

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias  
Biológicas

**“Desarrollo de estrategias analíticas para la  
determinación de fármacos antirretrovirales presentes  
como contaminantes emergentes en muestras  
ambientales y la evaluación toxicológica en muestras  
biológicas”**

MsC. Lesly Anniled Paradina Fernández

Dra. María Julia Culzoni  
Director de Tesis

Dra. Romina Brasca  
Co-director de Tesis

Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ) – Cátedra de  
Química Analítica I – Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas –  
Universidad Nacional del Litoral

**-2019-**

*Dedicada a mis padres, Delinna y José, los  
principales artífices de todos mis logros*



*“Necesitamos especialmente de la imaginación en las ciencias. No todo es matemática y no todo es simple lógica, también se trata de un poco de belleza y poesía”*

*María Montessori*

# ***AGRADECIMIENTOS***

## *A mis padres*

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, por incentivar me siempre a cumplir mis sueños, y apoyarme y entender mis decisiones, aún cuando estas suponen estar alejados físicamente por largos períodos de tiempo, y digo físicamente, porque a pesar de la distancia geográfica que nos separa eso no impide que nuestro vínculo sea igual o aún más fuerte que cuando estamos juntos. Su ejemplo de constancia, sacrificio y amor es una de las razones principales que me han permitido vencer tantos obstáculos y llegar hoy hasta aquí. La vida no me va a alcanzar para agradecerles todo lo que han hecho por mí, por eso les dedico esta tesis, pues se lo felices y orgullosos que se sienten de cada uno de mis logros tanto personales como profesionales.

## *A Julia y Romi*

Dos personas muy importantes en el desarrollo de esta tesis y en mi formación como doctorando y a las que agradezco infinitamente todo el conocimiento que hoy me llevo en el campo profesional son Julia y Romi, quienes más allá de ser mi directora y co-directora y de ser excelentes investigadoras, se ganaron mi confianza, admiración y sobretodo cariño por su sencillez, calidez humana y el apoyo incondicional que me brindaron desde mi llegada a Argentina. A Julia, no puedo dejar de agradecerle por aceptarme como becaria doctoral, aún sin conocerme y por ayudarme incluso antes de llegar a Argentina, pues no cualquier persona vincula el terreno profesional con el personal, y aún más en esos primeros momentos de llegar a un país desconocido donde sentir que uno no está solo se valora enormemente .

## *A mi grupo de trabajo del LADAQ*

Agradezco de igual manera a todo mi grupo de trabajo del LADAQ, (Carli, Mili, Quela, Héctor, Fabri, Romi, Julia, Ana y Pablo) y a Gabriel (ex-LADAQ), quienes hicieron que me sintiera integrada desde un principio, ayudándome cada uno de ustedes de disímiles

maneras durante estos 5 años. A Carli, gracias por nuestras charlas y nuestros cafés de las 3.00pm y por permitir que no me volviera loca con la impresión de la tesis.

Doy gracias por haberlos conocido a todos ustedes, y por formar parte de un grupo tan bello de personas que aman su trabajo, pero que además de ser muy buenos científicos, son maravillosas personas, lo cual es inclusive más importante en los tiempos que corren y los convierte en mejores profesionales. Quiero agradecer especialmente a Héctor, pues gracias a él hoy estoy terminando mi doctorado en Argentina, ya que fue la primera persona con la que contacte interesada en realizar mi doctorado y sin vacilar me tendió su mano y estuvo dispuesto a aceptarme en el LADAQ, inclusive sin conocerme, apostando y confiando en mí.

*A los grupos de colaboración*

No puedo dejar de agradecer a otras tantas personas que han contribuido al desarrollo de esta tesis a partir de proyectos de colaboración como son: el grupo de Ecotoxicología (Maxi, Paola, Rafael), el grupo de PRINARC (María Rosa, Melina y Luisina), gracias especialmente a María Rosa por ayudarme a que salieran estos últimos experimentos de la tesis en tiempo record.

*A los amigos de siempre*

Agradezco también a mis amigos de toda la vida (Clau, Rances y Yazmín) por estar siempre al tanto de mí, pues aunque nos separa la distancia sé que siempre puedo contar con ustedes, tanto para reírme con sus locuras, como para recibir sus palabras alentadoras, que tanto me ayudaron en esta última etapa.

*A Fran*

Aprovecho la ocasión y agradezco también a una persona que en muy poco tiempo se ha convertido en alguien muy especial para mí, Fran, y que gracias a él esta última etapa tan cargada de tareas y responsabilidades se hizo menos pesada. Gracias por aguantar mis cambios de humor y por alegrarme el día, incluso en esos días tan grises.

*A los amigos nuevos*

Agradezco también a los nuevos amigos que hice en Argentina: Gaby, Day, Yura, mis amigos colombianos (son muchos no puedo nombrarlos a todos), Sajra pues ustedes también hicieron más bello mi paso por Argentina. No puedo dejar de mencionar a mis chicos del inglés (Eva, Diego, Román, Mara, Ari, Carla, Agus) gracias por tantas risas que alegran el alma.

*A FBCB, UNL, CONICET*

Agradezco también a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral por permitirme realizar mi Doctorado en Ciencias Biológicas y al CONICET por otorgarme la beca que posibilitó la culminación de este doctorado.

Gracias a todos por contribuir de una forma u otra a la realización de esta tesis y por permitir que me lleve tan hermosos recuerdos de Argentina, tanto personales como profesionales.

***“El secreto de la felicidad no es hacer siempre lo que se quiere, sino querer siempre lo que se hace”***

***León Tolstoi***

## ***PUBLICACIONES***

High-throughput chemometrically assisted flow-injection method for the simultaneous determination of multi-antiretrovirals in water. **Lesly Paradina Fernández**, Romina Brasca, Mirta Raquel Alcaraz, María Julia Culzoni. *Microchemical Journal* 141(2018) 80–86.

Bioaccumulation and glutathione S-transferase activity on *Rhinella arenarum* tadpoles after short-term exposure to antiretrovirals. **Lesly Paradina Fernández**, Romina Brasca, Andrés M. Attademo, Paola M. Peltzer, Rafael C. Lajmanovich, María J. Culzoni. *Chemosphere* 246 (2020) Article 125830.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Contaminantes emergentes y el ambiente.....	17
1.2. Antirretrovirales como contaminantes emergentes.....	18
1.3. Ocurrencia de ARVs en matrices ambientales.....	25
1.4. Efectos ecotoxicológicos de ARVs en organismos acuáticos.....	26
1.5. Quimiometría como herramienta para análisis ambientales.....	28
1.5.1. Clasificación de datos instrumentales.....	29
1.5.2. Generación de datos multidimensionales.....	32
1.5.3. Algoritmos quimiométricos.....	33
1.5.4. Cifras de mérito analíticas.....	37
1.6. Optimización de métodos analíticos.....	39
OBJETIVOS.....	41
Objetivos generales.....	42
Objetivos específicos.....	42
CAPÍTULO 1.....	43
Caracterización ácido-base y determinación simultánea de drogas antirretrovirales en muestras ambientales de agua por FIA-DAD.....	43
1.1. Introducción.....	44
1.2. Objetivos.....	49
1.3. Materiales y métodos.....	49
1.3.1. Reactivos y soluciones.....	49
1.3.2. Instrumentación.....	50
1.3.3. Procedimiento experimental.....	51

1.3.4. Programas informáticos y algoritmos para análisis de los datos.....	53
1.4. Resultados y discusión .....	53
1.4.1. Caracterización ácido-base por titulación espectrofotométrica UV-Vis.....	53
1.4.2. Cuantificación de ARVs mediante FIA-DAD y MCR-ALS.....	65
1.5. Conclusiones .....	76
CAPÍTULO 2.....	78
<i>Determinación de abacavir en muestras ambientales de agua a partir de datos cinéticos- espectroscópicos de tercer orden .....</i>	<i>78</i>
2.1. Introducción .....	79
2.2. Objetivos .....	80
2.3. Materiales y métodos .....	81
2.3.1. Reactivos y soluciones .....	81
2.3.2. Instrumentación .....	81
2.3.3. Optimización mediante diseño de experimentos.....	82
2.3.4. Procedimiento experimental .....	84
2.3.5. Programas informáticos y algoritmos para el análisis de los datos.....	85
2.4. Resultados y discusión .....	86
2.4.1. Optimización mediante diseño de experimentos.....	86
2.4.2. Muestras de validación.....	89
2.4.3. Muestras reales .....	95
2.5. Conclusiones .....	100
CAPÍTULO 3.....	102
<i>Bioacumulación y efectos toxicológicos de ARVs en renacuajos Rhinella arenarum .....</i>	<i>102</i>
3.1. Introducción .....	103
3.2. Objetivos .....	107
3.3. Materiales y métodos .....	107
3.3.1. Reactivos y soluciones .....	107
3.3.2. Especies analizadas .....	108
3.3.3. Instrumentación .....	109
3.3.4. Ensayo de toxicidad.....	111
3.3.5 Optimización del diseño experimental.....	113
3.3.6. Procedimiento experimental .....	114

3.3.7. Análisis estadístico, programas informáticos y algoritmos para el análisis de los datos.....	117
3.4. Resultado y discusión .....	117
3.4.1 Ensayo de toxicidad agudo (48 h) a concentraciones de exposición subletales .....	117
3.4.2. Ensayo de toxicidad agudo (96 h) a concentraciones de exposición ambientales .....	130
3.5. Conclusiones .....	137
CONCLUSIONES GENERALES.....	139
BIBLIOGRAFÍA .....	143



# ***ABREVIATURAS***

ABC: Abacavir

AchE: Acetilcolinesterasa

ANOVA: Análisis de varianza

ARVs: Antirretrovirales

AZT: Zidovudina

BCF: Factor de bioconcentración

CCD: Diseño central compuesto

DAD: Detector de arreglo de diodos

d4T: Estavudina

EEFM: Matrices de excitación-emisión de fluorescencia

EFV: Efavirenz

EJCR: Región elíptica de confianza conjunta

FFD: Diseño factorial fraccional

FIA-DAD: Análisis de inyección en flujo con detector de arreglo de diodos

FLD: Detector de fluorescencia

FOMs: Cifras de mérito analíticas

GST: Glutación S- transferasa

HAART: Terapia antirretroviral altamente activa

LOD: Límite de detección

Log P: Coeficiente de partición

LOQ: Límite de cuantificación

MCR-ALS: Resolución multivariada de curvas por cuadrados mínimos alternantes

NNRTI: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

NRTI: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

NVP: Nevirapina

PARAFAC: Análisis paralelo de factores

SEN: Sensibilidad

SIMPLISMA: Método simple interactivo de auto-modelado para el análisis de mezclas

