fines de continuar la optimización de las otras condiciones del SPE.

En cuanto a las condiciones de lavado, se probaron 2 solventes, el metanol como solvente orgánico y una solución acuosa de MeOH/agua a pH 9 (50/50 v/v). En la Tabla 7 se muestran los resultados de las recuperaciones de la SPE obtenidas cuando se cargaba 10 mL de agua ultrapura a pH 9 sin aplicar el paso de lavado y cuando se empleaban los dos solventes mencionados. Como se mencionó anteriormente, con el lavado de 1 mL de metanol se registran pérdidas de los analitos ácidos y básicos debido a que tiene mayor poder de elución y a que en parte los analitos estaban retenidos por interacciones hidrofóbicas, y aunque al aplicar el lavado con la solución acuosa de metanol se obtienen recuperaciones más altas para los compuestos básicos, para los ácidos VAL y DICLO se ven muy disminuidas.

Como el objetivo es encontrar unas condiciones que favorezcan a ambos grupos de compuestos se establece el lavado con 1 mL de MeOH que además favorece la selectividad al método y ofrece valores de %R superiores al 40% para todos los compuestos. Condiciones de lavado similares se han seleccionado para extracción con SPE con sorbentes zwitteriónicos, como en el estudio de Moral et al. [38] que optimizó un protocolo de SPE con lavado de 5 mL de MeOH, o el trabajo de Nadal et al. [39] que estableció el volumen de lavado en 1 mL de MeOH.

Con el sorbente HXLPP-WAX/WCX también se inició con un volumen de carga de 10 mL y se aumentó progresivamente a 25 y 50 mL, aun que como ya se mencionó, tanto compuestos ácidos como básicos se perdían en el lavado por lo que los valores de %R para todos los

volúmenes son relativamente bajos. Aun así, se fijó el volumen en 25 mL para futuras extracciones con agua de río y de efluente de depuradora.

Finalmente, para la elución se propuso una elución básica, dividida en dos fracciones de 5 mL cada una, con una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 5% en MeOH, pero ya que se lograron recuperar cuantitativamente los analitos objetivo en la primera fracción de la elución se fijó el volumen de solvente en 5 mL. En el sorbente zwitteriónico los compuestos se retienen por interacciones hidrofóbicas, pues no se logró activar el carácter WAX y WXC a la vez, por lo que al pasar 1 mL de metanol durante el lavado hace que se pierdan parcialmente los analitos, quedando solo una parte de los compuestos retenidos aún. Sin embargo, con un volumen mayor, en este caso 5 mL, de una solución básica se rompen por completo las interacciones y eluyen los compuestos que quedaban retenidos.

Una vez realizados todos los ensayos, en la Figura 9 se observa el protocolo final de SPE establecido para el sorbente HXLPP-WAX/WCX y a continuación las recuperaciones (Tabla 8) obtenidas con dicho protocolo cuando se realizaron extracciones con soluciones patrón. Estas soluciones patrón se fortificaron a dos niveles de concentración diferentes para observar si los valores de %R se mantenían constantes, de esta manera se confirma que las recuperaciones permanecen muy similares cuando están fortificadas a 0.4 mg/L y a 0.08 mg/L.

#### **4.4 Análisis de muestras medioambientales**

Una vez establecidas todas las condiciones del protocolo de SPE, se realizaron extracciones con el sorbente HXLPP-WAX/WCX en matrices complejas de muestras de agua de efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales de Tarragona y agua del río Ebro. Cabe mencionar que cualquier señal obtenida en los blancos se restó de las señales obtenidas en las muestras de agua ambiental fortificadas.

Para los extractos de muestras de aguas medioambientales se procedió a filtrar el extracto reconstituido con un filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y posteriormente fueron analizados cromatográficamente para evaluar pérdidas y recuperaciones. Al igual que con las soluciones patrón de agua ultrapura, las muestras de agua de río y de efluente de depuradora se fortificaron a dos niveles de concentración diferentes para observar si había variación en las %R.

Para las muestras fortificadas a 0.4 mg/L, podemos observar en la Tabla 9 que los resultados de las %R para las muestras de agua de efluente de depuradora son ligeramente más altas que las de agua de río, con un máximo de 57%. En general, para el grupo de fármacos ácidos las recuperaciones son mayores a la de los fármacos básicos, posiblemente porque al pH de la carga se encontraban ionizados. En comparación con las %R obtenidas en solución patrón, el compuesto PRO pasó de 30% al 15% en agua de efluente y al 11% en agua de río, esto podría deberse a que las interferencias presentes en las muestras no se hayan podido eliminar por completo con el lavado y estén obstruyendo la unión de los analitos al sorbente.

