

Determinación de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos y sus metabolitos posterior a su interacción con la planta *Salvinia adnata* Desv. en el medio acuoso.

Stefhanny Carolina LUNA SANABRIA

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias, escuela de Química
Pregrado
Bucaramanga

2022

Determinación de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos y sus metabolitos posterior a su interacción con la planta *Salvinia adnata* Desv. en el medio acuoso.

Stefhanny Carolina LUNA SANABRIA

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de química

Directora: Elena E. STASHENKO, Química, Ph.D

Co-director: Andrés F. GONZÁLEZ SUÁREZ, Químico, M. Sc.

Centro de investigación en biomoléculas

Centro de cromatografía y espectrometría de masas

Centro de excelencia CENIVAM

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias, escuela de Química

Pregrado

Bucaramanga

2022

Agradecimientos

A mis padres William y Fanny, mi hermana Karen. Por ser mi ejemplo, compañía y fortaleza para mantener la confianza en mí para seguir adelante.

A los profesores Elena Stashenko y Jairo René Martínez, por la oportunidad de trabajar y ser parte de su centro de investigación, por las enseñanzas, correcciones y recomendaciones en el desarrollo del proyecto. Además de las experiencias de vida compartidas durante este proceso.

A mi co-director Andrés González, por cada una de las lecciones impartidas, apoyo y dedicación en la realización de la investigación.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por las vivencias inolvidables y el cariño.

Al laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de masas (CROM-MASS), por brindar los recursos para los consumibles y mantenimiento de los equipos cromatográficos necesarios para el desarrollo del proyecto.

Agradezco el apoyo financiero a MINCIENCIAS (actualmente Ministerio de Ciencia, Tecnología e innovación) por la convocatoria N°785/2017.

Agradecimientos a Minciencias, Mineducación, Mincomercio e ICETEX. Ecosistema Científico - Colombia Científica. Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

Contenido

Introducción	21
1. Marco referencial.	24
1.1. Contaminantes emergentes.....	24
1.1.1. Productos farmacéuticos.	24
1.1.2. Anti-inflamatorio esteroideo	24
1.1.3. Anti-inflamatorio no esteroideo.	24
1.2. Presencia, persistencia de los AINE en el medio ambiente	25
1.3. Procesos de degradación y transformación de fármacos en el medio acuoso.....	26
1.4. Impacto ambiental de los fármacos AINE en el medio acuoso.	27
1.5. Sistemas biológicos acuáticos.	28
1.5.1. <i>Salvinia adnata</i>	28
1.6. Método de extracción y análisis para la identificación de los AINE y sus metabolitos en el medio acuoso.	29
1.6.1. Técnicas de extracción.	29
1.6.2. Método de análisis instrumental.....	30
2. Antecedentes	32
2.1 AINE en el medio ambiente	32
2.2. Procesos de tratamiento para remoción de AINE	33
2.3. Metodologías de análisis de los fármacos AINE mediante HPLC y UHPLC	34
3. Objetivos	36
4. Metodología y desarrollo experimental	37
4.1. Reactivos, materiales y equipos.	37
4.1.2 Material de referencia.	39
4.2. Análisis por HPLC/DAD de los AINE.	39
4.2.1. Selección de condiciones para el análisis cromatográfico por HPLC.....	40

4.2.2. Determinación de parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica por HPLC	40
4.2.3. Determinación de las figuras analíticas de mérito para HPLC.	41
4.3. Extracción de los fármacos antiinflamatorios en muestras acuosas.....	43
4.3.1. Extracción en fase sólida, SPE.....	43
4.3.2. Pruebas de variables en la extracción en fase solida de los fármacos AINE ..	47
4.3.3. Figura analítica de mérito para el método de extracción.	48
- Determinación de la reproducibilidad del método de extracción.	48
4.3.4 Comparación de eficiencia de matriz en diferentes matrices acuosas.	48
4.4 Extracción líquido-líquido asistida por sal.....	49
4.5 Comparación de eficiencia de extracción para las técnicas de extracción implementadas	50
4.6. Condiciones de análisis por LC-MS	50
4.7 Procedimiento de preparación del experimento de interacción de los fármacos AINE en medio acuoso.	52
4.7.1. Identificación y propagación del material vegetal.	52
4.7.2. Preparación de material vegetal y reservorios de vidrio	52
4.7.3. Preparación de la solución acuosa enriquecida para el experimento de interacción.....	53
4.7.4. Experimento de interacción de los fármacos AINE en medio acuoso.	53
4.7.5. Recolección y preparación de extractos	54
5. Resultados	57
5.1. Metodología de análisis para los AINE por HPLC/DAD.	57
5.1.3. Parámetros de eficiencia de separación de los compuestos anti-inflamatorios por HPLC-DAD.	60
5.1.4. Figuras analíticas de mérito para el método analítico por HPLC/DAD.....	61

5.2. Extracción de los fármacos anti-inflamatorios en muestras acuosas.	64
5.2.1. Determinación de las condiciones de extracción de los compuestos anti-inflamatorios en muestra acuosa mediante extracción en fase sólida.	64
Tabla 18. Comparación de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE a pH 3 y 6, con los soportes sólidos: <i>Strata-X</i> , <i>Silicycle</i> y <i>Chromabond</i>	65
5.2.2. Figura analítica de mérito para el método de extracción en fase sólida.	71
5.2.2. Comparación de la eficiencia de extracción para tres niveles de concentración en diferentes matrices acuosas.	72
5.3. Determinación de las condiciones de extracción de los compuestos anti-inflamatorios en solución mediante extracción líquido-líquido asistida por sal.	75
5.5. Comparación de la eficiencia de extracción entre las técnicas implementadas.	76
5.6. Análisis por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia	77
5.6.1. Repetitividad de las áreas cromatográficas	78
5.7 Extracción, identificación y distribución de los fármacos AINE y algunos metabolitos presentes en los extractos del experimento comparativo de interacción de los fármacos AINE en medio acuoso.	79
5.7.1. Identificación, distribución y análisis de espectros de masas de piroxicam y sus metabolitos.	80
4.7.2. Identificación distribución y análisis de espectros de masas de diclofenaco y sus metabolitos.	89
5.7.3. Identificación, distribución y análisis de espectros de masas de naproxeno, ibuprofeno y sus metabolitos	107
6. Conclusiones	118
Bibliografía	120

Lista de figuras

Figura 1. Salvinia adnata. Foto tomada por la autora el 11 enero 2020, CENIVAM -UIS.....	28
Figura 2. Relación del número de publicaciones por año. Período de observación: 2000 al 2022. Palabras clave: “NSAIDs & environment”. Bases de datos: Scopus (Elsevier) y Web of Science . Fecha de consulta: 10 de septiembre del 2022.....	33
Figura 3. A. Relación del número de publicaciones por año. Período de observación 2000 al 2022. Palabras clave: “NSAIDs & HPLC”. Bases de datos: Scopus (Elsevier) y Web of Science . Fecha de consulta: 10 de septiembre del 2022. B. Relación del número de publicaciones por año. Período de observación 2000 al 2022. Palabras clave: “NSAIDs & UHPLC”. Bases de datos: Scopus (Elsevier) y Web of Science . Fecha de consulta: 10 de septiembre del 2022.....	35
Figura 4. Metodología implementada en el desarrollo de la investigación.	37
Figura 5. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Agilent Technologies 1260 Series. Nota: Fotografía tomada por Stefhanny Luna en CENIVAM el 25 de marzo de 2021.....	39
Figura 6. Equipo para extracción SPE, Baker Spe-24G (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU).	45
Figura 7. Diagrama del proceso de extracción de los AINE por SPE en muestras acuosas.....	47
Figura 8. Proceso de preparación de agua TAP esterilizada.....	49
Figura 9. Diagrama del procedimiento de extracción SALLE para los fármacos AINE en solución acuosa.	49
Figura 10. Esquema del experimento comparativo de interacción de los fármacos en medio acuoso.	53
Figura 11. Perfil cromatográfico del material de referencia certificado de los fármacos AINE analizados, obtenido por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD), en la columna Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), longitud de onda 205 nm y el gradiente seleccionado. 1. Piroxicam (PXM), 2. Naproxeno (NAP), 3. Diclofenaco (DIC), 4. Ibuprofeno (IBU) 5. Difenilamina (DFA, ISTD).	58
Figura 12. Perfiles cromatográficos obtenidos para la evaluación de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE extraídos a pH 6 con los cartuchos comerciales A. Strata X, B. Silicycle, C. Chromabond. La identificación de los picos cromatográficos es: 1. PXM; 2. DIC; 3. NAP; 4. IBU; DFA (ISTD).	67

Figura 13. Prueba de pH en la extracción de los fármacos AINE mediante con el soporte sólido Strata X (Phenomenex), n=3.	68
Figura 14. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda = 205$ nm) de los fármacos AINE: A. Blanco de extracción; B. Lavado del cartucho SPE y C. Perfil del MRC ($10 \mu\text{g L}^{-1}$).....	71
Figura 15. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda = 205$ nm) de: A. Extracto SPE de agua TAP; B. Extracto SPE de agua tipo I enriquecido de los AINE ($10 \mu\text{g L}^{-1}$); C. Extracto SPE de agua TAP enriquecido con los fármacos AINE ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) y D. Mezcla de los fármacos AINE ($10 \mu\text{g L}^{-1}$).	74
Figura 16. EIC obtenidas por UHPLC-ESI ⁺ -Orbitrap-HRMS de los extractos SPE de las muestras acuosas de las interacciones AF, AFb y APF	80
Figura 17. Estructura molecular propuesta para los metabolitos identificados tentativamente y PXM.....	81
Figura 18. A. Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de PXM-2, $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3\text{NS}$, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 40 eV) y su registro de iones-producto; B. Espectro <i>full</i> MS de PXM-2, obtenidos por UHPLC-ESI ⁺ -Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de PXM-2 y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%),(^{13}C ; 9%), (^{34}S , 4.5%). Muestra AF 25.	85
Figura 19. A. Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de PXM, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 30 eV) y sus iones-producto; B. Espectro <i>full</i> MS de PXM, obtenido por UHPLC-ESI ⁺ -Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de PXM y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%),(^{13}C ; 15%) y (^{34}S , 4.5%). Muestra AFb-25.....	86
Figura 20. Patrón de fragmentación de piroxicam. Tomado con modificaciones de Jiménez y col. (2018).	87
Figura 21. Variación de la cantidad de piroxicam y sus metabolitos extraídos mediante SPE y analizados por UHPLC-ESI ⁺ -Orbitrap-HRMS, en las muestras acuosas de los experimentos de interacción AF, AFb, APF y AP. A. PXM-1, B. PXM-2 y C. PXM.....	89
Figura 22. EIC obtenida por UHPLC-ESI ⁺ -Orbitrap-HRMS de los extractos SPE de las muestras acuosas de las interacciones AF, AFb y APF.	89

Figura 23. Estructuras moleculares propuestas para los metabolitos identificados tentativamente y DIC..... 90

Figura 24. **A.** Espectro *full* MS de DIC-1, C₁₄H₁₀O₄NCl₂; **B.** Espectro MS del ion [M + H]⁺ de DCF-1, energizado y fragmentado en la HCD (N₂, 30 eV) y sus iones-producto; **C.** Espectro *full* MS de DIC-1, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (*m/z*) en donde se detecta la molécula protonada [M + H]⁺ de DCF-1 y la relación isotópica de iones (³⁵Cl, ³⁵Cl; 100%) : (³⁵Cl, ³⁷Cl; 64.7%) : (³⁷Cl, ³⁷Cl; 9.9%) ≈ 9:6:1. Muestra AFb-2..... 95

Figura 25. **A.** Espectro *full* MS de DIC-2, C₁₄H₁₀O₄NCl₂; **B.** Espectro MS del ion [M + H]⁺ de DCF-2, energizado y fragmentado en la HCD (N₂, 30 eV) y sus iones-producto; **C.** Espectro *full* MS de DIC-2, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (*m/z*) en donde se detecta la molécula protonada [M + H]⁺ de DCF-2 y la relación isotópica de iones (³⁵Cl, ³⁵Cl; 100%) : (³⁵Cl, ³⁷Cl; 64.1%) : (³⁷Cl, ³⁷Cl; 7.3%) ≈ 9:6:1. Muestra AFb-2..... 96

Figura 26. **A.** Espectro MS del ion [M+H]⁺ de DIC-3, C₁₄H₁₀O₃NCl₂, energizado y fragmentado en la HCD (N₂, 20 eV) y registro de sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de DIC-3, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (*m/z*) en donde se detecta la molécula protonada [M + H]⁺ de DIC-3 y la distribución isotópica de iones (³⁵Cl, ³⁵Cl; 100%) : (³⁵Cl, ³⁷Cl; 62,3%) : (³⁷Cl, ³⁷Cl; 11.3%) ≈ 9:6:1. Muestra AFb-5. 98

Figura 27. **A.** Espectro *full* MS de DIC-4, C₁₃H₉O₂NCl₂; **B.** Espectro MS del ion [M + H]⁺ de DCF-4, energizado y fragmentado en la HCD (N₂, 50 eV) y registro de sus iones-producto; **C.** Espectro *full* MS de DIC-4, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (*m/z*) en donde se detecta la molécula protonada [M + H]⁺ de DCF-4 y la relación isotópica de iones (³⁵Cl, ³⁵Cl; 100%) : (³⁵Cl, ³⁷Cl; 64.1%) : (³⁷Cl, ³⁷Cl; 7.3%) ≈ 9:6:1. Muestra AFb-5..... 99

Figura 28. **A.** Espectro *full* MS de DIC-5, C₁₃H₉O₂NCl₂; **B.** Espectro MS del ion [M + H]⁺ de DCF-5, energizado y fragmentado en la HCD (N₂, 30 eV) y registro de sus iones-producto; **C.** Espectro *full* MS de DIC-5, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (*m/z*) en donde se detecta la molécula protonada [M + H]⁺ de DCF-5 y la relación isotópica de iones (³⁵Cl, ³⁵Cl; 100%) : (³⁵Cl, ³⁷Cl; 64.4%) : (³⁷Cl, ³⁷Cl; 9.5%) ≈ 9:6:1. Muestra AFb-5..... 100

Figura 29. **A.** Espectro MS del ion [M+H]⁺ de DIC-6, C₁₄H₁₀O₃NCl₂, energizado y fragmentado en la HCD (N₂, 20 eV) y registro de sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de DIC-6, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (*m/z*) en donde se detecta la molécula

protonada $[M + H]^+$ de DIC-6 y la distribución isotópica de iones (^{35}Cl , ^{35}Cl ; 100%) : (^{35}Cl , ^{37}Cl ; 71,8%) : (^{37}Cl , ^{37}Cl ; 8.67%) \approx 9:6:1. Muestra AF-10..... 102

Figura 30. **A.** Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de DIC-7, $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{NCl}$, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 20 eV) y el registro de sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de DIC-7, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de DIC-7 y la distribución isotópica de iones (^{35}Cl , 100%) : (^{37}Cl ; 25.4%) \approx 3:1. Muestra AF-15. 103

Figura 31. **A.** Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de DIC, $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{NCl}_2$, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 20 eV) y el registro de sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de DIC, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de DIC y la distribución isotópica de iones (^{35}Cl , ^{35}Cl ; 100%) : (^{35}Cl , ^{37}Cl ; 63.7%) : (^{37}Cl , ^{37}Cl ; 10.4%) \approx 9:6:1. Muestra AF-5. 104

Figura 32. Variación de la cantidad de diclofenaco y sus metabolitos extraídos mediante SPE y análisis por UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS, en las muestras acuosas de los experimentos de interacción AF, AFb, APF y AP. **A.** DIC-1, **B.** DIC-2, **C.** DIC-3, **D.** DIC-4, **E.** DIC-5, **F.** DIC-6, **G.** DIC-7, **H.** DIC. 106

Figura 33. EIC obtenida mediante UHPLC-ESI^{+/+}-Orbitrap-HRMS para NAP y IBU y sus metabolitos obtenidos de los extractos de las muestras acuosas de las interacciones AF, AFb y APF mediante SPE. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la **Tabla 30**.... 107

Figura 34. Estructura molecular propuesta para los metabolitos de IBU y las estructuras de los fármacos AINE NAP e IBU..... 109

Figura 35. Patrón de fragmentación de naproxeno. Tomado con modificaciones de Zayed y col. (2013)..... 109

Figura 36. **A.** Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de NAP, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 20 eV) y sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de NAP, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de NAP y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 15%). Muestra AFb-5. 111

Figura 37. **A.** Espectro *full* MS de IBU, $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$; **B.** Espectro *full* MS de IBU, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula con el aducto de amonio $[M + \text{NH}_4]^+$ de IBU y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 15%); **C.** Espectro *full* MS de IBU, en la región de masas (m/z) en donde se detecta el ion de la

molécula con el aducto de sodio $[M + Na]^+$ de IBU y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 15%) Muestra AFb-5..... 112

Figura 38. **A.** Espectro MS del ion $[M+NH_4]^+$ de IBU-1, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 10 eV) y sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de IBU-1, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula con el aducto de amonio $[M +NH_4]^+$ de IBU-1 y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 14%). Muestra APF-10..... 113

Figura 39. **A.** Espectro MS del ion $[M-H]^-$ de IBU-2, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 10 eV) y sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de IBU-2, obtenido por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula con el aducto de amonio $[M-H]^-$ de IBU-2 y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 14%). Muestra APF-10..... 114

Figura 40. Variación de la cantidad de naproxeno, ibuprofeno y sus metabolitos extraídos mediante SPE y analizados por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS, en las muestras acuosas de los experimentos de interacción AF, AFb, APF y AP. **A.** NAP, **B.** IBU-1, **C.** IBU-2 y **D.** IBU..... 116

Lista de tablas

Tabla 1. Técnicas de remoción de sustancias anti-inflamatorias en aguas residuales.	34
Tabla 2. Reactivos, materiales y equipos empleados en la presente investigación	38
Tabla 3. Especificaciones de los compuestos de referencia de fármacos anti-inflamatorios y estándar interno.....	39
Tabla 4. Estructura molecular de los compuestos farmacéuticos de interés y algunas propiedades fisicoquímicas.	43
Tabla 5. Revisión bibliográfica de condiciones de extracción de fármacos anti-inflamatorios mediante extracción SPE.	44
Tabla 6. Condiciones preliminares para extracción SPE de los fármacos AINE en el medio acuoso	45
Tabla 7. Especificaciones de los soportes sólidos ensayados para la extracción SPE de los fármacos AINE.	47
Tabla 8. Pruebas de variables en la extracción en fase sólida de fármacos AINE en muestras acuosas, n=3.....	48
Tabla 9. Proceso de reconstitución de extractos SPE del experimento de interacción con los fármacos AINE.	54
Tabla 10. Estudios reportados para el análisis cromatográfico de fármacos AINE por HPLC/DAD.....	57
Tabla 11. Parámetros cromatográficos seleccionados para el análisis por HPLC/DAD de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos.	58
Tabla 12. Gradiente de elución del método por cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD) para el análisis de los fármacos AINE de interés.	58
Tabla 13. Tiempos de retención de los fármacos anti-inflamatorios bajo estudio, analizados por HPLC-DAD ($\lambda=205$ nm).	59
Tabla 14. Parámetros de eficiencia de separación cromatográfica por HPLC/DAD ($\lambda=205$ nm)	60
Tabla 15. Repetitividad de los tiempos de retención y áreas cromatográficas en el método desarrollado por HPLC/DAD para análisis de fármacos AINE ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).	62
Tabla 16. Reproducibilidad de los tiempos de retención y áreas cromatográficas en el método desarrollado por HPLC/DAD para análisis de fármacos AINE, por diferentes analistas.....	62

Tabla 17. Linealidad, sensibilidad, nivel mínimo de detección y cuantificación del método de análisis para los fármacos AINE por HPLC/DAD.	64
Tabla 18. Comparación de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE a pH 5 y 6, con los soportes sólidos: <i>Strata-X</i> , <i>Silicycle</i> y <i>Chromabond</i>	65
Tabla 19. Prueba de volumen de solvente de elución para la extracción SPE de los fármacos AINE en muestra acuosa.....	69
Tabla 20. Capacidad del volumen de carga en el soporte sólido Strata X, durante la extracción de fármacos AINE en agua.....	70
Tabla 21. Determinación de la reproducibilidad para la eficiencia de extracción de los fármacos AINE (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) mediante SPE.....	72
Tabla 22. Comparación de los valores de eficiencia de extracción obtenidos con la técnica SPE para los fármacos AINE (2, 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$).....	73
Tabla 23. Comparación de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE en agua TAP: sin estabilizante, con estabilizante (4 y 8 $\mu\text{g L}^{-1}$), y con proceso de esterilización en autoclave.....	75
Tabla 24. Eficiencia de extracción de los fármacos AINE (2, 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) en agua tipo I a pH 5 y 6 con el método SALLE.....	76
Tabla 25. Comparación de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE a pH=6 en tres niveles de concentración: 2, 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	77
Tabla 26. Parámetros de las curvas de calibración de los fármacos AINE, obtenidos por UHPLC-ESI ⁺ - <i>Orbitrap</i> -HRMS (Vcap = +3,5 kV).....	78
Tabla 27. Repetitividad de las áreas cromatográficas obtenidas mediante UHPLC-ESI ⁺ - <i>Orbitrap</i> -HRMS del material de referencia certificado de los fármacos AINE (10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$).	78
Tabla 28. Información cromatográfica y de espectrometría de masas obtenida por UHPLC-ESI ⁺ - <i>Orbitrap</i> -HRMS de piroxicam y sus metabolitos detectados en los extractos SPE de las muestras acuosas del experimento de interacción de fármacos AINE.....	83
Tabla 29. Información cromatográfica y de espectrometría de masas obtenida por UHPL-ESI ⁺ - <i>Q-Orbitrap</i> -HRMS de diclofenaco y sus metabolitos detectados en los extractos SPE de las muestras acuosas del experimento de interacción con los fármacos AINE.....	92
Tabla 30. Información cromatográfica y de espectrometría de masas obtenida por UHPLC-ESI ^{+/+} - <i>Q-Orbitrap</i> -HRMS de naproxeno, ibuprofeno y sus metabolitos detectados en los extractos	

SPE de las muestras acuosas del experimento de interacción de fármacos en orden de aparición.
..... 108

Lista de apéndices

Apéndice 1. Curva de calibración por HPLC para: A. Piroxicam; B. Naproxeno; C. Diclofenaco; D. Ibuprofeno.	134
Apéndice 2. Curva de calibración por UHPLC-ESI [±] -Q-Orbitrap-HRMS para: A. Piroxicam; B. Naproxeno; C. Diclofenaco; D. Ibuprofeno, determinado como [M+NH ₄] ⁺	135
Apéndice 3. A. Espectro MS del ion [M+H] ⁺ de PXM-1, energizado y fragmentado en la HCD (N ₂ , 20 eV) y sus iones-producto; B. Espectro full MS de PXM-1, obtenido por UHPLC-ESI [±] -Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (<i>m/z</i>) en donde se detecta la molécula protonada [M + H] ⁺ de PXM-1 y la distribución isotópica de iones (¹² C; 100%) y (¹³ C; 6%). Muestra AF-25.....	136

Glosario

AINE	Anti-inflamatorio no esteroideo
AT	<i>Agilent Technologies</i>
CA	California
CE	Contaminantes emergentes
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
COX	Ciclooxigenasa
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
d.i	Diámetro interno de la columna cromatográfica (mm)
EE.UU.	Estados Unidos de América
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (por ejemplo)
EIC	<i>Extracted Ion Current</i> (Corriente iónica extraída)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
eV	Electrónvoltio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
HCD	<i>High Collision Dissociation</i> (celda de disociación de alta energía)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography-Diode</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos)
IMS	<i>Institute for healthcare informatics</i>
IQVIA	<i>Quintiles e IMS Health, Inc.</i>
ISTD	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno)
K_{ow}	<i>n-Octanol/Water Partition Coefficient</i> (Coeficiente de partición <i>n</i> -Octanol/agua).
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida)
LC-MS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de masas)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
ONU	Organización de las Naciones Unidas
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
PCP	<i>Personal Care Products</i> (Productos de cuidado personal)
pKa	<i>(Negative base-10 logarithm of the acid dissociation constant)</i> Logaritmo de base 10 de la constante de disociación ácida
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenceno
PTAR	<i>Planta de Tratamiento de Aguas Residuales</i>
SALLE	<i>Salt assisted liquid-liquid extraction</i> (Extracción líquido-líquido asistida por sal)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
TAP	Agua potable
UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography- Electrospray Ionization- Quadrupole- High Resolution Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia-Ionización <i>Electrospray</i> -Cuadrupolo-Espectrometría de masas de alta resolución)
UIS	Universidad Industrial de Santander

Resumen

Título: Determinación de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos y sus metabolitos posterior a su interacción con la planta *Salvinia adnata* en el medio acuoso *

Autor: Stefhanny Carolina Luna Sanabria*

Palabras claves: AINE, SPE, UHPLC-ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, análisis de agua.

En Colombia, los medicamentos más consumidos son los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Algunos de estos compuestos pueden ingresar al medio ambiente a través de los efluentes del tratamiento de aguas residuales, que los transportan a las fuentes de abastecimiento, utilizados para el consumo o para el riego de cultivos agrícolas.

En este trabajo se evaluó la transformación de fármacos AINE (ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno y piroxicam) en medio acuoso durante su interacción con la planta *Salvinia adnata* (salvinaceae) durante 25 días, divididos en dos periodos: 1) absorción (15 días), y 2) excreción (10 días); y durante 25 días, se evaluó interacción de los AINE en solución con y sin exposición a la radiación natural.

La extracción de los AINE y sus metabolitos del agua se realizó mediante la extracción en fase sólida (SPE) con cartucho Strata X[®] (100 mg). Se obtuvieron eficiencias de extracción de 94-99%, con ajuste de muestra a pH 6, elución con metanol (12 mL) y sin saturación del cartucho en tres niveles de concentración (2, 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). El análisis de los extractos de SPE se realizó mediante UHPLC-ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS utilizando agua y metanol como fase móvil, ambos con ácido fórmico (0,1%) y formiato de amonio (5 mM) y con tensión capilar de interfaz ESI fijada en $\pm 3,5$ kV. Los metabolitos hidroxilados y los productos de degradación fotoquímica de los AINE fueron los principales compuestos detectados y semicuantificados en las muestras

acuosas analizadas. Este estudio podría ser útil para monitorear el proceso de captación y excreción de metabolitos en aguas contaminadas con fármacos AINE.

Abstract

Title: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites after their interaction with the *Salvinia adnata* plant in the aqueous medium*

Authors: Stefhanny Luna Sanabria*

Keywords: NSAID, SPE, UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS, water analysis.

In Colombia, the most frequently consumed drugs are non-steroidal anti-inflammatory medicines (NSAIDs). Some of these compounds can enter to the environment through wastewater treatment effluents, which transport them to supply sources, used for consumption or for irrigation of agricultural crops.

In this work, the transformation of NSAIDs compounds (ibuprofen, diclofenac, naproxen and piroxicam) was evaluated in the aqueous medium during their interaction with the *Salvinia adnata* (salvinaceae) plant for 25 days, divided into two periods: 1) up-take (15 days), and 2) excretion (10 days), and for 25 days, the interaction of NSAIDs in solution with and without exposure to natural sunlight was evaluated.

The extraction of the NSAIDs and their metabolites from the water was carried out using the solid-phase extraction (SPE) with Strata X[®] cartridge (100 mg). Extraction efficiencies of 94-99% were obtained, with sample adjustment at pH 6, elution with methanol (12 mL) and without cartridge saturation at three concentration levels (2, 10 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). The analysis of the SPE extracts was carried out by UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS using water and methanol as mobile phase, both with formic acid (0.1%) and ammonium formate (5 mM) and with ESI interface capillary voltage set at ± 3.5 kV. The hydroxylated metabolites and photochemical degradation product of the NSAIDs were the main compounds detected and semi-quantified in the aqueous

samples analyzed. This study could be useful to monitor the process of up-take and excretion of metabolites in water, contaminated with NSAIDs.

Introducción

El consumo de agua a nivel mundial está determinado mayoritariamente por la actividad agropecuaria que los países realizan. Según el informe de la ONU-Agua (WWAP) de 2019, con base en los datos de FAO-Aquastat, se estima que aproximadamente el 69% del consumo mundial promedio está destinado para la agricultura, y se espera que la demanda de agua continúe aumentando a un ritmo similar hasta el 2050, con un crecimiento del 20 al 30% del nivel actual de uso (Houngbo y col., 2019).

Una creciente degradación de los recursos hídricos y desabastecimiento de las reservas naturales de agua es inminente, en medio de la alta demanda, por lo cual se requiere la búsqueda de alternativas de reutilización, siendo las aguas residuales tratadas una de las principales soluciones (Licciardello y col., 2018), debido a la gran cantidad de nutrientes encontrados indispensables en la absorción elemental para las plantas (Dube y col., 2018; Ben Hassena y col., 2018), pero la presencia de contaminantes, denominados contaminantes emergentes (CE) hace inadecuada su reutilización. Los CE, son generalmente sustancias provenientes de la actividad humana, que tienen potencial amenaza para la salud y el medio ambiente. Entre los principales CE se encuentran los antibióticos y los anti-inflamatorios no esteroideos, AINE (Tejada y col., 2014).

Los AINE, son fármacos ampliamente usados debido a su capacidad antipirética y anti-inflamatoria. En el año 2020, el mercado para estos productos farmacéuticos fue de 48,2 mil millones de dólares (IMARC, 2021), mostrando que el incremento en el tamaño de su mercado tiene un factor directo en el consumo y posterior presencia de estos en el medio ambiente, los cuales llegan a través de diferentes vías (*e.g.*, fabricación, eliminación directa, efluentes

hospitalarios y, principalmente por plantas de tratamiento de aguas residuales, PTAR), y la subsecuente disposición en las aguas superficiales (Baker y col., 2013; Botero-Coy y col., 2018).

Los AINE se consideran compuestos persistentes, encontrándose en el rango de ng/L a µg/L en ríos, lagos y aguas potables en todo el mundo (Amos Sibeko y col., 2019; Rabiet y col., 2006). Debido a la presencia de estos contaminantes en el medio ambiente, en las últimas décadas, numerosos estudios acerca de métodos de remoción y degradación han sido desarrollados, entre ellos figuran, procesos oxidativos avanzados, filtración por membrana, uso de carbón activado, fotodegradación, biorreactores y combinación de ellos (Benner y col., 2008; Snyder y col., 2007). A pesar de la alta eficiencia y remoción que se puede alcanzar, estas estrategias no son ampliamente utilizadas, principalmente, por su alto costo. En consecuencia, existe la creciente necesidad de implementar procesos alternativos para tratamientos complementarios, que puedan mitigar estos contaminantes de los suelos y cuerpos de aguas, de manera eficiente y con costos de operación y mantenimiento más bajos (Dordio y col., 2013).

La fitorremediación es uno de los procesos que cada vez es más utilizado para proporcionar un tratamiento secundario a las aguas residuales, ya que se ha demostrado con éxito la disminución de la concentración de varios contaminantes (*e.g.*, metales pesados, colorantes, fármacos), con menos inversión respecto a las otras alternativas tecnológicas (Susarla y col., 2002; Zhang y col., 2010).

Estas metodologías evidencian la capacidad de las plantas para adsorber, absorber y metabolizar estos contaminantes, así como de liberar exudados por su raíz que mejoran la biotransformación y degradación microbiana de los compuestos orgánicos en las fuentes de agua (Dordio y col., 2013).

La planta *Salvinia adnata*, evidencia potencial uso en biorremediación (Dhir., 2009) y como indicador de calidad del agua de los humedales (Dhivya y col., 2016).

En el presente proyecto, se estudió el medio acuoso enriquecido con los AINE (diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam) que interactuó con la planta *Salvinia adnata*. Adicionalmente, también se plantearon controles correspondientes a las interacciones de los AINE en el medio acuoso con y sin exposición a la radiación natural del sol.

Los fármacos adicionados inicialmente y los metabolitos generados por las condiciones experimentales en el medio acuoso se aislaron con el método de extracción en fase sólida, SPE (Babić y col., 2010) y los extractos se analizaron por UHPLC-ESI- *Orbitrap*-MS.

1. Marco referencial.

1.1. Contaminantes emergentes.

Los contaminantes emergentes son compuestos considerados amenaza potencial para los ecosistemas ambientales, salud y seguridad humana, que actualmente no están cubiertos por las regulaciones de calidad del agua existentes (Farré y col., 2018; Field y col., 2006), que abarcan diversos tipos de moléculas como drogas de abuso, productos de cuidado personal (PCP) , hormonas, tensoactivos, productos farmacéuticos entre otros (Yan y col., 2010). Actualmente, son foco de interés científico por su potencial toxicológico o toxicidad crónica.

1.1.1. Productos farmacéuticos.

Es aquel producto de origen natural, semi-sintético o sintético, destinado como medicina de uso humano o veterinario que tiene un componente biológicamente activo para el tratamiento de enfermedades (Clive y col., 1998), que se administra bajo cierta dosificación y está sujeto a controles por la legislación del país de importación y exportación (Resolución 003619, 2013).

1.1.2. Anti-inflamatorio esteroideo

Son corticoides naturales (hormonas producidas por la corteza adrenal) o semisintéticos análogos estructuralmente. Los esteroides sintéticos más usados son la dexametasona, prednisona, entre otros usados generalmente como inmunodepresores o antialergenicos (Ingianna 1963).

1.1.3. Anti-inflamatorio no esteroideo.

Son un grupo variado químicamente heterogéneo de fármacos compuesto principalmente por anti-inflamatorios, antipiréticos y analgésicos que reducen la inflamación, fiebre y dolor. Los AINE inhiben la actividad de la ciclooxigenasa (COX o PGH sintetasa) y sus dos isoformas

diferentes: COX-1 (enzima constitutiva, *e.g.*, control del flujo vascular) y COX-2 (se sintetiza en determinadas células inflamatorias como neutrófilos). Los AINE de mayor consumo generalmente no muestran selectividad de inhibición entre las dos isoformas, por lo cual son comercializados libremente (Clive y col., 1998).

En algunos países de América Latina, según un estudio realizado por IQVIA (*Quintiles e IMS Health, Inc*), actualmente existen 204 categorías de analgésicos que poseen como componente principal uno de los tres fármacos (acetaminofén, aspirina o ibuprofeno) siendo las ventas de ibuprofeno tres veces más altas en comparación con las de otros dos fármacos (Quintiles and IMS Health, 2018).

En Colombia, la venta durante los años 2016-2018 fue de más de 45 millones de unidades de analgésicos en sus diferentes presentaciones con estos principios activos, según datos proporcionados por el DANE, aunque también se evidencia la comercialización de antiinflamatorios como diclofenaco, naproxeno entre otros (Vianneth y col., 2013).

1.2. Presencia, persistencia de los AINE en el medio ambiente

Las concentraciones de los fármacos AINE en cuerpos de agua y plantas de tratamiento de aguas residuales se han registrado alrededor del mundo en el orden de ng/L a µg/L (Radović y col., 2014; Amos Sibeko y col., 2019; Paíga y col., 2016).

La Unión Europea considera a los AINE diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno entre otras sustancias farmacéuticas de alta prioridad en función de factores como: persistencia, aparición toxicidad, etc. (Sousa y col., 2018).

La persistencia, como medida cuantitativa se expresa en función la vida media de transformación para una sustancia química en el medio ambiente, estos cambios se pueden

atribuir a diversos procesos y combinación de ellos como: hidrólisis, biodegradación, fotólisis directa o indirecta y reacciones redox, los cuales dependen en gran medida de las condiciones ambientales (*e.g.* temperatura, pH, actividad de microorganismos y exposición a la radiación natural) (Bu, y col., 2016). Diversos estudios han reportado la persistencia de diclofenaco e ibuprofeno en fuentes de agua, en un rango de 8 a 30 y 4,6 a 32 días, respectivamente (Bu, y col., 2016), sin embargo, como la degradación depende de muchos factores, es inevitable observar variabilidad, en este mismo estudio, se reportó debido a procesos de fotólisis el menor tiempo de degradación para el diclofenaco en 0.008 días, y para el ibuprofeno bajo estas mismas condiciones, se observó su persistencia hasta de 413 días (Yamamoto y col., 2009). Para el naproxeno el rango de vida media estuvo entre 9,6 a 18,5 días en el agua de lagos y embalses, y la información de vida media más alta estuvo en 27 días en ríos (Araujo y col., 2011).

1.3. Procesos de degradación y transformación de fármacos en el medio acuoso.

Las transformaciones en el medio ambiente se producen por múltiples factores como: fotólisis directa o indirecta, biodegradación, hidrólisis, y reacciones redox, las cuales a su vez dependen de condiciones ambientales. Como se sabe estos procesos no ocurren de manera aislada, sino están ocurriendo de manera simultánea en el medio ambiente (Bu, y col., 2016).

En las aguas superficiales, los contaminantes pueden ser susceptibles a degradación fotoquímica de manera directa (absorción de radiación por la molécula) o por múltiples vías indirectas que incluyen reacciones con oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), radicales peroxi ($\bullet\text{OOR}$), reacciones con materia orgánica y otras especies reactivas (Moore y Chappuis, 1988; Zepp y col., 1981; Zepp y col., 1987).

En procesos de biodegradación, las principales acciones reportadas se encuentran para microorganismos, hongos y plantas (Stylianou y col., 2018; Moreira y col., 2018; Marco-urrea y col., 2010; Klampfl., 2019) Las principales transformaciones de metabolización que ocurren mediante este mecanismo son procesos de oxidación, hidroxilación, pérdida del grupo funcional ácido carboxílico y la conjugación del fármaco con hexosas, ácido malónico, ácido glutámico, entre otras (Stylianou y col., 2018; Lu y col., 2019; Fu y col., 2017).