REP: Error de predicción relativa

RSM: Metodología de superficie de respuesta

UHPLC-DAD/ MS-MS: Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con detector de arreglo de diodo / detector de espectrometría de masas

UV-Vis: Ultravioleta- visible

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

WWTP: Plantas de tratamiento de aguas residuales

3TC: Lamivudina

# ***RESUMEN***

Los antirretrovirales son fármacos empleados en el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que constituyen una clase de contaminantes emergentes y en las últimas décadas han recibido atención debido a los potenciales efectos negativos que pueden provocar en el ambiente. Estos fármacos son consumidos en altas dosis y, posteriormente, eliminados del cuerpo sin sufrir alteraciones en su estructura química o como metabolitos, y descargados a los ecosistemas acuáticos debido a su ineficiente remoción durante los procesos de tratamiento de aguas residuales. En este sentido, una de las principales preocupaciones relacionadas con la liberación de estas drogas en el ambiente resulta de los potenciales daños que puede ocasionar, tales como resistencias virales y/o toxicidad en organismos acuáticos. Algunos estudios han informado la presencia de estos fármacos en diferentes compartimentos ambientales, mayormente en la región de África. Sin embargo, son realmente escasos los estudios sobre la posible bioacumulación y los efectos toxicológicos que podrían ocasionar a organismos acuáticos. Es importante destacar que esta falta de información podría deberse en gran medida a la costosa tecnología que se requiere generalmente para estos fines, y que la mayor prevalencia del VIH ocurre en países del continente africano, por lo que, al no ser una problemática que afecte esencialmente a los países desarrollados, no recibe la atención necesaria. Por consiguiente, se hace imprescindible el desarrollo de metodologías sencillas y asequibles para el monitoreo de estos contaminantes a nivel ambiental, así como la evaluación de la posible bioacumulación en organismos acuáticos expuestos a estos antirretrovirales y la potencial toxicidad asociada.

Por lo tanto, el desarrollo de esta tesis involucró, en una fase inicial, la caracterización fisicoquímica de las drogas antirretrovirales en estudio (lamivudina, estavudina, zidovudina, abacavir, efavirenz y nevirapina) y el posterior desarrollo de metodologías analíticas basadas en sus propiedades fisicoquímicas con el fin de proporcionar a la comunidad científica metodologías sencillas, sensibles y confiables tanto desde el punto de vista analítico como del tratamiento de los datos.

La caracterización ácido-base de cada analito se realizó mediante titulaciones espectrofotométricas UV-Vis y el empleo del algoritmo quimiométrico MCR-ALS, obteniéndose los valores de  $pK_a$ . En este punto, es importante remarcar que se obtuvieron dos valores de  $pK_a$  para la nevirapina, estando informado en la literatura sólo uno de ellos.

Una vez que se determinaron las propiedades ácido-base de estos analitos, se hizo uso de este conocimiento para desarrollar un método de cuantificación simultánea de estas drogas en muestras ambientales de agua por FIA-DAD y empleando el algoritmo quimiométrico MCR-ALS. Es importante remarcar que, a pesar del gran solapamiento espectral entre los cinco analitos evaluados, se logró la cuantificación exacta de cada uno de ellos, inclusive en presencia de componentes desconocidos presentes en las matrices ambientales evaluadas.

Posteriormente, se procedió al desarrollo de otra metodología de cuantificación basada en espectroscopia de fluorescencia molecular y degradación del abacavir inducida por irradiación UV. Inicialmente, y con el objetivo de maximizar la señal de fluorescencia, se determinaron las condiciones experimentales óptimas a partir de un diseño de experimentos empleándose la metodología de superficie de respuesta. Una vez establecidas estas condiciones de trabajo, se continuó con el desarrollo del método analítico registrándose dos tipos de datos: matrices de excitación-emisión de fluorescencia adquiridas una vez concluida la irradiación UV (datos de segundo orden) del analito, y matrices de excitación-emisión de fluorescencia registradas a distintos tiempos de irradiación (datos de tercer orden), que se procesaron utilizando los algoritmos MCR-ALS y PARAFAC. Las diferentes estrategias de registro y análisis de datos se realizaron con el objetivo de evaluar las ventajas en términos de habilidad predictiva al aumentar el orden de los datos, y de mejoras de cifras de mérito tales como sensibilidad y límites de detección y cuantificación. Finalmente, se evaluaron muestras de validación con potenciales interferencias y muestras ambientales de agua. Los resultados obtenidos mostraron habilidades predictivas semejantes para ambos algoritmos empleando ambos tipos de datos, y la principal ventaja de los datos de tercer orden con respecto a los de segundo orden estuvo asociada a mejoras en las cifras de mérito analíticas.

Con el objeto de evaluar la posible bioacumulación y efectos toxicológicos de estos antirretrovirales en organismos acuáticos, se realizó un estudio de toxicidad aguda en renacuajos *Rhinella arenarum* para determinar la posible bioacumulación de estos antirretrovirales en organismos expuestos a diferentes niveles de concentración (subletales y ambientales). Es importante remarcar el alto grado de complejidad de estas matrices biológicas, en términos de presencia de múltiples componentes y bajos niveles de concentración de los analitos de interés, que se minimizó sometiendo las muestras a un procedimiento de extracción con elevados valores de recuperación. Posteriormente, se procedió a la cuantificación de las concentraciones de antirretrovirales absorbidos por los

renacuajos empleando dos metodologías analíticas, según los niveles de exposición evaluados. Es decir, para el caso del estudio a niveles de exposición subletales se utilizó UHPLC-DAD y análisis de los datos por MCR-ALS para resolver solapamientos en el tiempo de retención entre uno de los analitos de interés y las interferencias de la matriz.

Por otra parte, las concentraciones del estudio de exposición ambiental se evaluaron por UHPLC-MS/MS, estableciéndose previamente las condiciones experimentales óptimas que permitieran el elevado nivel de sensibilidad requerido mediante diseño experimental y optimización por la metodología de superficie de respuesta. Para finalizar, se evaluaron los efectos toxicológicos producidos por estas drogas durante el estudio de toxicidad a concentraciones subletales mediante el análisis de los biomarcadores enzimáticos AchE y GST, obteniéndose resultados correlacionados entre la bioacumulación y la toxicidad producida por estos antirretrovirales. En todos los casos evaluados se observó bioacumulación, siendo el efavirenz y la nevirapina los analitos mayormente absorbidos por los renacuajos. En el caso de la nevirapina, se observaron mayores niveles de toxicidad, lo que se vio reflejado en el incremento de la actividad de la enzima GST.

# ***ABSTRACT***

Antiretrovirals are pharmaceuticals used in the treatment of human immunodeficiency virus (HIV), which constitute emerging pollutants that have received attention in recent decades due to the potential negative effects they can cause to the environment. These drugs are consumed in high doses and, consequently, excreted in their original form or as a fraction of metabolites, and then discharged to aquatic ecosystems due to its inefficient removal during wastewater treatment processes. In this context, one of the main concerns related to the release of these drugs in the environment arises from the potential damages they can cause, such as viral resistance, and/or toxicity in sensitive aquatic organisms. Some studies have reported the presence of these drugs in different environmental compartments, mostly in Africa. However, studies related to bioaccumulation and toxicological effects on non-target aquatic organisms are really scarce. It is important to note that this lack of information could be associated with the expensive technology required to perform these analysis, and that the higher prevalence of HIV occurs in countries of the African continent. So, since it is not a problem affecting developed countries, it does not receive the proper attention. Consequently, the development of simple and affordable methodologies to monitor these pollutants at environmental levels, as well as the evaluation of the possible bioaccumulation in aquatic organisms exposed to these antiretrovirals and the associated potential toxicity is essential.

Therefore, in an initial phase, this thesis involved the physicochemical characterization of the antiretroviral drugs under study (lamivudine, stavudine, zidovudine, abacavir, efavirenz and nevirapine) and the subsequent development of analytical methods based on the properties of these analytes in order to provide simple, sensitive and reliable procedures.

The acid-base characterization of these analytes was performed through spectrophotometric titration monitored by UV-Vis, and using the MCR-ALS chemometric algorithm to calculate the  $pK_a$  values. At this point, it is important to note that two  $pK_a$  values were obtained for NVP, being reported in the literature only one of them.

Once the acid-base properties of these molecules were determined, and taking advantage of this knowledge, a method for the simultaneous quantitation of these drugs in

environmental samples by FIA-DAD and MCR-ALS was developed. It is important to highlight that, despite the high spectral overlap between the five evaluated analytes, it was possible to accurately quantitate each of them even in the presence of unknown interferences inherent to the environmental matrices.

Subsequently, another quantitation methodology based on molecular fluorescence spectroscopy and abacavir degradation induced by UV irradiation was developed. Initially, with the aim of maximizing the fluorescence signal, the optimal experimental conditions were determined by means of design of experiments using the response surface methodology. Once these conditions were established, the development of the analytical method involved the generation of two types of data: excitation-emission fluorescence matrices acquired after UV irradiation of the analyte (second order data), and excitation - emission fluorescence matrices recorded at different irradiation times (third order data), which were processed using both MCR-ALS and PARAFAC algorithms. These strategies were carried out with the objective of assessing the chemometric advantages in terms of predictive ability by increasing the order of the data, and improvement in figures of merit, such as sensitivity and limits of detection and quantitation. Finally, validation samples with potential interferences and environmental samples were evaluated. The results obtained in this study showed similar predictive ability between both algorithms using both types of data. The main advantage of third-order data with respect to second-order data was associated with improvements in the analytical figures of merit.