Para las muestras fortificadas a 0.08 mg/L se observa la misma tendencia en las recuperaciones, aunque con ligeras disminuciones para las muestras de río y de efluente de depuradora en los compuestos ácidos, pero no mayores al 5%. En general, las recuperaciones de las muestras fortificadas a este nivel de concentración para las muestras de efluente están entre el 19 y 70% y para las muestras de río entre 16 y 60%. Se calculó la repetibilidad de tres réplicas al nivel más bajo de concentración para las muestras de río obteniendo %RSD que va de 8 a 18% para los compuestos básicos y de 5 a 10% para los compuestos ácidos. En general, las recuperaciones de los analitos en las muestras de agua medioambiental corresponden con las obtenidas en soluciones patrón.

Los compuestos de estudio suelen encontrarse en un rango de concentración que va de 0.7 a 72 ng/L según otros [38, 43] estudios que analizaron muestras de agua medioambiental del mismo origen, por lo tanto, con los límites de cuantificación del método actual no se podría determinar los compuestos en muestras reales es por ello que en un principio la intención era continuar el análisis de las muestras de aguas río y efluente con LC-MS para poder llegar a LODs y LOQs más bajos y así poder determinar los fármacos a las concentraciones que se encuentran en las muestras reales, pero por cuestión de tiempo no se llegó a realizar. Al analizar los blancos de agua de río y efluente no se logró determinar ninguno de los compuestos.

## 5. Conclusiones

Las conclusiones del presente trabajo de fin de máster se describen a continuación:

- Las condiciones de SPE óptimas a las que se ha llegado para los cuatro sorbentes comerciales de intercambio iónico de modo mixto, el Oasis MCX, Oasis WCX, Oasis

MAX y Oasis WAX han logrado alcanzar valores de recuperación satisfactorios para los 13 fármacos.

- Los resultados obtenidos de las recuperaciones con el protocolo de SPE propuesto para el sorbente zwitteriónico HXLPP-WAX/WCX no han sido los esperados, posiblemente porque el pH de la muestra no favorecía la activación de los grupos funcionales carboxilo y amino, a la vez que la ionización de los fármacos ácidos y básicos.
- Se ha comprobado que el sorbente HXLPP-WAX/WCX tiene un gran potencial para la extracción de fármacos de matrices acuosas medioambientales, pero se necesita de más ensayos, así como de un análisis exhaustivo para lograr establecer unas condiciones que aseguren la retención de los compuestos objetivo mediante interacciones iónicas.

## 6. Referencias

- [1] S. Fekadu, E. Alemayehu, R. Dewil, B. Van der Bruggen, Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge, *Sci. Total Environ.* 654 (2019) 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072>.
- [2] M. Mezzelani, S. Gorbi, F. Regoli, Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms, *Mar. Environ. Res.* 140 (2018) 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>.
- [3] T. aus der Beek, F.A. Weber, A. Bergmann, S. Hickmann, I. Ebert, A. Hein, A. Küster, Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives, *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (2016) 823–835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>.
- [4] M.D.E. Sanidad, *Prestación Farmacéutica en el Sistema Nacional de Salud, 2022, (2023)*. [https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/InfAnualSNS2022/Informe\\_PrestacionFarmaceutica\\_2022.pdf](https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/InfAnualSNS2022/Informe_PrestacionFarmaceutica_2022.pdf) (accessed May 3, 2024).
- [5] AEGON, *La automedicación en España aumenta por segundo año consecutivo, Aegon Seguros (2022) 1–1*. <https://www.aegon.es/sobre-aegon/area-prensa/notas-de-prensa/nota-automedicacion-2022> (accessed April 29, 2024).
- [6] Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000,