1.4. Impacto ambiental de los fármacos AINE en el medio acuoso.

La preocupación por la presencia de los fármacos AINE en el medio acuoso se evidencia en la literatura desde la década de 1990. En numerosos estudios se ha informado la presencia de estos compuestos y sus metabolitos en los efluentes de tratamiento de aguas residuales (Nakada y col., 2005; Tauxe-Wuersch y col., 2005), que son los principales transportadores hacia fuentes receptoras como lagos, ríos, acuíferos subterráneos que se utilizan para el suministro de aguas para consumo y riego (Heberer, 2002; Mompelat y col., 2009).

Estos compuestos con actividad biológica y asociados con una alta estabilidad implican un potencial impacto en la biota acuática. Según estudios realizados por Ginebreda (2009), la afectación de comunidades de diatomeas e invertebrados bentónicos (*Chironomus* spp., *Tubifex tubifex* y *Daphnia magna*) en ríos del noreste de España, es notoria, en donde se encontró el ibuprofeno en concentraciones de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ginebreda y col., 2009). Así como en un estudio realizado sobre los efectos de diclofenaco sobre trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), provocados por la exposición prolongada en concentraciones de $1\text{-}50 \mu\text{g L}^{-1}$ durante 28 días, se evidenció la degeneración de células epiteliales, aparición de nefritis intersticial en branquias y acumulación en el hígado, riñón y tejido muscular, así como un deterioro en el estado de salud de

los peces (Schwaiger y col., 2004). También, se realizó un estudio de bioacumulación de ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco en la bilis de peces silvestres capturados aguas abajo de una planta de tratamiento de aguas residuales en Finlandia, y las concentraciones estuvieron entre 15 y 34 ng mL⁻¹, 6–103 ng mL⁻¹ y 6–148 ng mL⁻¹, respectivamente (Brozinski et al., 2013).

1.5. Sistemas biológicos acuáticos.

Los humedales han demostrado un potencial en la mitigación de CE y se destacan como alternativa eficiente de bajo costo, que proporciona una zona de transición controlada entre los ecosistemas terrestres y acuáticos (Dordio y col., 2008).

El uso de macrófitas flotantes de rápido crecimiento, *e.g.*, *Eichhornia crassipes* (jacinto de agua), *Lemna* spp. (Lenteja de agua), *Spirodella* spp., se asocia con el tratamiento secundario de efluentes de aguas residuales, así como de eliminación de contaminantes puntuales, *e.g.*, antibióticos, herbicidas, policlorados y fármacos (Dordio y col., 2011; Matamoros y col., 2012).

1.5.1. *Salvinia adnata*

Figura 1. *Salvinia adnata*. Foto tomada por la autora el 11 enero 2020, CENIVAM -UIS.



Salvinia adnata (**Figura 1**), también conocida como *Salvinia molesta* (Pérez-Consuegra y col., 2017), es un helecho flotante acuático, considerado especie invasora, perteneciente a la familia Salvinaceae, con un amplio potencial en fitorremediación (Dhir 2009). En la industria de la producción de biodiesel, la extracción en peso muerto obtuvo un rendimiento de 19.97% (Mubarak y col., 2016).

En los sistemas de tratamiento de aguas, estas plantas flotantes se han utilizado en el estanque de maduración para mejorar los efluentes de los estanques de estabilización en tratamientos secundarios del efluente primario de aguas residuales (Ng y Chang., 2017). Sin embargo, la adsorción de los fármacos AINE y de sus metabolitos en el medio acuoso no han sido evaluada en esta planta.

1.6. Método de extracción y análisis para la identificación de los AINE y sus metabolitos en el medio acuoso.

La determinación de anti-inflamatorios en matrices acuosas presenta un problema que se origina en la diversidad de sustancias químicas y la baja concentración (trazas), en las que normalmente se encuentran estos compuestos, además de las interferencias que dificultan su identificación y cuantificación.

1.6.1. Técnicas de extracción.

Entre las alternativas para solucionar estas dificultades en el proceso de detección, está el pretratamiento de la muestra, que asegura la concentración y purificación de los compuestos de interés que estén presentes en la matriz. SPE es una técnica utilizada ampliamente en la química ambiental para el aislamiento y concentración de compuestos orgánicos en soluciones acuosas.

Su principio se basa en la adsorción o la absorción de ciertos compuestos orgánicos en algún soporte sólido inorgánico u orgánico, que se selecciona, según la naturaleza de la interacción analito-soporte durante el proceso de extracción; SPE puede ser acoplada a diferentes técnicas de análisis, especialmente, cromatografía líquida (Fontanals y col., 2010).

La ventaja de esta técnica consiste en que se pueden pasar volúmenes grandes de muestra (*e.g.* 1L), para concentrar los compuestos de interés en el sorbente, además de la utilización de poco solvente en la elución de los analitos, lo que disminuye su costo, en comparación con la técnica “clásica” de extracción líquido – líquido (Das y col., 2012).

Sin embargo, para la extracción de compuestos orgánicos también se ha reportado la implementación de la técnica de extracción líquido-líquido, con la variante de agregar sal, que permite obtener porcentajes de recuperación de los compuestos superior al 80% (Noche y col., 2011).

1.6.2. Método de análisis instrumental

La cromatografía es esencialmente un método físico de separación de los componentes de una mezcla. La distribución en dos fases, una móvil y una estacionaria permite que, dependiendo de la naturaleza química de los componentes y algunas propiedades fisicoquímicas, suceda la elución de la columna a diferentes tiempos de retención (Poole y Poole., 1991).

La cromatografía líquida (LC) debe su nombre a la naturaleza de la fase móvil empleada en el método. Esta fase puede prepararse haciendo uso de una mezcla de diferentes solventes que son escogidos de acuerdo con la naturaleza de los componentes de la mezcla y la columna cromatográfica. La composición de la fase móvil puede mantenerse constante (modo isocrático) o variarse (modo gradiente) durante el análisis. La muestra previamente preparada es llevada al

puerto de inyección, donde se eluye con la fase móvil para ingresar a la columna cromatográfica, en donde los componentes de la muestra se distribuyen entre las dos fases (móvil y estacionaria), separándose en bandas cromatográficas, que eluyen de la columna en orden creciente de factor de retención de las sustancias que componen la mezcla (Robert., 2003; Niessen., 1999).

Algunos detectores usados en LC son arreglo de diodos (DAD), UV-Vis (ultravioleta visible), ya que permiten el análisis de moléculas de baja volatilidad, con electrones π en sus estructuras que, al ser excitados por la radiación ultravioleta, absorben a longitudes de onda específicas, generando una respuesta en el detector, proporcional a la concentración de la sustancia analizada *e.g.*, fármacos (Huber y col., 2009; Iuliani y col., 2010; Payán y col., 2011).

La técnica de cromatografía líquida acoplada a detectores de masas (LC-MS), como cromatografía líquida de ultra-alta resolución, UHPLC- MS, utiliza diversas interfaz para la generación de los iones en fase gaseosa, una de las más utilizadas es ionización por *electrospray* (ESI), que se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de métodos de análisis para matrices complejas de multi-residuos farmacológicos (Guillarme y col., 2010; Aristizabal-Ciro y col., 2017).

Cuando la investigación es dirigida a la identificación de metabolitos formados en los diferentes procesos de transformación del fármaco original, se usan detectores de masas, MS de alta resolución como *Orbitrap*- MS y configuraciones tándem, debido a su alta especificidad y sensibilidad (Herklotz y col., 2010; Pietrini y col., 2015).

2. Antecedentes

Con el objetivo de analizar el estado actual de las investigaciones sobre la presencia de AINE en el medio ambiente, técnicas de extracción y metodologías de análisis, se realizó un estudio de los antecedentes en la producción científica existente utilizando las bases de datos *Elsevier (Scopus)* y *Web of Science*

2.1 AINE en el medio ambiente

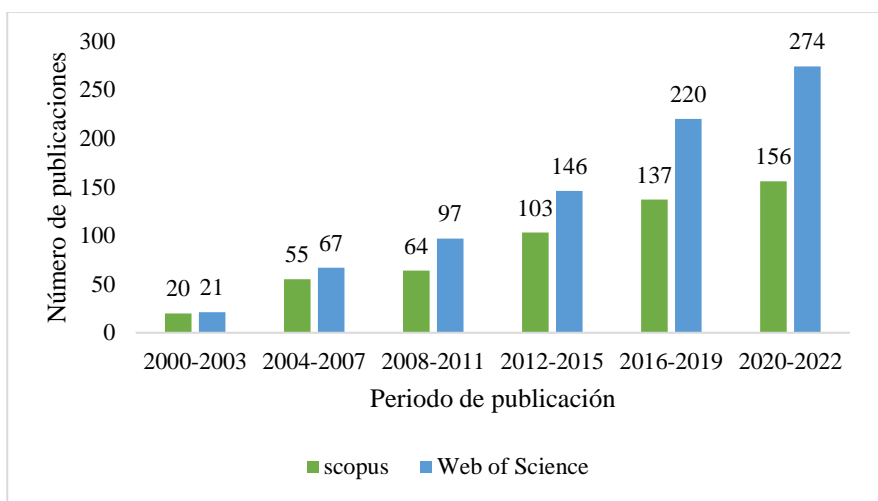
Los estudios sobre la presencia de los AINE en el medio ambiente han sido desarrollados principalmente en Estados Unidos, China, Reino Unido e India, centrandose las investigaciones en el área de medicina, ciencias del medio ambiente, química, farmacología, toxicología y bioquímica en editoriales especializadas como *Elsevier*, *Springer Nature*, *Wiley*, *MDPI*, *Taylor & Francis* entre otras. En la

Figura 2, se presenta un resumen comparativo del número de publicaciones sobre la presencia de los AINE en el medio ambiente. El interés en la investigación por estos compuestos ha ido en aumento, con una tendencia casi exponencial, debido al registro de estos contaminantes en la biósfera.

Dentro de los productos farmacéuticos más consumidos a nivel mundial se encuentran los analgésicos, pertenecientes a los AINE: diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno y piroxicam. El consumo de productos farmacéuticos adquiridos ya sea por prescripción médica o de libre venta, es uno de los principales focos de atención puesto que los fármacos ingresan a las aguas superficiales y al medio ambiente por varias rutas, que incluyen la excreción humana o animal, efluentes de aguas residuales, lodos de depuración y desechos antropogénicos, que son encontrados eventualmente en aguas superficiales (Petrović y col., 2003; Botero-Coy y col.,

2018; Moreno-González y col., 2014; Murray y col., 2010), en concentraciones del orden de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 2. Relación del número de publicaciones por año. Período de observación: 2000 al 2022. Palabras clave: “NSAIDs & environment”. Bases de datos: Scopus (Elsevier) y Web of Science . Fecha de consulta: 10 de septiembre del 2022.



2.2. Procesos de tratamiento para remoción de AINE

El tratamiento precario y poco eficiente que reciben las aguas residuales a nivel mundial es objeto de preocupación y la reutilización de estas aguas es vital para cubrir la demanda de consumo del recurso hídrico. Por lo cual, el desarrollo y el uso de metodologías que permitan la extracción, eliminación y análisis de estos compuestos farmacéuticos en los cuerpos de agua de manera confiable son muy importantes (Lavén y col., 2009).

La remoción de sustancias anti-inflamatorias se ha realizado bajo diferentes técnicas: oxidación electroquímica, procesos de coagulación-floculación y principalmente extracción en

fase sólida (SPE), a escala laboratorio. En la **Tabla 1**, se observan algunas de las metodologías implementadas para la eliminación de diferentes productos farmacéuticos en aguas

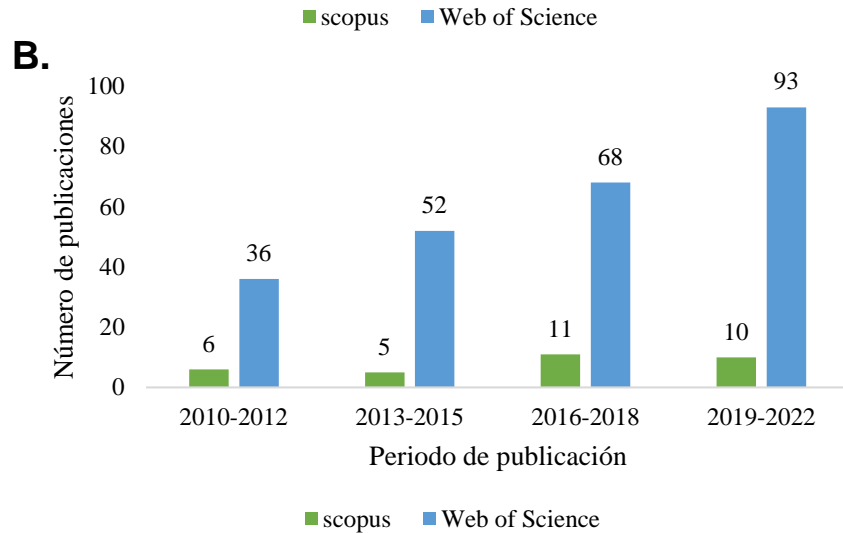
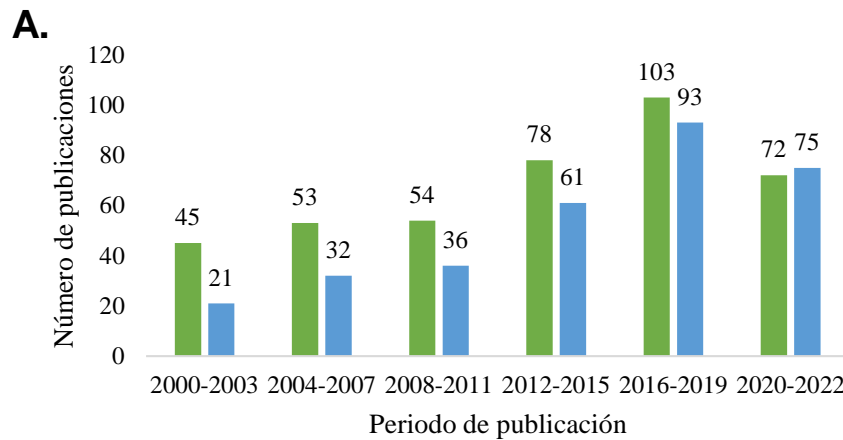
Tabla 1. Técnicas de remoción de sustancias anti-inflamatorias en aguas residuales.

Compuestos analizados	Técnica de extracción	Referencias
AINE, estatinas y el agente antibacteriano triclosán.	SPE	Lee y col., 2003
AINE, genfibrozil, carbamazepina, β -bloqueadores, trimetoprima y triclosán.	SPE	Paxéus, 2004
AINE y antibióticos	Oxidación electroquímica	Weichgrebe y col., 2004
PCP, antidepresivos y AINE	Procesos fisicoquímicos, coagulación-floculación y flotación	Carballa y col., 2005
AINE, antisépticos fenólicos, productos farmacéuticos de amida, disruptores endocrinos fenólicos y estrógenos naturales	SPE	Nakada y col., 2006
Estaminas y AINE	SPE impreso molecularmente	Zorita y col., 2008
AINE	SPE	Larsson y col., 2009

2.3. Metodologías de análisis de los fármacos AINE mediante HPLC y UHPLC

Con base en el análisis de antecedentes sobre la determinación de AINE por HPLC y UHPLC, se observó un número relativamente alto de publicaciones en los últimos 22 años sobre estudios que emplean la técnica HPLC para el análisis de los AINE. Las áreas destacadas en el desarrollo de las investigaciones son: farmacología, química, bioquímica, medicina y medio ambiente. Y las publicaciones se realizan principalmente en revistas reconocidas a nivel mundial: *Elsevier*, *Springer Nature*, *Wiley* entre otras (**Figura 3A**). Mientras para el desarrollo del análisis por UHPLC solo se cuenta con publicaciones de los últimos 12 años y destacan las mismas áreas de investigación y revistas de publicación que con la implementación de HPLC (**Figura 3B**).

Figura 3. A. Relación del número de publicaciones por año. Período de observación 2000 al 2022. Palabras clave: “NSAIDs & HPLC”. Bases de datos: *Scopus (Elsevier)* y *Web of Science* . Fecha de consulta: 10 de septiembre del 2022. **B.** Relación del número de publicaciones por año. Período de observación 2000 al 2022. Palabras clave: “NSAIDs & UHPLC”. Bases de datos: *Scopus (Elsevier)* y *Web of Science* . Fecha de consulta: 10 de septiembre del 2022.



3. Objetivos

Objetivo general

Evaluar los anti-inflamatorios diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, piroxicam y sus posibles metabolitos de biotransformación en el medio acuoso como resultado de su interacción con la planta acuática *Salvinia adnata*, mediante la técnica de extracción SPE y análisis por cromatografía y espectrometría de masas.

Objetivo específicos

Determinar las condiciones de extracción de diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam en el medio acuoso, mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE).

Establecer las condiciones de análisis por cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas (Orbitrap) que permitan la identificación y cuantificación de los cuatro anti-inflamatorios no esteroideos y/o sus metabolitos respectivamente, de manera confiable.

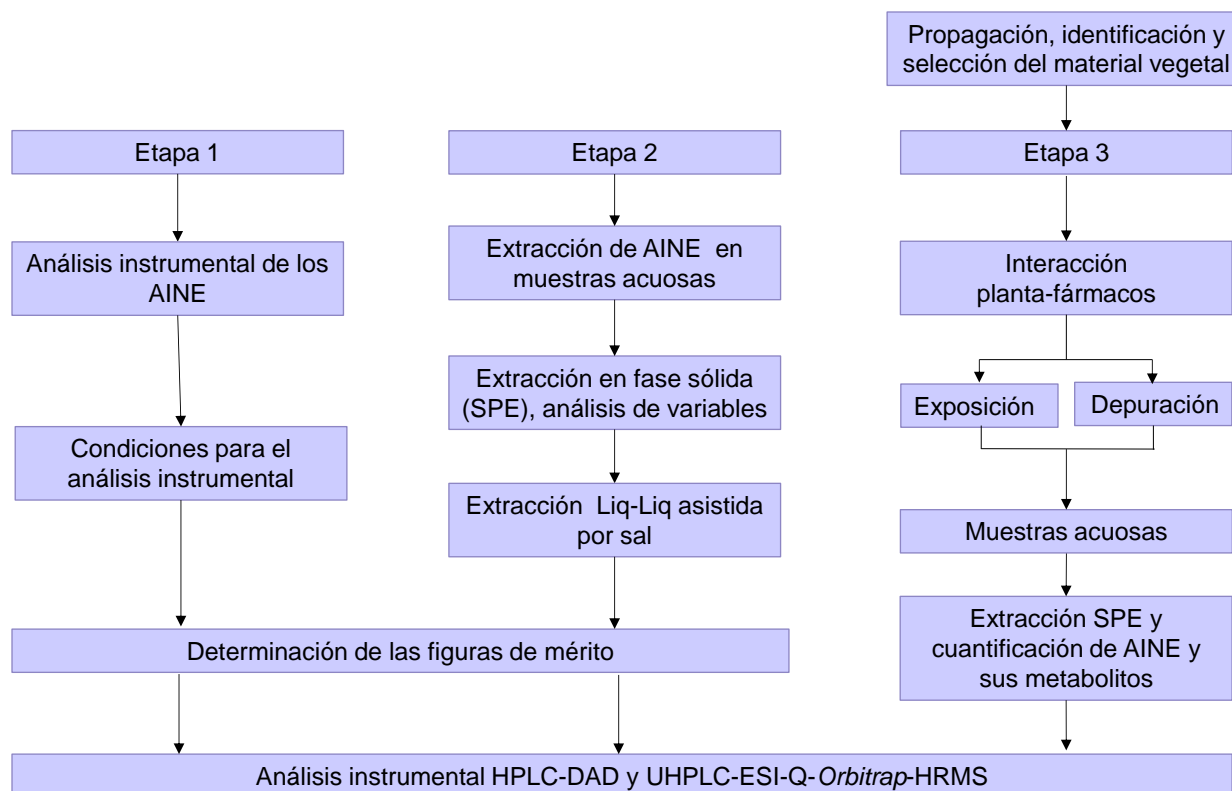
Establecer las figuras de mérito para el método de determinación de los fármacos diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam, en muestras acuosas.

Identificar y cuantificar algunos de los metabolitos producto de la interacción de la planta *Salvinia adnata* con diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam en el medio acuoso.

4. Metodología y desarrollo experimental

La metodología para el desarrollo de esta investigación se realizó en tres etapas, como se muestra en el siguiente esquema, véase **Figura 4**.

Figura 4. Metodología implementada en el desarrollo de la investigación.



4.1. Reactivos, materiales y equipos.

Los reactivos, materiales y equipos, empleados en este trabajo, se describen a continuación en la **Tabla 2**

Tabla 2. Reactivos, materiales y equipos empleados en la presente investigación

Producto	Especificaciones
Reactivos y solventes	
Acetato de etilo	Pureza: 99,8 % Grado HPLC; J.T. <i>Baker</i> (México, D.F., México).
Acetona	Pureza: 99,8 % Grado HPLC; Merck (Darmstadt, Alemania).
Acetonitrilo	Pureza: 99,8 % Grado HPLC; J.T. <i>Baker</i> (México, D.F., México).
Ácido clorhídrico	Pureza: 37 %; Grado ACS; Merck (Darmstadt, Alemania).
Ácido o - fosfórico	Pureza: 99 %; Grado ACS; Merck (Darmstadt, Alemania).
Metanol	Pureza: 99,8 % Grado HPLC; J.T. <i>Baker</i> (México, D.F., México).
Ácido ascórbico	Pureza: 99 % Grado reactivo: Merck
Material de laboratorio	
Tubos falcon®	15 mL
Tubos cónicos	Tubos cónicos de poli(propileno) de 1,5 mL de <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania).
Cartuchos Strata X	100 mg / 6 mL; <i>Phenomenex</i> (Torrance, CA).
Cartuchos <i>Silicycle</i>	500 mg / 6 mL; <i>Silicycle</i> (Quebec, Canadá).
Cartuchos <i>Chromabond</i>	100 mg / 1 mL;
Pipetas volumétricas	2,5,10 mL; <i>Scott</i> (Texas, EE. UU).
Balones aforados	1, 2, 5, 10, 25, 50, 250, 1000 mL;
Micropipetas	2-20, 25-250, 100-1000 µL; <i>Brand</i> (Wertheim, Alemania).
Embudos de decantación	250 mL
Filtros	filtros de papel franja negra de 150 mm de diámetro; <i>Munkell</i> grado 388 (Ahlstrom-Munksjö, Alemania) Filtros de membrana PVDF de 0,45 µm de Milipore (Sao pablo, Brasil)
Filtros de membrana	
Jeringas plásticas	2 y 5 mL;
Viales ámbar	2 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Melbourne, Australia)
Equipos de laboratorio	
Balanza analítica	<i>Mettler Toledo</i> AG285 (Nänicon, Suiza).
Potenciómetro	<i>Mettler Toledo</i> AL204 (Nänicon, Suiza).
Baño ultrasonido	LC-20H de <i>Ultrasonic</i> (Darmstadt, Alemania).
Agitador	minishaker, IKA <i>JKMS</i> (Hofheim, Alemania) <i>PL-325</i> , <i>Fisher Scientific</i>
Manta de agitación y calentamiento	<i>Magnetic stirrer MSH300</i> (Boeco, Alemania)
<i>Manifold</i>	<i>Baker Spe-24G</i> (J.T. <i>Baker</i> , Phillipsburg, NJ, EE. UU)
Autoclave	<i>ALL AMERICAM</i> Model 50X (Manitowc, EE. UU.)

4.1.2 Material de referencia.

En la **Tabla 3**, se reportan las especificaciones comerciales de las sustancias de referencias, que se emplearon en el estudio.

Tabla 3. Especificaciones de los compuestos de referencia de fármacos anti-inflamatorios y estándar interno

Compuesto	Referencia	Lote	Pureza, %	Proveedor
Diclofenaco	C12537500	G29008	99.2	Dr Ehrenstorfer
Ibuprofeno	C14278000	G976092	98.9	Dr Ehrenstorfer
Naproxeno	C15483500	G168852	99.6	Dr Ehrenstorfer
Piroxicam	DRE-C16278000	G1065671	99.6	Dr Ehrenstorfer
Difenilamina	8.20528.0100	S6861528507	99.0	Merk

4.2. Análisis por HPLC/DAD de los AINE.

El análisis cromatográfico preliminar se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC 1260 Series (Agilent Technologies (AT), Palo Alto, CA, EE. UU.), que consta de una unidad de desgasificación de solvente (G1379B), una bomba cuaternaria de gradiente (G1312A), un inyector automático de muestras (G1367B), y un termostato para la columna (G1316A). La separación se llevó a cabo en una columna *Gemini C₁₈* 100 mm x 4.6 mm d.i., x 5 µm de tamaño de partícula (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.). El procesamiento de los datos se realizó en el software *Agilent Chemstation LC*, Versión B.04.01 (**Figura 5**).

Figura 5. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies* 1260 Series.

Nota: Fotografía tomada por Stefhanny Luna en CENIVAM el 25 de marzo de 2021.



4.2.1. Selección de condiciones para el análisis cromatográfico por HPLC.

El análisis simultáneo de los fármacos anti-inflamatorios ibuprofeno (IBU), diclofenaco (DIC), naproxeno (NAP) y piroxicam (PXM), se desarrolló basado en diferentes artículos referencia.

4.2.2. Determinación de parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica por HPLC

Establecidas las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de los fármacos AINE estudiados, se calcularon los parámetros de eficiencia: factor de retención (k'), factor de selectividad (α), número de platos teóricos (N) y resolución (R_s) (Ecuaciones 1-4).

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0.5b}} \right)^2 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$\alpha = \frac{(t_{Rb} - t_M)}{(t_{Ra} - t_M)} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

$$R_s = \frac{1.18 (t_{Rb} - t_{Ra})}{(W_{0.5a} + W_{0.5b})} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Donde,

t_R = tiempo de retención del compuesto anti-inflamatorio de interés (min)

t_M = tiempo muerto (min)

$W_{0.5}$ = ancho de pico a la mitad de su altura máxima (min)

*Los subíndices a y b indican los picos cromatográficos correspondientes a dos sustancias diferentes.

4.2.3. Determinación de las figuras analíticas de mérito para HPLC.

Se determinaron las figuras analíticas de mérito: precisión (expresada como repetitividad), nivel mínimo detección (NMD) y cuantificación (NMC), linealidad y sensibilidad, según lo recomendado por las buenas prácticas de laboratorio. Para la determinación de estos parámetros se realizó una curva de calibración por el método de estandarización externa.

- **Solución stock:** se preparó una solución *stock* individual (5000 mg L^{-1} , 1 mL) de cada fármaco AINE (DIC, IBU, NAP) en metanol grado HPLC y para PXM se preparó en una mezcla de metanol:acetona (1:1 v/v)

- **Solución stock de la mix de los AINE:** Se preparó una solución *stock* de la mezcla de los AINE (IBU, NAP, DIC, PXM) de 100 mg L^{-1} en metanol grado HPLC a partir de las soluciones *stock* de 5000 mg L^{-1} .

- **Soluciones de trabajo:** se calcularon los volúmenes necesarios de solución *stock* para preparar soluciones con las siguientes concentraciones: 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 y $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, con un volumen final de 1 mL

- **Evaluación de la repetitividad del método para tiempos de retención (t_R) y áreas.** Los coeficientes de variación (CV) para el tiempo de retención y áreas permitieron evaluar la

repetitividad del método, esto se hizo en un punto de la curva de calibración, preparada diferentes analistas

$$CV, \% = \frac{\bar{X}}{S} * 100 \quad \text{(Ecuación 5)}$$

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 \dots X_n}{n} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{n=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Donde,

\bar{X} = promedio de los datos.

X_i = valor individual

n = número de datos

S = desviación estándar de los datos.

- Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método. La linealidad y sensibilidad se evaluaron al realizar una curva de calibración. La linealidad se determinó evaluando en el rango de concentraciones 0.1 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ en que la respuesta del detector es lineal, que evaluó el factor de respuesta en el rango de concentración. La sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%.

- Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y de cuantificación (NMC).

La determinación de los niveles se realizó con base en la recomendación del método UIPAC, usando las curvas de calibración individuales obtenidas del procesador de datos, para el nivel de detección se tomó tres veces el valor de $S_{y/x}$ y para el nivel de cuantificación como el doble del nivel de detección, es decir seis veces el valor de $S_{y/x}$.

$$NMD = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{m} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

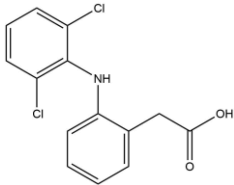
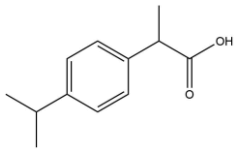
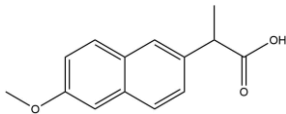
$$NMC = 2 * NMD \quad \text{(Ecuación 9)}$$

4.3. Extracción de los fármacos antiinflamatorios en muestras acuosas.

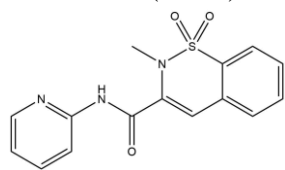
4.3.1. Extracción en fase sólida, SPE

Para la determinación de las mejores condiciones de extracción de los AINE en matrices acuosas, se consideraron las propiedades fisicoquímicas (**Tabla 4**) y se escogieron condiciones preliminares con base en lo reportado en la literatura (**Tabla 5** y **Tabla 6**), el acondicionamiento, solvente de elución y flujo.

Tabla 4. Estructura molecular de los compuestos farmacéuticos de interés y algunas propiedades fisicoquímicas.

Compuesto	Fórmula	Masa exacta	pKa	Solubilidad en agua (mg/L)	Log K _{ow}
Diclofenaco (DIC) 	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	295,01668	3,99 ^a	4,52 ^a	4,51 ^a
Ibuprofeno (IBU) 	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,13068	4,45 ^a	11,3 ^b	4,13 ^a
Naproxeno (NAP) 	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230,09429	4,15 ^a	15,9 ^b	3,18 ^c

Piroxicam (PXM)



C₁₅H₁₃N₃O₂S

299,07285

2,33^a
5,07^a

84,0^b

1.98^a

^a Avdeef (2001); ^b Yalkowsky y col., (2010); ^c Hansch y col., (1995)

Tabla 5. Revisión bibliográfica de condiciones de extracción de fármacos anti-inflamatorios mediante extracción SPE.

Compuesto (s)	Cartucho SPE	pH	Preparación del cartucho	Solvente y volumen de elución	Referencia
Ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco	<i>Strata X</i> (200 mg/ 3 mL) <i>Oasis MCX</i> (150 mg/ 6 mL)	2	Metanol (5 mL) agua tipo I (5 mL) agua tipo I (5 mL) a pH 2	Metanol (10 mL)	Paíga y col., (2017)
Ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco	<i>Strata X</i> (60 mg/ 3 mL)	2,6	Metanol (1.5 mL) agua a pH = 2.6 (1.5 mL)	Metanol (1,5 mL)	Kosjek y col., (2005)
Ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco	<i>Strata X</i> Si - C ₁₈	3,6	Acetona (5 mL) Metanol, 5 mL Agua tipo I (10 mL) pH = 3,6	Acetona (20 mL)	Patrolecco y col., (2013)
Diclofenaco	<i>Oasis HBL</i> 500 mg/3 mL	4 6 8 10	Metanol (10 mL) agua tipo I (3*5 mL)	Metanol (6 mL) Diclorometano (6 mL), acetato de etilo (6 mL) acetona (6 mL)	Zhang y col., (2007)
Ibuprofeno y diclofenaco	<i>Oasis HBL</i>	7,8	<i>n</i> -hexano (5 mL) acetato de etilo, (5 mL), metanol (10 mL), agua TAP 10 mL	agua destilada (5 mL)	Weigel y col., (2004)

Tabla 6. Condiciones preliminares para extracción SPE de los fármacos AINE en el medio acuoso

Parámetros	
Acondicionamiento	Metanol HPLC (3 mL), agua tipo I ajustada al pH de la muestra (3 mL)
Solvente de elución	Metanol
Flujo de elución	6 mL min ⁻¹

El procesamiento de las muestras para su extracción se realizó mediante en un *manifold*, *JT Baker Spe-24G*, como se muestra en la **Tabla 6**

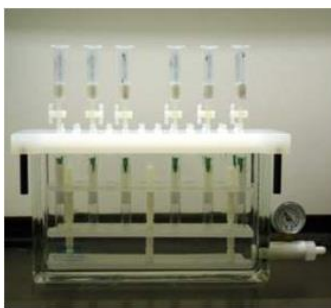
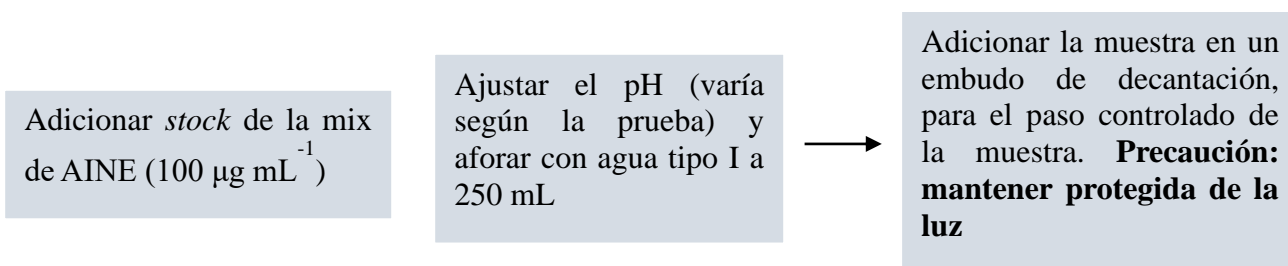


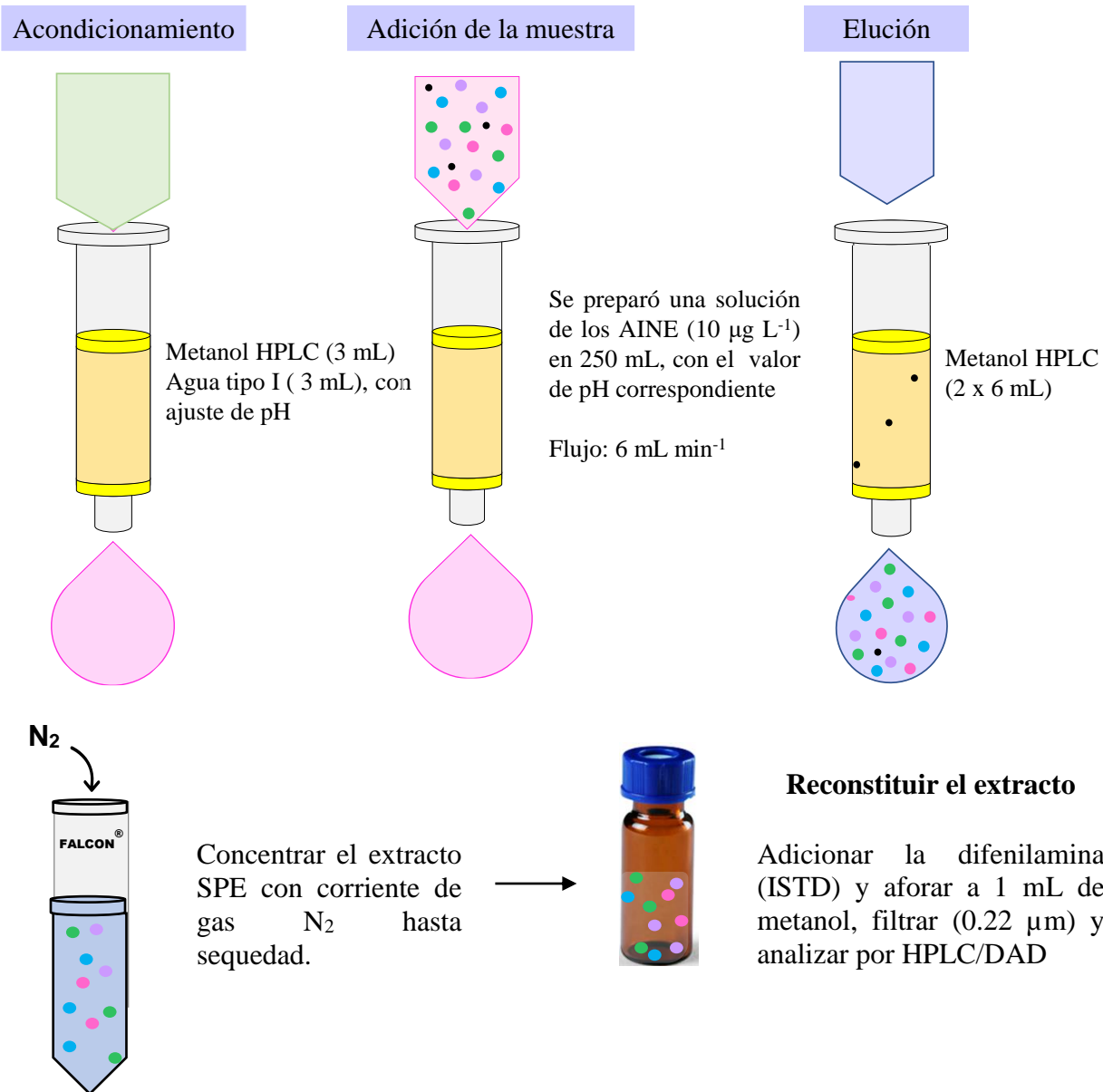
Figura 6. Equipo para extracción SPE, Baker Spe-24G (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU).

El procedimiento de extracción de los AINE en solución acuosa mediante extracción SPE se encuentra descrito de manera general en la **Figura 7**.