With the goal of evaluating the possible bioaccumulation and toxicological effects of these antiretrovirals in aquatic organisms, an acute toxicity study was carried out in *Rhinella arenarum* tadpoles to determine the possible bioaccumulation of these antiretrovirals in organisms exposed to different concentration levels (sublethal and environmental). It is important to highlight the high degree of complexity of these biological matrices, in terms of the presence of multiple components and low levels of concentration of the analytes of interest, which was minimized by a sample extraction procedure, with high recovery values. Consequently, the quantitation of the absorbed concentrations by tadpoles using two analytical methodologies, according to the evaluated exposition levels, was performed. For the case of the study at sublethal exposure levels, the data generated by UHPLC-DAD was analyzed by MCR-ALS to resolve chromatographic overlaps between one of the analytes and the matrix interferences. On the other hand, the absorbed concentrations by tadpoles at environmental exposure levels were evaluated using UHPLC-MS/MS. Previously, the optimal experimental conditions that allowed the high

levels of sensitivity required were established by experimental design and optimization by the response surface methodology. Finally, the toxicological effects produced by these drugs during the toxicity study at sublethal concentrations were evaluated by analysis of the enzymatic biomarkers AchE and GST, obtaining correlated results between bioaccumulation and toxicity. Bioaccumulation was observed in all the evaluated cases, being efavirenz and nevirapine the analytes mostly absorbed by tadpoles. The highest levels of toxicity were observed for nevirapine, a fact that was reflected in the increase in the GST enzyme activity.



# ***INTRODUCCIÓN***

***“Dos madres tienen los hombres: la  
naturaleza y las circunstancias”***

***José Martí***

## *1.1. Contaminantes emergentes y el ambiente*

Desde principios de la década de 1960, la mayoría de las investigaciones toxicológicas ambientales se han centrado en lo que se conoce como “contaminantes heredados”. Estos contaminantes incluyen químicos tóxicos que, generalmente, persisten después de ser liberados al ambiente, tales como metales (cadmio, plomo, cobre, estroncio, níquel, cromo), hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, dioxinas, dibenzofuranos, y pesticidas clorados, los que se encuentran altamente regulados por organismos con competencias en el área ambiental. Sin embargo, hace relativamente pocos años otro grupo de compuestos químicos llamados “contaminantes emergentes” recibió una particular atención de toxicólogos, entidades reguladoras y público en general. La frase “contaminantes emergentes” se usa por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos para centrarse en productos químicos recientemente descubiertos en el ambiente, que no poseen procedimientos regulatorios asociados y que pueden ser potencialmente tóxicos para los animales e, incluso, los humanos. El Servicio Geológico de los Estados Unidos define a los contaminantes emergentes como “cualquier químico sintético o natural o cualquier microorganismo que no es comúnmente monitoreado en el ambiente, pero que tiene la potencialidad de ingresar en el ambiente y puede causar efectos adversos a nivel ecológico o en la salud humana”. De hecho, muchos contaminantes emergentes se han detectado en muestras ambientales; sin embargo, no se monitorean de manera rutinaria debido a los altos costos de análisis y a la limitación de la tecnología analítica requerida [1].

La liberación de los contaminantes emergentes al ambiente generalmente no ocurre como subproductos de la fabricación, sino debido a su uso y eliminación por parte de las industrias y del ser humano. A menudo estos contaminantes pueden encontrarse en aguas residuales municipales, agrícolas, industriales e incluso en agua potable. De manera similar, se pueden detectar en una amplia variedad de compartimentos ambientales tales como suelos, sedimentos, cursos de agua, por lo que se considera que están distribuidos de manera extendida [1].

Las drogas farmacéuticas se usan ampliamente en medicina humana y veterinaria, constituyendo una clase de contaminantes emergentes de creciente preocupación. Estos fármacos se han detectado en aguas residuales tratadas, ríos, arroyos, agua de mar, agua subterránea y agua potable en rangos de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Sin embargo, el conocimiento de sus efectos ecotoxicológicos en organismos acuáticos, que se

encuentran particularmente afectados debido a la exposición continua a estas drogas, es escaso [2].

## 1.2. Antirretrovirales como contaminantes emergentes

Los antirretrovirales (ARVs) son drogas farmacéuticas que se usan ampliamente en el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la prevención de la transmisión de madre a hijo [3,4]. El tratamiento más comúnmente empleado se conoce como terapia antirretroviral altamente activa (*HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy*) e involucra la combinación de al menos tres tipos de drogas antirretrovirales [5]. Los componentes esenciales de esta terapia generalmente incluyen dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (*NRTIs: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*), tales como la lamivudina, estavudina, zidovudina y abacavir, combinados con inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (*NNRTIs: Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*) como, por ejemplo, la nevirapina y el efavirenz o con un inhibidor de proteasa. Esta terapia reduce dramáticamente la replicación del VIH y restaura o preserva el sistema inmune, disminuyendo considerablemente la incidencia de mortalidad asociada al virus. Además, inhibe efectivamente la replicación viral en el sistema nervioso central, reduciendo la ocurrencia de complicaciones neurológicas severas causadas por el VIH [6].

En la actualidad, se estima que existen 37.9 millones de personas viviendo con VIH a nivel mundial, de las cuales 23.3 millones tienen acceso a la terapia antirretroviral [7]. El régimen de terapia involucra la toma diaria de estas drogas ARVs en altas dosis (60-600 mg) por administración oral [8]. Una vez que ingresan al organismo son absorbidas y parcialmente metabolizadas o biotransformadas por reacciones de Fase 1 (oxidación, reducción e hidrólisis) y de Fase 2 (conjugaciones) y son excretadas posteriormente vía orina y heces. Las drogas farmacéuticas pueden ser eliminadas del cuerpo sin sufrir ningún cambio, es decir, como compuesto original, como conjugados glucurónico o sulfato, o como una mezcla compleja de varios metabolitos. La velocidad de eliminación varía dependiendo del individuo, la droga y la dosis administrada [9]. En el caso de los ARVs, se eliminan del cuerpo en altos niveles, inclusive en su forma original (Tabla 1); por ejemplo, la lamivudina se elimina vía orina en un 71% y la estavudina, en un 95% [10].

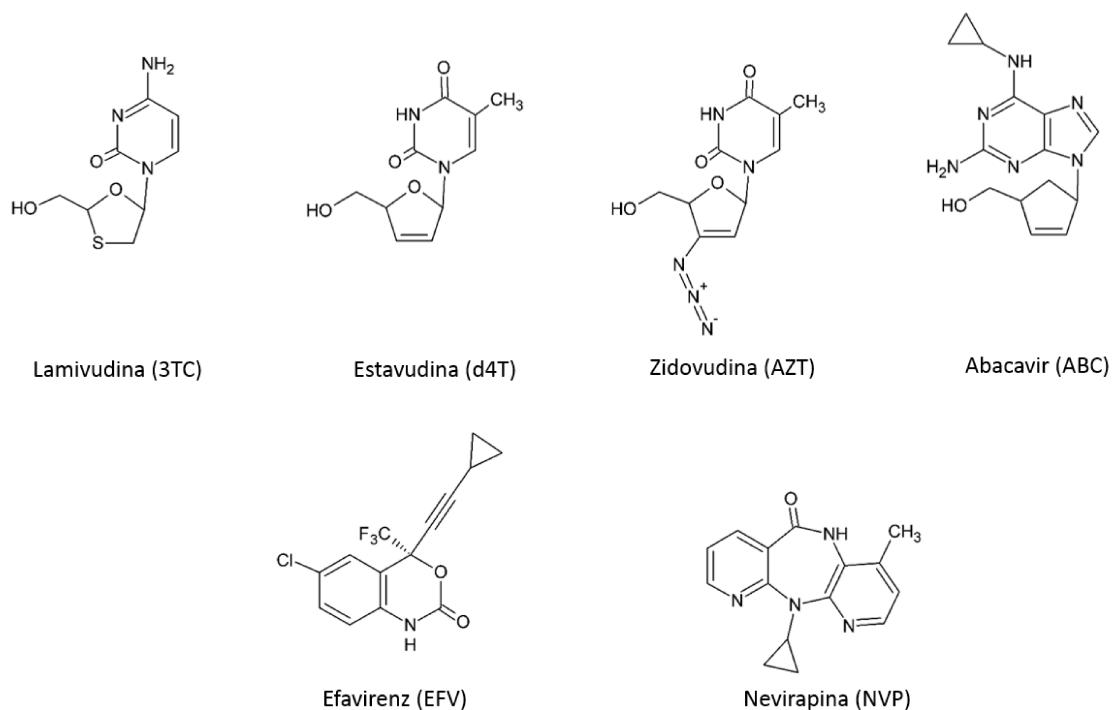
**Tabla 1.** Información fisicoquímica y farmacocinética de las drogas ARVs

Droga	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Log P <sup>a</sup>	Dosis diaria en adultos (mg)	Eliminación		Ref. <sup>b</sup>
				Compuesto original	Metabolitos	
Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos						
3TC	229.3	-2.6	300	71 % orina	-	[10,11]
d4T	224.2	-0.8	60-80	95% orina 3% heces	-	[11,12]
AZT	267.2	0.2	300	14% orina	74% orina	[10-12]
ABC	286.3	1.6	600	1.2% orina	81% orina y 16 % heces	[10-12]
Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos						
EFV	315.7	5.4	600	16-61% heces	14-34% orina	[5]
NVP	266.3	3.9	400	<3% orina	80% orina y 10 % heces	[5]

<sup>a</sup> Coeficiente de partición octanol-agua

<sup>b</sup> Referencias

A continuación, se describen algunas de las principales características fisicoquímicas y farmacocinéticas de los ARVs y en la Fig. 1 se muestran sus estructuras químicas.



**Figura 1.** Estructuras químicas de las drogas antirretrovirales en estudio.

## *Lamivudina*

La lamivudina (3TC) es un NRTI análogo del nucleósido citidina [8]. Tiene actividad contra el VIH y el virus de la hepatitis B. Es una droga soluble en agua ( $70 \text{ mg mL}^{-1}$ ) con bajo coeficiente de partición ( $\log P = -2.6$ ) dada su hidrofilicidad [11]. En cuanto a su farmacocinética y distribución en humanos, se absorbe rápidamente con una biodisponibilidad oral del 86%. La vida media de eliminación ocurre entre 5 y 7 horas, y se elimina primariamente a través de la orina en su forma original. Las dosis estándares de administración diaria involucran 150 mg dos veces al día o 300 mg una vez al día [10,12], tal como se resume en la Tabla 1.