- por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Directiva nº. 2000/60 (2000, 23 de octubre) (España). Boletín Oficial del Estado, (327). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2000-82524>
- [7] L.G. Cortes, D. Marinov, I. Sanseverino, A.N. Cuenca, M. Niegowska, E.P. Rodriguez, T. Lettieri, Selection of substances for the 4th Watch List under the Water Framework Directive, 2020. <https://doi.org/10.2760/01939>.
- [8] Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. Real Decreto nº. 3/2023 (2023, 11 de enero)(España). Boletín Oficial del Estado, (9). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2023-628>
- [9] C. Europea, La Comisión acoge con satisfacción el acuerdo provisional para una gestión más exhaustiva y rentable de las aguas residuales urbanas, (2024). [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/ip\\_24\\_504](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/ip_24_504) (accessed May 5, 2024).
- [10] M. Escolà Casas, N.S. Schröter, I. Zammit, M. Castaño-Trias, S. Rodriguez-Mozaz, P. Gago-Ferrero, L. Corominas, Showcasing the potential of wastewater-based epidemiology to track pharmaceuticals consumption in cities: Comparison against prescription data collected at fine spatial resolution, *Environ. Int.* 150 (2021) 106404. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106404>.
- [11] J.M.Q. Alonso, A.A. Merino, Tratamientos avanzados para la eliminación de fármacos en aguas superficiales, *Rev. Salud Ambient.* 15 (2015) 18–21.
- [12] M. Quero-Pastor, C. Garrido-Perez, A. Acevedo Merino, J.M. Quiroga Alonso, Toxicity and Degradation Study of Clofibric Acid by Treatment with Ozone in Water, *Ozone Sci. Eng.* 38 (2016) 425–433. <https://doi.org/10.1080/01919512.2016.1203288>.
- [13] Z.E. Mbhele, S. Ncube, L.M. Madikizela, Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application in selective extraction of fenoprofen from wastewater, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 36724–36735. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3602-x>.
- [14] S. Barişçi, F. Ulu, M. Sillanpää, A. Dimoglo, Evaluation of flurbiprofen removal from

- aqueous solution by electrosynthesized ferrate(VI) ion and electrocoagulation process, *Chem. Eng. J.* 262 (2015) 1218–1225. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.083>.
- [15] B. Petrie, D. Camacho-Muñoz, Analysis, fate and toxicity of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters and the environment: a review, *Environ. Chem. Lett.* 19 (2021) 43–75. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01065-y>.
- [16] A. Togola, H. Budzinski, Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 627–635. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1251-x>.
- [17] M. Farré, M. Petrovic, D. Barceló, Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1203–1214. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0936-x>.
- [18] P. Vazquez-Roig, V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, SPE and LC-MS/MS determination of 14 illicit drugs in surface waters from the Natural Park of L'Albufera (València, Spain), *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2851–2864. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3720-x>.
- [19] L. Patrolecco, N. Ademollo, P. Grenni, A. Tolomei, A. Barra Caracciolo, S. Capri, Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection, *Microchem. J.* 107 (2013) 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.035>.
- [20] O.S. Olatunji, O.S. Fatoki, B.O. Opeolu, B.J. Ximba, R. Chitongo, Determination of selected steroid hormones in some surface water around animal farms in Cape Town using HPLC-DAD, *Environ. Monit. Assess.* 189 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6070-8>.
- [21] N. Fontanals, B.C. Trammell, M. Galià, R.M. Marcé, P.C. Iraneta, F. Borrull, U.D. Neue, Comparison of mixed-mode anion-exchange performance of N-vinylimidazole-divinylbenzene sorbent, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1622–1629. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600035>.
- [22] P. Avar, G. Maasz, P. Takács, S. Lovas, Z. Zrinyi, R. Svigruha, A. Takátsy, L.G. Tóth, Z.