Preparación de la muestra



Extracción en SPE



Lavado del soporte sólido. Terminado el proceso de extracción de los AINE, el cartucho SPE se lavó bajo el siguiente procedimiento:

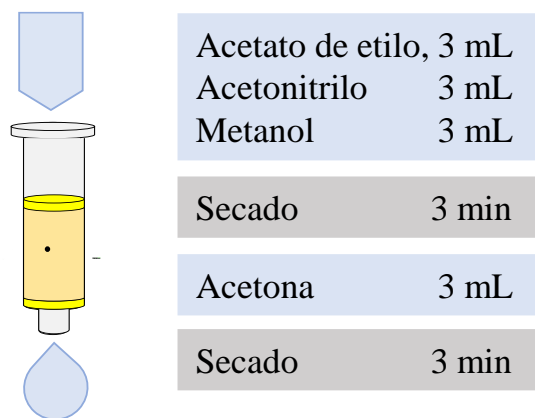


Figura 7. Diagrama del proceso de extracción de los AINE por SPE en muestras acuosas.

4.3.2. Pruebas de variables en la extracción en fase sólida de los fármacos AINE

Se evaluó la influencia en la extracción de los AINE de tres diferentes soportes sólidos (**Tabla 7**). Las pruebas de extracción SPE, se realizaron bajo el procedimiento descrito para el acondicionamiento y la extracción (**Figura 7**), ajustando el pH de las muestras en tres y seis.

Tabla 7. Especificaciones de los soportes sólidos ensayados para la extracción SPE de los fármacos AINE.

Cartucho SPE	Lote	Presentación	Tipo de relleno	Tamaño de partícula (µm)
<i>Strata X</i>	S300-185	100 mg/6 mL	Polímero base modificado con <i>N</i> -vinilpirrolidona	33
<i>Silicycle</i>	-	500 mg/ 6 mL	Gel de sílice modificada con octadecilo (17%)	40 - 63
<i>Chromabond</i>	28.113	100 mg/ 1 mL	SiOH, Florisil [®] , NH ₂ , CN	45

Con base en los resultados de eficiencia de extracción usando los cartuchos mencionados en los resultados (véase sección 4), se estableció que la mejor extracción se obtuvo usando el cartucho *Strata X*, por lo cual, las siguientes pruebas en las variables de pH, volumen de elución y

volumen de carga del cartucho solo se realizaron para este soporte sólido (**Tabla 8**). La eficiencia de extracción de los fármacos AINE, (%) fue la observable seleccionada.

Tabla 8. Pruebas de variables en la extracción en fase sólida de fármacos AINE en muestras acuosas, n=3

Variable	Niveles
pH	2, 3, 4, 5 y 6
Volumen de solvente de elución	6, 9 y 12 mL
Volumen de carga del cartucho	25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 y 250 mL

4.3.3. Figura analítica de mérito para el método de extracción.

- Determinación de la reproducibilidad del método de extracción.

La determinación de la reproducibilidad del método de extracción se realizó mediante la comparación de la eficiencia de extracción y coeficientes de variación de dos analistas en la extracción de muestras de agua tipo I enriquecidas con los AINE en $10\mu\text{g L}^{-1}$ por triplicado.

4.3.4 Comparación de eficiencia de matriz en diferentes matrices acuosas.

Establecidas las condiciones de extracción en agua tipo I, se realizaron pruebas por triplicado para determinar la eficiencia de extracción para tres concentraciones de los AINE en solución acuosa: 2, 10 y $100\mu\text{g L}^{-1}$ y pruebas de efecto matriz en agua potable en las mismas concentraciones y se comparó la eficiencia de extracción para las dos matrices (agua tipo 1 y agua potable, TAP).

Adicionalmente, se comparó la eficiencia de extracción de los AINE ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) en agua TAP con adición de ácido ascórbico (4 y $8 \mu\text{g L}^{-1}$) y en agua TAP esterilizada. El proceso para esterilización del agua se realizó como se muestra en la **Figura 8**.

Figura 8. Proceso de preparación de agua TAP esterilizada.



En un frasco de vidrio previamente esterilizado se adiciono agua TAP (1L)

El autoclave se ajustó y mantuvo en 120°C . Alcanzada la temperatura se adiciono la botella, durante 15 min con calentamiento constante, por último, se dejo enfriar a temperatura ambiente

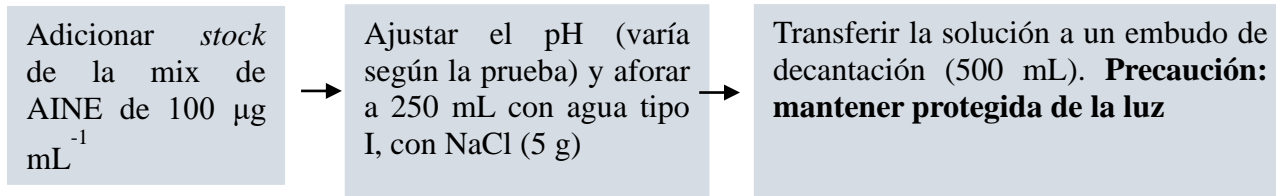
4.4 Extracción líquido-líquido asistida por sal.

La implementación de la técnica de extracción líquido-líquido asistida por sal (SALLE) se desarrolló con base en los estudios reportados Noche y col., (2011), con algunas modificaciones. Para las condiciones de extracción de fármacos anti-inflamatorios por medio de esta técnica, se plantearon pruebas para tres niveles de concentración: 2 , 10 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ en agua tipo I, usando acetato de etilo como solvente orgánico de extracción y se probó el $\text{pH}=5$ de extracción recomendado por el autor, junto con el establecido para la extracción SPE, $\text{pH}=6$. La metodología de extracción implementada para la SALLE se muestra en la

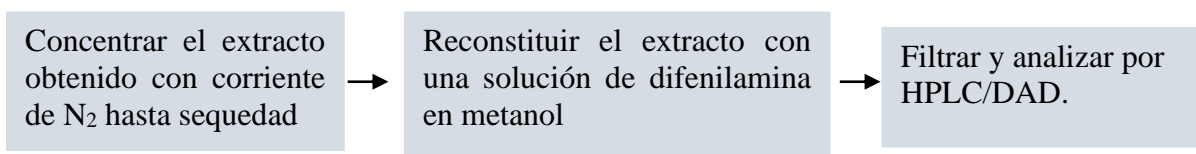
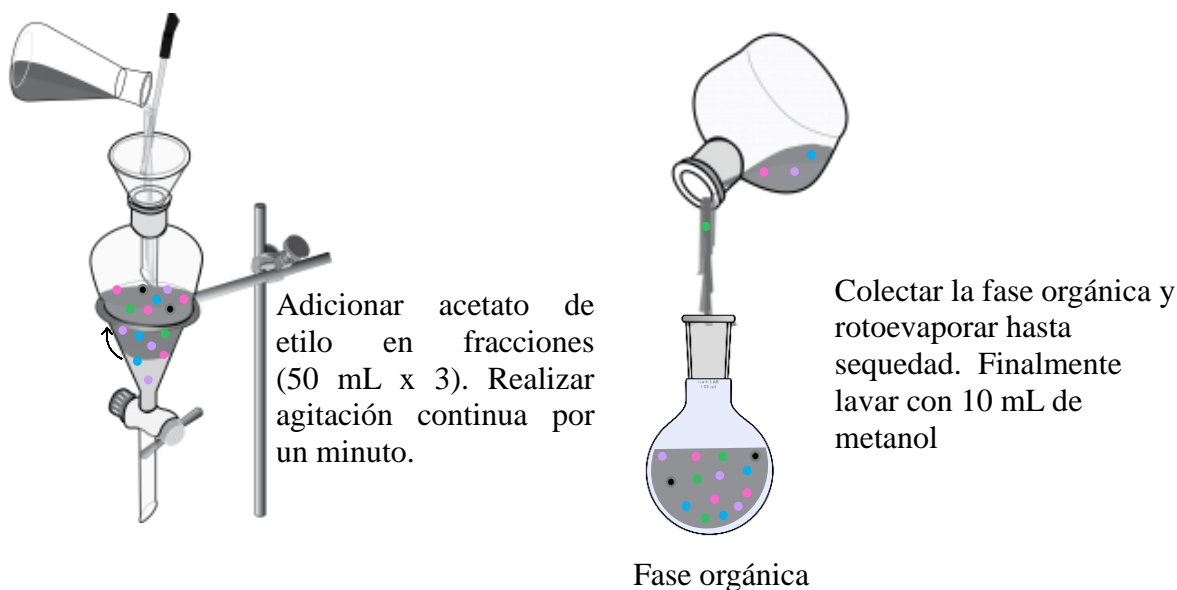
Figura 9.

Figura 9. Diagrama del procedimiento de extracción SALLE para los fármacos AINE en solución acuosa.

Preparación de la muestra



Extracción líquido-líquido asistida por sal (SALLE)



4.5 Comparación de eficiencia de extracción para las técnicas de extracción implementadas

Se realizó la comparación de la eficiencia de extracción de los AINE en agua tipo I, en concentraciones de 2, 10 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ a pH 6, obtenidos mediante SPE y SALLE.

4.6. Condiciones de análisis por LC-MS

El análisis de los fármacos AINE se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de ultra-alta resolución UHPLC, *VanquishTM* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), con

una bomba binaria de gradiente, una unidad de desgasificación, un inyector automático y compartimento de columna con control termostático. El auto muestreador con bandejas de 120 viales se mantuvo en 10°C y el compartimento de columna en 40°C. La separación cromatográfica se realizó en una columna *ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈* (Agilent Technologies, St. Louis, MO, EE. UU.) 50 mm L x 2,1 mm de d.i., tamaño de partícula de 1,8 µm). El caudal de la fase móvil que contenía agua (0.1% ácido fórmico, AF y 5 mM de formiato de amonio, FA) (A) y metanol (0.1% AF y 5 mM de FA) (B) fue de 300 µL min⁻¹. La condición de gradiente inicial fue 100% de A, cambio linealmente a 100% de B en ocho minutos y se mantuvo durante cuatro minutos, luego regresó a 100% de A en un minuto y se mantuvo durante siete minutos. El volumen de inyección fue de 2 µL.

El cromatógrafo líquido se acopló a un espectrómetro de masas *Q-Exactive Plus Orbitrap* (Thermo Scientific, Bremen, Alemania) con una fuente de ionización por electronebulización termostática (HESI-II) operada en modo de iones positivos y negativos. El voltaje de capilar se evaluó en 3.5 kV. La temperatura del nebulizador se fijó en 350 °C; la temperatura del capilar de 320 °C; el gas envolvente y auxiliar (N₂) se ajustaron en 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. El nitrógeno (> 99%) se obtuvo de un generador NM32LA (Peak Scientific, Escocia, Reino Unido). En el modo *Full Scan*, para modo de adquisición de iones positivo y negativo la resolución del *Orbitrap-MS* se estableció en 70000 (*full-width-at-half-maximum*, en *m/z* 100, R_{FWHM}); el control automático de ganancia (AGC) fue de 3x10⁶; el tiempo de inyección al *C-trap* fue de 200 ms y el rango de masas fue de *m/z* 70-1000. Las moléculas protonadas y deprotonadas se fragmentaron en la celda de colisiones activada (HDC) con energías de 10 y 20 eV. Los espectros de masas se registraron el modo de AIF (*all-ion fragmentation*) para cada energía de colisión, a una resolución de 35000, AGC de 3x10⁵; tiempo de inyección al *C-trap* fue

50 ms y rango de masas de m/z 70-1000. La calibración del espectrómetro de masas se realizó utilizando una solución de calibración de iones positivos y negativos *Pierce LTQ Velos ESI* (*Thermo Scientific*, Rockford, IL, EE. UU.). Los datos obtenidos se analizaron usando el software *Thermo Xcalibur 3.1* (*Thermo Scientific*, San José, CA, EE. UU.)

4.7 Procedimiento de preparación del experimento de interacción de los fármacos AINE en medio acuoso.

4.7.1. Identificación y propagación del material vegetal.

La adquisición de la planta *Salvinia adnata* Desv. se realizó en el mercado nacional. La identificación botánica del material vegetal con número de *voucher* 20888 se llevó a cabo en el Herbario de la Universidad Industrial de Santander - UIS (campus central, Bucaramanga). El proceso de propagación se realizó en un reservorio artificial en condiciones ambientales ubicado en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigación para la Agro Industrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales tropicales (CENIVAM), ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander – UIS (Bucaramanga – Colombia).

4.7.2. Preparación de material vegetal y reservorios de vidrio

Los especímenes adultos de peso $10 \pm 0,5$ g y raíces de $15 \pm 0,5$ cm, se seleccionaron del reservorio artificial ubicado en CENIVAM. Las hojas y raíces de la planta se lavaron cuidadosamente para evitar cortes y se acondicionaron en un recipiente de plástico con agua TAP, durante el periodo de la preparación de las soluciones con los AINE para las muestras.

Los reservorios de vidrio donde se realizó el experimento fueron previamente lavados con una solución de Extran®, luego se mantuvieron en mezcla sulfocrómica durante 12 horas,

finalmente se lavaron con abundante agua, se secaron y almacenaron hasta el día del montaje experimental. Los reservorios para las muestras AFb que fueron forradas en el exterior con plástico negro y tapadas con papel aluminio para evitar el ingreso de luz e interferencias del medio ambiente.

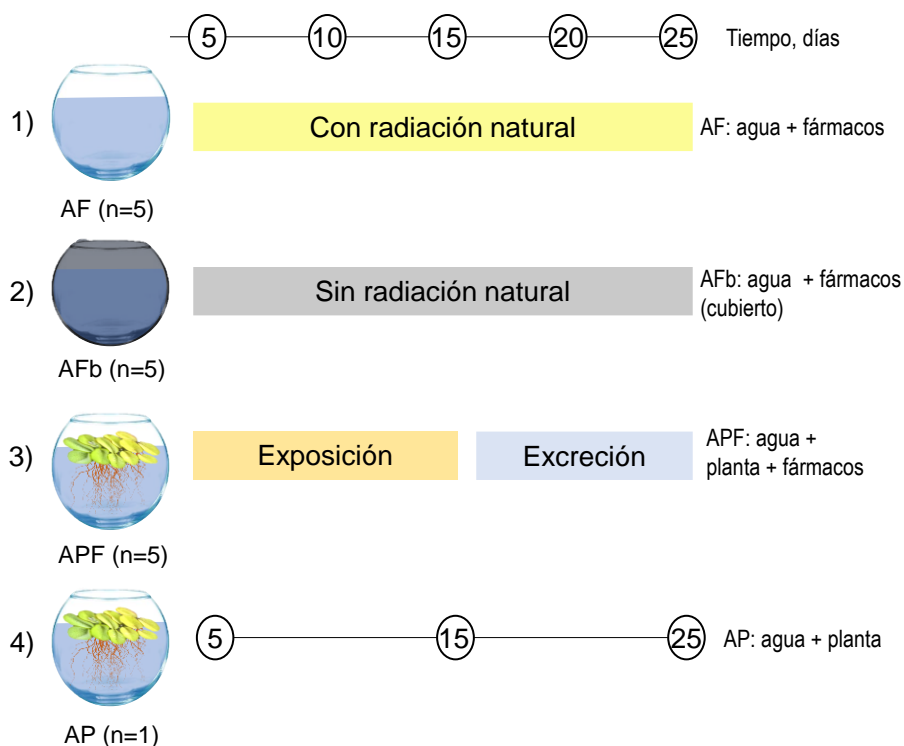
4.7.3. Preparación de la solución acuosa enriquecida para el experimento de interacción

A partir de una solución stock de la mix de los AINE (DIC, IBU, NAP y PXM) de 5000 mg L⁻¹, se adicionaron en los recipientes de vidrio 20 µL en 250 mL de agua TAP, la concentración en solución para los AINE es de 100 µg L⁻¹ para cada uno.

4.7.4. Experimento de interacción de los fármacos AINE en medio acuoso.

La determinación de los AINE y sus metabolitos, producto de la interacción en el medio acuoso (agua TAP), se realizó mediante el análisis comparativo en tres diferentes condiciones ambientales naturales en solución acuosa: 1) fotólisis (radiación natural), AF; 2) biodegradación en condiciones aerobias (oscuridad) AFb, usados como controles; 3) la interacción con la planta *Salvinia adnata*, APF y 4) la interacción de la planta en el medio acuático sin los fármacos con el fin de identificar el tiempo de degradación del compuesto precursor y la cantidad de los diferentes metabolitos en estas condiciones. El experimento se desarrolló durante 25 días y hubo muestreo cada cinco días. (**Figura 10**).

Figura 10. Esquema del experimento comparativo de interacción de los fármacos en medio acuoso.



4.7.5. Recolección y preparación de extractos

Las muestras de agua se colectaron en botellas ámbar cada 5 días hasta completar los 25 días del experimento, se filtraron (papel filtro franja negra de 150 mm de diámetro *Munkell* grado 388) y se ajustaron a pH=6, seguidamente se realizó la extracción de las muestras mediante la técnica SPE (**Figura 7**), y la reconstitución de las muestras se realizó como se muestra en la **Tabla 9**. La adición del estándar interno (ISTD) se realizó con una solución de difenilamina de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabla 9. Proceso de reconstitución de extractos SPE del experimento de interacción con los fármacos AINE.

Muestras	Días 5,10 y 15	Días 20 y 25
AF y AFb	Se reconstituye con 1 mL de H ₂ O: metanol LC-MS; 1:1, v/v, seguidamente se tomó una alícuota de 40 µL más 5 µL de la solución del ISTD y se afora a 1 mL (H ₂ O: metanol LC-MS; 1:1, v/v)	Se reconstituye con 1 mL de H ₂ O: metanol LC-MS; 1:1 y se toma una alícuota de 500 µL más 2,5 µL de la solución del ISTD
APF		Se reconstituye con 250 µL de H ₂ O: metanol LC-MS; 1:1 y se adicionan 1,5 µL de la solución del ISTD

Las muestras de blanco AP, se reconstituyeron con una solución de H₂O:metanol; 1:1 v/v (250 µL) y se adicionaron 1,5 µL de la solución del ISTD, todas las muestras se filtraron (PDVF, 0,22 µm) y se realizó el análisis por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS.

4.8. Identificación y cuantificación de los AINE y sus metabolitos por LC-MS

Los compuestos DIC, IBU, NAP, PXM se identificaron confirmatoriamente por medio del material de referencia certificado, comparación de los tiempos de retención, distribución isotópica, composición elemental y patrón de fragmentación. La identificación de los metabolitos producto de degradación provenientes de las interacciones estudiadas, se realizó de manera tentativa con base en los criterios de identificación, fórmula elemental, distribución isotópica patrón de fragmentación.

La cuantificación de los AINE se realizó por medio de una curva de calibración para los compuestos DIC, IBU, NAP y PXM en un rango de 0,1-1000 µg L⁻¹ (**Apéndice 2**), con adición de difenilamina (ISTD) en 20 µg L⁻¹ por el método de estandarización interna. La determinación de la cantidad de los AINE y los metabolitos en los extractos analizados se realizó mediante la siguiente formula:

$$\text{Cantidad } (\mu\text{g}) = \frac{\left(\frac{A_x}{A_{ISTD}} - b \right)}{m_x} * C_{ISTD} * F_d}{V_{final}}$$

Donde:

A_x : área del AINE o producto de degradación en el extracto

A_{ISTD} : área del estándar interno difenilamina

b : intercepto de curva de calibración del AINE analizado.

m_x : pendiente de la curva de calibración del AINE analizado.

C_{istd} : concentración del estándar interno, $20 \mu\text{g L}^{-1}$

F_d : factor de dilución (para las muestras de los días 5,10 y 15 es 25, y para los días 20 y 25 la muestra se concentró cuatro veces)

V_{final} : volumen de reconstitución del extracto SPE, (1000 μL)

La cuantificación de los metabolitos se expresó en μg equivalentes del compuesto anti-inflamatorio del cual se originó.

5. Resultados

5.1. Metodología de análisis para los AINE por HPLC/DAD.

Se realizó un estudio bibliográfico de metodologías para el análisis simultáneo de los compuestos de interés y se observó que generalmente la fase móvil empleada está compuesta por un sistema binario de solventes: fase acuosa (solvente A), de soluciones *buffer* de fosfato o en medio ácido con ácido *o*-fosfórico y la fase orgánica (solvente B) por metanol o acetonitrilo.

Algunas de las metodologías reportadas en la literatura y sus condiciones analíticas implementadas se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Estudios reportados para el análisis cromatográfico de fármacos AINE por HPLC/DAD.

Autores	Compuestos	Condiciones
Cunha y col., (2015)	Ibuprofeno	Fase móvil: acetonitrilo y 40 mmol L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ (pH= 7) modo gradiente Columna: C ₁₈ (250×4.6 mm ² , 5 m) de <i>Shimadzu</i> (Kyoto, Japón).
Madikizela y col., (2017)	Diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno	Fase móvil: acetonitrilo y 0.2 % ácido fórmico en agua, modo gradiente Columna: <i>Lichrospher C₁₈</i> HPLC (250 x 4.00 mm x 5 μm) Merck (Darmstadt, Alemania)
Ascar y col., (2013)	Diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno	Fase móvil: Acetonitrilo y KH ₂ PO ₄ en agua (pH= 4.2) modo isocrático, Columna: <i>Atlantis C₁₈</i> (250 mm × 4.6 mm x 5 μm)

Los parámetros operacionales implementados en el equipo HPLC/DAD, siguieron la metodología descrita por Ascar y col., (2013), y se aplicaron algunas modificaciones, como se describe en la **Tabla 11** y **Tabla 12**.

Tabla 11. Parámetros cromatográficos seleccionados para el análisis por HPLC/DAD de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos.

Parámetros	Especificaciones
Fase móvil	A. KH_2PO_4 , 5 mM en agua (pH=4,0) B. Acetonitrilo
Temperatura, °C	30
Flujo, mL/min	1
Longitud de onda, nm	205
Volumen de inyección de muestra, μL	20

La adecuada separación de cada uno de los compuestos se logró con el gradiente propuesto en la **Tabla 12.**

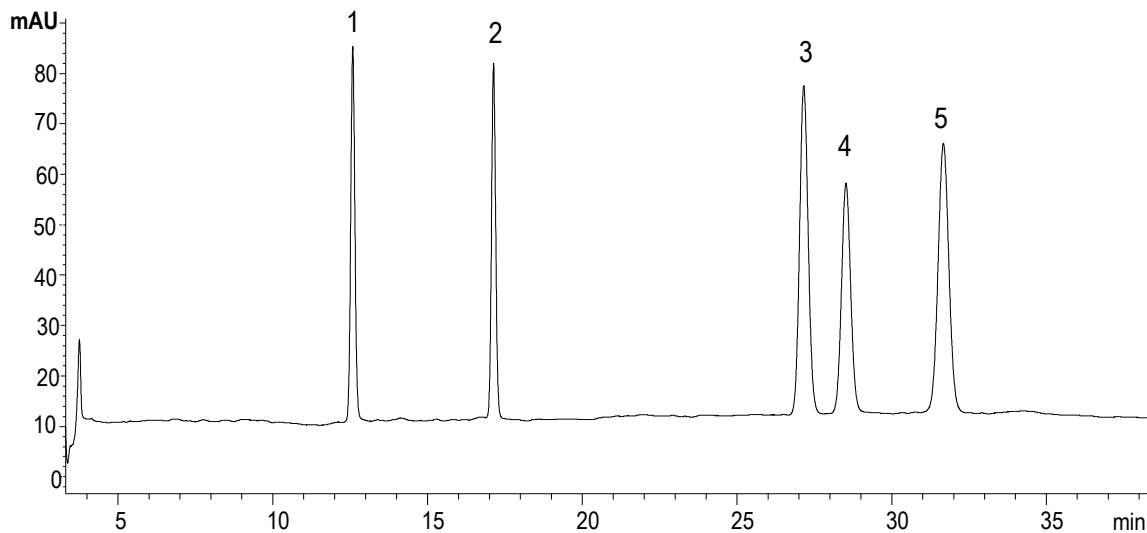
Tabla 12. Gradiente de elución del método por cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD) para el análisis de los fármacos AINE de interés.

Tiempo, min	KH_2PO_4 , 5 mM en agua (A, %)	Acetonitrilo, (B, %)
0	70	30
13	55	45
30	55	45
35	70	30
40	70	30

En la **Figura 11**, se muestra el perfil cromatográfico obtenido de la mezcla de anti-inflamatorios de referencia PXM, NAP, DIC, IBU y DFA (ISTD), en una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, obtenidos bajo las condiciones de análisis por HPLC/DAD especificadas en la **Tabla 11 y 12.**

Figura 11. Perfil cromatográfico del material de referencia certificado de los fármacos AINE analizados, obtenido por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD), en la columna Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm), longitud de onda 205

nm y el gradiente seleccionado. 1. Piroxicam (PXM), 2. Naproxeno (NAP), 3. Diclofenaco (DIC), 4. Ibuprofeno (IBU) 5. Difenilamina (DFA, ISTD).



Para cada uno de los fármacos AINE se determinó el tiempo de retención inyectando la mezcla de los estándares tres veces. Véase **Tabla 13**.

Tabla 13. Tiempos de retención de los fármacos anti-inflamatorios bajo estudio, analizados por HPLC-DAD ($\lambda=205$ nm).

Fármacos anti-inflamatorios	t_R , min \pm S (n = 3)
PXC	12,73 \pm 0,001
NAP	17,24 \pm 0,02
DIC	26,84 \pm 0,09
IBU	27,63 \pm 0,03
DFA (ISTD)	30,32 \pm 0,06

El tiempo de retención de un compuesto por cromatografía líquida de alta eficiencia está relacionado con su estructura química, por la afinidad con la fase estacionaria de la columna utilizada y la fase móvil empleada.

Así las diferentes interacciones (hidrofóbicas, puentes de hidrogeno, interacciones dipolares y electroestáticas) son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o por la fase estacionaria, de tal manera que el componente más afín con la fase estacionaria se retiene más y tarda más eluir, mientras que el componente más afín con la fase móvil se retiene menos y eluye antes (Quattrocchi y col., 1992).

En cromatografía líquida, la fase reversa es una de las más implementadas, y el orden de elución de las sustancias está condicionado por la menor constante de distribución correspondiente al compuesto con mayor carácter polar.

5.1.3. Parámetros de eficiencia de separación de los compuestos anti-inflamatorios por HPLC-DAD.

Se determinaron los parámetros de eficiencia de separación para los cuatro compuestos anti-inflamatorios bajo estudio, la resolución, número de platos teóricos, factores de selectividad, retención y simetría fueron determinados de acuerdo con las ecuaciones de la **sección 4.2.2**. En la **Tabla 14** se muestran los resultados de los parámetros

Tabla 14. Parámetros de eficiencia de separación cromatográfica por HPLC/DAD ($\lambda=205$ nm) .

N° de pico	Analito	Resolución, Rs	Factor de retención, k'	Factor de selectividad, α	Numero de platos teóricos	Factor de simetría
1	PXM	-	4.71	-	28809	0.91
2	NAP	Rs ₂₋₁ 18.35	6.73	α_{2-1} 1.43	46440	0.98
3	DIC	Rs ₃₋₂ 26.34	11.04	α_{3-2} 1.64	39527	1.10
4	IBU	Rs ₄₋₃ 1.86	11.39	α_{4-3} 1.03	57725	1.03
5	DFA	Rs ₄₋₅ 5.11	12.59	α_{5-4} 1.11	-	1.17

La resolución (Rs) en cromatografía depende de tres factores: 1) eficiencia, calculada en función del número de platos teóricos, N; 2) la selectividad de la columna que varía con α y, 3)

el factor de retención, que varía con k' . Teóricamente un $R_s = 1.5$ representa una resolución completa, con solo 0.2% de sobreposición de los picos cromatográficos y un número de platos teóricos de 2000, N ; la resolución mínima alcanzada fue 1.86, por lo cual para todos los compuestos anti-inflamatorios se logró una separación con $R_s > 1.5$ incluso entre los compuestos más cercanos en el cromatograma (DIC y IBU) y N superior a 57725. En cuanto al factor de retención, es importante tener en cuenta que la resolución no varía linealmente con k' sino $k'/(k'+1)$, para mayores valores de k' la función se vuelve asintótica y la resolución no varía significativamente, por lo cual un aumento de k' desmedido no se reflejará en la resolución sino en el tiempo de análisis, ensanchamiento de los picos y reducción de la sensibilidad. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, en la literatura se han establecido rangos apropiados entre 0.5 y 20 (Quattrocchi y col., 1992). En el presente trabajo, el factor de retención para los compuestos anti-inflamatorios estuvo entre 4.71 y 12.59. En la selectividad, si α es igual a 1, las señales cromatográficas no se diferencian (co-elución de los analitos) pero con el aumento de α , la selectividad incrementa. Para todos los analitos estudiados, el valor de α fue mayor de 1. Finalmente, el factor de simetría de los compuestos anti-inflamatorios fue cercano a uno (0.91 - 1.10) lo que indica que las señales cromatográficas no presentan *tailling* o *fronting* excesivo y conservan su forma gaussiana de tendencia.

5.1.4. Figuras analíticas de mérito para el método analítico por HPLC/DAD.

5.1.4.1. Evaluación de la repetitividad y reproducibilidad del método analítico para el tiempo de retención (t_R) y área cromatográfica.

Se estimó la repetitividad del método analítico al escoger un punto de la curva de calibración de concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se inyectó seis veces, utilizando un inyector automático (G1367B). La repetitividad se expresó como los coeficientes de variación (CV) del

método analítico para los tiempos de retención y áreas cromatográficas de cada uno de los fármacos AINE, cuyos valores máximos fueron 0.3 y 3.3 % para t_R y área, respectivamente. Los resultados de calificación del método analítico respecto al t_R y áreas se observan en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Repetitividad de los tiempos de retención y áreas cromatográficas en el método desarrollado por HPLC/DAD para análisis de fármacos AINE ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Compuesto	Tiempo retención, min (n=6)			Áreas cromatográficas, mAU*s (n=6)		
	\bar{t}_R , (n = 6)	S	CV, %	\bar{A} , (n = 5)	S	CV, %
PXM	12.7	0.01	0.1	103	2	2
NAP	17.2	0.04	0.2	96	1	1
DIC	27.7	0.09	0.3	179	3	2
IBU	28.6	0.07	0.2	146	5	3

Los coeficientes de variación del método cromatográfico se usaron para la determinación de la reproducibilidad de los t_R y áreas para cada uno de los compuestos anti-inflamatorios, empleando una solución *stock* de la mix de los AINE, se prepararon soluciones de concentración de 1 y $7.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los analitos, y se inyectaron $20 \mu\text{L}$, por quintuplicado, por dos analistas diferentes (A y B). Los resultados de la evaluación para los t_R y áreas de picos cromatográficos con diferente analista se observan en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Reproducibilidad de los tiempos de retención y áreas cromatográficas en el método desarrollado por HPLC/DAD para análisis de fármacos AINE, por diferentes analistas

Concentración, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Analista	Analito	Tiempo de retención, min			Áreas cromatográficas, mAU*s		
			\bar{t}_R , (n = 6)	S	CV, %	\bar{A} , (n = 6)	S	CV, %
1	A	PXM	12.69	0.01	0.1	104	1.9	2
	B		12.74	0.01	0.05	102.9	0.6	0.5
	A	NAP	17.2	0.1	0.3	95.9	0.6	0.7
	B		17.1	0.1	0.5	97	2	2
	A	DIC	27.7	0.1	0.4	179	4	2
	B		27.7	0.1	0.4	179	4	2

7.5	A	IBU	28.6	0.1	0.3	148	3	2
	B		28.5	0.3	0.9	148	3	2
	A	PXM	12.73	0.01	0.1	707	17	2
	B		12.73	0.01	0.1	706.7	0.7	2
	A	NAP	17.2	0.1	0.4	690	20	3
	B		17.2	0.1	0.4	690	1	3
	A	DIC	27.8	0.2	0.5	1257	28	2
	B		27.8	0.2	0.5	1257	3	2
	A	IBU	28.6	0.1	0.3	910	30	3
	B		28.6	0.1	0.3	910	2	3

Los coeficientes de variación de los tiempos de retención para los analistas A y B en concentraciones de 1 y 7.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estuvieron entre 0.05 – 0.9%, y para las áreas cromatográficas entre 0.5 – 2.9%. Para ambas mediciones, los CV no superaron el 3%.

5.1.4.2. Evaluación de la linealidad, sensibilidad, niveles mínimos de detección y cuantificación del método de HPLC.

Mediante la curva de calibración para cada uno de los AINE, se establecieron los parámetros referentes a la respuesta individual de cada analito y su comportamiento en orden creciente de concentración (véase **Tabla 17**). El método por cromatografía líquida para el análisis de los fármacos AINE es aplicable en el rango de concentración de 0.1 a 10 mg mL^{-1} , con valores de correlación entre 0.9994 – 0.9998. La sensibilidad del método, expresada según la pendiente se encontró entre 84.6 – 157.4 y, la incertidumbre de las mediciones realizadas para cada analito no superó 10%. Las curvas de calibración para cada compuesto se encuentran en el **Apéndice 1**.

La determinación de los niveles mínimos de detección y cuantificación para el método analítico se desarrollaron mediante la curva de calibración individual de los anti-inflamatorios y se calculó el valor de $S_{y/x}$. El nivel mínimo de detección (NMD), se tomó como tres veces el

valor de $S_{y/x}$ y para el nivel mínimo de cuantificación (NMC), como el doble del nivel de detección. En la **Tabla 17**, se observan los valores de linealidad, sensibilidad, NMD y NMC para cada uno de los fármacos AINE.

Tabla 17. Linealidad, sensibilidad, nivel mínimo de detección y cuantificación del método de análisis para los fármacos AINE por HPLC/DAD.

Compuesto	Ecuación	R ²	S _{y/x}	NMD, µg mL ⁻¹	NMC, µg mL ⁻¹
PXM	Y=84.595X+ 8.8641	0.9996	7.2	0.3	0.8
NAP	Y=84.987X + 10.558	0.9994	4.7	0.2	0.6
DIC	Y=157.76X+ 16.388	0.9998	8.5	0.2	0.8
IBU	Y=105.35x + 28.441	0.9995	9.5	0.2	0.8

5.2. Extracción de los fármacos anti-inflamatorios en muestras acuosas.

5.2.1. Determinación de las condiciones de extracción de los compuestos anti-inflamatorios en muestra acuosa mediante extracción en fase sólida.

La extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés SPE; es una técnica que se caracteriza por su capacidad de concentración y extracción de manera precisa de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas presentes en diversas matrices. En la técnica SPE, los analitos para extraer son sometidos a un proceso de partición entre la fase líquida (donde están disueltos los analitos) y la fase estacionaria (soporte sólido). Donde el analito debe tener mayor afinidad por la fase estacionaria que con la matriz para ser extraído. En este sentido, la selección del soporte sólido es uno de los pasos cruciales junto con las condiciones de extracción, ya que puede influir en parámetros de selectividad y capacidad de extracción.

Para establecer las condiciones de extracción de los compuestos de interés, se realizó el procedimiento descrito para el proceso de extracción (**sección 4.3.1**) y la metodología de análisis por HPLC/DAD (**sección 5.1.**) con difenilamina (DFA) como estándar interno, se evaluaron las variables: soporte sólido, pH de la muestra, volumen del solvente de elución y saturación del cartucho, en agua tipo I que contenía los fármacos AINE ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), y el observable de las pruebas fue el porcentaje de eficiencia de extracción de los fármacos AINE. Adicionalmente, se realizó un proceso de lavado de los soportes sólidos para su reutilización.

5.2.1.1. Soporte sólido: Se evaluó y comparó la eficiencia de extracción de los AINE en solución acuosa a pH 3 y 6, usando los soportes sólidos *Strata-X*, *Silicycle* y *Chromabond* obtenidos comercialmente (

Tabla 18) y se compararon sus perfiles cromatográficos, **Figura 12**.

Tabla 18. Comparación de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE a pH 3 y 6, con los soportes sólidos: *Strata-X*, *Silicycle* y *Chromabond*.

N° pico Fig 12	Compuesto	Eficiencia de extracción, % \pm S, n=3					
		pH 3			pH 6		
		<i>Strata X</i>	<i>Silicycle</i>	<i>Chromabond</i>	<i>Strata X</i>	<i>Silicycle</i>	<i>Chromabond</i>
1	PXM	87 \pm 16	0	0	96 \pm 5	60 \pm 13	0
2	NAP	93 \pm 5	0	0	97 \pm 3	96 \pm 5	0
3	DIC	99 \pm 8	0	0	99 \pm 2	93 \pm 11	0
4	IBU	56 \pm 15	0	0	99 \pm 2	71 \pm 12	0

La afinidad y retención de los compuestos de interés con el soporte sólido dependerá de la naturaleza química del analito y composición del polímero del soporte (Fontanals y col., 2010). Los primeros sorbentes denominados “clásicos” en SPE, fueron con base en gel de sílice modificada con cadenas alquílicas de C₁₈, C₈ entre otros, que actúan como sorbentes de fase

reversa, y modificaciones con grupos CN que actúan como sorbentes de fase normal. Los soportes sólidos *Silicycle* y *Chromabond* pertenecen a esta familia de “clásicos”. Sin embargo, reportes evidencian que estos soportes presentan varias desventajas, como la inestabilidad a pH extremo y baja eficiencia de extracción de analitos polares (Fontanals y col., 2010).

Mientras los soportes poliméricos, con base en una estructura hidrofóbica que son modificados químicamente con grupos funcionales polares, extraen más eficazmente los compuestos polares que sus análogos no modificados (hidrofóbicos). El soporte *Strata X*, *Phenomenex* (Torrence, CA, EE. UU.) tiene como polímero base poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) macroporoso y se encuentra modificado con grupos pirrolidona (Fontanals y col., 2010).

Debido a que los fármacos antiinflamatorios de interés son compuestos ácidos polares (**Tabla 4**), se observó la mayor afinidad con los soportes sólidos *Strata-X* y *Silicycle* con el incremento del pH de extracción, obteniéndose la mayor eficiencia de extracción entre el 96-99% para el soporte sólido *Strata X* a pH 6, mientras que para el soporte sólido *Chromabond* con las condiciones de extracción establecidas y cambio de pH, no se logró la recuperación de ninguno de los compuestos debido a su baja afinidad química.