## *Estavudina*

La estavudina (d4T) es un NRTI análogo del nucleósido timidina [8]. La d4T posee un coeficiente de partición de  $-0.8$  [11]. Se absorbe rápidamente vía dosis oral, con una biodisponibilidad oral del 86% y vida media de eliminación de aproximadamente 2.3 h. La d4T sufre un metabolismo insignificante, excretándose un 95% en la orina y un 3% en las heces. Las dosis estándares para adultos involucran 40 mg de d4T cada 12 h para pacientes cuyos pesos corporales son  $\geq 60 \text{ Kg}$ , mientras que si el peso resulta  $\leq 60 \text{ Kg}$  se administran dosis orales de 30 mg cada 12 h (Tabla1). La estavudina es una droga con significativa toxicidad en humanos, siendo causal de neuropatía periférica, lipoatrofia, acidosis láctica, esteatosis hepática y pancreatitis [10,12].

## *Zidovudina*

La zidovudina (AZT) es un NRTI análogo de la timidina [8]. Posee moderada solubilidad en agua ( $25 \text{ mg mL}^{-1}$ ), mientras en alcohol presenta una mayor solubilidad ( $67 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Es un compuesto débilmente lipofílico con un coeficiente de partición de 0.2 [11]. Esta droga se absorbe rápidamente, alcanzando una biodisponibilidad oral de 64%. La AZT se elimina primariamente por glucuronidación hepática y en forma de metabolitos en un 74% y en su forma original por vía urinaria en un 14%. Las dosis estándares de AZT para adultos son de 600 mg al día, dividida en dosis de 300 mg cada 12 h. La AZT ha mostrado toxicidad hematológica en humanos incluida neutropenia y anemia, y su uso prolongado (por ejemplo,  $> 1$  año) causa miopatía sintomática y miositis, así como lipoatrofia [10,12].

## *Abacavir*

El abacavir (ABC) es un NRTI, análogo carbocíclico sintético de la guanosina [8]. Este compuesto es soluble en agua ( $77\text{mg mL}^{-1}$ ) y posee un coeficiente de partición de 1.6 [11]. El ABC se absorbe rápidamente luego de la administración oral con una biodisponibilidad del 83% y una vida media de eliminación cercana a las 1.5 h. La ruta principal de eliminación del ABC ocurre a partir de metabolismo por alcohol deshidrogenasa y glucuronil transferasa. Este compuesto se excreta en la orina en su forma original en un 1% y como metabolitos asociados en 81% en orina y 16% en heces. La dosis estándar de administración en adultos son 600 mg diarios o 300 mg cada 12 horas [10,12].

## *Efavirenz*

El efavirenz (EFV) es un derivado de benzoxazinona y pertenece a los NNRTIs. Es un compuesto prácticamente insoluble en agua ( $10\text{ mg mL}^{-1}$ ) y altamente lipofílico con un coeficiente de partición de 5.4. Presenta una biodisponibilidad oral del 40-45% y una vida media de eliminación de 40-55 h. La excreción de esta droga ocurre en un 14-34% en forma de metabolitos vía orina y vía heces en un 16-61% en su forma original [5]. La dosis diaria de administración es de 600 mg [12]. Los principales efectos de toxicidad ocasionados por el EFV son afectaciones en el sistema nervioso central, teratogenicidad y hepatotoxicidad [8].

## *Nevirapina*

La nevirapina (NVP) es una dipiridodiazepinona y pertenece a la familia de los NNRTI. Es un compuesto débilmente soluble en agua ( $0.1\text{ mg mL}^{-1}$ ) y con propiedades de elevada lipofilidad (coeficiente de partición de 3.9). Presenta una alta permeabilidad intestinal, siendo su biodisponibilidad oral mayor al 90%. Posee una vida media de eliminación de aproximadamente 45 h y su excreción ocurre principalmente en forma de metabolitos glucuronidados (80% en orina y 10% en heces), mientras que el compuesto original se excreta en orina en niveles menores al 3% de la dosis administrada [5]. El régimen de dosis efectiva incluye 200 mg de NVP diariamente por 14 días y posteriormente 200 mg cada 12 h. La NVP puede ocasionar severa hepatotoxicidad en humanos, especialmente durante las primeras 18 semanas de tratamiento, a menudo asociado con erupción cutánea [5,13]

Como se expresa en la Tabla1, estos ARVs son eliminados por el cuerpo humano en altos niveles. En general, son descargados al ambiente debido al inadecuado tratamiento de las aguas residuales y eventualmente diluidos en las aguas superficiales [3,4].

Es importante tener en cuenta que los glucurónidos constituyen la forma más simple y común de conjugación de los compuestos farmacéuticos, los que pueden desconjugarse durante el tratamiento de aguas residuales. La enzima glucuronidasa se encuentra presente de manera bastante extendida en las bacterias coliformes fecales que prevalecen en estas plantas de tratamiento. Por lo tanto, en los casos en los que los glucurónidos son el metabolito primario de excreción de las drogas farmacéuticas, tal como sucede para los ARVs, se debe tener en cuenta esta consideración [14].

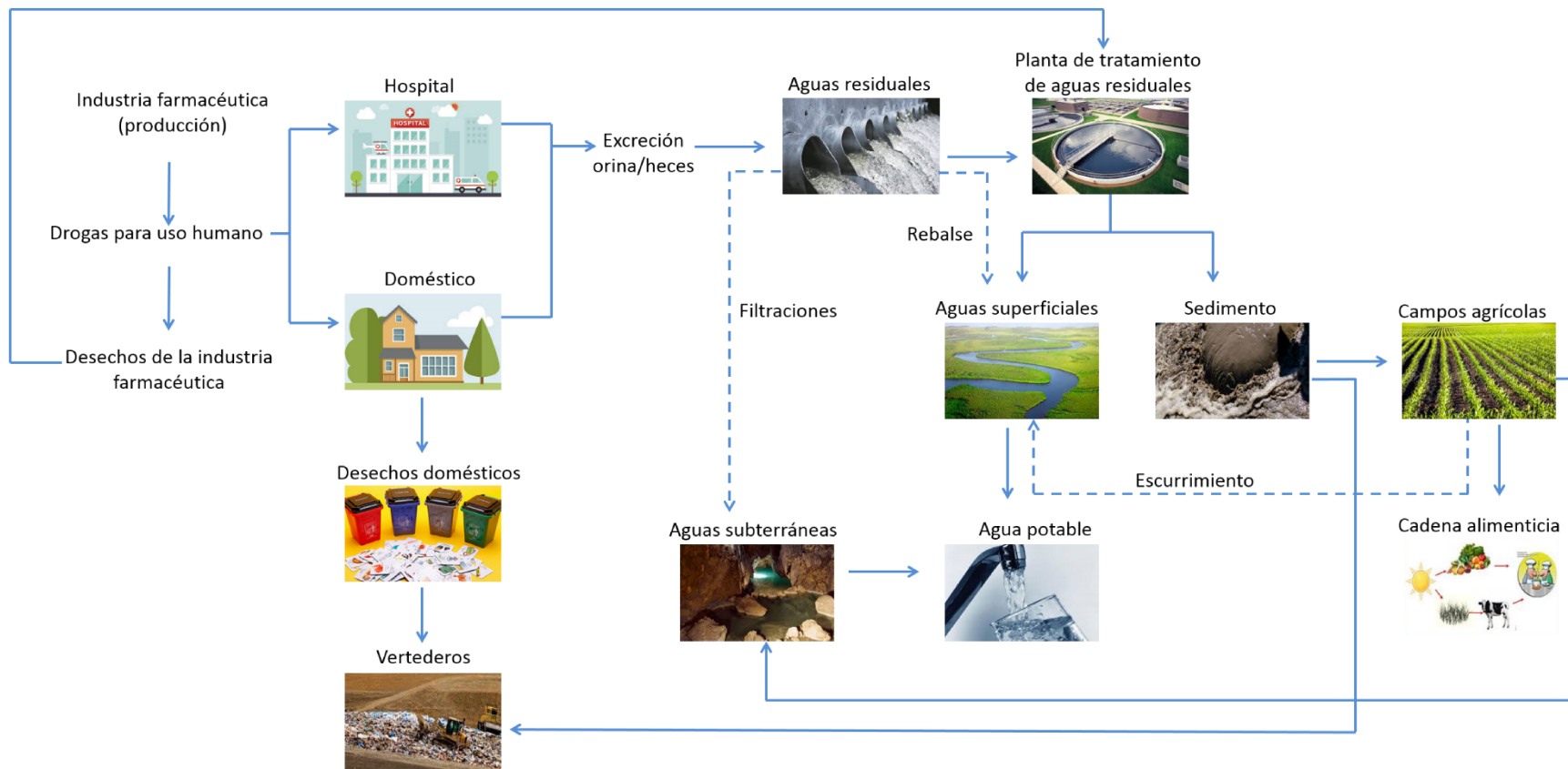
La posibilidad de la liberación masiva de estos ARVs y su posterior introducción en el ambiente es un tema preocupante, teniendo en cuenta las altas dosis consumidas y la farmacocinética de cada una de estas drogas. La liberación de estas drogas farmacéuticas y sus metabolitos al ambiente acuático ocurre a través de varias vías de exposición que incluyen emisión a partir de la producción de efluentes, liberación a aguas superficiales a partir de plantas de tratamientos de aguas residuales, instalaciones de acuicultura y escurrimiento de los suelos. No obstante, las dos mayores fuentes de contaminación ambiental son los efluentes provenientes de aguas residuales domésticas y hospitalarias (Fig. 2). Esta liberación de drogas al ambiente ocurre como resultado de la eliminación incompleta a partir de las plantas de tratamiento de aguas residuales y/o fuentes difusas, tales como la eliminación de medicamentos vencidos a través de los desagües domiciliarios o junto con los desechos domésticos que terminan en vertederos/basurales o rellenos sanitarios, filtrándose en los compartimentos de agua circundantes. Cabe destacar que, en estudios recientes, también se identificó el impacto significativo de las descargas provenientes de las plantas de fabricación de estos fármacos [15].

La presencia de estas drogas en ecosistemas acuáticos tiene una alta repercusión ambiental desde el punto de vista de las potenciales alteraciones que pueden desencadenar en los organismos acuáticos, especialmente los NRTIs, que pueden causar toxicidad mitocondrial debido a que su estructura nucleosídica puede integrarse en las cadenas de DNA y RNA [12,16]. En este sentido, algunos autores sugieren que estos compuestos se encuentran entre las clases de drogas terapéuticas más peligrosas con respecto a la toxicidad que pueden causar en algas, dáfnidos y peces [17,18]. Otro de los potenciales efectos adversos de los ARVs está relacionado con la salud humana y la

posibilidad del desarrollo de resistencia viral, disminuyendo o impidiendo su efectividad en infecciones virales como el VIH [12,16].