- Pirger, HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples, *Drug Test. Anal.* 8 (2016) 124–128. <https://doi.org/10.1002/dta.1829>.
- [23] A. Moral, P. Clivillé-Cabré, F. Borrull, K.G. Furton, A. Kabir, R.M. Marcé, N. Fontanals, Application of a homemade silica-based mixed-mode ion-exchange sorbent for the determination of drugs in environmental water samples, *Adv. Sample Prep.* 7 (2023) 100074. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2023.100074>.
- [24] V. Brieudes, S. Lardy-Fontan, B. Lalere, S. Vaslin-Reimann, H. Budzinski, Validation and uncertainties evaluation of an isotope dilution-SPE-LC-MS/MS for the quantification of drug residues in surface waters, *Talanta* 146 (2016) 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.073>.
- [25] G. Castro, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, Selective determination of sartan drugs in environmental water samples by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Chemosphere* 224 (2019) 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.137>.
- [26] V.A. Manzo Sandoval, Microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) de fármacos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs) desde muestras acuosas, 2015.
- [27] M.E.T. Padrón, C. Afonso-Olivares, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, Microextraction techniques coupled to liquid chromatography with mass spectrometry for the determination of organic micropollutants in environmental water samples, *Molecules* 19 (2014) 10320–10349. <https://doi.org/10.3390/molecules190710320>.
- [28] R.E. Kannouma, M.A. Hammad, A.H. Kamal, F.R. Mansour, A dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic droplet for determination of antiviral agents in environmental water using HPLC/UV, *Microchem. J.* 171 (2021) 106790. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106790>.
- [29] Y. Wang, Y. Jie, Q. Hu, Y. Yang, Y. Ye, S. Zou, J. Xu, G. Ouyang, A polymeric solid-phase microextraction fiber for the detection of pharmaceuticals in water samples, *J. Chromatogr. A* 1623 (2020) 461171. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461171>.

- [30] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 774 (2013) 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.010>.
- [31] A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices. Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.103>.
- [32] S. Weigel, R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.036>.
- [33] Y. Ning, H. Fan, Y. Liu, H. Huang, Z. Ke, X. Xu, Y., & She, Preparation and application of polystyrene-divinylbenzene sorbent with weak cation-exchange character for the selective extraction of illicit drugs in environmental water, *J. Chromatogr. A* 1671 (2022) 462994. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462994>.
- [34] M. Caban, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, J. Maszkowska, M. Wagil, J. Kumirska, Comparison of the usefulness of SPE cartridges for the determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta$ -agonists (basic drugs) in environmental aqueous samples, *J. Chem.* 1 (2015) 195280. <https://doi.org/10.1155/2015/195280>.
- [35] N. Fontanals, F. Borrull, R.M. Marcé, Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents in environmental analysis, *J. Chromatogr. A* 1609 (2020) 460531. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460531>.
- [36] B. Tegegne, B.S. Chandravanshi, F. Zewge, L. Chimuka, Solid-phase optimisation for simultaneous determination of thirteen pharmaceuticals in Ethiopian water samples with HPLC-DAD detection: an initial assessment, *Environ. Monit. Assess.* 193 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08999-y>.
- [37] A. Moral, F. Borrull, K.G. Fourton, A. Kabir, R.M. Marcé, N. Fontanals, Extraction of

- selected benzothiazoles, benzotriazoles and benzenesulfonamides from environmental water samples using a home-made sol-gel silica-based mixed-mode zwitterionic sorbent modified with graphene, *Talanta* 256 (2023) 124315.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124315>.
- [38] A. Moral, F. Borrull, K.G. Furton, A. Kabir, N. Fontanals, R.M. Marcé, Development of sol-gel silica-based mixed-mode zwitterionic sorbents for determining drugs in environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1676 (2022) 463237.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463237>.
- [39] J.C. Nadal, S. Dargo, F. Borrull, P.A.G. Cormack, N. Fontanals, R.M. Marcé, Hypercrosslinked polymer microspheres decorated with anion- and cation-exchange groups for the simultaneous solid-phase extraction of acidic and basic analytes from environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1661 (2022) 462715.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462715>.
- [40] S. Jin, Y. Qiao, J. Xing, Ternary mixed-mode silica sorbent of solid-phase extraction for determination of basic, neutral and acidic drugs in human serum, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 3731–3742. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1037-3>.
- [41] N. Fontanals, F. Borrull, R.M. Marcé, Overview of mixed-mode ion-exchange materials in the extraction of organic compounds, *Anal. Chim. Acta* 1117 (2020) 89–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.053>.
- [42] N. Fontanals, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, Hypercrosslinked polymer microspheres with weak anion-exchange character. Preparation of the microspheres and their applications in pH-tuneable, selective extractions of analytes from complex environmental samples, *J. Chromatogr. A* 1215 (2008) 21–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.124>.
- [43] J.C. Nadal, F. Borrull, K.G. Furton, A. Kabir, N. Fontanals, R.M. Marcé, Selective monitoring of acidic and basic compounds in environmental water by capsule phase microextraction using sol-gel mixed-mode sorbents followed by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem, *J. Chromatogr. A* 1625 (2020) 461295.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461295>.