5.2.1.2. Efecto del pH de extracción

Con base en los resultados obtenidos en la

Tabla 18, donde se evidencio que uno de los pasos cruciales para la extracción eficiente y simultánea de los AINE se encuentra regida por el soporte sólido usado y el pH, se realizó el análisis de eficiencia de extracción con el soporte *Strata X* en el rango de pH de 2 a 6, y se compararon sus perfiles cromatográficos (véase **Figura 12**).

Figura 12. Perfiles cromatográficos obtenidos para la evaluación de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE extraídos a pH 6 con los cartuchos comerciales **A.** *Strata X*, **B.** *Silicycle*, **C.** *Chromabond*. La identificación de los picos cromatográficos es: 1. PXM; 2. DIC; 3. NAP; 4. IBU; DFA (ISTD).

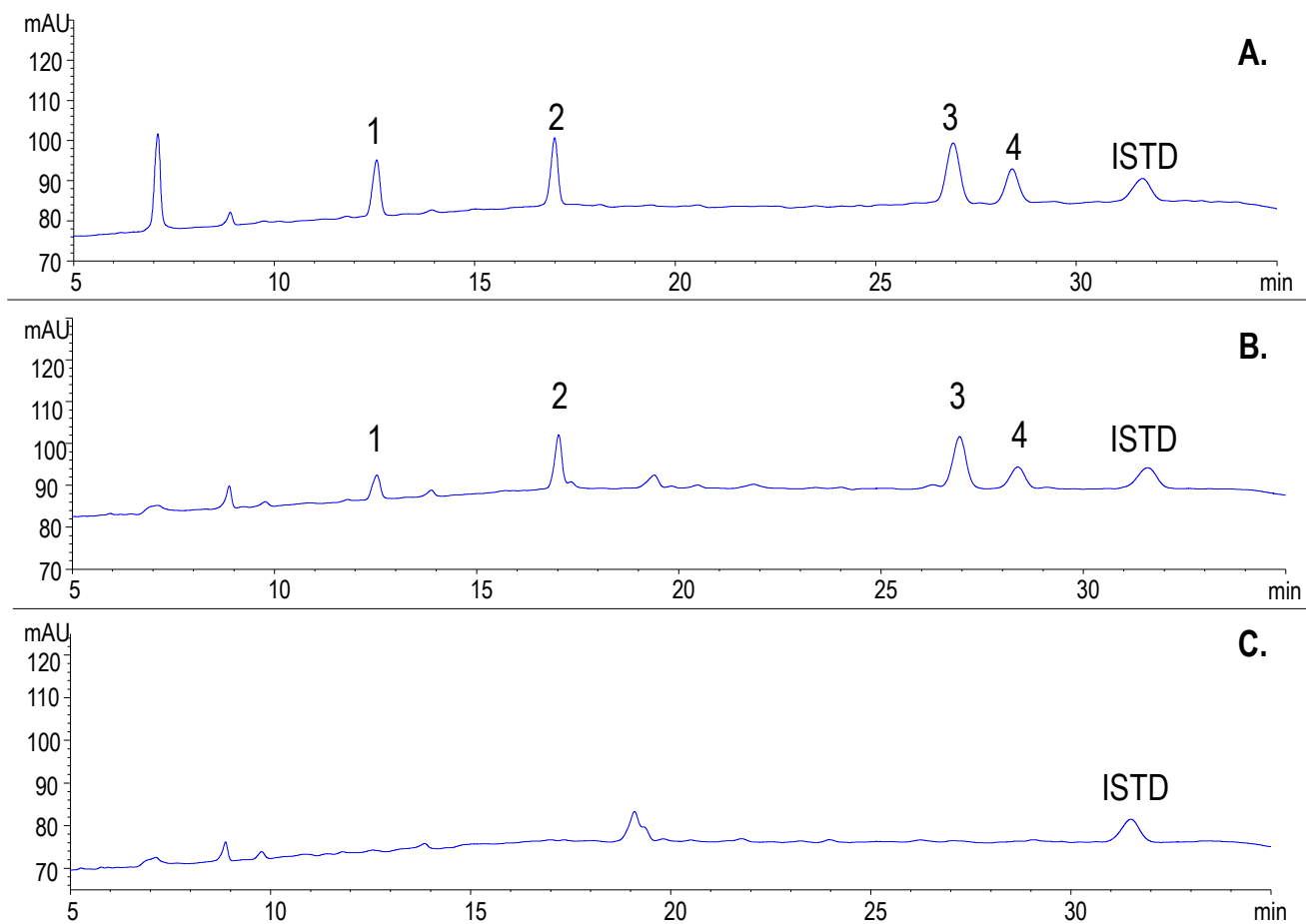
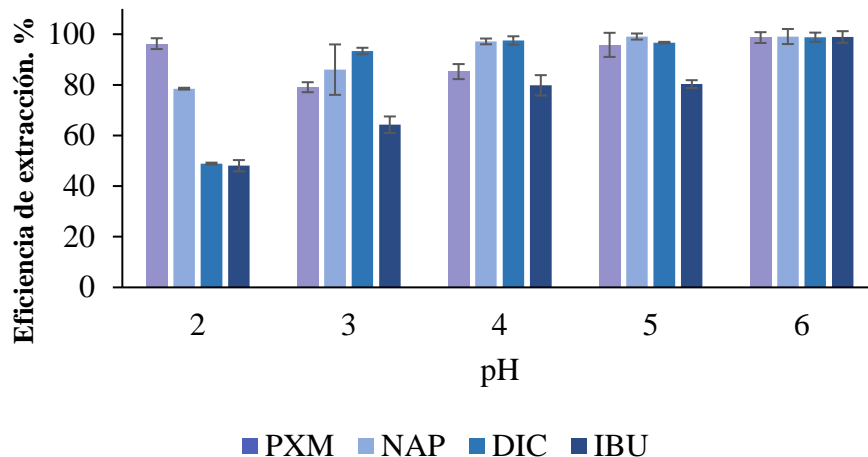


Figura 13. Prueba de pH en la extracción de los fármacos AINE mediante con el soporte sólido *Strata X (Phenomenex)*, n=3.



Como se observa en la **Figura 12**, los compuestos PXM, NAP y DIC presentaron una mayor eficiencia de extracción en los valores de pH cercanos al punto de equivalencia de pKa, sin embargo, la recuperación máxima de todos fármacos AINE se alcanzó a pH 6, específicamente para el IBU (véase

Tabla 18). Debido a que la mayoría de los fármacos AINE se encontraran en su forma iónica en solución (deprotonados), y el grupo de modificación de soporte sólido correspondiente a la pirrolidona (pKa 14.7 PubChem, 2022) se encuentra protonada en los valores de pH estudiados, el aumento en la eficiencia de extracción se logra por interacciones iónicas, además, de las ya establecidas π - π e hidrofóbicas por parte de los anillos aromáticos del PS-DVB.

- Volumen de elución

La cantidad mínima de solvente (metanol) necesario para que la elución de los compuestos del soporte sólido sea completa, se determinó con experimentos para tres volúmenes: 6, 9 y 12 mL. Los resultados para las pruebas se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Prueba de volumen de solvente de elución para la extracción SPE de los fármacos AINE en muestra acuosa.

Compuesto	Eficiencia de extracción, % $\bar{X} \pm S$ (n=3)		
	6 mL	9 mL	12 mL
PXM	79 \pm 1	81 \pm 2	96 \pm 5
NAP	94 \pm 1	99 \pm 8	97 \pm 3
DIC	68 \pm 0,3	103 \pm 4	99 \pm 2
IBU	89 \pm 7	50 \pm 7	99 \pm 2

Se observó que la eficiencia de extracción de los fármacos AINE fue afectada negativamente cuando se usaron volúmenes menores que 12 mL en la elución de los compuestos AINE, debido a que si el volumen adicionado no es el suficiente para removerlos analitos del soporte sólido; aunque la extracción sea eficiente, estos no logran ser eluidos del soporte sólido. Por lo tanto, se estableció como volumen de elución 12 mL del solvente.

5.2.1.3. Volumen de carga del soporte sólido *Strata X*.

La determinación de la capacidad del volumen de carga del soporte sólido se realizó mediante la adición de volúmenes de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 y 250 mL de solución enriquecida con los fármacos AINE (10 $\mu\text{g L}^{-1}$), la concentración de los AINE retenidos por el soporte sólido se determinó mediante una calibración para cada compuesto mediante la técnica de estandarización interna. Las curvas de calibración para cada fármaco AINE encuentran en el **Apéndice 1**. La concentración final en el extracto asumiendo un 100 % de eficiencia de extracción fue de 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Con los resultados de la **Tabla 20**, se puede identificar que la concentración va aumentando con la cantidad de volumen adicionado de manera lineal y no se registra un equilibrio de retención de los fármacos AINE en solución. La determinación del volumen de

carga se realizó con tres soportes sólidos para todo el experimento, lo cual explica la disminución en la eficiencia de extracción de los compuestos.

Tabla 20. Capacidad del volumen de carga en el soporte sólido *Strata X*, durante la extracción de fármacos AINE en agua

Volumen, mL	Concentración, $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($\bar{X} \pm S$, n=3)			
	PXM	NAP	DIC	IBU
25	0.3	0.1	0.2	0.3
50	0.3	0.3	0.4	0.4
75	0.7	0.6	0.7	0.7
100	0.9	1.1	0.7	1.0
125	1.0	1.2	0.8	1.3
150	1.1	1.3	1.0	1.6
175	1.5	1.4	1.2	1.9
200	1.6	2.1	1.5	2.2
225	1.7	2.2	1.6	2.2
250	1.9	2.2	1.7	2.3

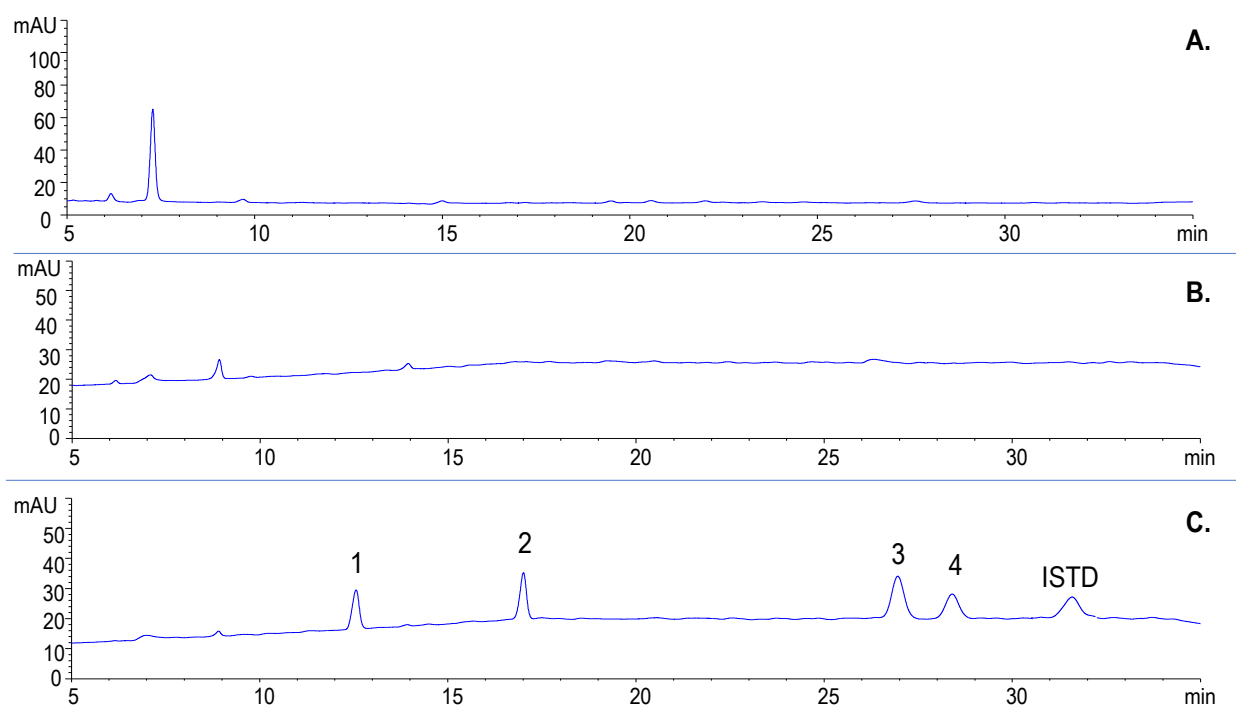
-Lavado de soporte sólido.

El lavado del soporte sólido para su reutilización fue considerado un factor importante en el aspecto ecológico y económico de la implementación de la SPE.

Finalizado el proceso de extracción de los fármacos AINE, el lavado del cartucho se realizó como se muestra en la **sección (4.3.1)**, con una elución sucesiva de solventes próticos y apróticos de diferente polaridad. Para determinar que el lavado del soporte fue completo y efectivo, se colectó el volumen de solvente correspondiente al lavado, y se realizó el proceso de secado y reconstitución, finalmente se analizó por HPLC/DAD. En la **Figura 14**, se muestra la comparación de los perfiles cromatográficos del blanco de extracción, lavado del soporte sólido *Strata x* y la mezcla de los fármacos AINE de referencia.

La reutilización de los soportes sólidos solo se pudo realizar tres veces para cada soporte, debido a que luego de esta cantidad de extracciones, el soporte presentó grietas, que no permitieron el paso homogéneo de la solución acuosa por el cartucho disminuyendo su interacción por este, que causa disminución en la eficiencia de extracción de los fármacos AINE.

Figura 14. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda = 205$ nm) de los fármacos AINE: **A.** Blanco de extracción; **B.** Lavado del cartucho SPE y **C.** Perfil del MRC ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)



5.2.2. Figura analítica de mérito para el método de extracción en fase sólida.

5.2.2.1. Determinación de la reproducibilidad del método de extracción.

La reproducibilidad del método de extracción SPE de los fármacos AINE ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) en agua tipo I, se determinó mediante la comparación de la eficiencia de extracción y coeficientes

de variación de dos analistas. En la **Tabla 21** se muestra la eficiencia de extracción de los AINE en $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada analista con $n=3$.

Tabla 21. Determinación de la reproducibilidad para la eficiencia de extracción de los fármacos AINE ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) mediante SPE.

Compuesto	Eficiencia de extracción, % ($\bar{X} \pm S$)			
	Analista A	CV, %	Analista B	CV, %
PXM	99 ± 2	2	96 ± 5	5
NAP	99 ± 3	3	97 ± 3	2
DIC	99 ± 2	2	99 ± 2	2
IBU	99 ± 2	2	99 ± 2	1

En la **Tabla 21**, se observó que con el método de SPE desarrollado se logró la extracción simultánea de los fármacos AINE en agua tipo I con eficiencias de extracción entre el 96-99% y los coeficientes de variación para el método SPE, para los dos analistas no superan el 5%.

5.2.2. Comparación de la eficiencia de extracción para tres niveles de concentración en diferentes matrices acuosas.

Las concentraciones mínimas y máximas para los fármacos AINE reportadas en ecosistemas acuáticos varían ampliamente en las diferentes matrices. Por lo cual se implementó el análisis de los fármacos AINE en los niveles concentraciones de 2, 10 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ en dos matrices acuosas (agua tipo I y TAP), para evaluar la eficiencia de extracción en función del efecto matriz y la concentración de los fármacos AINE en solución acuosa. En la **Tabla 22**, se muestran las eficiencias de extracción de los fármacos AINE en agua tipo I y TAP en los tres niveles de concentración evaluados, y en la **Figura 15**, se muestran los perfiles cromatográficos por

HPLC/DAD para los extractos SPE de muestras acuosas (tipo I y TAP) enriquecidas en una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 22. Comparación de los valores de eficiencia de extracción obtenidos con la técnica SPE para los fármacos AINE (2, 10 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$)

N° pico Fig 15	Compuestos	Eficiencia de extracción, % ($\bar{X} \pm S$, n=3)					
		$2 \mu\text{g L}^{-1} \pm S$		$10 \mu\text{g L}^{-1} \pm S$		$100 \mu\text{g L}^{-1}, \pm S$	
		Tipo I	TAP	Tipo I	TAP	Tipo I	TAP
1	PXM	93 ± 9	< NMD	96 ± 5	<NMD	99 ± 1	<NMD
2	NAP	98 ± 1	91 ± 6	97 ± 3	91 ± 2	$99 \pm 0,4$	85 ± 1
3	DIC	109 ± 29	80 ± 5	99 ± 2	$89 \pm 0,3$	98 ± 1	83 ± 2
4	IBU	82 ± 9	95 ± 13	99 ± 2	102 ± 3	$96 \pm 0,2$	91 ± 11

Mediante el análisis por HPLC/DAD, se evidenció que en la SPE de los fármacos AINE en agua TAP, el compuesto PXM (pico 1) no fue detectado en ninguna de las concentraciones evaluadas, mientras que, en agua tipo I, la eficiencia de extracción del compuesto determinó entre 93-99 %. Para los compuestos NAP, DIC, IBU la eficiencia de extracción en agua TAP en las concentraciones probadas disminuyó aproximadamente entre 10-15 % en comparación con las eficiencias de extracción obtenidas en la matriz de agua tipo I.

Debido al efecto matriz que se evidenció en la extracción de los fármacos AINE, específicamente en el compuesto PXM, (véase **Tabla 22**) se realizaron modificaciones a la matriz, a saber: adición de ácido ascórbico como estabilizante en el agua TAP, en concentraciones de 4 y $8 \mu\text{g L}^{-1}$ y, adicionalmente un proceso de esterilización usando un autoclave (véase **sección 3.3.4**). La extracción de los fármacos por SPE se realizó en una concentración de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 23**.

Figura 15. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda = 205$ nm) de: **A.** Extracto SPE de agua TAP; **B.** Extracto SPE de agua tipo I enriquecido de los AINE ($10 \mu\text{g L}^{-1}$); **C.** Extracto SPE de agua TAP enriquecido con los fármacos AINE ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) y **D.** Mezcla de los fármacos AINE ($10 \mu\text{g L}^{-1}$).

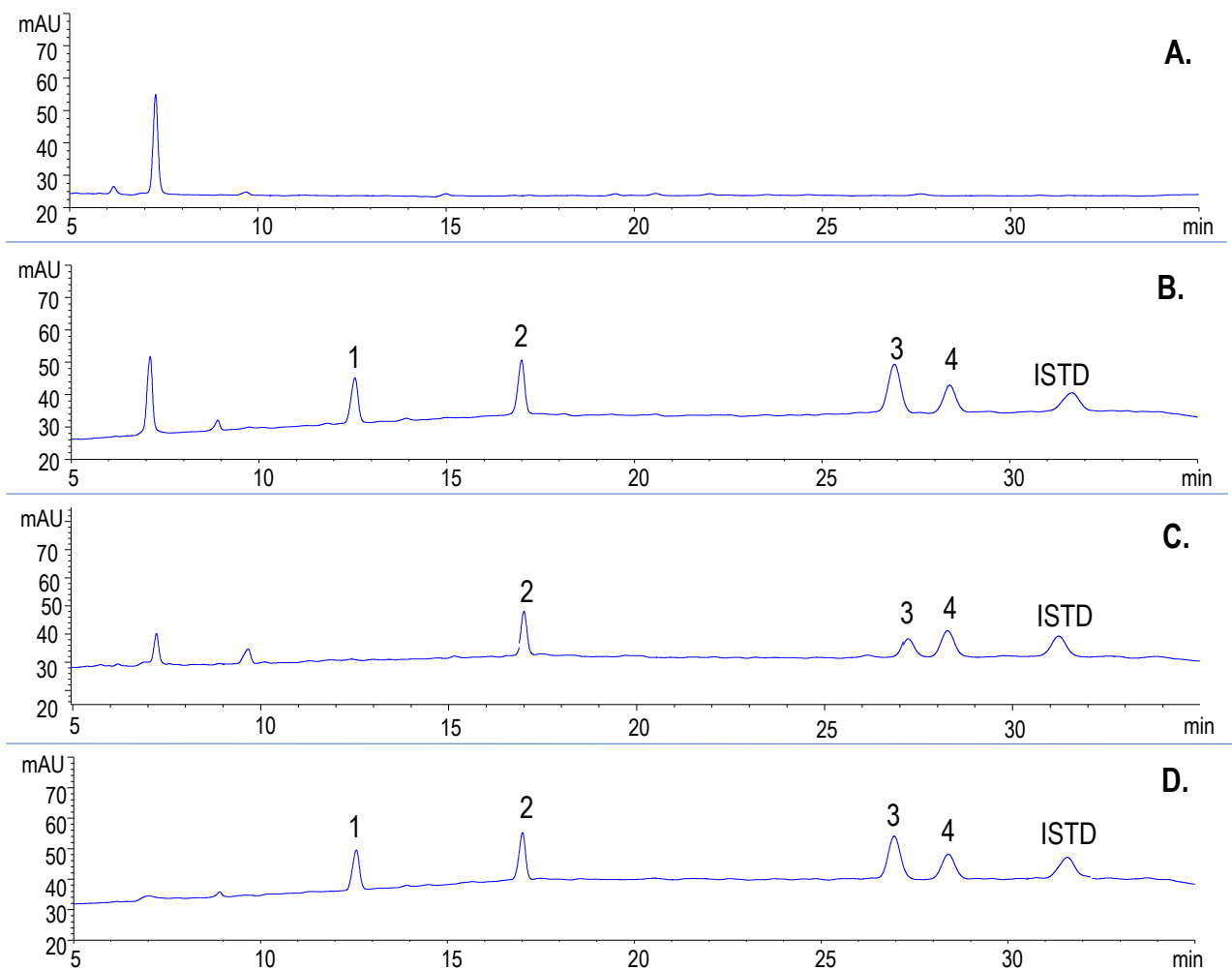


Tabla 23. Comparación de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE en agua TAP: sin estabilizante, con estabilizante (4 y 8 $\mu\text{g L}^{-1}$), y con proceso de esterilización en autoclave.

Compuestos	Eficiencia de extracción, % ($\bar{X} \pm S$)			
	Agua TAP	Con estabilizante		Autoclave
		4 $\mu\text{g L}^{-1}$	8 $\mu\text{g L}^{-1}$	
PXM	< NMD	87	94	88 \pm 1
NAP	85 \pm 1	92	98	110 \pm 0,4
DIC	83 \pm 3	92	98	92 \pm 0,3
IBU	91 \pm 11	80	99	96 \pm 1

Con base en los resultados de la **Tabla 23**, se evidenció que la respuesta negativa en la eficiencia de extracción por el efecto matriz se suprimió significativamente con la adición del ácido ascórbico (4 y 8 $\mu\text{g L}^{-1}$), con eficiencias de extracción del compuesto PXM entre 87 y 94 %, respectivamente. Al realizar el proceso de esterilización del agua TAP, con el autoclave, se logró un 88% en la eficiencia de extracción del compuesto. Para NAP y DIC con las modificaciones realizadas en la matriz, la eficiencia de extracción aumentó aproximadamente entre un 6 y 20 %. Para el IBU, la eficiencia de extracción disminuyó alrededor de 9% con la adición del estabilizante en la concentración de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$, pero al agregar el estabilizante en concentración de 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ aumentó en el mismo porcentaje alcanzándose la mayor eficiencia de extracción en esta condición.

5.3. Determinación de las condiciones de extracción de los compuestos anti-inflamatorios en solución mediante extracción líquido-líquido asistida por sal.

La extracción líquido-líquido asistida por sal (SALLE), es una técnica basada en la “clásica” extracción líquido-líquido en la cual se añade una concentración de sal adecuada para

lograr la separación de una fase acuosa de otra orgánica (parcialmente miscible) (Noche y col., 2011).

El procedimiento de extracción se desarrolló de acuerdo con las condiciones reportadas por Noche y col., (2011), con algunas modificaciones, y la metodología como se muestra en la sección 3.4. Se evaluó la influencia del pH agua en la extracción (SALLE), comparando la eficiencia extracción para la condición descrita en el artículo de referencia (pH=5) y la establecida por SPE (pH 6) en tres niveles de concentración (2, 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) de los fármacos AINE en agua tipo I (véase **Tabla 24**).

Tabla 24. Eficiencia de extracción de los fármacos AINE (2, 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) en agua tipo I a pH 5 y 6 con el método SALLE.

Compuesto	Eficiencia de extracción, % ($\bar{X} \pm S$, n=3)					
	2 $\mu\text{g L}^{-1} \pm S$		10 $\mu\text{g L}^{-1} \pm S$		100 $\mu\text{g L}^{-1}, \pm S$	
	pH 5	pH 6	pH 5	pH 6	pH 5	pH 6
PXM	0	49 \pm 6	17 \pm 0	27 \pm 2	17 \pm 0	5 \pm 3
NAP	76 \pm 10	87 \pm 19	88 \pm 3	86 \pm 9	80 \pm 7	77 \pm 2
DIC	37 \pm 11	97 \pm 6	78 \pm 3	89 \pm 2	82 \pm 3	74 \pm 3
IBU	73 \pm 18	82 \pm 6	95 \pm 4	95 \pm 4	76 \pm 6	73 \pm 3

La influencia del cambio de pH en la eficiencia de extracción de los fármacos AINE para SALLE en la concentración de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ evidenció que a pH 6 se logró mayor recuperación para todos los AINE, pero para los niveles más altos de concentración, la diferencia en la eficiencia de extracción para los AINE en los pH evaluados no es lo suficientemente para establecer la mejor condición.

5.5. Comparación de la eficiencia de extracción entre las técnicas implementadas.

En la extracción de los fármacos AINE en agua tipo I, se implementaron dos técnicas de extracción SPE y SALLE, por lo cual se realizó la comparación entre sus eficiencias de extracción, desviaciones y coeficientes variación, para los tres niveles de concentración de fármacos se muestran en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Comparación de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE a pH=6 en tres niveles de concentración: 2, 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$

Compuesto	Eficiencia de extracción, %, $\bar{X} \pm S$ (CV, %), n=3					
	2 $\mu\text{g L}^{-1} \pm S$		10 $\mu\text{g L}^{-1} \pm S$		100 $\mu\text{g L}^{-1}, \pm S$	
	SPE	SALLE	SPE	SALLE	SPE	SALLE
PXM	93 \pm 9, (8)	49 \pm 6, (13)	96 \pm 5, (5)	27 \pm 2, (0)	99 \pm 1, (1)	5 \pm 3, (53)
NAP	98 \pm 1, (1)	90 \pm 19, (22)	97 \pm 3, (3)	86 \pm 9, (11)	99 \pm 0.4, (0.4)	77 \pm 2, (3)
DIC	110 \pm 27, (28)	97 \pm 6, (7)	99 \pm 2, (2)	89 \pm 2, (2)	98 \pm 1, (1)	74 \pm 3, (5)
IBU	82 \pm 9, (10)	82 \pm 6,(7)	99 \pm 2, (2)	95 \pm 4, (4)	96 \pm 0.2, (0.2)	73 \pm 3, (4)

Entre las técnicas SPE y SALLE, se evidenció que con la técnica SPE, se logró la mayor eficiencia de extracción (82-110%) para todos los fármacos AINE. Además, las desviaciones y coeficientes de variación para esta técnica fueron menores que para la técnica SALLE. Sin embargo, en la medición de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ se obtuvieron coeficientes de variación superiores al 5 %, que aún son acorde a las buenas prácticas de laboratorio (BPL).

5.6. Análisis por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia

Las condiciones analíticas para LC/MS se realizaron según los parámetros de la sección 3.6. En la **Tabla 26**, para cada uno de los fármacos AINE, aparecen los principales parámetros de las curvas lineales de calibración, así como los niveles mínimos de detección (NMD) y cuantificación (NMC) para los compuestos, mediante el método de adición de estándar (DFA, ISTD) (véase **Apéndice 2**).

Tabla 26. Parámetros de las curvas de calibración de los fármacos AINE, obtenidos por UHPLC-ESI⁺- Orbitrap-HRMS (Vcap = +3,5 kV).

Compuesto	Rango $\mu\text{g L}^{-1}$	m	b	R ²	NMD, $\mu\text{g L}^{-1}$	NMC, $\mu\text{g L}^{-1}$
PXM	0,25-1000	3,3069	-1,3371	0,993	0,01	0,04
NAP	1-1000	0,6394	-0,2557	0,997	0,08	0,28
DIC	0,25-1000	0,4961	-0,1694	0,996	0,07	0,22
IBU	2,5-1000	0,0402	-0,0138	0,991	0,4	1,40

5.6.1. Repetitividad de las áreas cromatográficas

Se evaluó la repetitividad de las áreas de las corrientes iónicas extraídas (EIC) de los materiales de referencia de los AINE para dos concentraciones (véase **Tabla 27**). Las inyecciones de las soluciones de referencia se realizaron por quintuplicado por UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS, bajo las condiciones descritas en la **sección 4.6**. Las desviaciones de los t_R y las áreas cromatográficas de los fármacos AINE estuvieron entre 2 y 0.02, y los coeficientes de variación no superaron el 22% .

Tabla 27. Repetitividad de las áreas cromatográficas obtenidas mediante UHPLC-ESI⁺- Orbitrap-HRMS del material de referencia certificado de los fármacos AINE (10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Concentración, $\mu\text{g L}^{-1}$	Compuesto	[M+H] ⁺	Área (x 10 ⁶), n=5					Promedio	S	CV, %
10	PXM	332.06995	7.4	7.7	7.5	7.2	7.6	7.5	0.15	1
	NAP	231.10157	1.1	1.1	1.3	1.2	1.2	1.20	0.07	6
	DIC	296.02396	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.20	0.04	3
	IBU	224.16451*	0.08	0.1	0.1	0.07	0.07	0.09	0.02	22
100	PXM	332.06995	72	77	74	72	72	73	2	3
	NAP	231.10157	11.2	11.1	11.1	11.1	11.3	11.20	0.08	0.7
	DIC	296.02396	11.4	11.5	11.6	11.6	11.6	11.50	0.08	0.7
	IBU	224.16451*	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6	0.60	0.05	8

*Para ibuprofeno se determinó la EIC del aducto [M+NH₄]⁺

5.7 Extracción, identificación y distribución de los fármacos AINE y algunos metabolitos presentes en los extractos del experimento comparativo de interacción de los fármacos AINE en medio acuoso.

Algunos de los medicamentos más consumidos a nivel mundial son los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), la creciente demanda en su uso ha llevado a la aparición de compuestos como NAP, DIC, IBU en el medio ambiente en aguas superficiales, debido a la descarga de los efluentes de aguas residuales tratadas en donde aún hay persistencia de los fármacos y otros compuestos.

Con base en las condiciones ambientales naturales a las que estarían expuestos los AINE en el medio acuoso, se realizó un experimento por separado y en paralelo para tres interacciones: fotodegradación, por la radiación solar (AF); biodegradación aerobia sin radiación solar (AFb); correspondientes a los controles y biodegradación en presencia de la planta acuática *Salvinia adnata* (APF) (véase **sección 4.7.4**), cada uno por quintuplicado. Adicionalmente, se prepararon blancos negativos correspondientes a las muestras de agua TAP, y las muestras de agua TAP que interactúan únicamente con la planta acuática (AP).

Los extractos de las muestras acuosas obtenidos mediante la técnica SPE, que contenía los fármacos AINE y sus metabolitos, se analizaron por UHPLC-ESI[±]-Q-Orbitrap-HRMS, la cuantificación se realizó mediante curva de calibración para los fármacos AINE (**Apéndice 2**), y para los metabolitos se calculó el factor de respuesta del AINE precursor con la estandarización interna (difenilamina, ISTD), como se ha reportado en otros trabajos (Poirier-Larabie y col., 2016), en ausencia de material de referencia. Las masas exactas ($\Delta\text{ppm} < 3$) de las especies protonadas, deprotonadas o aductos con amonio, junto con la distribución isotópica del ion

molecular y el patrón de fragmentación fueron la base para elucidar las fórmulas moleculares. Las áreas cromatográficas de los fármacos AINE y sus metabolitos respectivos se obtuvieron de la EIC según las masas exactas de $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, aductos de amonio o sodio. Para cada potencial metabolito identificado, se evaluó la elucidación de la estructura a partir de la interpretación de los espectros de masas de los compuestos adquiridos en modo de monitoreo de ion(es) seleccionado(s), SIM; además, de considerar los mecanismos de fragmentación, con base en las especies reportadas en la literatura para diferentes condiciones de experimentación. Los patrones de fragmentación de $[M+H]^{+/-}$ o aductos se adquirieron en *full MS*, 10, 20, 30, 40 y 50 eV en la celda HCD. La energía de la celda se seleccionó de tal manera que los espectros de masas tuvieran tanto iones-fragmento, como iones $[M+H]^{+/-}$, con intensidad relativa superior al 5%.

5.7.1. Identificación, distribución y análisis de espectros de masas de piroxicam y sus metabolitos.

El análisis por LC-MS permitió identificar, tentativamente, dos metabolitos del PXM en los extractos SPE de las muestras acuosas correspondientes a las interacciones AF, AFb y APF. La

Figura 16, presenta las EIC de las moléculas protonadas de PXM y sus metabolitos detectados en las muestras acuosas, y la **Figura 17**, muestra la estructura química propuesta para cada uno respectivamente. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la **Tabla 28**.

Figura 16. EIC obtenidas por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de los extractos SPE de las muestras acuosas de las interacciones AF, AFb y APF

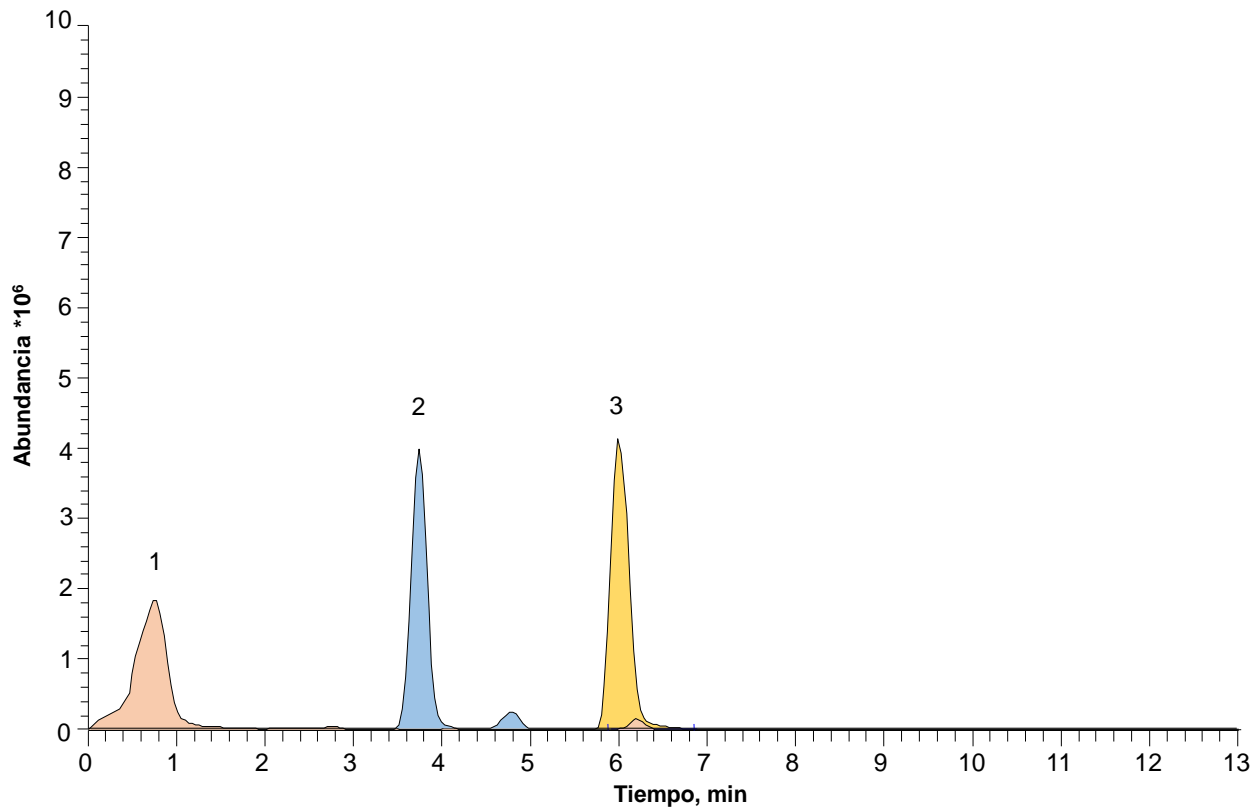
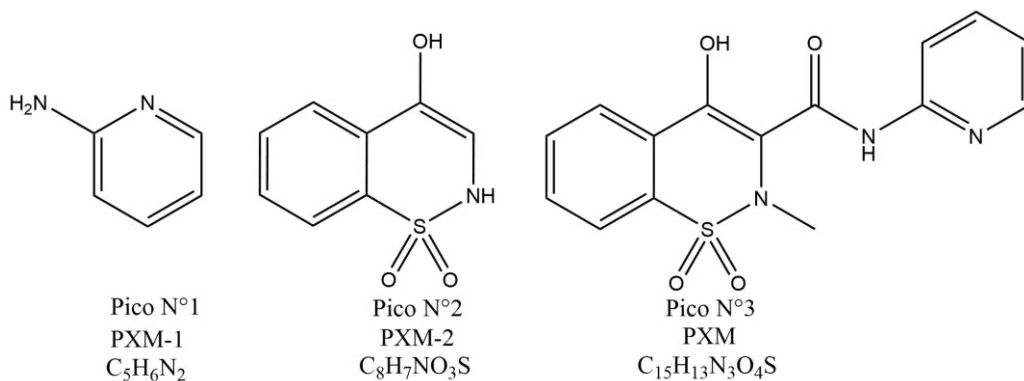


Figura 17. Estructura molecular propuesta para los metabolitos identificados tentativamente y PXM.