Por lo tanto, los ARVs se consideran contaminantes emergentes ambientales debido a que presentan ciertas características tales como ocurrencia (como consecuencia de su liberación en las plantas de tratamiento de aguas residuales y efluentes, y de su liberación por medio de fuentes difusas) y posibles efectos negativos a bajos niveles de exposición crónica en los ecosistemas (e incluso en los humanos) [9].





**Figura 2.** Principales fuentes de contaminación y distribución de drogas farmacéuticas en el ambiente. *Adaptada a partir de Bebianno y col., Kummerer y col., Ebele y col. y Jain y col. [9,14,19,20]*

### 1.3. Ocurrencia de ARVs en matrices ambientales

En la última década, se ha informado la ocurrencia de ARVs en aguas superficiales y subterráneas, agua potable, efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (*WWTP: Wastewater Treatment Plants*) en niveles de concentración comprendidos entre los  $\text{ng L}^{-1}$  y  $\mu\text{g L}^{-1}$ , y en sedimentos de WWTP en niveles más elevados [15] (Tabla 2). Cabe destacar que la mayor prevalencia de ARVs se ha detectado en África, debido al elevado consumo de estos fármacos en esa región [4,21-25].

**Tabla 2.** Presencia de ARVs en matrices ambientales. Los valores representan el rango de concentraciones máximas informadas en la literatura.

Matriz <sup>a</sup>	Método de extracción <sup>e</sup>	Concentración <sup>c</sup>	Referencias
<b>3TC</b>			
Efluentes de WWTP	SPE	22-31070	[22,23,26,27]
Aguas superficiales	SPE	230-167100	[16,22,23]
Aguas subterráneas	-	22.9	[28]
Agua de lago	SPE	12	[29]
Agua de represa	SPE	242	[4]
Agua potable	SPE	27.73-84	[16,30]
Lixiviados de vertederos	-	355	[31]
Sedimento de estuario	ASE <sup>a</sup>	0.6 <sup>d</sup>	[24]
<b>d4T</b>			
Aguas superficiales	SPE	2.9-778	[4,17]
<b>AZT</b>			
Efluentes de WWTP	SPE	37-564	[4,17,21-23,26]
Aguas superficiales	SPE	13-17410	[16,17,22,23]
Agua de represa	SPE	627	[4]
Agua potable	SPE	72.7	[32]
<b>ABC</b>			
Efluentes de WWTP	SPE	33	[26]
Aguas superficiales	-	750	[16]
Estuario	SPE	2.3	[26]
Agua potable	-	80	[16]
Lixiviados de vertederos	-	185	[31]
Sólidos suspendidos y sedimentos	MAE -SPE	0.1 <sup>d</sup>	[26]

**Tabla 2 (continuación).** Presencia de antirretrovirales en matrices ambientales. Los valores representan el rango de concentraciones máximas informadas en la literatura.

Matriz <sup>a</sup>	Método de extracción	Concentración <sup>c</sup>	Referencias
<b>EFV</b>			
Efluentes de WWTP	SPE	110-34000	[21,22,25]
Aguas superficiales	SPE	354-560	[22,24]
Aguas subterráneas	SPE	5	[24]
Agua de represa <sup>a, b</sup>	SPE	82-148	[24,33]
Sedimentos de estuario	Extracción sorptiva	3 d	[24]
Sedimentos de WWTP <sup>b</sup>	ASE	43600 d	[25]
<b>NVP</b>			
Efluentes de WWTP <sup>a, b</sup>	SPE QuEChERs	7.7-2030	[17,21-23,25,26]
Aguas superficiales	SPE	71-5620	[17,22-24]
Aguas subterráneas	SPE	13-25.2	[24,28]
Agua de represa	SPE	0.5-1480	[4,24]
Sedimentos de WWTP <sup>b</sup>	SPE	< 3400 <sup>d</sup>	[25]
Sedimentos de estuario	ASE	81 <sup>d</sup>	[24]

<sup>a</sup> Instrumentación empleada cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa: (LC-MS/MS: *Liquid Chromatography-mass spectrometer detector*)

<sup>b</sup> Instrumentación empleada cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa: (GC-MS/MS: *Gas Chromatography-mass spectrometer detector*)

<sup>c</sup> Las concentraciones están expresadas en ng L<sup>-1</sup>

<sup>d</sup> Las concentraciones en sedimentos están expresadas en ng g<sup>-1</sup>

<sup>e</sup> Extracción en fase sólida: (SPE: *Solid Phase Extraction*); Extracción acelerada de solventes: (ASE: *Accelerated Solvent Extraction*); Extracción asistida por microondas: (MAE: *Microwave Assisted Extraction*) Extracción en fase solida dispersiva: (QuEChERs, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe*).

#### 1.4. Efectos ecotoxicológicos de ARVs en organismos acuáticos

Tanto la farmacocinética como la farmacodinámica se estudian en profundidad antes de la aprobación de una droga para uso terapéutico. En la actualidad, existen, además, guías estrictas en los Estados Unidos y la Unión Europea con respecto a la evaluación ambiental de los compuestos farmacéuticos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen drogas farmacéuticas que se introdujeron en el mercado antes de la publicación de estas guías y que la información ecotoxicológica de esas drogas es bastante escasa. De hecho, existe evidencia de que algunos de estos compuestos son persistentes en el

ambiente, impactando en organismos acuáticos de diferentes maneras, generando, por ejemplo, alteraciones en el desarrollo de larvas, o deformidades anatómicas en un amplio rango de organismos [34].

Los datos sobre concentración y prevalencia de drogas farmacéuticas en el ambiente indican que se encuentran en niveles relativamente bajos, del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , siendo poco probable que desencadenen toxicidad aguda. No obstante, aunque se encuentran en bajas concentraciones, son continuamente descargadas en el ambiente y recibidas en los sistemas acuáticos y, por lo tanto, este escenario representa una exposición sostenida en los organismos durante su ciclo de vida [34]. Es por esto que los riesgos asociados a la toxicidad de las drogas farmacéuticas se investigan, generalmente, en dosis altas de exposición.

Es importante destacar que la presencia de contaminantes en matrices ambientales no necesariamente significa la generación de daños en los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, surge preocupación cuando se detectan compuestos químicos para los que existe evidencia de posibles efectos adversos en la vida silvestre. Los factores más importantes relacionados con la presencia de contaminantes emergentes en estos ambientes son la persistencia, la bioacumulación y la toxicidad [19].

### *Persistencia*

Como ya se mencionó, la incapacidad por parte de las plantas de tratamiento de aguas residuales de efectuar la eliminación completa de varias drogas farmacéuticas representa un riesgo potencial hacia los organismos acuáticos y la salud pública [19]. En este sentido, algunas drogas farmacéuticas se consideran ambientalmente persistentes debido a que pueden permanecer sin degradarse en compartimentos ambientales tales como agua, suelo y sedimentos por un largo período de tiempo [19,35]. Algunos estudios han mostrado la persistencia de 3TC y ABC en ecosistemas acuáticos con tiempos de vida media menores a 5 días en aguas superficiales y residuales. Por otro lado, la NVP y la AZT se consideran muy estables luego de los procesos de tratamiento de aguas residuales [15]. Estas observaciones indican que algunos ARVs son lo suficientemente persistentes para mantenerse químicamente intactos durante los procesos de tratamiento de aguas residuales, descargándose, posteriormente, en las aguas superficiales y, eventualmente, llegando a fuentes de agua potable y entrando en la cadena alimenticia [15].

## *Bioacumulación*

Las drogas farmacéuticas se detectan en su forma original o como metabolitos en ambientes acuáticos a concentraciones relativamente bajas, permaneciendo, muchas veces, biológicamente activas. Por lo tanto, pueden ser absorbidas por organismos acuáticos a través de las superficies dérmicas o respiratorias y ser causantes de efectos adversos [19]. Es importante remarcar que los estudios relacionados con la bioacumulación de ARVs en organismos acuáticos son realmente escasos, encontrándose en la literatura información acerca de la presencia de EFV en plasma de peces ( $\text{ng L}^{-1}$ ) y 3TC en músculo de peces ( $\text{ng g}^{-1}$ ) [36,37].

## *Toxicidad*

La mayor preocupación relacionada con las implicancias de las drogas farmacéuticas desde el punto de vista toxicológico, es que están diseñadas específicamente para maximizar su actividad biológica incluso a bajas dosis, y actuar sobre determinados mecanismos metabólicos, enzimáticos y de señalización celular. La conservación evolutiva de estas moléculas dianas en especies determinadas incrementa potencialmente la posibilidad de estas drogas de ser activas farmacológicamente inclusive en organismos *non-target*. Este modo de acción conceptual puede aplicarse a la biota acuática, que se encuentra expuesta a drogas farmacéuticas en su ambiente natural, lo que podría conllevar a potenciales efectos ecotoxicológicos [19]. La toxicidad de las drogas farmacéuticas varía dependiendo de los organismos expuestos, la duración de la exposición y la concentración [19].

En términos generales, la información científica sobre los efectos ecotoxicológicos de los ARVs en organismos acuáticos es bastante escasa. Sólo algunos investigadores han informado potenciales efectos ecotoxicológicos para NVP y AZT en algas, dáfidos y peces [15,23] y para EFV en peces [38].

## *1.5. Quimiometría como herramienta para análisis ambientales*

El monitoreo de drogas farmacéuticas en ecosistemas ambientales y, especialmente en organismos acuáticos, requiere de técnicas analíticas apropiadas con elevada sensibilidad para poder determinar los bajos niveles en los que se presentan. La

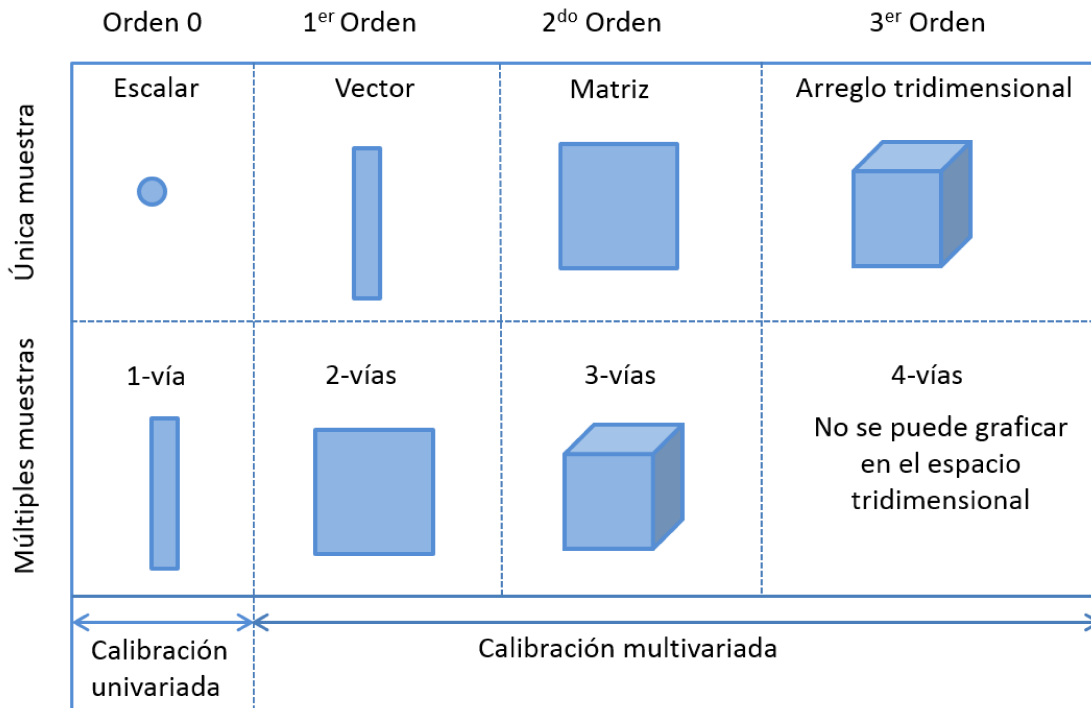
determinación de contaminantes en muestras ambientales generalmente se lleva a cabo usando técnicas cromatográficas acopladas a detectores de masas debido a que tienen una sensibilidad de detección del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$  (Tabla 2).

Sin embargo, estas metodologías son costosas, consumen tiempo y frecuentemente requieren laboriosos pretratamientos de la muestra antes del análisis. La cromatografía líquida con detección por arreglo de diodos (*DAD: Diode Array Detector*) o detección por fluorescencia (*FLD: Fluorescence Detector*) se presenta como una alternativa menos costosa, que resulta en muchas ocasiones adecuada para el análisis si se somete la muestra a un pretratamiento que incluya una etapa de preconcentración. Por otra parte, la espectroscopia de fluorescencia también puede resultar adecuada para el análisis de compuestos que se encuentran en bajas concentraciones. Sin embargo, estas mediciones en ocasiones muestran falta de selectividad, dada la presencia de otras especies que componen las muestras ambientales o biológicas de elevada complejidad [39]. Esta falta de selectividad se puede solucionar mediante la generación y el análisis de datos multidimensionales empleando algoritmos quimiométricos que utilizan métodos matemáticos y estadísticos empleando la lógica formal, para proveer información química relevante del sistema bajo estudio [40]. Por lo tanto, los métodos quimiométricos constituyen una herramienta complementaria y de mucha utilidad en la resolución de problemas analíticos.

Particularmente, en el caso de análisis de muestras ambientales en la literatura se ha informado la utilización de estrategias quimiométricas variadas permitiendo la determinación de una gran variedad de compuestos de interés [41,42].

### ***1.5.1. Clasificación de datos instrumentales***

Los datos instrumentales pueden clasificarse según su orden, es decir, el número de dimensiones que presentan para una única muestra. Si los datos generados para un grupo de muestras se agrupan, se obtienen arreglos que se clasifican según el número de vías en los que se disponen [43,44]. En la Fig. 3 se muestra la clasificación o jerarquización de los datos instrumentales según el orden de los datos obtenidos para una única muestra y las vías de un arreglo de datos para múltiples muestras.



**Figura 3.** Representación esquemática de la clasificación de los datos instrumentales según el orden de los datos y sus calibraciones asociadas.

### *Datos de orden cero*

Los datos de orden cero son generados por instrumentos que producen una única respuesta por muestra como, por ejemplo, las señales de absorbancia registradas a una única longitud de onda [43].

### *Datos de primer orden*

Los datos de primer orden son aquellos generados por instrumentos que permiten la obtención de un conjunto de señales dispuestas en un arreglo vectorial para cada muestra, tales como los espectros de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis), los espectros de emisión de fluorescencia molecular o los espectros de absorbancia infrarroja (IR) [43].

### *Datos de segundo orden*

Las matrices de datos para una única muestra son considerados datos de segundo orden. Estos datos pueden ser registrados de dos formas: (1) usando un único instrumento o (2) mediante técnicas analíticas acopladas o dispuestas en tándem. Algunos ejemplos de este tipo de datos son las matrices de excitación-emisión (*EEM*:

*Excitation-Emission Matrix*) de fluorescencia, los datos obtenidos de una reacción cinética o de un gradiente de pH con detección espectral, y aquellos datos obtenidos por cromatografía de líquidos acoplada a un detector de arreglo de diodos, de fluorescencia molecular o espectrometría de masas, entre otros [43].

### *Datos de tercer orden*

La introducción de una dimensión adicional en los datos conduce a datos de orden superior. Este tipo de datos de tercer orden pueden ser obtenidos por monitoreo de una reacción cinética o de gradiente de pH mediante espectroscopia de fluorescencia u obtenidos con un cromatógrafo de líquidos acoplado a detección mediante generación de EEM de fluorescencia [43].

### *Calibración multivariada*

Los métodos de calibración multivariada se enfocan en el establecimiento y la aplicación de modelos matemáticos que relacionan las señales instrumentales multivariadas con las concentraciones de los analitos o las propiedades de una muestra, y se clasifican, como se describe en la Tabla 3, según el orden de los datos multidimensionales generados [39].

La ventaja más evidente de los métodos basados en calibración multivariada de segundo orden y orden superior es que permiten la cuantificación simultánea de analitos en presencia de potenciales interferencias causadas por componentes no esperados en la muestra, que no fueron calibrados. Esta propiedad se conoce como la ventaja de segundo orden, y permite la discriminación adecuada del analito de interés en presencia de constituyentes no esperados en las muestras a evaluar sin necesidad de separarlos físicamente [44]. Algunos autores definen otras potenciales ventajas relacionadas con la calibración multivariada de tercer orden, que incluyen la capacidad de resolver un problema complejo empleando un arreglo de datos de una única muestra, con independencia de muestras adicionales, obteniéndose aumentos en la sensibilidad y la selectividad, y resolviendo problemas de colinealidad entre señales [45].

Es importante señalar que el aumento en el orden de los datos instrumentales tiene un impacto positivo en las cifras de mérito que caracterizan a los métodos analíticos [46].



### *1.5.2. Generación de datos multidimensionales*

Los datos de orden superior se pueden generar, como se explicó anteriormente, utilizando un único instrumento o mediante el acoplamiento de distintas técnicas analíticas. Es importante conocer los detalles de la generación de los datos desde el punto de vista experimental. A continuación se describen algunas de las metodologías empleadas en esta tesis para la generación de datos multidimensionales.

#### *Monitoreo de reacciones con detección espectral*

Las reacciones químicas, los equilibrios químicos e incluso los cambios estructurales de macromoléculas se pueden monitorear utilizando diferentes técnicas espectrales. Entre las metodologías utilizadas con estos propósitos se encuentran los métodos cinético-espectroscópicos (detección UV o fluorescencia), gradientes de pH monitoreados mediante espectrofotometría, entre otros [43].

#### *Métodos cromatográficos con detección espectral*

Las técnicas cromatográficas acopladas a detección espectral UV-Vis, emisión de fluorescencia o espectrometría de masas se emplean ampliamente en la generación de datos de segundo orden basados en métodos separativos [47].

De manera general, la cromatografía clásica involucra el análisis de muestras complejas a partir de la resolución completa entre señales cromatográficas individuales de los distintos constituyentes de la muestra. Sin embargo, la resolución completa de las señales no siempre se logra, obteniéndose cromatogramas con señales solapadas [47].

La matriz de datos generada para una muestra única utilizando un método cromatográfico con detección espectral contiene los tiempos de retención en una de las dimensiones y la información espectral en la otra. Las matrices se obtienen registrándose las señales espectrales, en un rango espectral determinado, para cada tiempo de retención, en un rango de tiempo establecido. Los instrumentos que permiten obtener este tipo de datos deben contar con detectores que permitan la obtención de espectros en un tiempo muy corto. Dentro de los detectores más comúnmente encontrados en los instrumentos analíticos se pueden mencionar los DAD, los detectores de fluorescencia de barrido rápido (*FSFD: Fast-Scanning Fluorescence Detector*) y los detectores de masas (*MSD: Mass Detector*).

Por otro lado, es posible obtener datos de segundo orden mediante la utilización de técnicas basadas en análisis en flujo como el análisis por inyección en flujo (*FIA: Flow Injection Analysis*) [48].

### *Matrices de excitación-emisión de fluorescencia*

Una de las metodologías más populares para la generación de datos de segundo orden es la basada en la generación de EEM. Esto se debe, entre otras cosas, a la simplicidad de la obtención de los datos, al requerimiento de un único instrumento, a que las señales de emisión de fluorescencia presentan una mayor sensibilidad en comparación con espectroscopia UV y a que se requiere de instrumentos de costos relativamente bajos.

Una de sus principales características es que, al no ser una técnica separativa, para una muestra con múltiples componentes se obtendrán señales altamente solapadas requiriéndose de las ventajas provistas por las herramientas quimiométricas para la resolución de las contribuciones individuales de cada componente puro [47].

La obtención de una EEM de fluorescencia se logra registrándose las señales de emisión de fluorescencia en una determinada región espectral a diferentes longitudes de onda de excitación. Las regiones espectrales de emisión y excitación se seleccionan de acuerdo al sistema en estudio y a los componentes que constituyen las muestras.

Con estas técnicas analíticas es posible, también, obtener datos de orden superior aumentando el número de modos instrumentales, por ejemplo, monitoreando reacciones cinéticas mediante generación de EEM.