En el espectro de masas del pico N°1 correspondiente a PXM-1 (véase **Apéndice 3**, PXM-1); la masa impar del $[M+H]^+$ en m/z 95.06068 (100 %) indican la presencia de número par de átomos de nitrógeno y su intensidad alta se asocia a la presencia de un anillo aromático en su

estructura. Con base en la composición elemental, se establece la presencia de dos átomos de nitrógeno para la molécula, Además de la presencia del fragmento $C_5H_4N^+$ en m/z 78.03426 (5%), que se originó por la pérdida de NH_3 (**Apéndice 3A, PXM-1**). Este compuesto se identificó como producto de degradación en muestras acuosas irradiadas con luz solar y bajo condiciones no forzadas (Dattatray y col., 2011; Jiménez y col., 2018).

Tabla 28. Información cromatográfica y de espectrometría de masas obtenida por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de piroxicam y sus metabolitos detectados en los extractos SPE de las muestras acuosas del experimento de interacción de fármacos AINE.

t _R , min	N° pico Fig 16	Abreviación	Fórmula	HCD, eV	Modo de ionización	Masa exacta		Δppm	Iones producto	
						Calculada	Experimental		Tipo de fragmento	m/z, (I %)
0.74	1	PXM-1	C ₅ H ₆ N ₂	30	Positivo	95.06037	95.06068	3.17444	[M+H] ⁺	95.06068, (100)
									[(M+H)-NH ₃] ⁺	78.03426, (5)
3.74	2	PXM-2	C ₈ H ₇ O ₃ NS	40	Positivo	198.02194	198.02151	-2.14849	[M+H] ⁺	198.02151, (100)
									[(M+H)-H ₂ CNH] ⁺	168.99504 (10)
									[(M+H)-SO ₂] ⁺	134.05981 (70)
									No identificado	121.02832 (30)
6.17	3	PXM	C ₁₅ H ₁₃ O ₂ N ₃ S	30	Positivo	332.06995	332.06964	-0.93958	[(M+H)-SO ₂ -CO] ⁺	106.06528 (5)
									[M+H] ⁺	332.06964 (10)
									[(M+H)-C ₆ H ₆ NO ₂] ⁺	210.02199 (2)
									[(M+H)-C ₇ H ₄ O ₃ S] ⁺	164.08182 (30)
									[(M+H)-C ₉ H ₉ O ₃ NS] ⁺	121.03976 (50)
[(M+H)-C ₁₀ H ₇ NO ₄ S] ⁺	95.06071 (100)									

En el espectro de masas del pico N° 2 correspondiente a PXM-2 (véase **Figura 18A**), registra una m/z 198.02151 (100%) que corresponde a la molécula protonada $C_8H_8O_3NS^+$. Con base en la distribución isotópica de PXM-2 (**Figura 18B**), se evidencia la presencia de la presencia de azufre en la estructura del metabolito, adicionalmente se confirma la presencia del grupo sulfóxido por la pérdida de la molécula neutra de SO_2 en m/z 134.05981 (70 %). Un ciclo de seis carbonos al menos con una insaturación (tautómero ceto), se confirmó por la aparición del fragmento en m/z 168.99504 (10 %), debido a un reordenamiento retro-*Diels-Alder*. La presencia del grupo carbonilo, se identificó por la pérdida de 28 unidades (CO).

La distribución isotópica de PXM-2 mantiene los porcentajes de abundancia para ^{13}C (9%) y ^{34}S (4.5%). Muszyńska y col. (2019), lo reportaron como metabolito de biodegradación mediante cultivo *in vitro* del micelio de *Lentinula edodes* en procesos de degradación que principalmente afectan el conector entre la tiazina y el anillo de piperidina.

El espectro de masas y el patrón de fragmentación del pico N° 3 identificado como PXM (**Figura 19A** y **Figura 19B**) registran la molécula protonada $C_{15}H_{13}O_2N_3S$ en m/z 332.06995 (10 %), obtenida a 30 eV. La presencia del ciclo de seis carbonos se confirma por la formación del ion fragmento $C_8H_{10}ON_3^+$ con m/z 164.08182 (30 %), formado de la pérdida del fragmento $C_7H_4O_3S$ desde el tautómero ceto por reordenamiento retro-*Diels-Alder*.

Los iones característicos con m/z 164.08182, 121.03976 y 95.06037 identificados en este trabajo fueron reportados por Muszyńska y col. (2019) y Jiménez y col. (2018). La ruta de fragmentación para el PXM propuesta por Jiménez y col. (2018), se muestra en la

Figura 20.

Figura 18. A. Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de PXM-2, $C_8H_8O_3NS$, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 40 eV) y su registro de iones-producto; **B.** Espectro *full MS* de PXM-2, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de PXM-2 y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%), (^{13}C ; 9%), (^{34}S , 4.5%). Muestra AF 25.

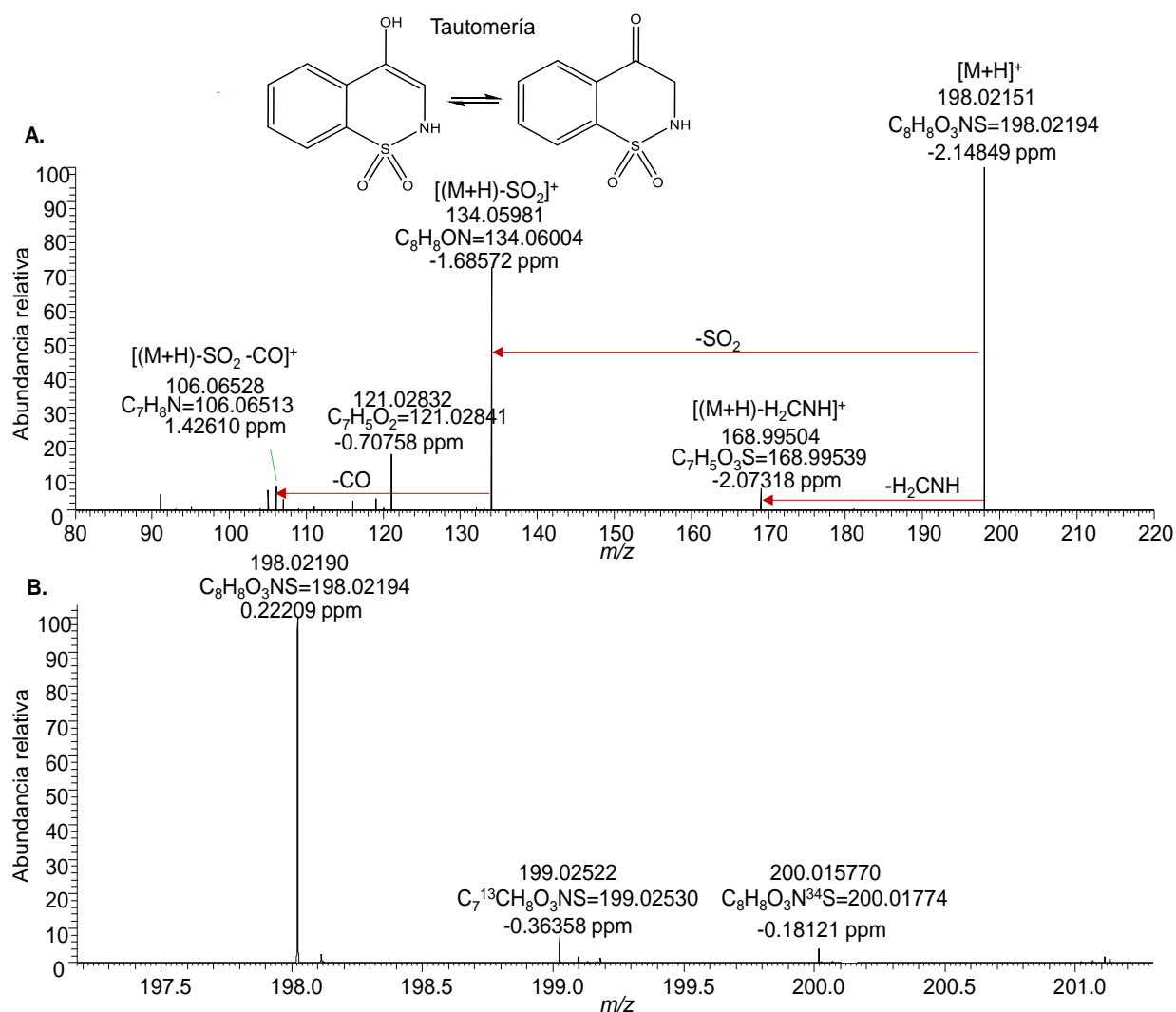


Figura 19. A. Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de PXM , energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 30 eV) y sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de PXM, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de PXM y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%),(^{13}C ; 15%) y (^{34}S , 4.5%). Muestra AFb-25.

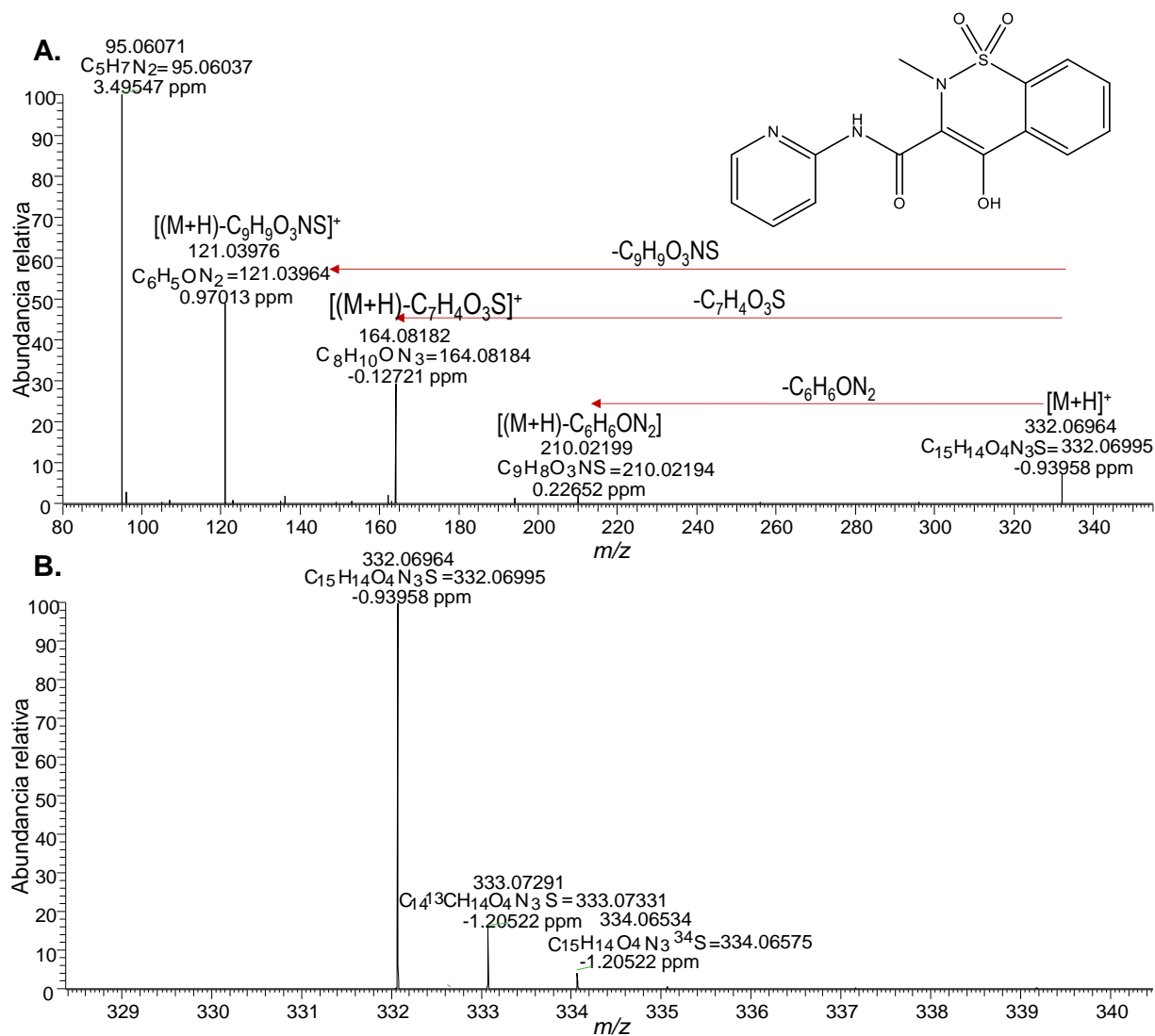
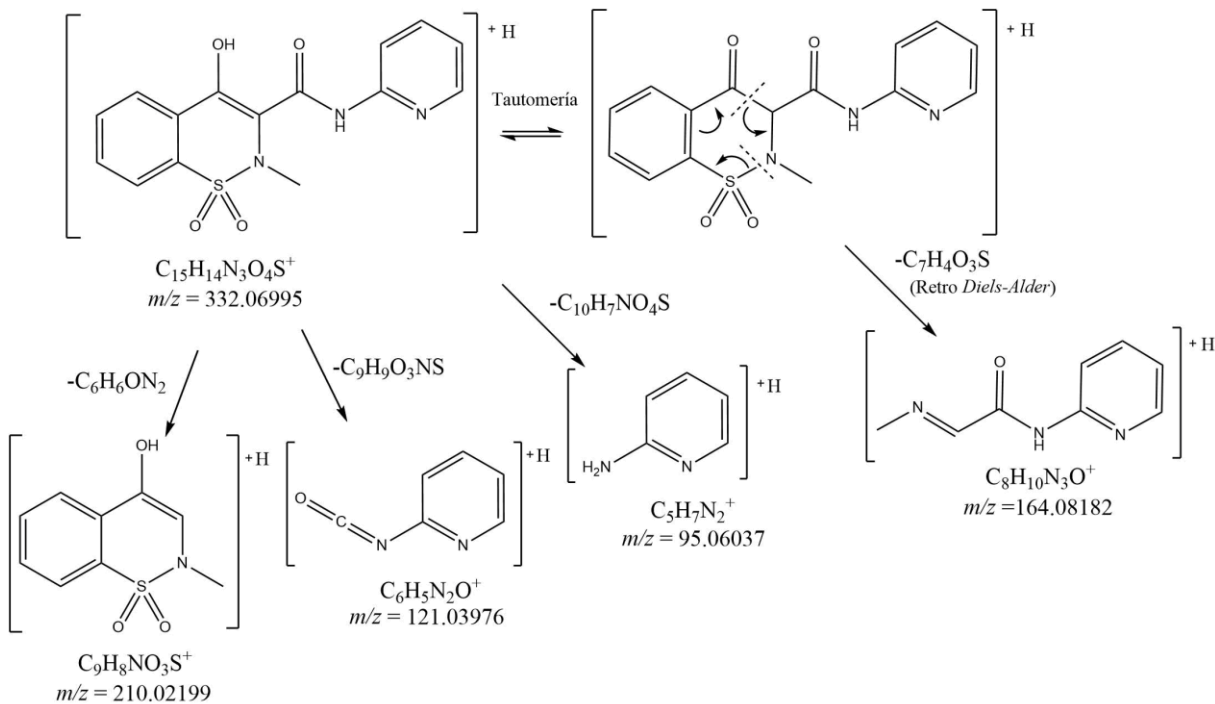
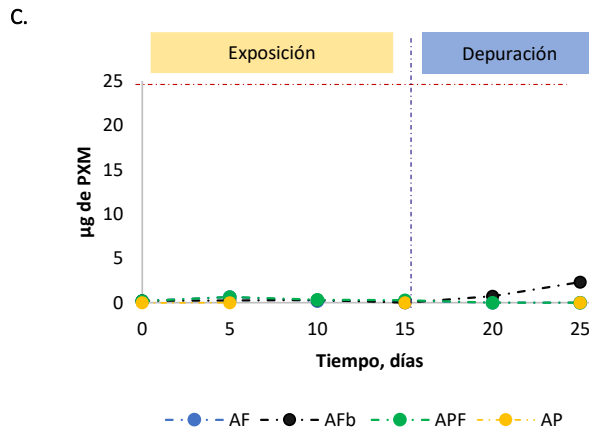
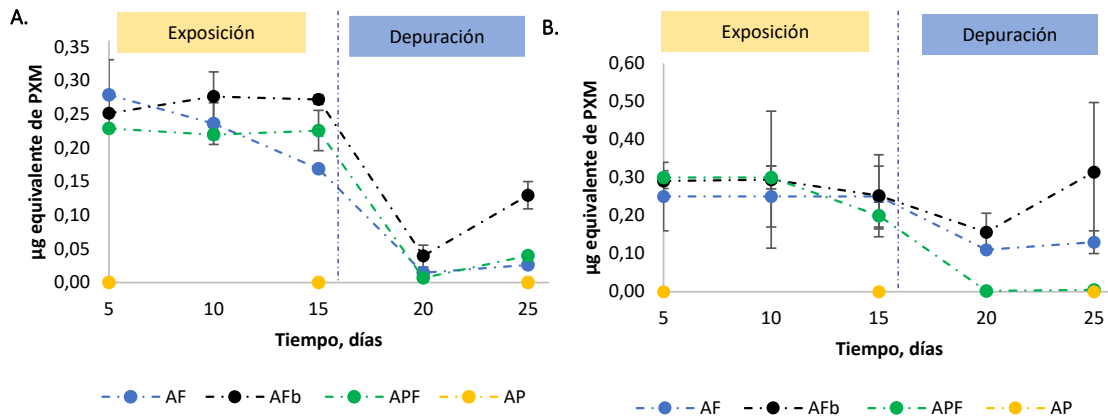


Figura 20. Patrón de fragmentación de piroxicam. Tomado con modificaciones de Jiménez y col. (2018).

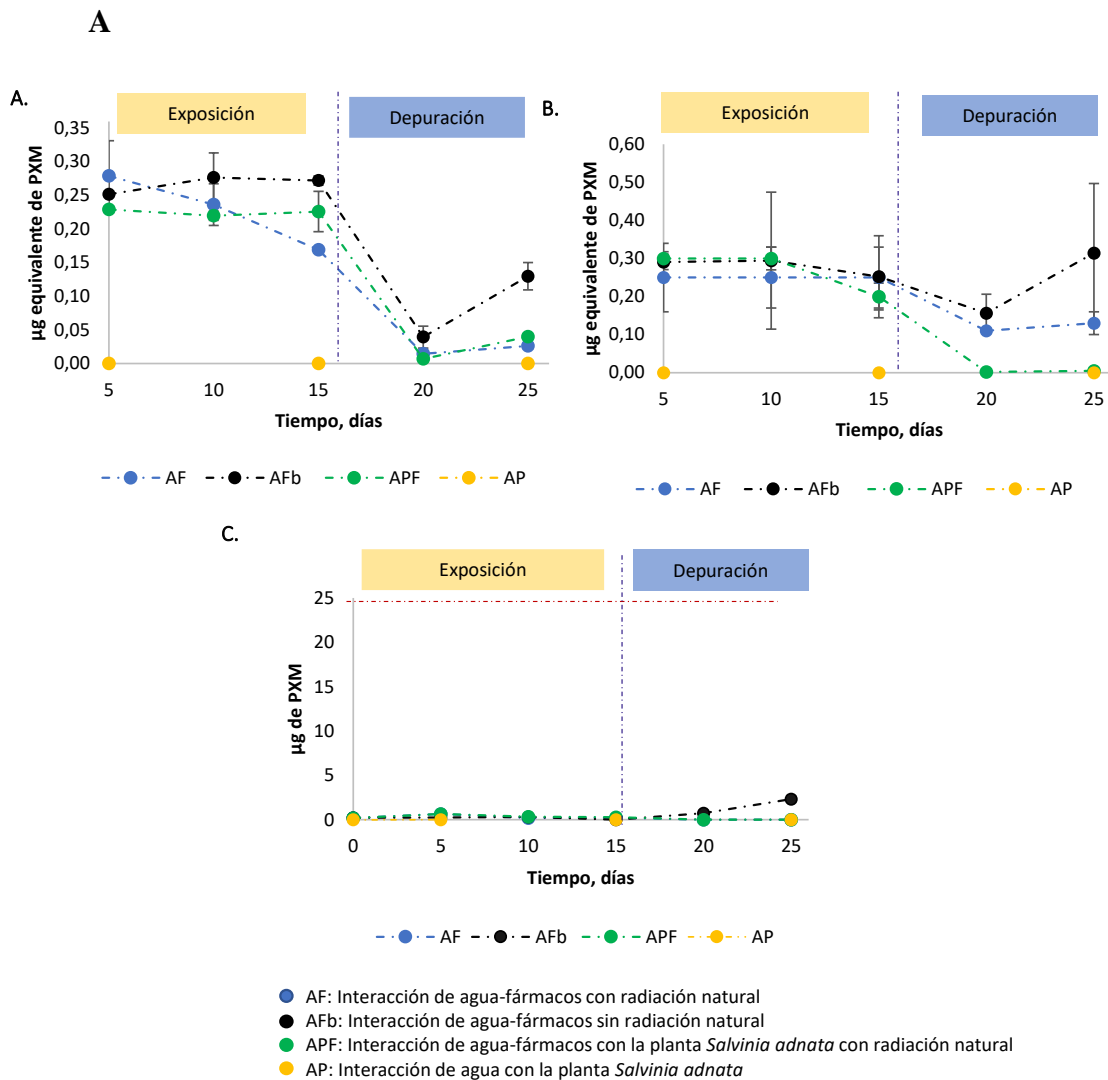


La distribución de PXM y sus dos metabolitos (véase **Figura 21**) se obtuvo de las muestras acuosas de las interacciones estudiadas, durante un periodo de 25 días para AF, AFb y en el proceso de interacción con la planta (APF), se muestra dividido en dos partes: 1) exposición (15 días) y 2) excreción entre los días 20 y 25. Las cantidades de los metabolitos se expresaron en μg equivalentes de PXM. Los metabolitos PXM-1 y PXM-2 se detectaron en las

muestras de todas las interacciones estudiadas (

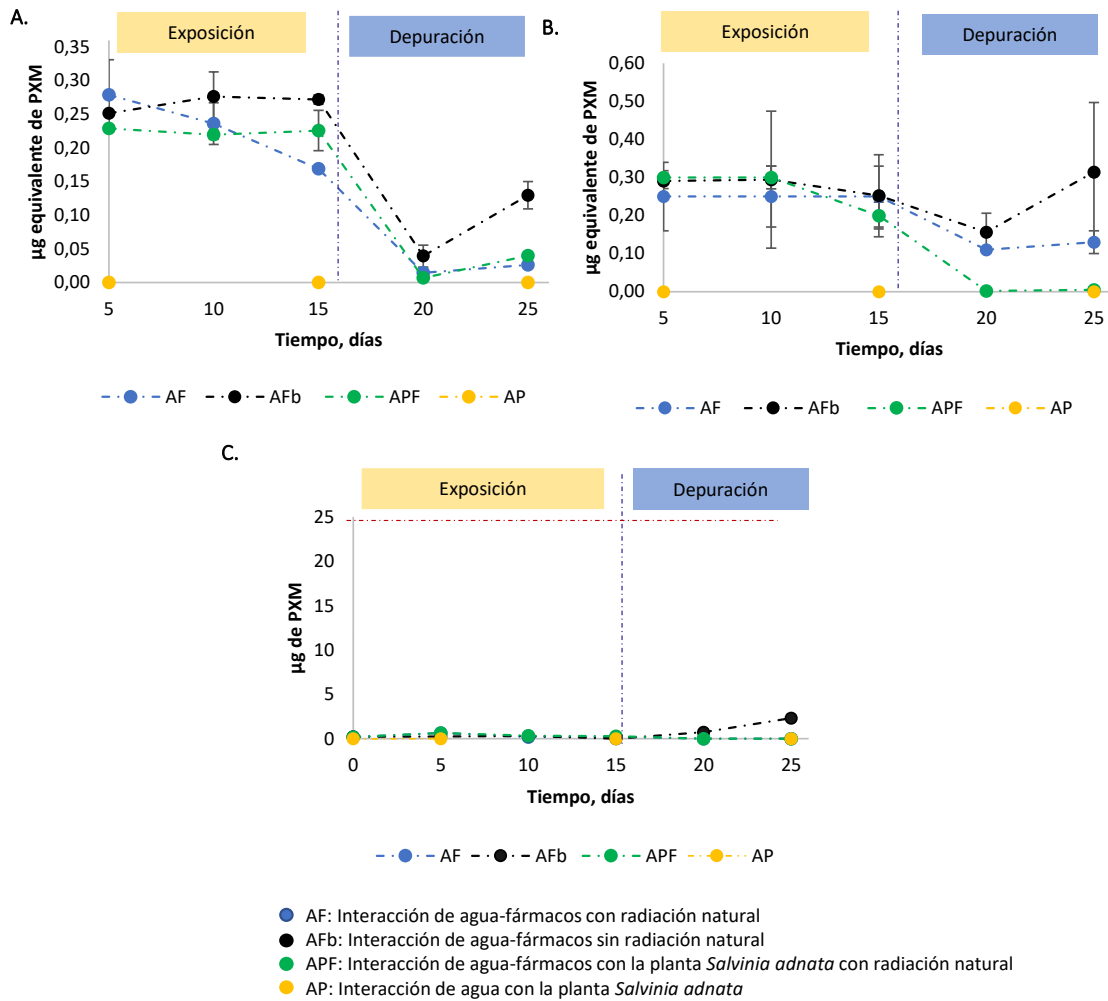


- AF: Interacción de agua-fármacos con radiación natural
- AFb: Interacción de agua-fármacos sin radiación natural
- APF: Interacción de agua-fármacos con la planta *Salvinia adnata* con radiación natural
- AP: Interacción de agua con la planta *Salvinia adnata*



B). Además, se detectaron estos compuestos en cantidades menores que para el PXM en el mismo periodo de depuración comprendido entre los días 20 y 25 de la interacción APF, que sugiere un posible proceso de retorno del compuesto original o de algún metabolito por parte de

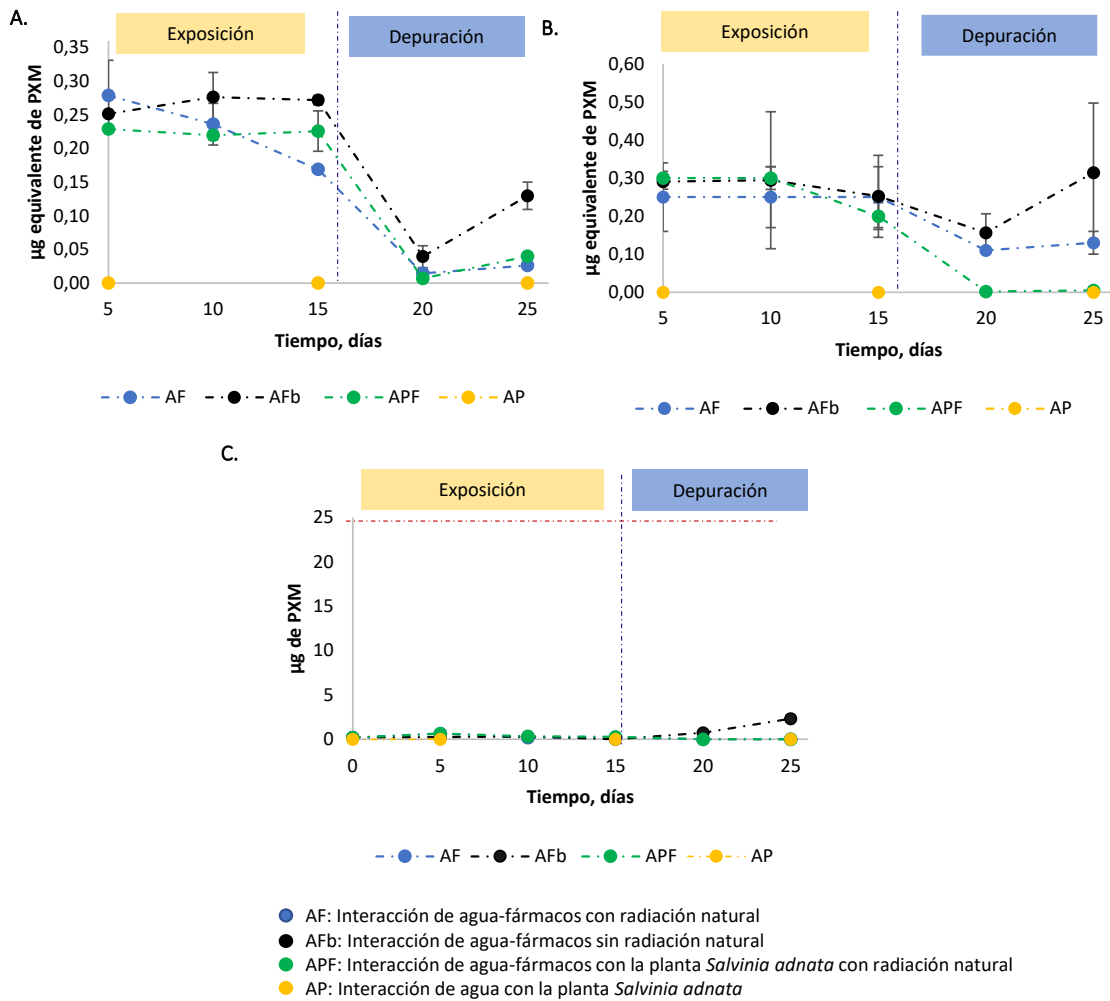
la planta hacia el medio acuoso. Para el PXM (



C), se observó que la cantidad presente en las muestras en el día cero fue de 0.2 µg correspondiente 0.8% de la cantidad inicial de PXM, esta disminución se atribuye al efecto matriz identificado en las muestras de agua TAP (pH 7.35 ± 0.05) (sección 5.2.2.). Adicionalmente, con base en la investigación realizada por Jiménez y col., (2018) donde se evaluó la degradación biológica, fotoquímica y térmica de tres oxicanes en muestras de agua de río (pH 7.8) enriquecidas, se observó la formación del compuesto PXM-1 después de aproximadamente 10 horas en las muestras irradiadas con luz solar y en muestras bajo condiciones no forzadas se monitoreó durante 30 días, y para el PXM se observó que la radiación

solar promovió la rápida degradación con un tiempo de vida media de nueve horas aproximadamente; y en muestras de agua de río bajo condiciones no forzadas el tiempo de vida media fue de 3.62 días.

Figura 21. Variación de la cantidad de piroxicam y sus metabolitos extraídos mediante SPE y analizados por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS, en las muestras acuosas de los experimentos de interacción AF, AFb, APF y AP. **A.** PXM-1, **B.** PXM-2 y **C.** PXM



4.7.2. Identificación distribución y análisis de espectros de masas de diclofenaco y sus metabolitos.

El análisis por LC-MS permitió identificar, tentativamente, siete metabolitos del DIC en los extractos SPE de las muestras acuosas correspondientes a las interacciones AF, AFb y APF. En la

Figura 22, se presentan las EIC de las moléculas protonadas de DIC y los metabolitos detectados en las muestras acuosas analizadas, y, en la **Figura 23**, se muestran las estructuras químicas propuestas para cada una respectivamente. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la **Tabla 29**.

Figura 22. EIC obtenida por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de los extractos SPE de las muestras acuosas de las interacciones AF, AFb y APF.

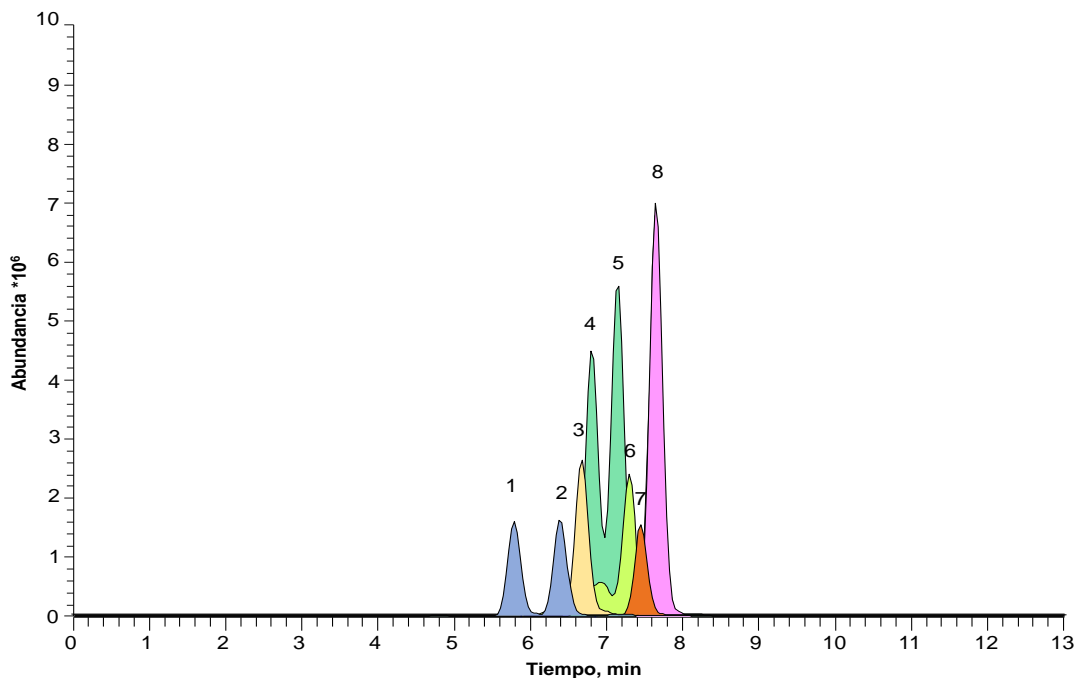
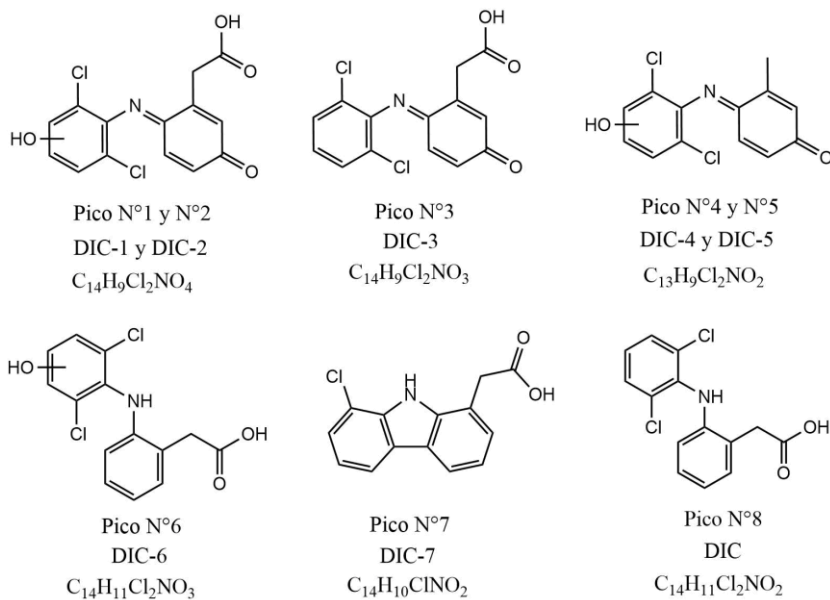


Figura 23. Estructuras moleculares propuestas para los metabolitos identificados tentativamente y DIC.



En la

Figura 22, se presenta la EIC para DIC y sus metabolitos detectados en los extractos SPE de las muestras acuosas de las condiciones estudiadas, los tiempos de retención de los metabolitos son menores que DIC, lo que sugiere una mayor polaridad de los metabolitos debido al modo de gradiente en cromatografía líquida de fase reversa.

Tabla 29. Información cromatográfica y de espectrometría de masas obtenida por UHPL-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS de diclofenaco y sus metabolitos detectados en los extractos SPE de las muestras acuosas del experimento de interacción con los fármacos AINE.

t _R ,min	N° pico Fig 22	Abreviatura	Fórmula	HCD, eV	Modo de ionización	Masa exacta		Δppm	Iones producto	
						Calculada	Experimental		Tipo de fragmento	m/z, (I %)
5,77	1	DIC-1	C ₁₄ H ₉ O ₄ NCl ₂	30	positivo	325.99814	325.99783	-0.94003	*[M+H] ⁺	325.99814 (42)
									[(M+H)-H ₂ O] ⁺	307.98727 (52)
									[(M+H)-H ₂ O-H ₂ O] ⁺	289.97672 (39)
									[(M+H)-HCOOH] ⁺	279.99240 (79)
									[(M+H)-H ₂ O-Cl] ⁺	273.01843 (11)
									[(M+H)-HCOOH-H ₂ O] ⁺	261.98184 (61)
									[(M+H)-HCOOH-Cl] ⁺	245.02362 (100)
									[(M+H)-HCOOH-HCl] ⁺	244.01582 (14)
									[(M+H)-HCOOH-H ₂ O-CO] ⁺	233.98703 (8)
									[(M+H)-HCOOH-Cl-CO] ⁺	216.02103 (3)
6,36	2	DIC-2	C ₁₄ H ₉ O ₄ NCl ₂	30	positivo	325.99814	325.99759	-1.68893	*[M+H] ⁺	325.99759 (30)
									[(M+H)-H ₂ O] ⁺	307.98672 (1)
									[(M+H)-CO] ⁺	298.00272 (17)
									[(M+H)-Cl] ⁺	291.02881 (6)
									[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	279.99197 (2)
									[(M+H)-Cl-CH ₃] ⁺	276.00534 (100)
									[(M+H)-CO-HCl] ⁺	262.02612 (9)
									[(M+H)-Cl-CH ₃ -CO] ⁺	248.01051 (10)
6,65	3	DIC-3	C ₁₄ H ₉ O ₃ NCl ₂	20	positivo	310.00323	310.00284	-1.24826	*[M+H] ⁺	310.00284 (20)
									[(M+H)-H ₂ O] ⁺	291.99231 (100)
									[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	263.99734 (1)
									[(M+H)-H ₂ O-CO-Cl] ⁺	229.02859 (1)
									[(M+H)-H ₂ O-CO-Cl-Cl] ⁺	194.05991 (1)
6,80	4	DIC-4	C ₁₃ H ₉ O ₂ NCl ₂	50	positivo	282.00831	282.00790	-1.44126	*[M+H] ⁺	282.00790 (33)
									[(M+H)-CO] ⁺	254.01311 (5)
									[(M+H)-CO-CH ₃] ⁺	238.98961 (35)
									[(M+H)-CO-Cl] ⁺	219.04433 (3)
									[(M+H)-CO-HCl] ⁺	218.03648 (10)
									[(M+H)-CO-CH ₃ -Cl] ⁺	204.02089 (100)
									[(M+H)-CO-Cl-Cl] ⁺	184.07561 (3)

Tabla 29. Continuación.

7,16	5	DIC-5	C ₁₃ H ₉ O ₂ NCl ₂	10	positivo	282.00831	282.00772	-2.0906	*[M+H] ⁺	282.00772 (38)
									[(M+H)-H ₂ O] ⁺	263.99731 (100)
									[(M+H)-Cl] ⁺	247.03911 (60)
									[(M+H)-HCl] ⁺	246.03133 (12)
									[(M+H)-Cl-OH] ⁺	230.03639 (22)
									[(M+H)-Cl-HCl] ⁺	211.06252 (1)
7,30	6	DIC-6	C ₁₄ H ₁₁ O ₃ NCl ₂	20	positivo	312.01888	312.01837	-1.61394	*[M+H] ⁺	312.01837 (100)
									[(M+H)-H ₂ O] ⁺	294.0079 (26)
									[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	266.01309 (45)
									[(M+H)-H ₂ O-CO-Cl] ⁺	231.04433 (50)
									[(M+H)-H ₂ O-CO-HCl] ⁺	230.03648 (17)
									[(M+H)-H ₂ O-CO-Cl-Cl] ⁺	196.07570 (2)
7,43	7	DIC-7	C ₁₄ H ₁₀ O ₂ NCl	10	positivo	260.04728	260.04712	-0.6295	*[M+H] ⁺	260.04712 (3)
									[(M+H)-HCOOH] ⁺	214.04153 (100)
7,64	8	DIC	C ₁₄ H ₁₁ O ₂ NCl ₂	10	positivo	296.02396	296.02371	-0.8391	*[M+H] ⁺	296.02371 (24)
									[(M+H)-H ₂ O] ⁺	278.01315 (44)
									[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	250.01830 (100)
									[(M+H)-H ₂ O-CO-Cl] ⁺	215.04950 (34)

* Masa exacta de la molécula protonada o aducto según corresponda.

En la **Tabla 29**, se muestra la información cromatográfica general de los compuestos identificados, y se observó el aumento en el número de los átomos de oxígeno en cuatro compuestos, lo que sugiere que la oxidación es uno de los procesos de degradación que ocurrió en las diferentes condiciones, en el periodo monitoreado.

En el espectro de masas de los picos N°1 y pico N°2 correspondientes a DIC-1 y DIC-2 (**Figura 24A** y

Figura 25A) se registró la molécula protonada $C_{14}H_{10}O_4NCl_2 [M+H]^+$ en m/z 325.99789 (100) y 325.99759 (100) respectivamente, además se identificaron los iones de aductos formados con sodio en m/z 347.97977 y 347.97992 respectivamente. La presencia de dos átomos de cloro en la estructura se corroboró tanto por la distribución de señales isotópicas del $[M+H]^+$ correspondientes a $^{35}Cl, ^{35}Cl$; 100% : $^{35}Cl, ^{37}Cl$; 64.7% : $^{37}Cl, ^{37}Cl$; 9.9% \approx 9:6:1, y a cada uno se asocia la presencia de un ^{13}C (véase **Figura 24C** y

Figura 25C), como por la formación de fragmentos que contenían el elemento Cl (**Figura 24B** y

Figura 25B). Se confirmó la presencia del grupo funcional ácido carboxílico debido a la pérdida de ácido fórmico en para DIC-1, y para DIC-2 por la pérdida de H_2O , seguida de CO que da lugar al fragmento en m/z 279.99197.

Salgado y col. (2012), identificaron un compuesto con la misma masa molecular y fórmula elemental, mediante análisis por LC-MS, en modo de adquisición de iones positivos, sin embargo, los fragmentos reportados por este autor no coincidieron con los obtenidos en este estudio para ninguno de los dos metabolitos, sin embargo, Murgulo y col. (2018) lo reportaron en modo de adquisición de iones negativos y, Perez-Estrada y col. (2005), identificaron el compuesto de degradación de DIC mediante reacción foto-Fenton (5 mM de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y H_2O_2 , 30%).

Figura 24. **A.** Espectro *full MS* de DIC-1, $C_{14}H_{10}O_4NCl_2$; **B.** Espectro *MS* del ion $[M + H]^+$ de DCF-1, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 30 eV) y sus iones-producto; **C.** Espectro *full MS* de DIC-1, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de DCF-1 y la relación isotópica de iones (^{35}Cl , ^{35}Cl ; 100%) : (^{35}Cl , ^{37}Cl ; 64.7%) : (^{37}Cl , ^{37}Cl ; 9.9%) \approx 9:6:1. Muestra AFb-2.

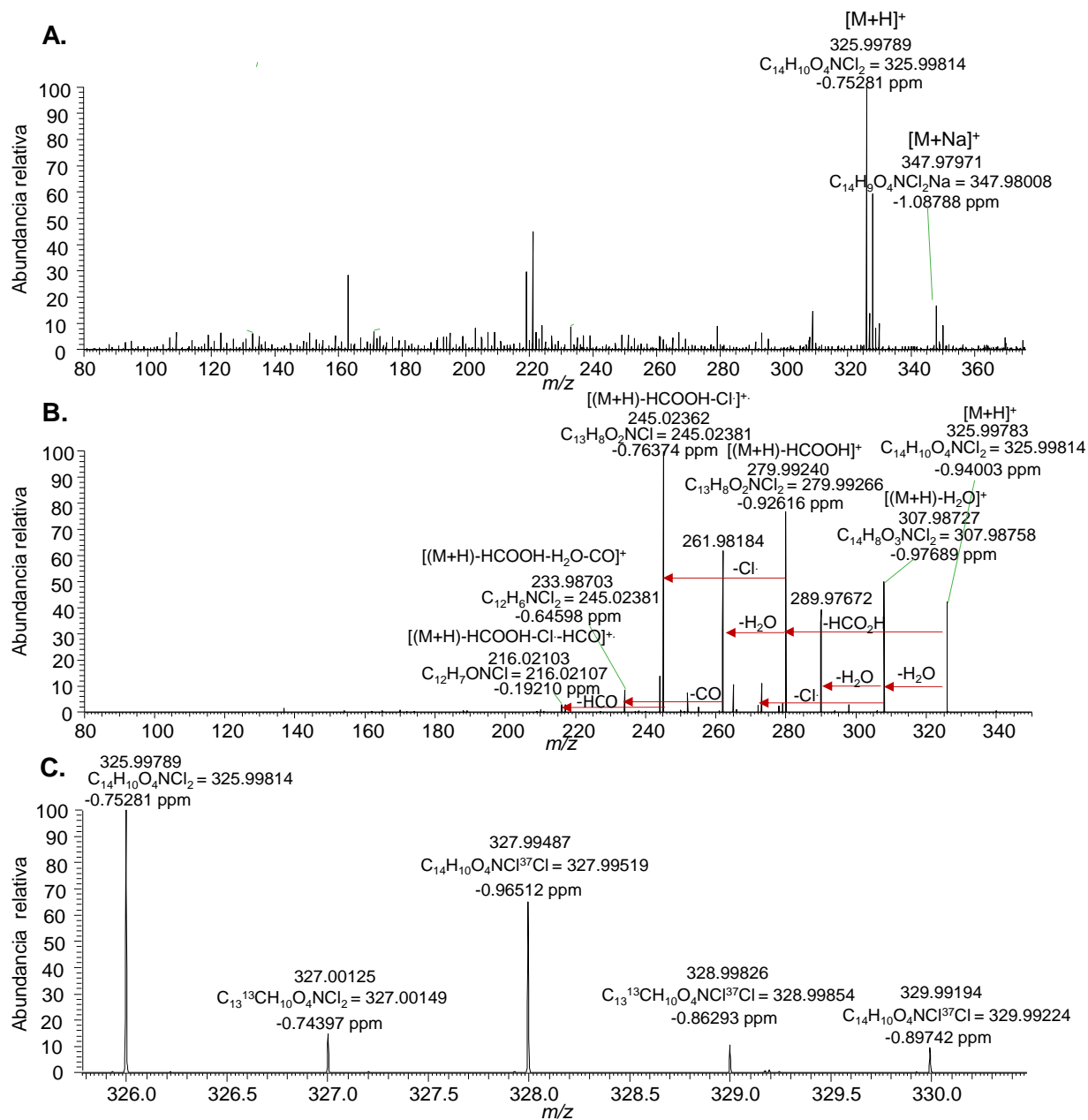
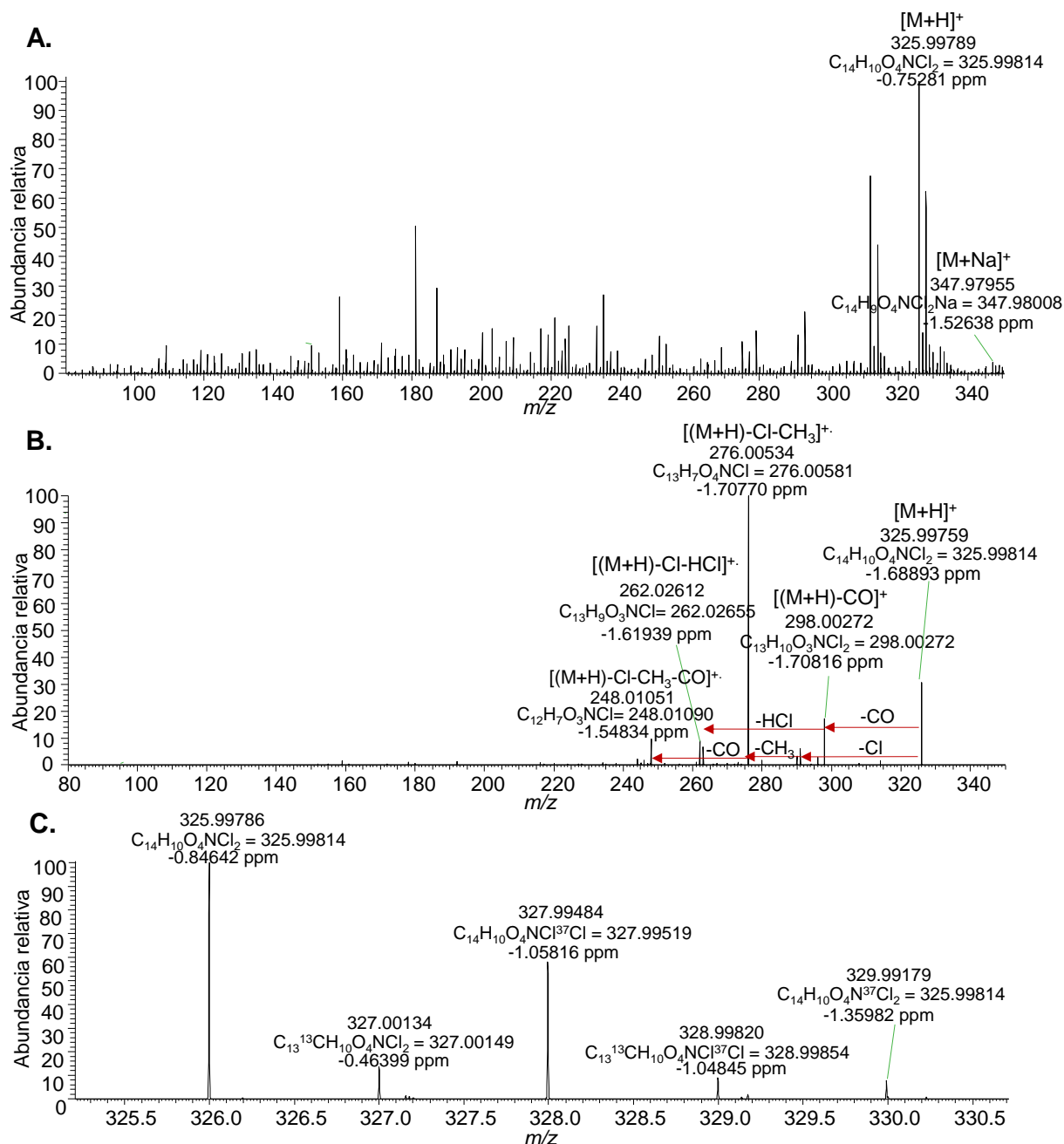


Figura 25. A. Espectro *full MS* de DIC-2, $C_{14}H_{10}O_4NCl_2$; B. Espectro *MS* del ion $[M + H]^+$ de DCF-2, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 30 eV) y sus iones-producto; C. Espectro *full MS* de DIC-2, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de DCF-2 y la relación isotópica de iones (^{35}Cl , ^{35}Cl ; 100%) : (^{35}Cl , ^{37}Cl ; 64.1%) : (^{37}Cl , ^{37}Cl ; 7.3%) \approx 9:6:1. Muestra AFb-2.



En el espectro de masas del pico N°3 correspondiente a DIC-3 (

Figura 26A) se registró la molécula protonada $C_{14}H_{10}O_3NCl_2$, $[M+H]^+$ en m/z 310.00284 (20). La presencia de dos átomos de cloro se confirma por la formación del ion en m/z 194.05991 $[(M+H)-H_2O-CO-2Cl]^+$, además de la distribución típica de intensidades de señales isotópicas de su ion $[M+H]^+$ correspondientes a ^{35}Cl , ^{35}Cl ; 100% : ^{35}Cl , ^{37}Cl ; 62,3% : ^{37}Cl , ^{37}Cl ; 11.3% \approx 9:6:1. (

Figura 26B).

La composición elemental de DIC-3 reveló dos átomos de hidrógeno menos con respecto al pico N°6 correspondiente a DIC-6, lo que podría interpretarse con la formación de un doble enlace adicional. La presencia del grupo funcional del ácido carboxílico se confirmó por los iones fragmento de la pérdida de H_2O m/z 291.99231 (100%), seguida de pérdida de CO en m/z 194.05991 (1%), como ocurre también con el espectro de masas del patrón de DIC (Murgulo y col., 2018).

En los espectros de masas de DIC-4 (pico N°4,

Figura 27A) y DIC-5 (pico N°5,

Figura 28) se observaron dos picos que registraron la molécula protonada $C_{13}H_{10}O_2NCl_2$, en m/z 282.00812 (100) y 282.00809 (100) respectivamente. Adicionalmente, se registró el aducto formado por sodio para ambos compuestos.

De la misma manera como en anteriores compuestos, se determinó la presencia de los átomos de cloro mediante la distribución de señales isotópicas para $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ (

Figura 27C) y

Figura 28C), también por la presencia de fragmentos que contenían este elemento (

Figura 27B y

Figura 28B). Se presume que la formación de estos productos de degradación se origina de la reacción de descarboxilación en la cadena alifática de DIC-1 y DIC-2 (Murgulo y col. 2018).

Figura 26. A. Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de DIC-3, $C_{14}H_{10}O_3NCl_2$, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 20 eV) y registro de sus iones-producto; **B.** Espectro *full MS* de DIC-3, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de DIC-3 y la distribución isotópica de iones (^{35}Cl , ^{35}Cl ; 100%) : (^{35}Cl , ^{37}Cl ; 62,3%) : (^{37}Cl , ^{37}Cl ; 11.3%) \approx 9:6:1. Muestra AFb-5.

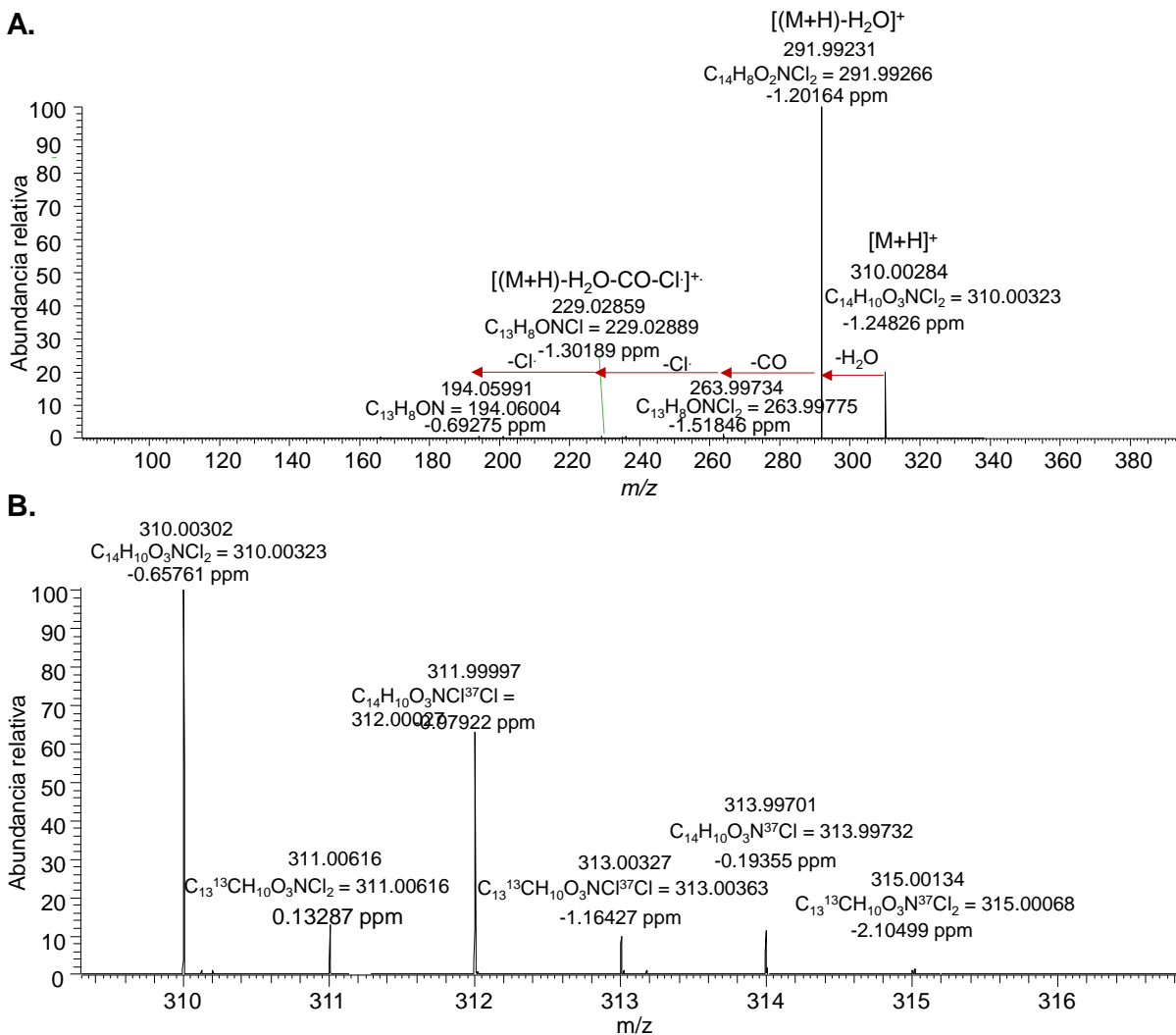


Figura 27. **A.** Espectro *full MS* de DIC-4, C₁₃H₉O₂NCl₂; **B.** Espectro MS del ion [M + H]⁺ de DCF-4, energizado y fragmentado en la HCD (N₂, 50 eV) y registro de sus iones-producto; **C.** Espectro *full MS* de DIC-4, obtenidos por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada [M + H]⁺ de DCF-4 y la relación isotópica de iones (³⁵Cl, ³⁵Cl; 100%) : (³⁵Cl, ³⁷Cl; 64.1%) : (³⁷Cl, ³⁷Cl; 7.3%) ≈ 9:6:1. Muestra AFb-5.

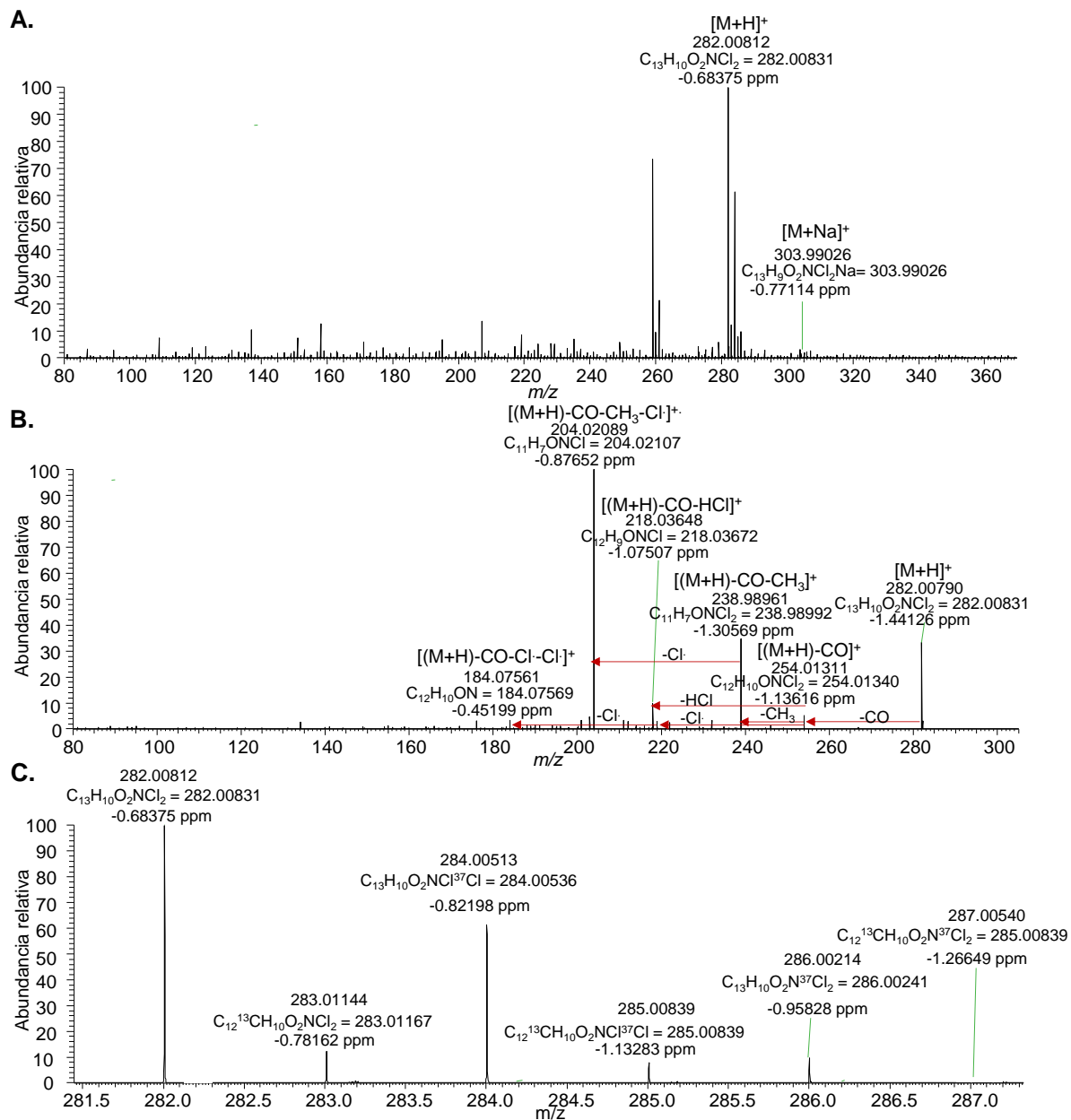
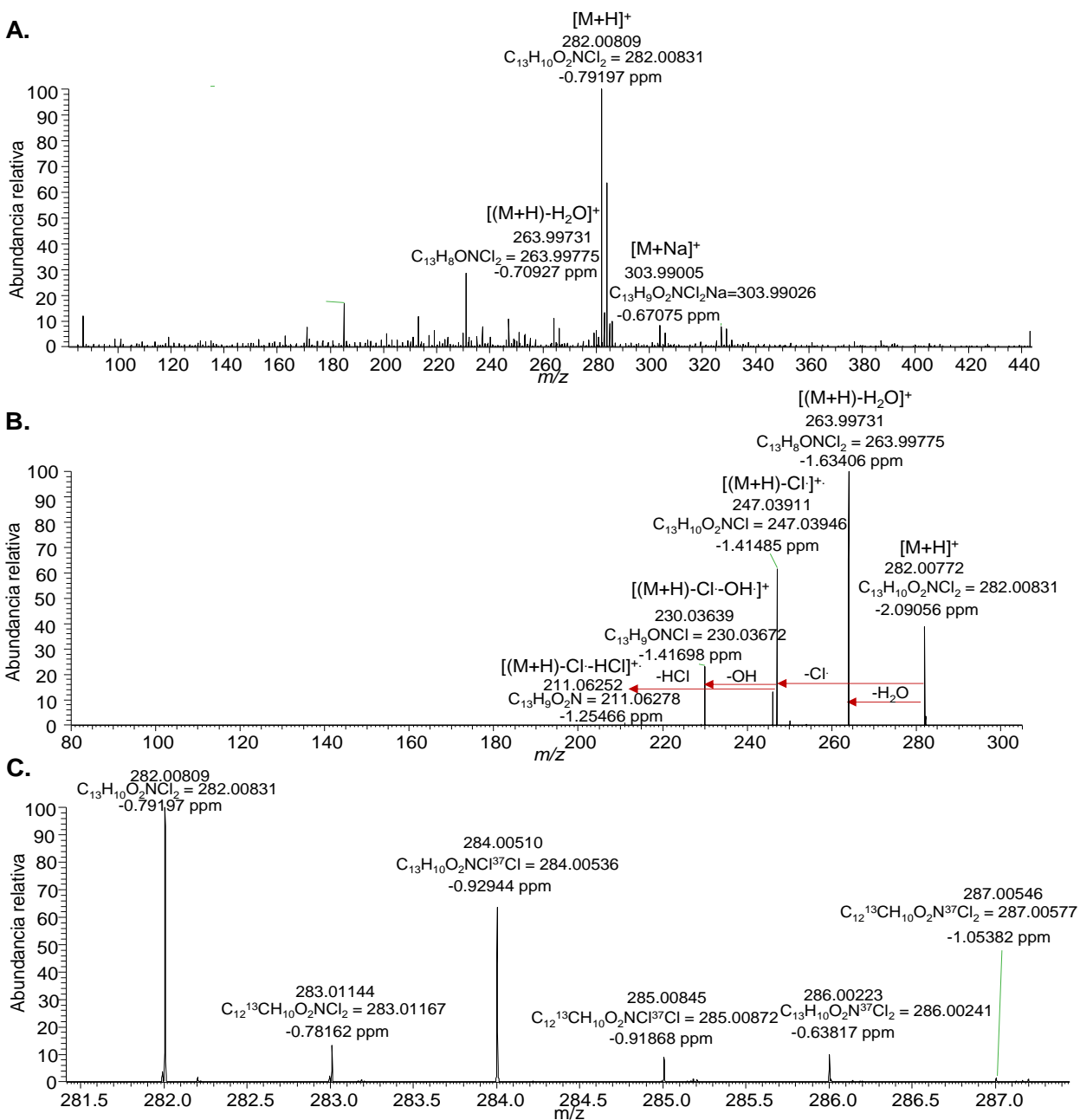


Figura 28. **A.** Espectro *full MS* de DIC-5, $C_{13}H_9O_2NCl_2$; **B.** Espectro MS del ion $[M + H]^+$ de DCF-5, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 30 eV) y registro de sus iones-producto; **C.** Espectro *full MS* de DIC-5, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de DCF-5 y la relación isotópica de iones (^{35}Cl , ^{35}Cl ; 100%) : (^{35}Cl , ^{37}Cl ; 64.4%) : (^{37}Cl , ^{37}Cl ; 9.5%) \approx 9:6:1. Muestra AFb-5.



En el espectro de masas del pico N°6 correspondiente a DIC-6 (véase **Figura 29A**) se registró la molécula protonada $C_{14}H_{10}O_3NCl_2$, $[M+H]^+$ en m/z 312.01837 (100). La presencia de dos átomos de cloro se confirma por la formación del ion en m/z 196.07570 $[(M+H)-H_2O-CO-2Cl]^+$, además de la distribución típica de intensidades de señales isotópicas de su ion $[M+H]^+$ correspondiente a 9:6:1 (véase **Figura 29B**). La composición elemental de DIC-6 reveló un

átomo de oxígeno adicional, con respecto al pico N°8 correspondiente a DIC, que indica una hidroxilación en el compuesto (Murgulo y col., 2018; Emhofer y col., 2017; Ben Ouada y col., 2109).

El compuesto mono clorado registrado en el cromatograma de LC-MS con $t_R = 7.46$ min (pico N°7

Figura 30), según su espectro de masas se detectó la molécula protonada con composición elemental $C_{14}H_{11}O_2NCl$ (

Figura 30A), la presencia de un solo átomo de cloro para esta estructura se confirmó con la distribución de las intensidades de las señales isotópicas en su ion $[M+H]^+$ en m/z 260.04712 (100%, un átomo de ^{35}Cl); m/z 262.04413 (25.4% , un átomo de ^{37}Cl) con relación 3:1 (

Figura 30B). Murgulo y col., (2018) identificaron esta molécula en procesos de fotólisis y fotocatalisis y se propuso como posible estructura el ácido acético clorocarbazol (Poirier-Larabie y col., 2016; Koumaki y col., 2015).

La identificación de DIC en los extractos acuosos de las interacciones se realizó de manera confirmatoria basada en el parámetro cromatográfico del t_R , como en la comparación de los espectros de MS, patrón de fragmentación, masas exactas de iones, composición elemental y distribución isotópica con el material de referencia certificado de DIC. El espectro de masas, fórmula condensada y la relación isotópica obtenidas en los espectros HRMS de DIC presente en los extractos (**Figura 31A** y **Figura 31B**), fueron idénticas a las del CMR de DIC.

Figura 29. A. Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de DIC-6, $C_{14}H_{11}O_3NCl_2$, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 20 eV) y registro de sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de DIC-6, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula

protonada $[M + H]^+$ de DIC-6 y la distribución isotópica de iones (^{35}Cl , ^{35}Cl ; 100%) : (^{35}Cl , ^{37}Cl ; 71,8%) : (^{37}Cl , ^{37}Cl ; 8.67%) \approx 9:6:1. Muestra AF-10.

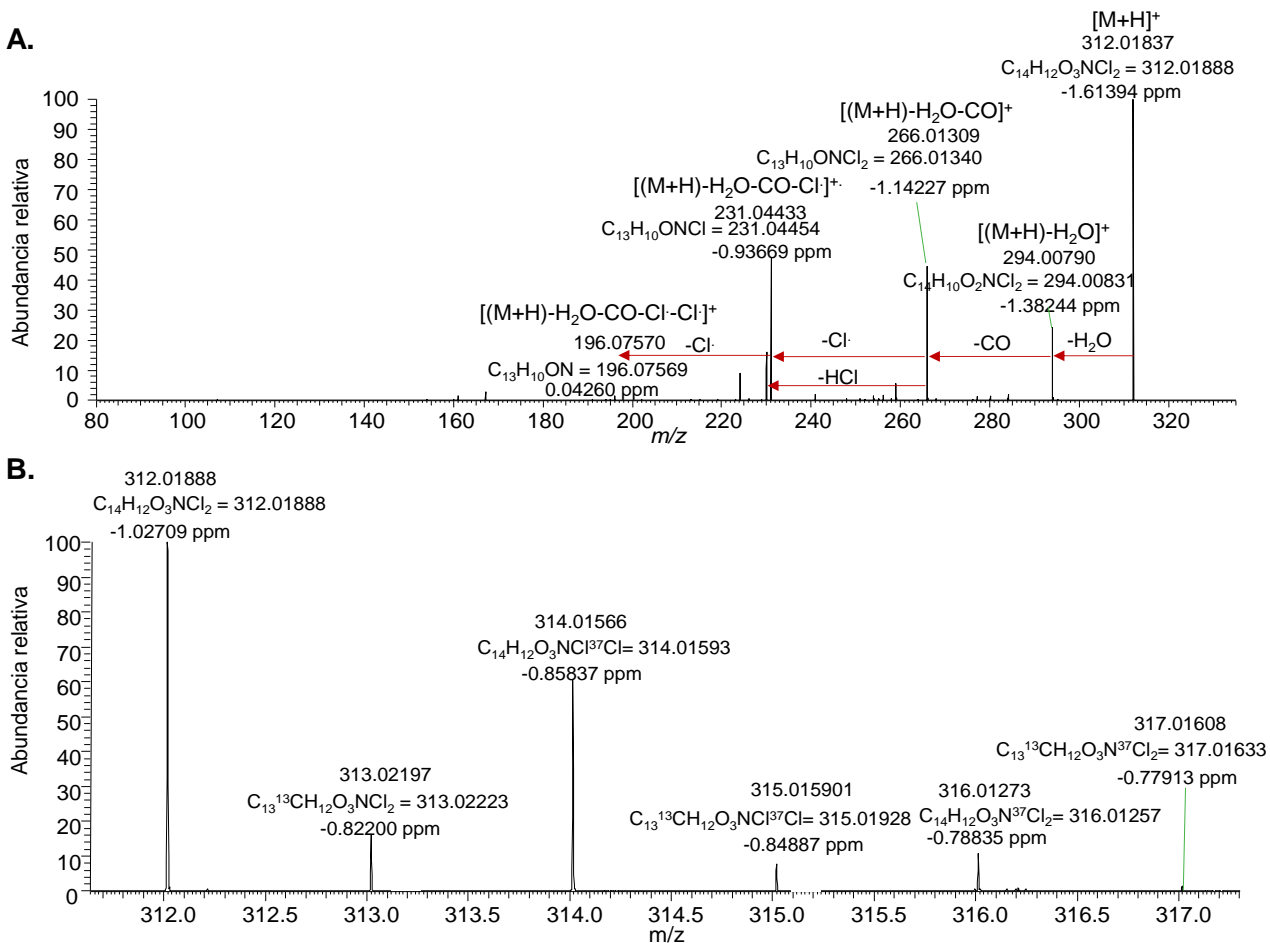


Figura 30. A. Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de DIC-7, $C_{14}H_{11}O_2NCl$, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 20 eV) y el registro de sus iones-producto; B. Espectro *full MS* de DIC-7, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la

molécula protonada $[M + H]^+$ de DIC-7 y la distribución isotópica de iones (^{35}Cl , 100%) : (^{37}Cl ; 25.4%) \approx 3:1. Muestra AF-15.