### *1.5.3. Algoritmos quimiométricos*

Existe una gran variedad de algoritmos matemáticos disponibles para el procesamiento de datos multivariados. La elección de emplear un algoritmo en particular va a depender, principalmente, del tipo de dato instrumental generado y del propósito del análisis [49]. Algunos de los algoritmos más empleados en el análisis de datos de segundo y tercer orden son: el análisis paralelo de factores (*PARAFAC: Parallel Factor Analysis*) y sus variantes [50], el método de aniquilación de rango generalizado (*GRAM: Generalized Rank Annihilation Method*), la resolución multivariada de curvas por cuadrados mínimos alternantes (*MCR-ALS: Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*) [51], entre otros.

A continuación se describirán de manera resumida los algoritmos quimiométricos empleados en esa tesis: MCR-ALS y PARAFAC.

### *Resolución multivariada de curvas por cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS)*

MCR-ALS es un algoritmo ampliamente utilizado que mostró ser una herramienta poderosa en la resolución de muestras desconocidas que den como resultado tablas o matrices de datos que puedan ser descritas como un modelo bilineal [52]. Este método de modelado flexible permite obtener información acerca de un sistema multi-componente por discriminación de las contribuciones individuales de sus constituyentes químicos [51] y se basa en la descomposición del siguiente modelo bilineal:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \times \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

donde la matriz  $\mathbf{D}$  ( $J \times K$ ) contiene las señales instrumentales totales del sistema en estudio( por ejemplo, espectros UV en función del pH o del tiempo);  $\mathbf{C}$  ( $K \times N$ ) contiene los  $K$  sensores del primer modo instrumental de cada  $N$  componente presente en el sistema (por ejemplo, la evolución de la concentración en un proceso);  $\mathbf{S}$  es una matriz ( $J \times N$ ) conteniendo el factor de sensibilidad instrumental de cada uno de los  $N$  componentes a cada  $j$  longitud de onda (por ejemplo, los espectros asociados a cada especie) y  $\mathbf{E}$  ( $J \times K$ ) representa la contribución del error de las mediciones.

La descomposición bilineal y la búsqueda de las respuestas individuales se logra mediante un proceso basado en un método iterativo, obteniéndose directamente estimaciones de las matrices  $\mathbf{C}$  y  $\mathbf{S}$ . Se debe tener en cuenta que para comenzar el proceso de iteración se requieren parámetros que contengan información similar a la del sistema en estudio; es decir, se requiere de estimaciones iniciales tipo- $\mathbf{C}$  o tipo- $\mathbf{S}$  que pueden ser obtenidas experimentalmente o mediante algoritmos de descomposición bilineal auxiliares, tales como el llamado método simple interactivo de auto-modelado para el análisis de mezclas (*SIMPLISMA: Simple-to-use Interactive Self-modelling Mixture Analysis*). Este método permite la resolución de datos multidimensionales de manera simple, rápida y de fácil interpretación [53], resolviendo cada componente de manera individual.

El proceso de optimización mediante ALS se basa en la minimización del error residual de la descomposición bilineal mediante el uso de restricciones matemáticas o químicas. Las restricciones se clasifican según su naturaleza o implementación. Cuando

las restricciones son implementadas, la información química o matemática acerca de los perfiles debe ser traducida a una condición matemática [54]. Las restricciones más utilizadas son [54,55]:

- No-negatividad: fuerza a los perfiles a tener valores positivos. Es aplicable a concentraciones o respuestas instrumentales, que, por naturaleza, deben ser positivas, por ejemplo, los espectros de emisión de fluorescencia o espectros de masas.
- Unimodalidad: fuerza a los perfiles a tener un único máximo. Es aplicable a perfiles que presenten formas de pico, como señales cromatográficas, o perfiles que muestren crecimiento o decrecimiento con valores tipo *plateau* máximos o mínimos, respectivamente.
- Condición de sistema cerrado: representa la traducción matemática de la condición de balance de masa en química. Es aplicable solo cuando la concentración total de las especies detectables es constante en cada etapa del proceso.
- Trilinealidad: sigue la expresión de modelo trilineal y solo es aplicable para el modelado de múltiples muestras dispuestas en un arreglo de 2-vías aumentado. Al utilizarla se asegura que los resultados sean únicos, es decir, se asegura la obtención de resultados sin ambigüedad.
- Correspondencia entre especies: es aplicable al análisis de múltiples muestras en un arreglo de 2-vías aumentado. Se establece la presencia o ausencia de un componente en una matriz particular **C** y/o **S**. La información presencia/ausencia se aplica como código binario de 1 y 0, respectivamente.

En general, el proceso de MCR-ALS incluye:

- 1- Determinación del número de especies espectroscópicamente activas por descomposición del valor singular (*SVD: Singular Value Decomposition*);
- 2- Obtención de estimaciones iniciales tipo-**C** o tipo-**S** del sistema;
- 3- Cálculo de **S<sup>T</sup>** utilizando restricciones;
- 4- Cálculo de **C** usando restricciones;
- 5- Reproducción de **D** con los productos de **C** y **S<sup>T</sup>**; y
- 6- Repetición desde 3 hasta obtener convergencia.

El criterio de convergencia se basa en la comparación del ajuste obtenido en dos iteraciones consecutivas y se logra cuando la diferencia relativa entre dos iteraciones consecutivas es menor a un valor umbral establecido.

Se debe tener en cuenta que con MCR es posible obtener resultados ambiguos para un mismo sistema, debido a que el modelo presenta libertad rotacional, es decir, la descomposición puede dar lugar a diferentes resultados que explican el mismo sistema. Algunas de las restricciones matemáticas que se utilizan ayudan, principalmente, a la reducción de la ambigüedad rotacional, mientras que otras restricciones, como la condición de sistema cerrado, favorecen la reducción de la ambigüedad por diferencias en concentraciones. Por lo tanto, el uso de las diferentes restricciones, como también, el uso de los arreglos de 2-vías aumentados, analizando múltiples muestras simultáneamente, ayuda a disminuir la ambigüedad de los resultados, obteniéndose resultados cercanos a la situación real. Adicionalmente, los perfiles contenidos en **C** y **S** permiten inferir acerca del comportamiento de los constituyentes del sistema en el proceso y de su comportamiento espectral a causa de que los perfiles pueden ser físicamente interpretados. Por otro lado, la información contenida en **C** puede ser utilizada para fines predictivos en calibración multivariada.

### *Análisis paralelo de factores (PARAFAC)*

PARAFAC es un algoritmo para datos multidimensionales de segundo orden y orden superior que descompone los arreglos de datos en juegos de *loadings* y puntuaciones (*scores*) para describirlos de una forma más condensada que la original [56].

Un modelo PARAFAC para un arreglo de 3-vías está definido por los elementos  $a_{in}$ ,  $b_{jn}$  y  $c_{kn}$  [50] siguiendo un modelo de triadas, según Ortiz y col. [57].

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad i = 1,2, \dots, I; j = 1,2, \dots, J; k = 1,2, \dots, K \quad (2)$$

donde  $a_{in}$  denota el valor de los perfiles en el modo de las muestras para los  $N$  constituyentes en la muestra  $i$ ;  $b_{jn}$  y  $c_{kn}$  son los valores correspondientes a los 2 modos instrumentales para los  $n$  constituyentes en cada sensor instrumental  $j$  y  $k$ , respectivamente y  $e_{ijk}$  colecta los errores del modelo.

La principal ventaja del modelo PARAFAC es la unicidad de la solución. En los modelos bilineales basados en ALS, el mayor inconveniente es la libertad rotacional que presentan en su resolución, que puede ser significativamente reducida mediante la utilización de información externa [50,56]. Sin embargo, para los modelos PARAFAC no sería necesario el uso de restricciones debido a que el modelo es identificado únicamente por su estructura, si bien en la práctica pueden ser utilizadas algunas restricciones a fin de

favorecer la obtención de la solución óptima. Las matrices de *loadings* **B** y **C** obtenidas de la descomposición pueden ser físicamente interpretables. Por ejemplo, para EEM de fluorescencia, los perfiles contenidos en **B** y **C** representan los espectros de excitación y emisión, mientras que la información contenida en **A** indica las concentraciones relativas de los constituyentes de la muestra. La unicidad de la solución, sin embargo, solo se alcanza si no existe deficiencia de rango en ninguno de los modos; es decir, el número de componentes es igual en cada uno de los modos instrumentales y los vectores representativos del modelo son linealmente independientes [50]. La información contenida en **A** es utilizada, habitualmente, para análisis predictivos en calibración multivariada.

#### 1.5.4. Cifras de mérito analíticas

En química analítica, las cifras de mérito (*FOMs: Figures Of Merit*) son parámetros numéricos empleados en la comparación de rendimientos relativos de diferentes metodologías analíticas, permitiendo establecer sus capacidades de detección [58].

#### *Sensibilidad*

La sensibilidad (SEN) constituye, probablemente, la cifra de mérito más importante debido a que es clave en la expresión empleada para determinar las restantes cifras de mérito. Una de las definiciones de sensibilidad que incluye a los datos univariados y multivariados describe la sensibilidad en términos de propagación de la incertidumbre, como el grado de ruido de salida de un sistema para un determinado ruido de entrada. A partir de esta aproximación se desarrolló la siguiente ecuación matemática general para estimar la sensibilidad:

$$SEN = \left\{ \mathbf{g}_n^T [\mathbf{Z}_{esp}^T (\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{noesp} \mathbf{Z}_{noesp}^+) \mathbf{Z}_{esp}]^{-1} \mathbf{g}_n \right\}^{-1/2} \quad (3)$$

donde cada parámetro dependerá del modelo matemático utilizado y el orden de los datos. La matriz  $\mathbf{Z}_{esp}$  y el vector especial de la identidad del analito,  $\mathbf{g}_n$ , corresponden a la fase de calibración; los subíndices “*esp*” y “*noesp*” se refieren a componentes esperados y no esperados, respectivamente. La matriz  $\mathbf{Z}_{esp}$  colecta los perfiles de los constituyentes presentes en la muestra de calibración y el vector  $\mathbf{g}_n$  selecciona o combina esta información, haciéndola específica para el constituyente de interés  $n$ . El factor final de la

Ec. 3,  $(\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{noesp}\mathbf{Z}_{noesp}^+)$ , es la manifestación matemática de la ventaja de segundo orden y solo aparece en metodologías de calibración de segundo orden u orden superior.