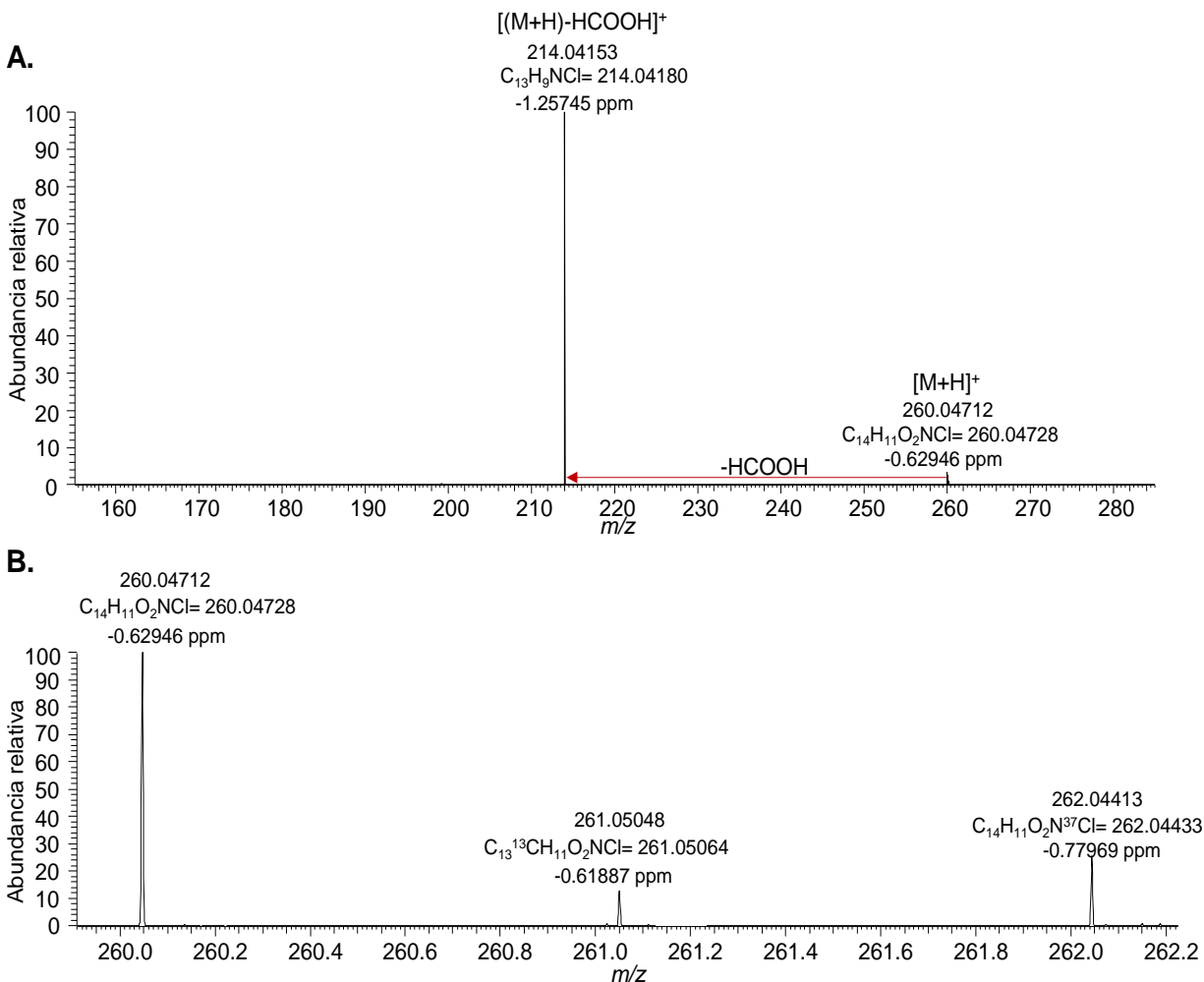
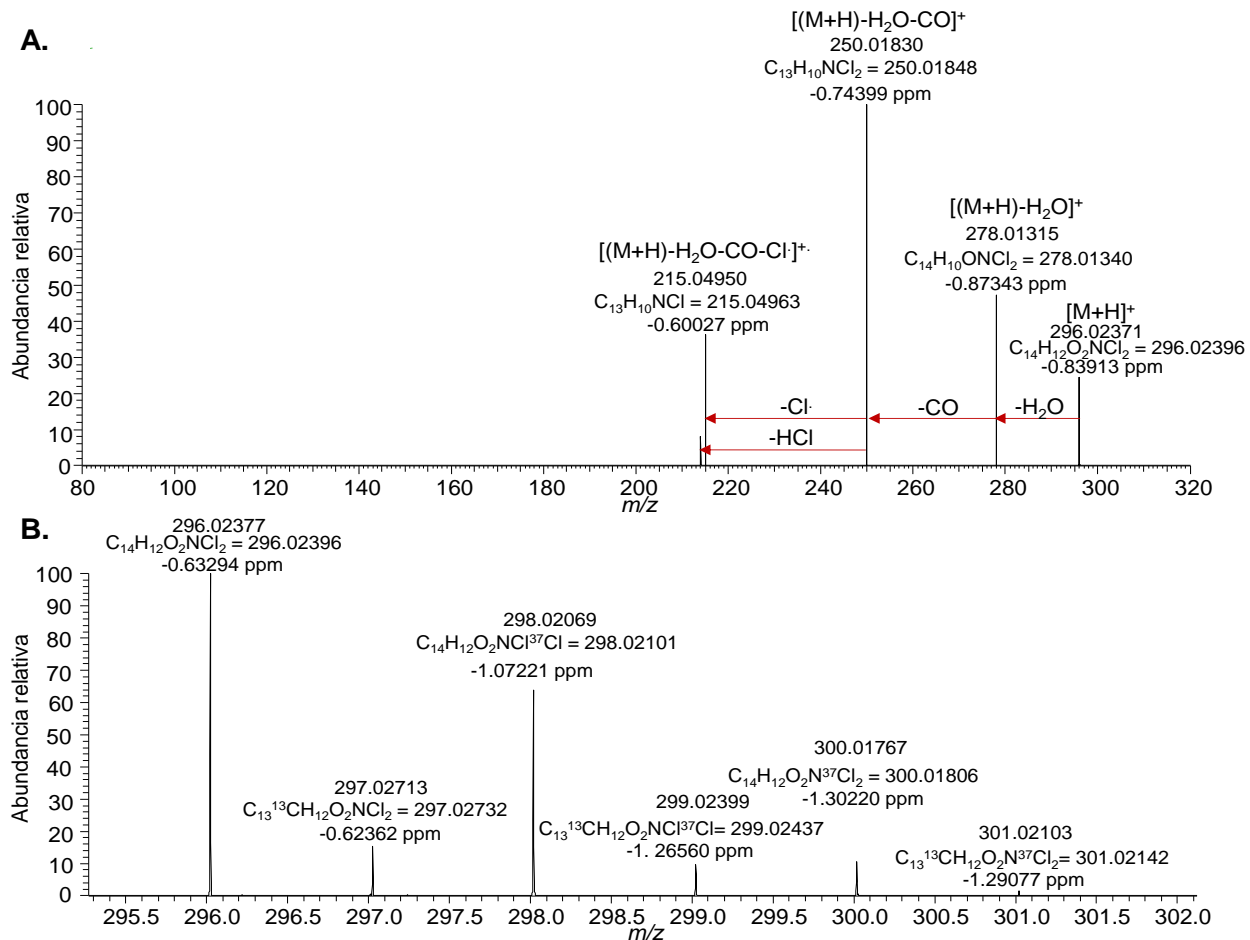


Figura 31. **A.** Espectro MS del ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ de DIC, $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{NCl}_2$, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 20 eV) y el registro de sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de DIC, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la

molécula protonada $[M + H]^+$ de DIC y la distribución isotópica de iones (^{35}Cl , ^{35}Cl ; 100%) : (^{35}Cl , ^{37}Cl ; 63.7%) : (^{37}Cl , ^{37}Cl ; 10.4%) \approx 9:6:1. Muestra AF-5.



La distribución de DIC y sus metabolitos identificados en las muestras acuosas se identificaron en las muestras correspondientes a las interacciones AF, AFb durante 25 días de experimentación, y para APF se muestran los periodos de exposición (15 días) y de depuración (10 días) en la

, las cantidades de los metabolitos se expresaron en μg equivalentes de DIC.

De manera general, se obtuvo una tendencia de mayor cantidad de formación de los metabolitos en los procesos de control (AF y AFb) que, en las muestras de interacción con la planta acuática, exceptuando el compuesto DIC-7 (véase

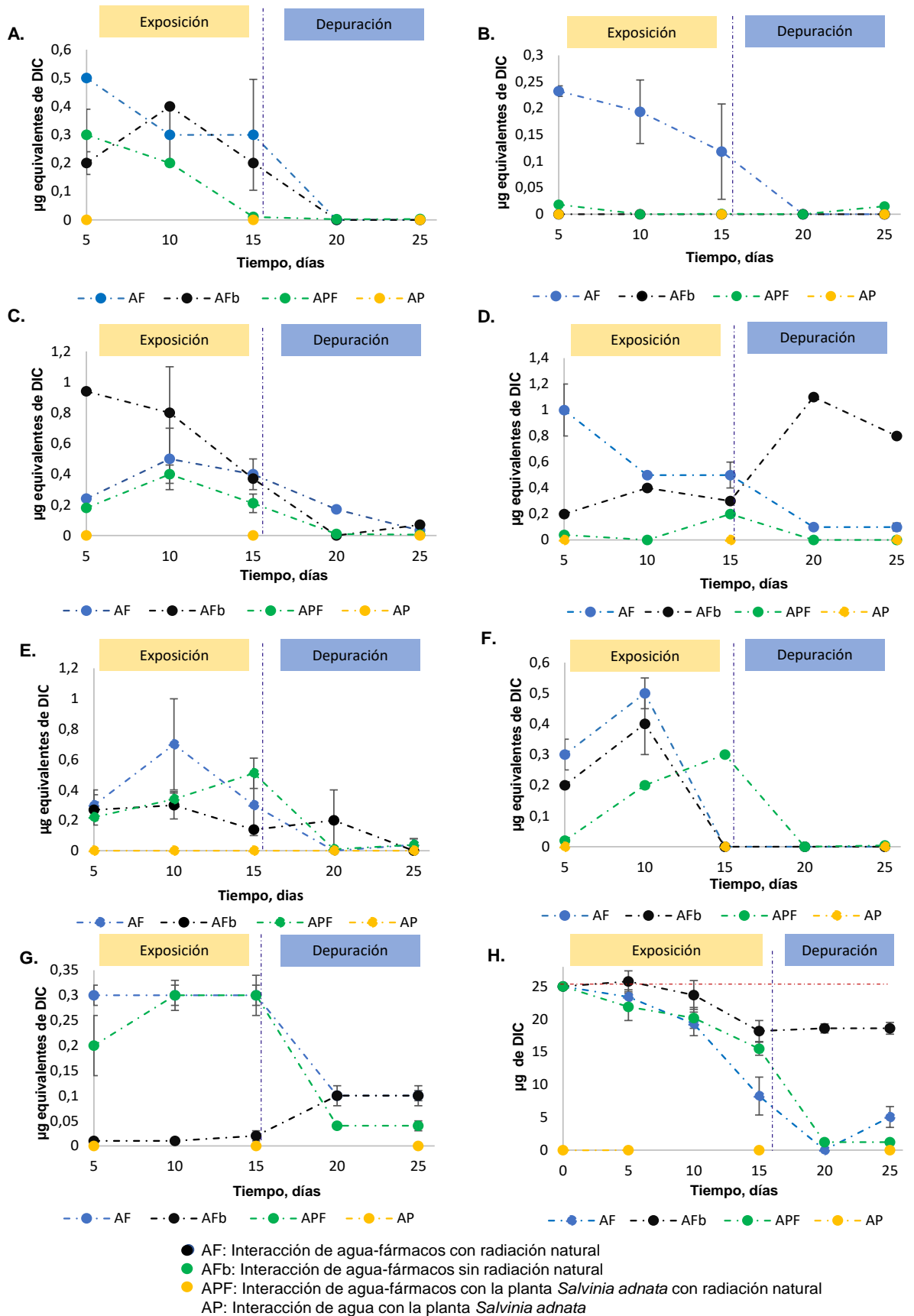
G), cuya cantidad presente en el medio acuoso para este sistema fue equivalente a la detectada en el proceso AF en los días 10 y 15 de experimentación. La cantidad de metabolitos formada en el periodo de exposición para los procesos de control equivalente en porcentaje al diclofenaco agregado en las muestras (25 µg) fue de 14%, mientras en el proceso de interacción con la planta fue del 6%.

Para el DIC, el compuesto precursor (véase

H), se observó que la degradación del compuesto ocurrió más rápidamente en las muestras con exposición a la radiación natural del sol, alcanzándose un 67% de degradación después de 15 días, mientras que este decaimiento ocurrió más lentamente en las interacciones AFb y APF, con un 27 y 33% de degradación, respectivamente en el mismo periodo.

La cinética de degradación del DIC medida por fotólisis fue descrita por Agüera y col., (2005) en la cual se observó que el tiempo de vida medio del compuesto en solución acuosa fue de 30 horas (normalizado en tiempo de irradiación continua), sin embargo, este resultado depende la intensidad lumínica a la que se expuso la muestra durante el proceso.

Figura 32. Variación de la cantidad de diclofenaco y sus metabolitos extraídos mediante SPE y análisis por UHPLC-ESI-*Orbitrap*-HRMS, en las muestras acuosas de los experimentos de interacción AF, AFb, APF y AP. **A.** DIC-1, **B.** DIC-2, **C.** DIC-3, **D.** DIC-4, **E.** DIC-5, **F.** DIC-6, **G.** DIC-7, **H.** DIC.



5.7.3. Identificación, distribución y análisis de espectros de masas de naproxeno, ibuprofeno y sus metabolitos

El análisis por LC-MS permitió identificar los compuestos NAP e IBU de manera confirmatoria, y dos metabolitos de IBU en los extractos SPE de las muestras acuosas correspondientes a las interacciones AF, AFb y APF. En **Figura 33**, se observa la superposición EIC correspondientes a los compuestos NAP, IBU y sus metabolitos, y en la **Figura 34** se encuentran sus estructuras químicas propuestas tentativamente.

Figura 33. EIC obtenida mediante UHPLC-ESI^{+/+}-Orbitrap-HRMS para NAP y IBU y sus metabolitos obtenidos de los extractos de las muestras acuosas de las interacciones AF, AFb y APF mediante SPE. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la **Tabla 30**.

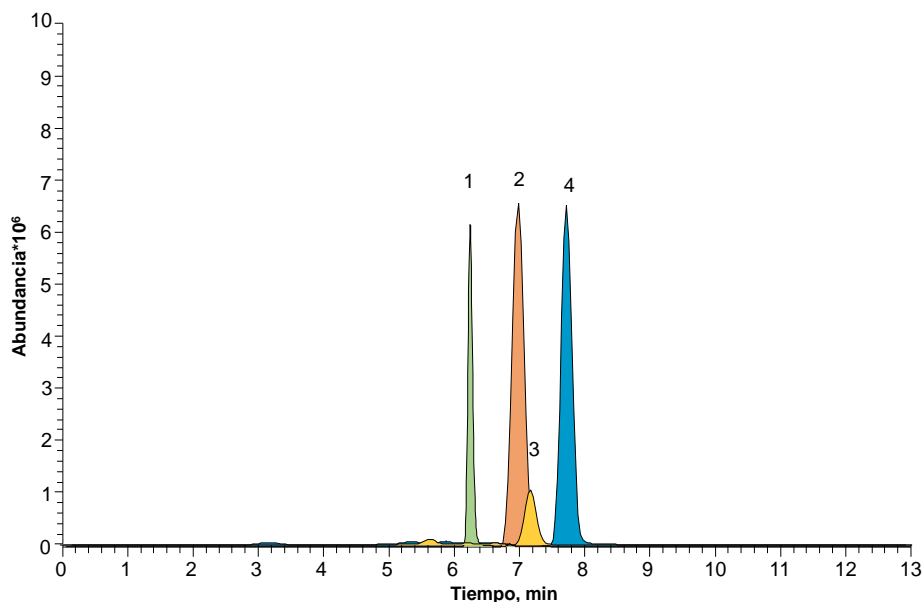


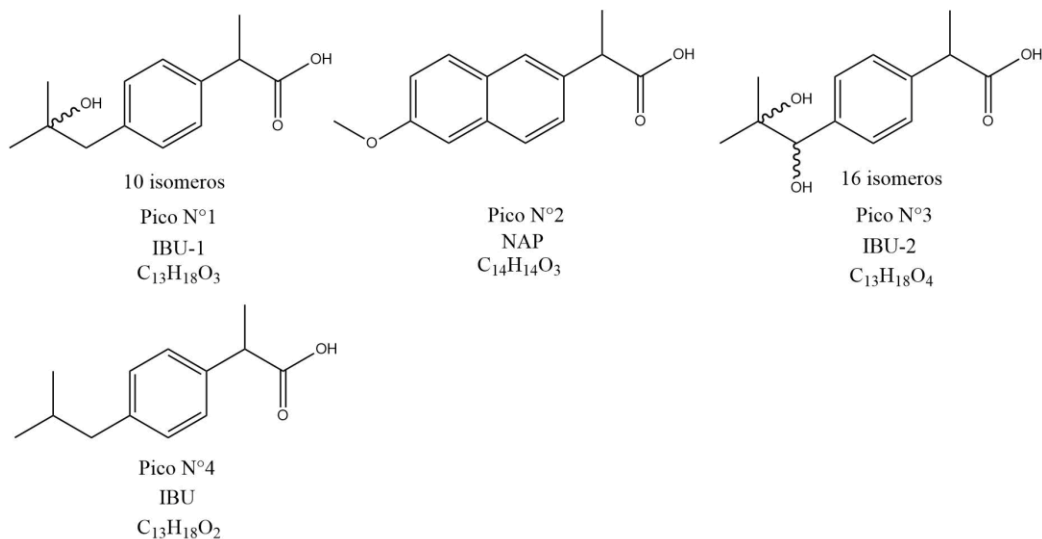
Tabla 30. Información cromatográfica y de espectrometría de masas obtenida por UHPLC-ESI^{-/+}-Q-Orbitrap-HRMS de naproxeno, ibuprofeno y sus metabolitos detectados en los extractos SPE de las muestras acuosas del experimento de interacción de fármacos en orden de aparición.

N° pico Fig 33	t _R , min	Abreviatura	Fórmula	Aducto	HCD, eV	Modo de ionización	Masa exacta		Δppm	Iones producto	
							Calculada	Experimental		Tipo de fragmento	m/z, (I %)
1	6.22	IBU-1	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	[M+NH ₄] ⁺	10	Positivo	240.15942	240.15915	-1.12796	*[M+NH ₄] ⁺	240.15915 (20)
										[(M+NH ₄)-H ₂ O] ⁺	222.14873 (16)
										[(M+NH ₄)-H ₂ O-NH ₃] ⁺	205.12225 (100)
										[(M+NH ₄)-H ₂ O-NH ₃ -C ₃ H ₆] ⁺	163.07523 (7)
2	7.05	NAP	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	[M+H] ⁺	20	Positivo	231.10157	231.10132	-1.09255	*[M+H] ⁺	231.10132 (13)
										[(M+H)-HCOOH] ⁺	185.09595 (100)
										[(M+H)-HCOOH-CH ₃] ⁺	170.07243 (1)
3	7.34	IBU-2	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	[M-H] ⁻	50	Negativo	237.11214	237.11227	0.58479	*[M-H] ⁻	237.11227 (40)
										[(M-H)-CO ₂] ⁻	193.12215 (29)
										[(M-H)-CH ₂ O-CO] ⁻	179.10657 (18)
										[(M-H)-CO ₂ -CH ₂ O] ⁻	163.11150 (100)
										[(M-H)-CH ₂ O-CO-H ₂ O] ⁻	161.09587 (20)
4	7.89	IBU	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	Full	Positivo	224.16505	224.16437	-0.47852	*[M+NH ₄] ⁺	224.16437 (100)
										[(M+NH ₄)-NH ₃] ⁺	207.13792 (25)
										[(M+NH ₄)-NH ₃ -COOH] ⁺	161.13243 (100)
										[(M+NH ₄)-NH ₃ -COOH-C ₂ H ₂] ⁺	135.11682 (10)
										[(M+NH ₄)-NH ₃ -COOH-C ₂ H ₂ -C ₂ H ₂] ⁺	119.08567 (109)

* Masa exacta de la molécula protonada, deprotonada o aducto según corresponda.

La estructura molecular propuesta para los metabolitos identificados tentativamente de IBU y las estructuras de los fármacos AINE NAP e IBU se encuentran la **Figura 34**

Figura 34. Estructura molecular propuesta para los metabolitos de IBU y las estructuras de los fármacos AINE NAP e IBU.

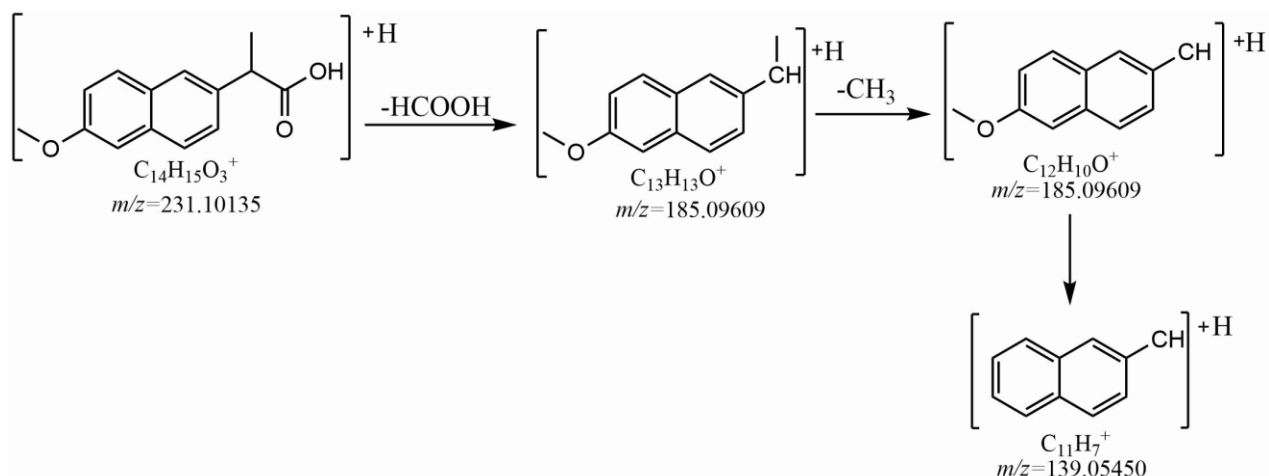


Los metabolitos detectados en los extractos SPE de las muestras acuosas presentan t_R menores que su precursor IBU, debido a que son más polares (**Figura 33**).

La identificación de NAP e IBU en los extractos SPE de las muestras acuosas, se realizó de manera confirmatoria, al igual que para todos los AINE precursores de este estudio. Los espectros de masas y su distribución isotópica para el NAP e IBU se muestran en las **Figura 36** y

Figura 37. Los iones característicos para NAP con m/z 185.09595, 170.07243, 139.05450 identificados en este trabajo fueron reportados por Zayed y col. (2013), la ruta de fragmentación propuesta para el NAP se muestra en la **Figura 35**.

Figura 35. Patrón de fragmentación de naproxeno. Tomado con modificaciones de Zayed y col. (2013).



Para los metabolitos de IBU identificados tentativamente, se observó un aumento en el número de átomos de oxígeno, sugiriendo que la oxidación es el proceso de degradación que ocurre en la diferentes condiciones estudiadas y durante el periodo monitoreado.

El espectro de masas del pico N°1 correspondiente a IBU-1, $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (**Figura 38A**), se detectó el ion correspondiente al aducto de amonio, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ en m/z 240.15915. La composición elemental de IBU-1, mostró el aumento en un átomo de oxígeno con respecto al IBU (pico N°4). El compuesto hidroxilado como la estructura más probable para este metabolito se confirmó con la pérdida de agua con la formación del ion $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}^+$ en m/z 222.14873. El hidroxibuprofeno, fue reportado como producto de degradación biológica en la planta *Lemna gibba* y en su medio de cultivo acuático (Pietrini y col., 2015), este compuesto también se ha identificado como producto de degradación en lodos, y medios de cultivos con microorganismos y hongos (Collado y col., 2012; Zwiener y col., 2002; Bastos y col., 2011). El segundo metabolito para IBU, correspondiente a IBU-2 en el pico N°3 (

Figura 39), se detectó como ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ en m/z 237.11227. La composición elemental de IBU-2, mostró el aumento en dos átomos de oxígeno con respecto al IBU (pico N°4) siendo el

compuesto di- hidroxilado su probable estructura. La presencia del grupo funcional del ácido carboxílico se confirmó por el ion fragmento de la pérdida de CO₂ en m/z 193.12231 (29%), y la pérdida de H₂O de uno de los grupos hidroxilo en m/z 161.09587 (30). Pietrini y col., (2015) identificaron el di-hidroxiibuprofeno en la planta *Lemna gibba* y el medio de cultivo; y en estudios realizados con hongos (Marco-Urrea y col., 2009).

Figura 36. A. Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de NAP, energizado y fragmentado en la HCD (N₂, 20 eV) y sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de NAP, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de NAP y la distribución isotópica de iones (¹²C; 100%) y (¹³C; 15%). Muestra AFb-5.

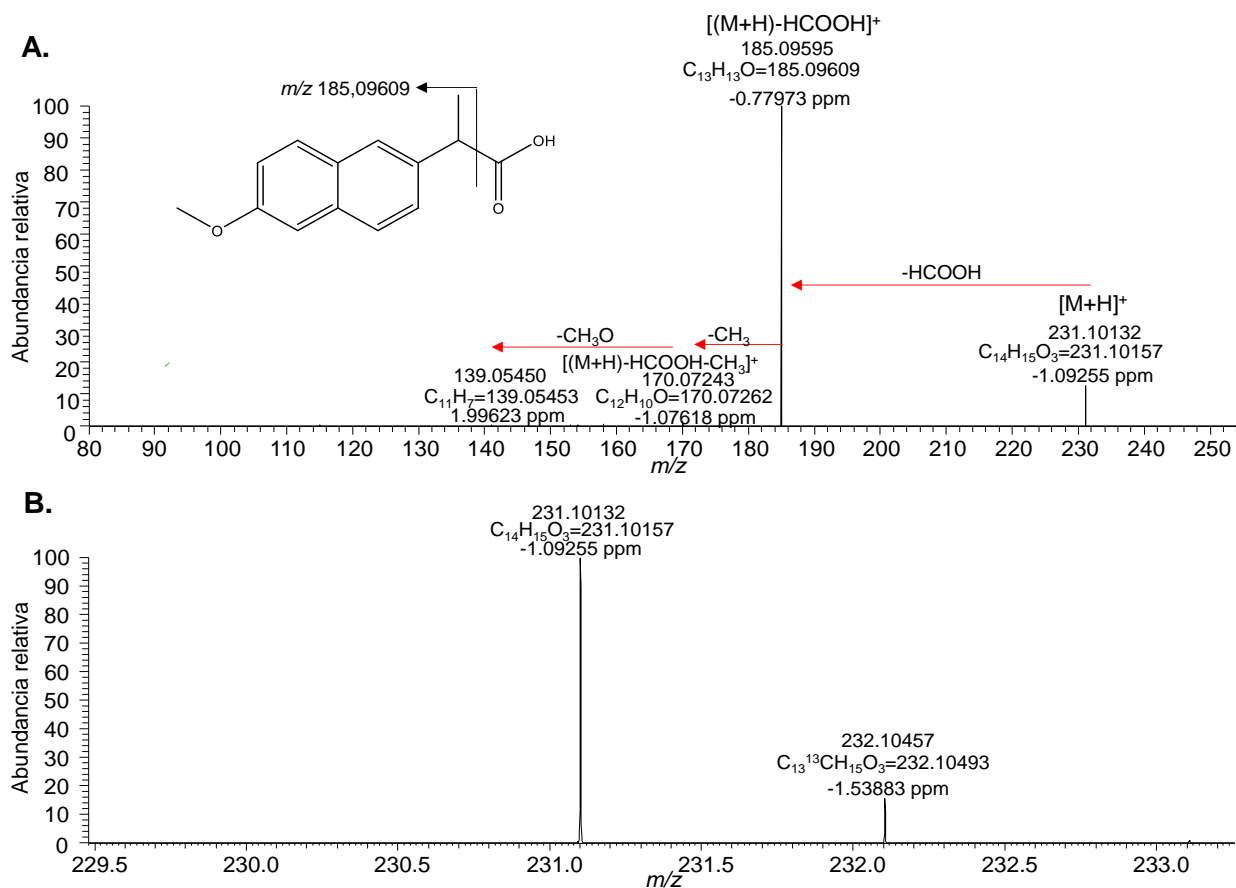


Figura 37. A. Espectro *full MS* de IBU, $C_{13}H_{18}O_2$; **B.** Espectro *full MS* de IBU, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula con el aducto de amonio $[M + NH_4]^+$ de IBU y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 15%); **C.** Espectro *full MS* de IBU, en la región de masas (m/z) en donde se detecta el ion de la molécula con el aducto de sodio $[M + Na]^+$ de IBU y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 15%) Muestra AFb-5.

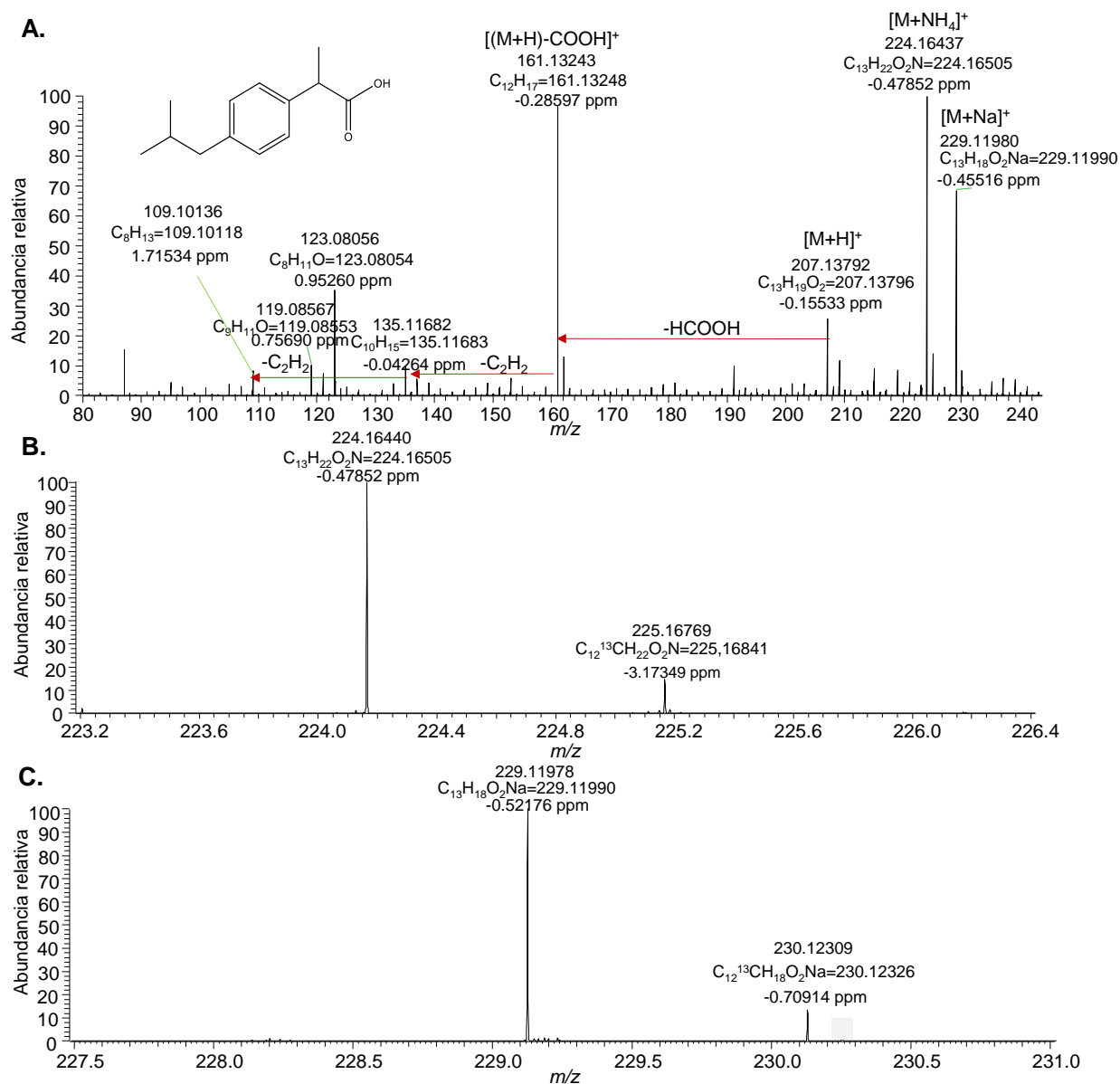


Figura 38. A. Espectro MS del ion $[M+NH_4]^+$ de IBU-1, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 10 eV) y sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de IBU-1, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula con el aducto de amonio $[M +NH_4]^+$ de IBU-1 y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 14%). Muestra APF-10.

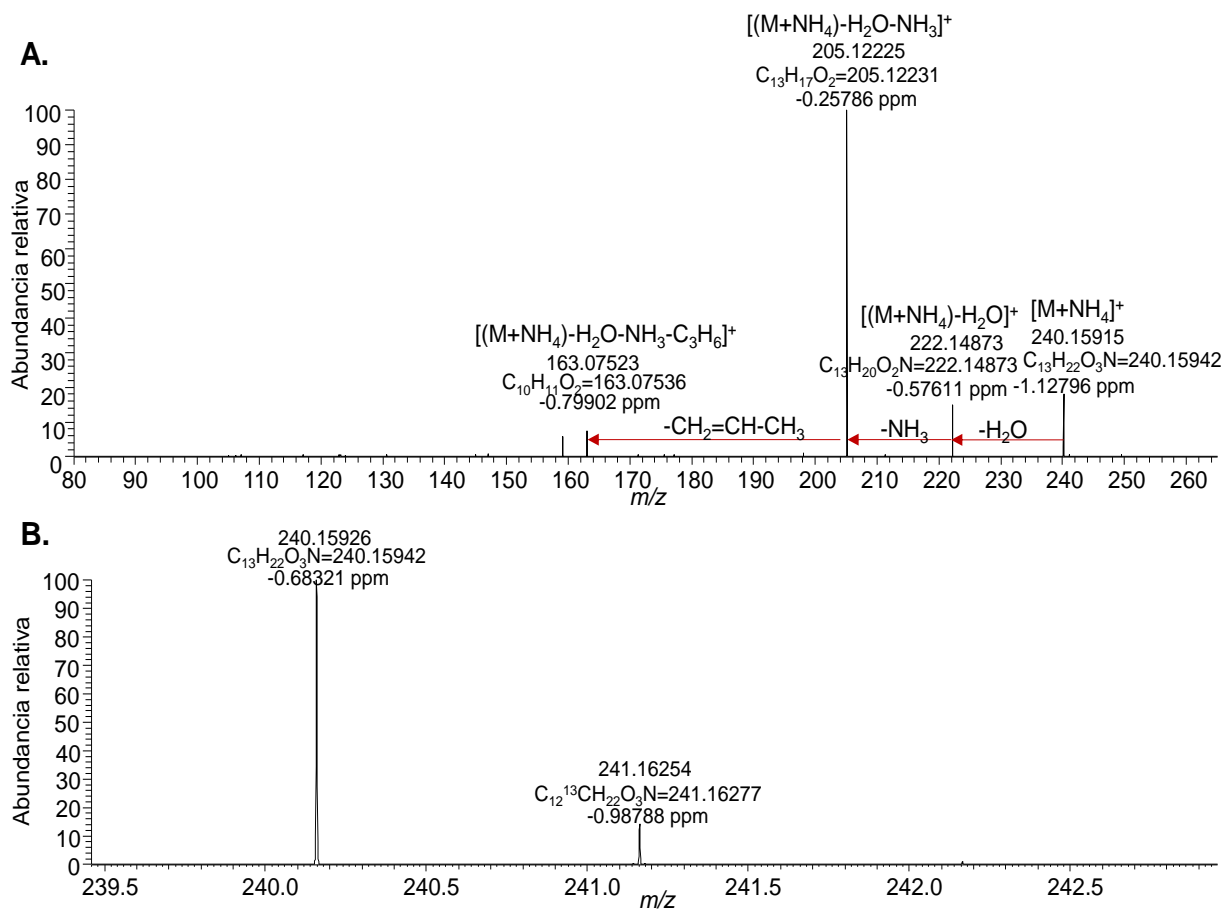
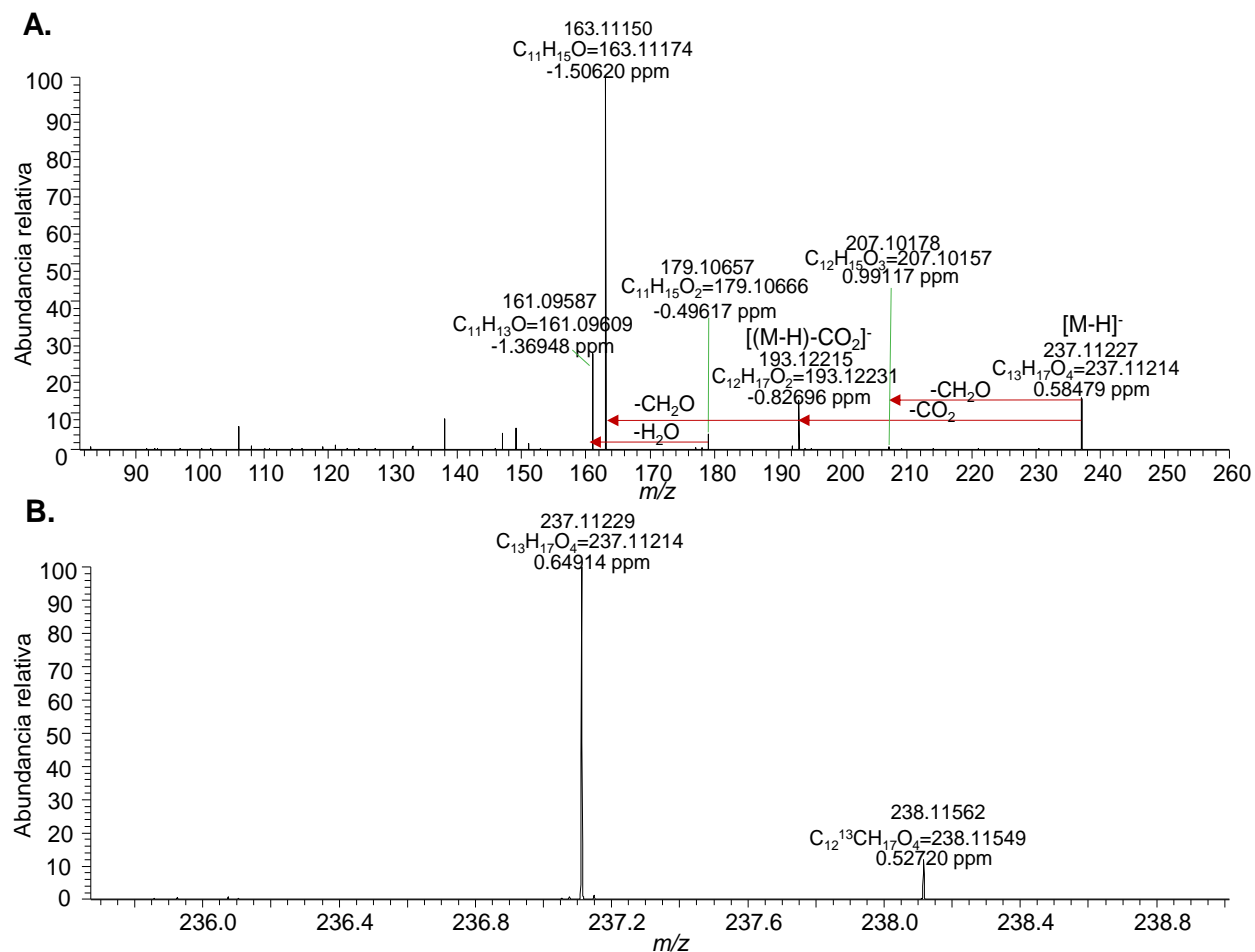


Figura 39. A. Espectro MS del ion $[M-H]^-$ de IBU-2, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 10 eV) y sus iones-producto; **B.** Espectro *full* MS de IBU-2, obtenido por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula con el aducto de amonio $[M-H]^-$ de IBU-2 y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 14%). Muestra APF-10.



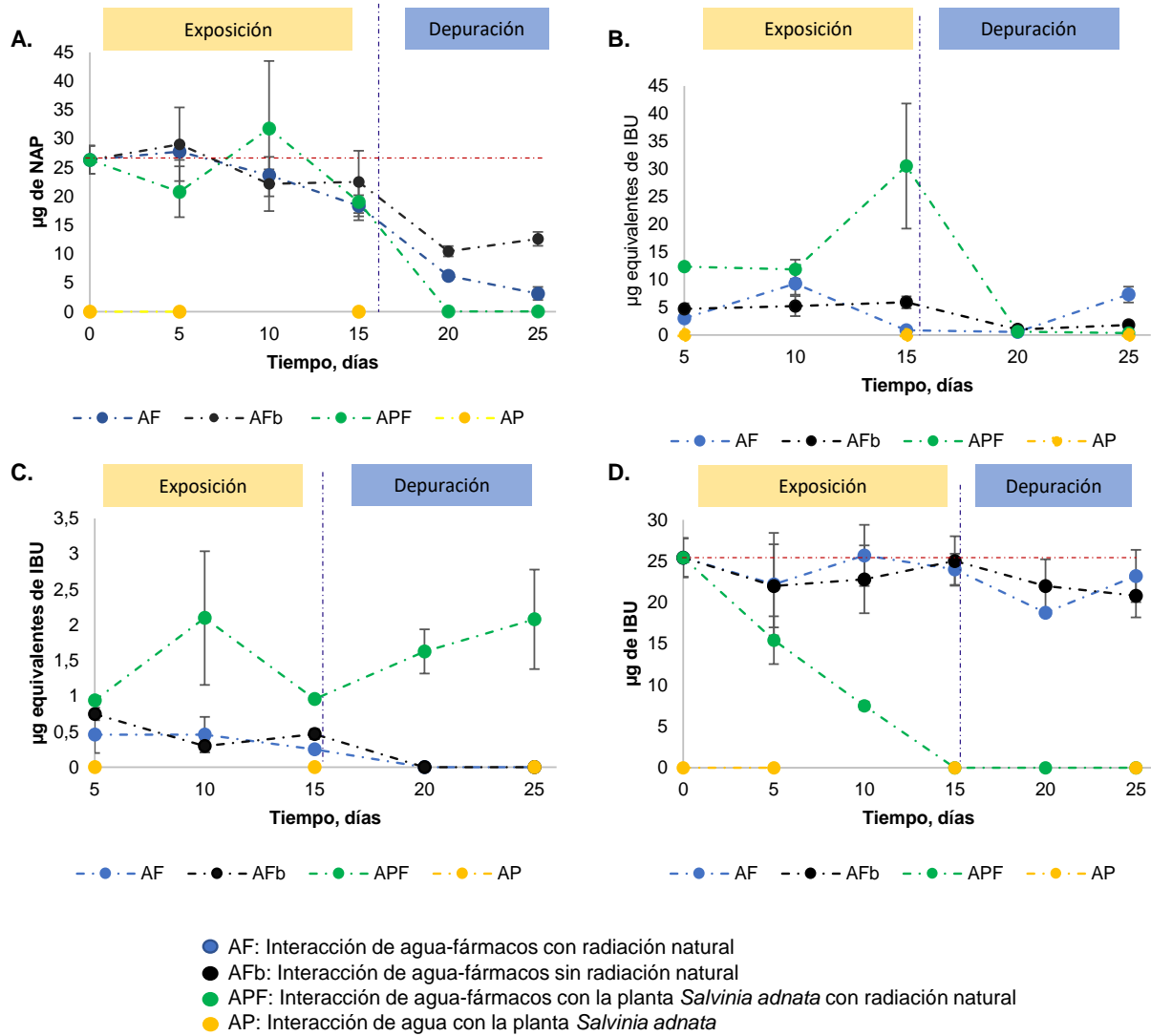
En la **Figura 40**, se muestra la variación de NAP e IBU y sus metabolitos en función del tiempo, la cual se realizó en las mismas condiciones y periodos de experimentación con el resto de los fármacos AINE.

Como se puede observar en la **Figura 40A**, la degradación de NAP en el medio acuoso en los primeros 15 días fue mínima (entre 12-25%), lo que podría explicar la no detección de metabolitos derivados de este fármaco AINE. También se detectaron 0.08 μg de NAP (0.3%) en el agua, en el periodo de excreción comprendido entre los días 15-25 de las muestras acuosas de APF, teniendo en cuenta que la degradación alcanzada durante el periodo de exposición fue del 24%, se atribuye al bajo retorno del NAP al medio acuático por su potencial de bioacumulación. Este potencial es expresado en función de su coeficiente octanol-agua ($\log K_{ow}$). Si, $\log K_{ow}$ es mayor o igual que tres, estos compuestos se caracterizan por unirse con la porción lipídica de los organismos y bioacumularse, para NAP el $\log K_{ow}$ es 3.18 (Ríos y col., 2022).

Para el IBU (**Figura 40D**), la degradación en las muestras de interacción agua-fármaco, con y sin radiación de la luz solar (AF y AFb) solo alcanzó un 20% de disminución. La lenta degradación del ibuprofeno en procesos de fotólisis (radiación natural), se reportó por Koumaki y col., 2015 donde no supero el 50 % de la degradación, durante un periodo de experimentación de 17 días. Mientras que en el experimento de interacción con la planta *S. adnata* (APF) se alcanzó la degradación completa a los 15 días de exposición y en el periodo de depuración y no se observó el retorno del AINE al medio acuoso.

Se observó que la transformación del IBU fue principalmente en presencia de la planta acuática, observándose su transformación mayoritariamente en IBU-1 (**Figura 40B**) y una parte en IBU-2 durante el periodo de exposición, mientras que en el periodo de depuración se detectó mayoritariamente la presencia de IBU-2 (**Figura 40C**).

Figura 40. Variación de la cantidad de naproxeno, ibuprofeno y sus metabolitos extraídos mediante SPE y analizados por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-HRMS, en las muestras acuosas de los experimentos de interacción AF, AFb, APF y AP. **A.** NAP, **B.** IBU-1, **C.** IBU-2 y **D.** IBU.



En términos generales, los procesos abióticos y bióticos determinan el destino de los compuestos orgánicos en el medio acuático, incluyendo los fármacos. Las transformaciones abióticas en aguas superficiales pueden ocurrir mediante la hidrólisis y la fotólisis (Andreozzi y col., 2002), mientras en procesos bióticos la transformación ocurre por biodegradación.

Los compuestos farmacéuticos, diseñados principalmente para su consumo por vía oral, son resistentes a la hidrólisis, lo que sugiere a los mecanismos de fotólisis directa o indirecta como una de las principales vías para su transformación en medios abióticos. En la fotólisis directa, la transformación es causada por la absorción directa de la radiación solar, considerando factores como latitud, hora del día, profundidad del cuerpo de agua y espesor de la capa de ozono se puede determinar el tiempo de vida media del compuesto en estas condiciones (Zepp y col., 1977), mientras que la fotólisis indirecta involucra adicionalmente otros factores que influyen en la degradación, como los fotosensibilizadores naturales nitratos y los ácidos húmicos, estos constituyentes naturales bajo la radiación solar pueden generar especies oxidantes fuertes, como radicales hidroxilo y oxígeno singlete (Zepp y col., 1987). Por otro lado, los ácidos húmicos que absorben la radiación solar y actúan como filtro, reduciendo la fotodegradación de los compuestos (GAO y col., 1998; Andreozzi y col., 2002).

Sin embargo, estos procesos de transformación fotoquímica en medios acuosos no se dan de manera aislada, si no ocurren simultáneamente con los procesos de biotransformación. Estudios han evidenciado procesos de atenuación de fármacos de manera eficiente mediante la actividad de microorganismos en el agua (Zwiener y col.,2001), hongos (Marco-Urrea y col., 2009) y plantas (Gonda y col., 2016; Emhofer y col., 2017; Pietrini y col., 2015), siendo los compuestos transformados por lo general más polares que su compuesto precursor.

6. Conclusiones

Se implemento la técnica de extracción en fase solida (SPE), usando el soporte sólido *Strata X* a pH 6 de extracción, y como solvente de elución metanol (12 mL), para el análisis de los fármacos AINE en matrices acuosas. Con la técnica SPE, se obtuvieron eficiencias de recuperación entre 96-99% en agua tipo I, con coeficientes de variación que no superaron el 5% (concentración $10 \mu\text{g L}^{-1}$) y en agua TAP entre 83-98% para los fármacos AINE diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno en las diferentes concentraciones evaluadas. Debido al efecto matriz observado para el piroxicam se implementaron modificaciones (adición de ácido ascórbico y esterilización) en la matriz acuosa (agua TAP), y se obtuvieron recuperaciones entre el 87-94%

Se implementó la metodología por HPLC/DAD para el análisis de los fármacos AINE cumpliendo los parámetros de reproducibilidad de áreas cromatográficas, con coeficientes de variación que no superaron el 5%, utilizando como fase móvil KH_2PO_4 en agua (5 mM, pH=4.0) y acetonitrilo, en modo gradiente, usando la columna *Gemini C₁₈* (250 mm x4.6 mm x 5 μm) con una separación cromatográfica aceptable ($R_s > 1.86$)

Se identificaron y cuantificaron los fármacos AINE y algunos de sus metabolitos de transformación por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-HRMS con los modificadores NH_4HCO_2 (5 mM) y ácido fórmico 0.1% en agua y metanol, como fase móvil, en una columna *ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈* (50 mm x 2.1 mm x 1.8 μm). los fármacos AINE se identificaron según el tiempo de retención de los materiales de referencia certificados, composición elemental y distribución isotópica y patrón de fragmentación de los iones de las moléculas protonadas o formación de aductos con sodio y/o amonio.

Se identificaron metabolitos de degradación de los fármacos AINE en las diferentes interacciones evaluadas (AF, AFb y APF), principalmente se detectaron metabolitos producto de oxidación. En el experimento de interacción de los fármacos AINE con la planta *Salvinia adnata* en medio acuoso (APF), durante el periodo de exposición generalmente se detectaron las menores cantidades del fármaco AINE en comparación con lo encontrado en las otras interacciones evaluadas, y en el periodo de excreción se detectaron cantidades para el diclofenaco de 1.2 µg, naproxeno de 2.4 y 1.2 µg, piroxicam 0.004 µg y el ibuprofeno no se detectó.

Bibliografía

- Agüera, A., Pérez Estrada, L. A., Ferrer, I., Thurman, E. M., Malato, S., Fernández-Alba, A. R. (2005). Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight. *J. Mass Spectrom*, 40(7), 908–915.
- Amos Sibeko, P., Naicker, D., Mdluli, P. S., Madikizela, L. M. (2019). Naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in river water, sediments and *Eichhornia crassipes* of Mbokodweni river in South Africa: An initial screening. *Environ. Forensics*, 1–10.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), 1319–1330.
- Araujo, L., Villa, N., Camargo, N., Bustos, M., García, T., Prieto, A. de J. (2011). Persistence of gemfibrozil, naproxen and mefenamic acid in natural waters. *Environ Chem Lett*, 9(1), 13–18.
- Aristizabal-Ciro, C.; Botero-Coy, A. M.; López, F. J.; Peñuela, G. A. (2017). Monitoring pharmaceuticals and personal care products in reservoir water used for drinking water supply. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 24 (8), 7335–7347.
- Ascar, L., Ahumada, I., López, A., Quintanilla, F., Leiva, K. (2013). Nonsteroidal anti-inflammatory drug determination in water samples by HPLC-DAD under isocratic conditions. *J. Braz. Chem. Soc*, 24 (7), 1160-1166.
- Avdeef, A. (2001). Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr. Top. Med. Chem*, 1(4), 277–351.
- Baker, D. R., Kasprzyk-Hordern, B. (2013). Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: new

- developments. *Sci. Total Environ*, 454, 442–456.
- Ben Hassena, A., Zouari, M., Trabelsi, L., Khabou, W., Zouari, N. (2018). Physiological Improvements of young olive tree (*Olea europaea* L. Cv. Chetoui) under short term irrigation with treated wastewater. *Agric. Water Manag*, 207 (May), 53–58.
- Ben Ouada, S., Ben Ali, R., Cimetiere, N., Leboulanger, C., Ben Ouada, H., & Sayadi, S. (2019). Biodegradation of diclofenac by two green microalgae: *Picocystis* sp. and *Graesiella* sp. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 186, 109769.
- Benner, J., Salhi, E., Ternes, T., von Gunten, U. (2008) Ozonation of Reverse Osmosis Concentrate: Kinetics and Efficiency of Beta Blocker Oxidation. *Water Res*, 42 (12), 3003–3012.
- Borges, K. B., de Oliveira, A. R. M., Barth, T., Jabor, V. A. P., Pupo, M. T., Bonato, P. S. (2010). LC–MS–MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. *Anal. Bioanal. Chem*, 399(2), 915–925.
- Botero-Coy, A. M., Martínez-Pachón, D., Boix, C., Rincón, R. J., Castillo, N., Arias-Marín, L. P., Manrique-Losada, L., Torres-Palma, R., Moncayo-Lasso, A., Hernández, F. (2018) ‘An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in colombian wastewater.’ *Sci. Total Environ*, 642, 842–853.
- Brozinski, J.-M., Lahti, M., Meierjohann, A., Oikari, A., Kronberg, L. (2012). The anti-inflammatory drugs diclofenac, naproxen and ibuprofen are found in the bile of wild fish caught downstream of a wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol*, 47(1), 342–348.
- Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Huang, J., Wang, B. (2016). Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs. *Emerging*

Contaminants, 2(3), 145–147.

- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M. (2005). Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Res*, 39 (19), 4790–4796.
- Collado, N., Buttiglieri, G., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Comas, J., Rodriguez-Roda, I. (2012). Removal of ibuprofen and its transformation products: Experimental and simulation studies. *Sci. Total. Environ*, 433, 296–301.
- Cunha, R. R., Chaves, S. C., Ribeiro, M. M. A. C., Torres, L. M. F. C., Muñoz, R. A. A., Santos, W. T. P. D., Richter, E. M. (2015). Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection. *J. Sep. Sci*, 38(10), 1657–1662.
- Das, D., Gupta, U., Das, A. K. (2012). Recent developments in Solid Phase Extraction in elemental speciation of environmental samples with special reference to aqueous solutions. *TrAC - Trends Anal. Chem*, 38, 163–171.
- Dhir, B. (2009). *Salvinia* : An aquatic fern with potential use in phytoremediation. *Environ. We Int. J. Sci. Tech*, 7112 (4), 23–27.
- Dhivya, S M, kalaichelvi. K., Spoorthi, K. J. (2016). Influence of water quality changes on the distribution and diversity of aquatic macrophytes in certain wetlands of chikkamagalur district. *Int. J. Plant, Anim. Environ. Sci*, 8 (3), 37–43.
- Dordio, A. V., Belo, M., Martins Teixeira, D., Palace Carvalho, A. J., Dias, C. M. B., Picó, Y., Pinto, A. P. (2011). Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha* Spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Bioresour. Technol*, 102 (17), 7827–7834.

- Dordio, A., Carvalho Palace, A. J., Pinto, A. P. (2008). Wetlands : Water “ living filters ” ?
Department of Chemistry, University of Évora, Évora, Portugal, 1–83.
- Dordio, A. V., Carvalho, A. J. P. (2013). Organic xenobiotics removal in constructed wetlands,
with emphasis on the importance of the support matrix. *J. Hazard. Mater*, 252, 272–292.
- Dube, S., Muchaonyerwa, P., Mapanda, F., Hughes, J. (2018). Effects of sludge water from a
water treatment works on soil properties and the yield and elemental uptake of *Brachiaria
decumbens* and *Lucerne* (*Medicago Sativa*). *Agric. Water Manag.* 208 (June), 335–343.
- Emhofer, L., Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klampfl, C. W. (2017). High-performance
liquid chromatography – mass spectrometry analysis of the parent drugs and their
metabolites in extracts from cress (*Lepidium sativum*) grown hydroponically in water
containing four non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Chromatogr. A*, 1491, 137–
144.
- Farré, M. la., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging
pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC
- Trends Anal. Chem*, 27 (11), 991–1007.
- Field, Jennifer A., Johnson, C. Annette. Rose, J. B. (2006). What is “emerging”? *Hydrocarb.
Eng*, 11 (9), 1.
- Fontanals, N., Marcé, R. M., Borrull, F., Cormack, P. A. G. (2010). Mixed-mode ion-exchange
polymeric sorbents: dual-phase materials that improve selectivity and capacity. *Trends
Anal. Chem*, 29(7), 765–779.
- Fu, Q., Zhang, J., Borchardt, D., Schlenk, D., Gan, J. (2017). Direct Conjugation of Emerging
Contaminants in Arabidopsis: Indication for an Overlooked Risk in Plants? *Environ. Sci.
Technol*, 51(11), 6071–6081.

- Guillarme, D., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J. L. (2010). Coupling Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *TrAC - Trends Anal. Chem*, 29 (1), 15–27.
- Ginebreda, A., Guasch, H., de Alda, M. J. L., Romaní, A. M., Sabater, S., Barceló, D., Muñoz, I., López-Doval, J. C., Ricart, M., Villagrasa, M. (2009). Bridging Levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river Basin (Northeast Spain). *Environ. Toxicol. Chem*, 28 (12), 2706–2714.
- Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Szűcs, Z., Balla, B., & Vasas, G. (2016). Efficient biotransformation of non-steroid anti-inflammatory drugs by endophytic and epiphytic fungi from dried leaves of a medicinal plant, *Plantago lanceolata* L. *Int. Biodeterior. Biodegrad*, 108, 115–121.
- Hansch, C., Leo, A., D. Hoekman. (1995). Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society.
- Herklotz, P. A., Gurung, P., Vanden Heuvel, B., Kinney, C. A. (2010). Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere*, 78 (11), 1416–1421.
- Houngbo, G. F., Uhlenbrook, S., Connor, R. (2019). No dejar a nadie atrás, *informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos*, París, Francia.
- Huber, C., Bartha, B., Harpaintner, R., Schröder, P. (2009). Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants-two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 16 (2), 206–213.
- Ingianna J. (1963). *Acta médica Costa Rica*, 6 (1), 17-28
- IMARC - Analgesics Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and

Forecast 2021-2026.

- Iuliani, P., Carlucci, G., Marrone, A. (2010). Investigation of the HPLC response of NSAIDs by fractional experimental design and multivariate regression analysis. Response optimization and new retention parameters. : *J. Pharm. Biomed. Anal*, 51 (1), 46-55.
- Jiménez, J. J., Muñoz, B. E., Sánchez, M. I., Pardo, R. (2018). Forced and long-term degradation assays of tenoxicam, piroxicam and meloxicam in river water. Degradation products and adsorption to sediment. *Chemosphere*, 191, 903–910.
- Klampfl, C. W. (2019). Metabolization of pharmaceuticals by plants after uptake from water and soil: A review. *TrAC - Trends Anal. Chem*, 111, 13–26.
- Kosjek, T., Heath, E., Krbavcic, A. (2005). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environ Int*, 31(5), 679–685.
- Koumaki, E., Mamais, D., Noutsopoulos, C., Nika, M.-C., Bletsou, A. A., Thomaidis, N. S., Eftaxias, A., Stratogianni, G. (2015). Degradation of emerging contaminants from water under natural sunlight: The effect of season, pH, humic acids and nitrate and identification of photodegradation by-products. *Chemosphere*, 138, 675–681.
- Larsson, N., Petersson, E., Rylander, M., Jönsson, J. A. (2009). Continuous flow hollow fiber Liquid-Phase microextraction and monitoring of NSAID pharmaceuticals in a sewage treatment plant effluent. *Anal. Methods*, 1 (1), 59–67.
- Lavén, M., Alsberg, T., Yu, Y., Adolfsson-Erici, M., Sun, H. (2009). Serial mixed-mode cation- and anion-exchange Solid-Phase Extraction for separation of basic, neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater and analysis by high-performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatography. A*, 1216 (1), 49–62.

- Lee, H. B., Sarafin, K.; Peart, T. E., Svoboda, M. L. (2003). Acidic pharmaceuticals in sewage - methodology, stability test, occurrence, and removal from Ontario samples. *Water Qual. Res. J. Canada*, 38 (4), 667–682.
- Licciardello, F., Milani, M., Consoli, S., Pappalardo, N., Barbagallo, S., Cirelli, G. (2018). Wastewater tertiary treatment options to match reuse standards in agriculture. *Agric. Water Manag.*, 210 (June), 232–242.
- Lu, Z., Sun, W., Li, C., Ao, X., Yang, C., Li, S. (2019). Bioremoval of non-steroidal anti-inflammatory drugs by *Pseudoxanthomonas sp.* DIN-3 isolated from biological activated carbon process. *Water Res.*, 161, 459-472.
- Madikizela, L. M., Chimuka, L. (2017). Simultaneous determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in wastewater using solid-phase extraction with high performance liquid chromatography. *Water SA*, 43(2), 264.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 74(6), 765–772.
- Matamoros, V., Nguyen, L. X., Arias, C. A., Salvadó, V., Brix, H. (2012). Evaluation of aquatic plants for removing polar microcontaminants: A microcosm experiment. *Chemosphere*, 88 (10), 1257–1264.
- Modhave, D. T., Handa, T., Shah, R. P., Singh, S. (2011). Successful characterization of degradation products of drugs using LC-MS tools: Application to piroxicam and meloxicam. *Anal. Methods*, 3(12), 2864.
- Moore, D. E., Chappuis, P. P. (1988). A comparative study of the photochemistry of the non-steroidal anti-inflammatory drugs, naproxen, benoxaprofen and indomethacin.

- photochemistry and photobiology, *J. Photochem. Photobiol.*, 47(2), 173–180.
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Gros, M., Pérez-Cánovas, E., Barceló, D., León, V. M. (2014). Input of pharmaceuticals through coastal surface watercourses into a mediterranean lagoon (Mar Menor, SE Spain): Sources and Seasonal Variations. *Sci. Total Environ.*, 490, 59–72.
- Mubarak, M., Shaija, A., Suchithra, T. V. (2016). Ultrasonication: An effective pre-treatment method for extracting lipid from *Salvinia molesta* for biodiesel production. *Resour. Technol.*, 2 (3), 126–132.
- Murgolo, S., Moreira, I., Piccirillo, C., Castro, P., Ventrella, G., Cocozza, C., Mascolo, G. (2018). Photocatalytic degradation of diclofenac by hydroxyapatite–TiO₂ composite material: identification of transformation products and assessment of toxicity. *Materials*, 11(9), 1779.
- Muszyńska, B., Dąbrowska, M., Starek, M., Żmudzki, P., Lazur, J., Pytko-Polończyk, J., Opoka, W. (2019). *Lentinula edodes* mycelium as effective agent for piroxicam mycoremediation. *Front. Microbiol.*, 10, 313.
- Murray, K. E.; Thomas, S. M.; Bodour, A. A. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ. Pollut.*, 158 (12), 3462–3471.
- Nakada, N., Komori, K., Suzuki, Y. (2005). Occurrence and fate of anti-inflammatory drugs in wastewater treatment plants in Japan. *Environ. Sci.*, 12 (6), 359–369.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., Takada, H. (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res.*, 40 (17), 3297–3303.

National Center for Biotechnology Information (5 de septiembre de 2022). PubChem Compound Summary for CID 12025, 2-Pyrrolidinone <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Pyrrolidinone>.

Ng, Y. S., Chan, D. J. C. (2017). Wastewater phytoremediation by *Salvinia molesta*. *J. Water Process Eng*, 15, 107–115.

Niessen, W. M. A. (1999). State-of-the-art in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 856 (1–2), 179–197.

Noche, G. G., Laespada, M. E. F., Pavón, J. L. P., Cordero, B. M., Lorenzo, S. M. (2011). In situ aqueous derivatization and determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by salting-out-assisted liquid–liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1218(37), 6240–6247.

Paíga, P., Santos, L. H. M. L. M., Delerue-Matos, C. (2017). Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 135, 75–86.

Paíga, P., Santos, L. H. M. L. M., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J. G., Delerue-Matos, C. (2016). Presence of pharmaceuticals in the *Lis* river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Sci. Total. Environ*, 573, 164–177.

Patrolecco, L., Ademollo, N., Grenni, P., Tolomei, A., Barra Caracciolo, A., Capri, S. (2013). Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. *Microchem. J*, 107, 165–171.

Payán, M. R., López, M. Á. B., Torres, R. F., Navarro, M. V., Mochón, M. C.

- (2011). Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples. *Talanta*, 85(1), 394–399.
- Paxéus, N. (2004). Removal of selected Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, β -blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Sci. Technol*, 50 (5), 253–260.
- Pérez-Consuegra, N., Cuervo-Gómez, A., Martínez, C., Montes, C., Herrera, F., Madriñán, S., Jaramillo, C. Paleogene. (2017). *Salvinia* (Salviniaceae) from Colombia and their paleobiogeographic implications. *Rev. Palaeobot. Palynol*, 246, 85–108.
- Pérez-Estrada, L. A., Malato, S., Gernjak, W., Agüera, A., Thurman, E. M., Ferrer, I., Fernández-Alba, A. R. (2005). Photo-Fenton degradation of diclofenac: identification of main intermediates and degradation pathway. *Environ. Sci. Technol*, 39(21), 8300–8306.
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends Anal. Chem*, 22 (10), 685–696.
- Pietrini, F., Di Baccio, D., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D., Zacchini, M. (2015). Ibuprofen exposure in *Lemna gibba* L.: Evaluation of growth and phytotoxic indicators, detection of ibuprofen and identification of its metabolites in plant and in the medium. *J. Hazard. Mater*, 300, 189–193.
- Poirier-Larabie, S., Segura, P. A., Gagnon, C. (2016). Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. *Sci. Total. Environ*, 557-558, 257–267
- Poole, C.F., Poole, S. K. (1991). *Chromatography Today*. Elsevier.
- Quattrocchi, O., Andrizzi, S., Laba, R. (1992). *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica*.

- Edt. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires. Argentina. 46-49.
- Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, J.-L., Budzinski, H., & Elbaz-Poulichet, F. (2006). Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized mediterranean catchment. *Environ. Sci. Technol.*, 40(17), 5282–5288.
- Radović, T., Grujić, S., Petković, A., Dimkić, M., Laušević, M. (2014). Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. *Environ. Monit. Assess*, 187(1), 4092
- Resolución 003619. Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos. 17 de septiembre 2013 (Colombia).
- Ríos, A., Gutierrez-Suarez, K., Carmona, Z., Ramos, C., Oliveira, L. (2022). Pharmaceuticals as emerging pollutants: Case naproxen an overview. *Chemosphere.*, 291, 132822
- Robert E, A. (2003). *liquid chromatography– mass spectrometry: an introduction*. John Wiley & Sons, L.
- Salgado, R., Pereira, VJ, Carvalho, G., Soeiro, R., Gaffney, V., Almeida, C., Noronha, JP (2013). Photodegradation kinetics and transformation products of ketoprofen, diclofenac and atenolol in pure water and treated wastewater. *J. Hazard. Mater*, 244-245, 516-527.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol*, 68 (2), 141–150.
- Snyder, S. A., Adham, S., Redding, A. M., Cannon, F. S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., Wert, E. C., Yoon, Y. (2007). Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination*, 202 (1–3), 156–181.

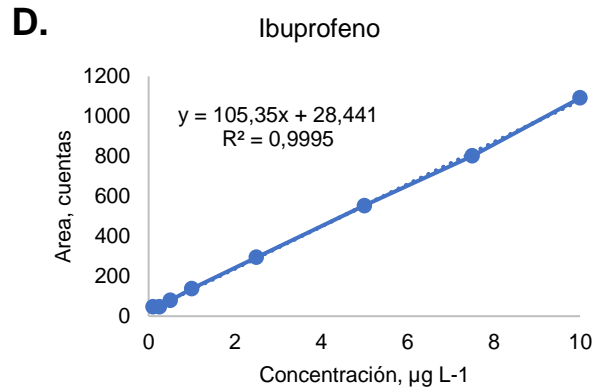
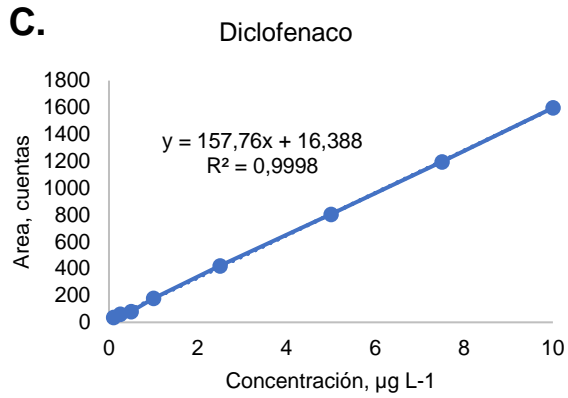
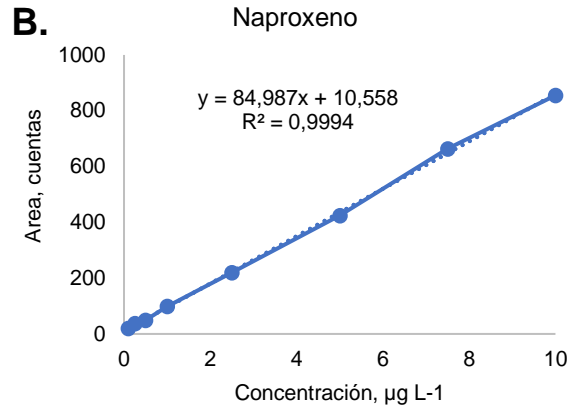
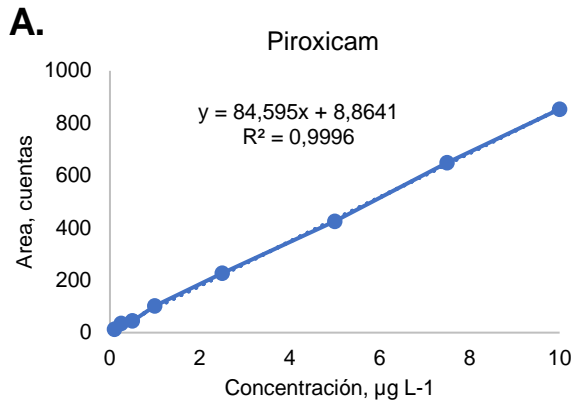
- Stylianou, K., Hapeshi, E., Vasquez, M. I., Fatta-Kassinos, D., Vyrides, I. (2018). Diclofenac biodegradation by newly isolated *Klebsiella* sp. KSC: Microbial intermediates and ecotoxicological assessment. *J. Environ. Chem. Eng.*, 6(2), 3242–3248.
- Susarla, S., Medina, V. F., McCutcheon, S. C. (2002). Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.*, 18 (5), 647–658.
- Tauxe-Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Res.*, 39 (9), 1761–1772.
- Vianneth, M.; Roa, S. (2013). Condición de venta de analgésicos antiinflamatorios no esteroides, legalmente autorizados para su comercialización en Colombia. Estrategias de uso racional. *Rev. Colomb. Ciencias Químico – Farm.*, 42 (2), 145–168.
- Weichgrebe, D., Danilova, E., Rosenwinkel, K. H., Vedenjapin, A. A., Baturova, M. (2004). Electrochemical oxidation of drug residues in water by the example of tetracycline, gentamicine and aspirin®. *Water Sci. Technol.*, 49 (4), 201–206.
- Weigel, S., Kallenborn, R., Hühnerfuss, H. (2004). 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(2), 183–195.
- Yalkowsky, S.; He, Y.; Jain, P. (2010). Handbook of aqueous solubility data (2^a ed). Taylor & Francis Group.
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., Sekizawa, J. (2009). Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and

- sorption experiments. *Water Resour*, 43(2), 351–362.
- Yan, S., Subramanian, S. B., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Zhang, T. C. (2010). Emerging contaminants of environmental concern : Source , transport , fate , and treatment. *Pr. Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manag*, 14, 2–20.
- Zayed, M. A., Hawash, M. F., El-Desawy, M., & El-Gizouli, A. M. M. (2017). Investigation of naproxen drug using mass spectrometry, thermal analyses and semi-empirical molecular orbital calculation. *Arab. J. Chem*, 10(3), 351–359.
- Zepp, R. G., Baughman, G. L., Schlotzhauer, P. F.(1981). Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water: I. Sunlight induced reactions of aquatic pollutants photosensitized by humic substances. *Chemosphere*, 10, 109-117.
- Zepp, R. G., Cline, D. M. (1977). Rates of direct photolysis in aquatic environment. *Environ. Sci. Technol*, 11(4), 359–366.
- Zepp, R. G., Hoigne, J., Bader, H. (1987). Nitrate-induced photooxidation of trace organic chemicals in water. *Environ. Sci. Technol*, 21(5), 443–450.
- Zhang, Z. L., Zhou, J. L. (2007). Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1154(1-2), 205–213.
- Zhang, B. Y., Zheng, J. S., Sharp, R. G.(2010). Phytoremediation in engineered wetlands: mechanisms and applications. *Procedia Environ. Sci.* 2, 1315–1325.
- Zorita, S., Boyd, B., Jönsson, S., Yilmaz, E., Svensson, C., Mathiasson, L., Bergström, S. (2008). Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted Solid-Phase Extraction. *Anal. Chim. Acta*, 626 (2), 147–154.
- Zwiener, C., Seeger, S., Glauner, T., Frimmel, F. (2002). Metabolites from the biodegradation of

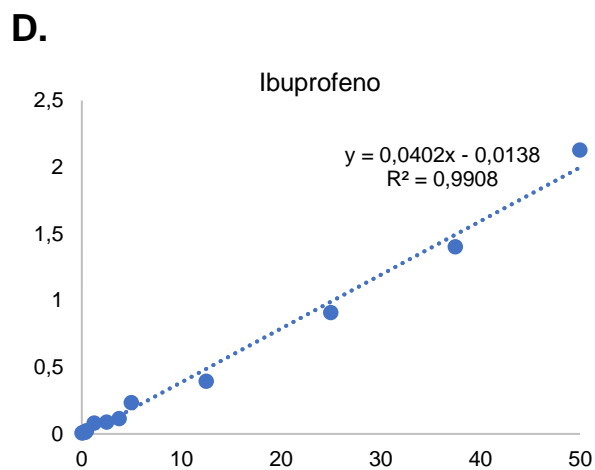
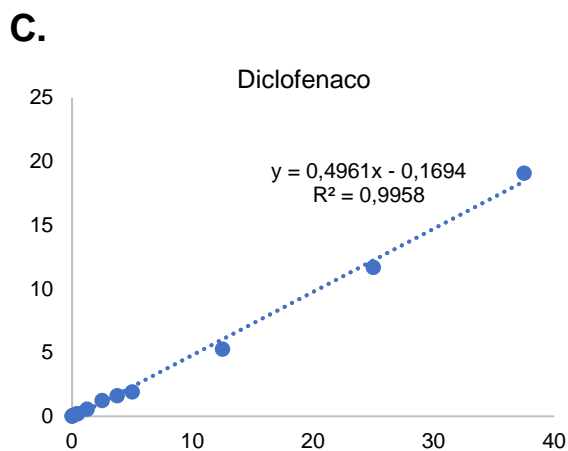
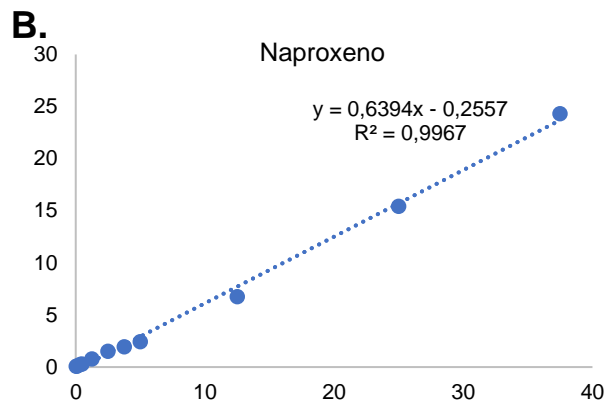
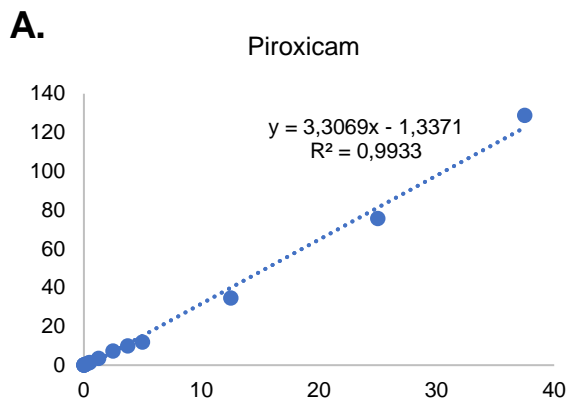
pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. *Anal. Bioanal. Chem*, 372(4), 569–575.

Apéndices

Apéndice 1. Curva de calibración por HPLC para: **A.** Piroxicam; **B.** Naproxeno; **C.** Diclofenaco; **D.** Ibuprofeno.



Apéndice 2. Curva de calibración por UHPLC-ESI^{+/−}-Q-Orbitrap-HRMS para: **A.** Piroxicam; **B.** Naproxeno; **C.** Diclofenaco; **D.** Ibuprofeno, determinado como [M+NH₄]⁺.



Apéndice 3. A. Espectro MS del ion $[M+H]^+$ de PXM-1, energizado y fragmentado en la HCD (N_2 , 20 eV) y sus iones-producto; **B.** Espectro full MS de PXM-1, obtenido por UHPLC-ESI⁺-Q-Orbitrap-HRMS: región de masas (m/z) en donde se detecta la molécula protonada $[M + H]^+$ de PXM-1 y la distribución isotópica de iones (^{12}C ; 100%) y (^{13}C ; 6%). Muestra AF-25.