Así, por ejemplo, en el caso de datos multidimensionales de segundo orden, dispuestos en un arreglo de 2-vías aumentado, aplicando un modelo MCR-ALS, la SEN se deriva en la expresión:

$$SEN_{MCR} = \rho_k [J(\mathbf{S}^T\mathbf{S})_{kk}^{-1}]^{-1/2} \quad (4)$$

siendo  $k$  el índice del analito de interés en la mezcla de múltiples componentes,  $J$  el número de datos en cada submatriz en el modo aumentado y  $\rho_k$  la pendiente de la curva estimada en la regresión pseudounivariada construida con los perfiles de concentración obtenidos mediante modelado por MCR-ALS. Se puede observar que la SEN, en este caso, depende del perfil espectral calculado  $\mathbf{S}$  [59].

### *Sensibilidad analítica*

La sensibilidad analítica se define como la relación entre la sensibilidad y el ruido instrumental, tal como se describe en la Ec. 5:

$$\gamma = SEN/\sigma_x \quad (5)$$

donde  $\sigma_x$  es una estimación del nivel de ruido de la señal instrumental medida. Este parámetro analítico se expresa en unidades de concentración<sup>-1</sup>, es independiente de la señal  $y$ , por lo tanto, puede emplearse para comparar metodologías basadas en diferentes mediciones instrumentales [58].

### *Límite de detección*

La definición de límite de detección (*LOD: Limit Of Detection*) basado en las recomendaciones de la IUPAC (*IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry*) es la mínima concentración que puede ser detectada por el método de manera confiable. Por lo tanto, considerando un nivel de confianza del 95%, el LOD en calibraciones multivariadas viene dado por la siguiente ecuación:

$$LOD = 3.3\sigma_0 = 3.3 (SEN^{-2}\sigma_x^2 + h_0SEN^{-2}\sigma_x^2 + h_0\sigma_{y_{cal}}^2)^{1/2} \quad (6)$$

donde  $\sigma_x^2$  es la varianza de la señal instrumental,  $\sigma_{y_{cal}}^2$  es la varianza de las concentraciones de calibración y  $h_0$  es el efecto palanca de una muestra blanco, que se obtiene de la expresión:

$$h_0 = \frac{1}{I_{cal}} + \frac{\bar{y}_{cal}^2}{\sum_{i=1}^{I_{cal}} (y_i - \bar{y}_{cal})^2} \quad (7)$$

donde  $I_{cal}$  es el número de muestras de calibración,  $y_i$  la concentración nominal del analito e  $\bar{y}_{cal}$  la concentración media de calibración [58].

### *Límite de cuantificación*

El límite de cuantificación (*LOQ: Limit Of Quantitation*) se define como la concentración mínima de analito que puede ser estimada con un error relativo menor al 10%, con adecuada precisión y exactitud [58], y que se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$LOQ = 10 (\text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_{y_{cal}}^2)^{1/2} \quad (8)$$

## *1.6. Optimización de métodos analíticos*

El desarrollo de un método analítico involucra una gran variedad de factores que tienen la potencialidad de afectar su rendimiento. Por lo tanto, es una práctica común que para el análisis de muestras complejas se requiera la aplicación de un procedimiento de optimización que permita obtener la mejor combinación de variables experimentales, con el fin de maximizar las respuestas en estudio. Esta optimización puede lograrse mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta (*RSM: Response Surface Methodology*). La RSM utiliza una serie de técnicas matemáticas y estadísticas para la construcción de un modelo que responda al ajuste de los datos experimentales [60]. A modo sintético, el modelo seleccionado debe ser capaz de describir de forma adecuada el comportamiento de los datos con el objetivo de realizar posteriores predicciones estadísticas confiables. Entonces, cuando las respuestas dependen de varios factores se puede realizar la optimización simultánea de los niveles que deben alcanzar las variables [61]. Por estas razones, para modelar la curvatura del sistema y obtener mejores resultados, cada factor debe estudiarse en varios niveles.



En general, los diseños de experimentos pueden clasificarse, según sus características, en: 1) diseños de *screening*, que permiten el análisis de factores con el objetivo de seleccionar los que influyen en las respuestas seleccionadas; es decir, generalmente se utilizan en los pasos de selección de factores. En este grupo se encuentran los diseños factoriales fraccionados (*FFD: Fractional Factorial Design*) y diseño Plackett-Burman, y 2) diseños de optimización, que permiten obtener datos experimentales que luego pueden ser modelados con el propósito de caracterizar una superficie de respuesta y, mediante la optimización, encontrar los valores que deben tener los factores para que las respuestas lleguen a su óptimo. Dentro de este tipo de diseños se encuentran el diseño central compuesto (*CCD: Composite Central Design*) y el diseño de mezclas.

Los diseños factoriales se utilizan en las primeras etapas del desarrollo analítico, en las que se desea definir el número de factores influyentes en el sistema. Posteriormente, se modelan las respuestas correspondientes a los puntos del diseño y se determinan las condiciones óptimas a partir de la “Función de deseabilidad de Derringer” [61]. Con este propósito, primero se crea una función deseabilidad parcial ( $d_i$ ) para cada respuesta, utilizando los modelos que mejor describen las respuestas y estableciendo los criterios de la optimización. Además, se definen los parámetros de optimización; es decir, se decide si los factores o las respuestas deben maximizarse, minimizarse, mantenerse en el rango o alcanzar un valor predeterminado. A su vez, con el fin de darle la importancia necesaria, teniendo en cuenta las características del sistema y el objetivo final, se aplica a cada parámetro un peso o énfasis. Finalmente, se obtiene una función de “Deseabilidad Global” ( $D$ ) que se expresa de la siguiente manera:

$$D = (d_1^{r_1} \times d_2^{r_2} \times \dots \times d_n^{r_n})^{\frac{1}{\sum r_i}} = (\prod_{i=1}^n d_i^{r_i})^{\frac{1}{\sum r_i}} \quad (9)$$

donde  $n$  es el número de variables incluidas en el proceso de optimización y  $r_n$  es la importancia relativa de cada factor o respuesta con respecto a las otras.

De esta manera, se pueden obtener una serie de combinaciones de los factores que cumplen con los requisitos previamente establecidos.

# ***OBJETIVOS***

***“Lo importante en la ciencia no es tanto  
obtener nuevos datos, sino descubrir  
nuevas formas de pensar sobre ellos”***

***William Lawrence Bragg***

## *Objetivos generales*

Utilizar técnicas separativas acopladas a detectores de arreglo de diodos (DAD), fluorescencia de barrido rápido y espectrometría de masas, y técnicas de espectroscopia molecular e inyección en flujo (FIA-DAD), en conjunto con algoritmos quimiométricos de modelado de señales, para desarrollar estrategias analíticas globales destinadas a la determinación de ARVs en muestras ambientales de agua y muestras biológicas.

## *Objetivos específicos*

- 1) Generar datos de orden superior, empleando, por un lado, cromatografía líquida acoplada a detectores de arreglo de diodos, fluorescencia de barrido rápido y espectrometría de masas, y, por el otro, técnicas de espectroscopia molecular y FIA-DAD para ser aplicados a la determinación de: a) fármacos ARVs presentes en muestras ambientales de agua, b) fármacos ARVs en muestras biológicas y c) los potenciales efectos ecotoxicológicos de los fármacos ARVs en larvas de anfibios anuros.
- 2) Aplicar algoritmos quimiométricos que permitan realizar la cuantificación de los analitos en las muestras que contengan interferencias no calibradas.
- 3) Aportar a la comunidad científica métodos eficientes de análisis, validados según normas internacionales, para su aplicación en áreas de interés biológico y ambiental.
- 4) Aportar a la comunidad científica datos referidos a estudios de bioacumulación de ARVs en organismos acuáticos y sus posibles efectos toxicológicos, para la posterior evaluación de riesgo ambiental.

# ***CAPÍTULO 1***

*Caracterización ácido-base y  
determinación simultánea de drogas  
antirretrovirales en muestras ambientales  
de agua por FIA-DAD*

## 1.1. Introducción

Uno de los primeros pasos en el desarrollo y la investigación de nuevas metodologías analíticas con el fin de cuantificar analitos que presentan características ácido-base es el conocimiento de sus constantes de disociación. La constante de disociación ácida, comúnmente expresada en términos de  $pK_a$ , se encuentra relacionada con el grado de ionización de una molécula a distintos valores de pH [62]. El conocimiento de esta propiedad juega un papel fundamental en el desarrollo y la optimización de diferentes procesos analíticos, biológicos y ambientales (Tabla 3). Desde el punto de vista analítico, la información del  $pK_a$  es muy útil en el desarrollo de métodos con fines separativos, tales como cromatografía líquida o electroforesis capilar, debido a la fuerte dependencia entre el  $pK_a$  del compuesto y el pH de la fase móvil en la retención cromatográfica y el comportamiento electroforético de compuestos ionizables [63-66]. Así mismo, el valor de  $pK_a$  es muy útil durante el desarrollo de métodos de extracción o de limpieza que se basan en las propiedades ácido-base de un analito para separarlo de manera selectiva de una matriz compleja [67].

Por otra parte, el impacto del  $pK_a$  en procesos biológicos como la solubilidad, lipofilicidad, permeabilidad [68,69], velocidad de fotólisis, actividad antimicrobiana, permeabilidad a través de la piel [69,70], farmacocinética y farmacodinámica de un gran número de drogas [71] ha sido ampliamente estudiado. Desde el punto de vista ambiental, la constante de disociación puede influir en la toxicidad de determinadas drogas frente a organismos acuáticos [72,73]. De manera similar, este parámetro puede tener repercusión en la absorción de drogas en suelos, lo que puede conducir, posteriormente, a contaminación de aguas superficiales y subterráneas [74]. En este sentido, se informaron casos en los que el conocimiento de las constantes de disociación permitió la remediación directa en el tratamiento de aguas residuales, a través del desarrollo de métodos que emplean estas propiedades ácido-base en la remoción eficiente de contaminantes tales como las drogas farmacéuticas [75,76].

**Tabla 3.** Procesos analíticos, biológicos y ambientales en los que el conocimiento del pK<sub>a</sub> tiene un rol preponderante.

Sistema/Matriz	Analitos	Métodos	Objetivo	Ref. <sup>a</sup>
<b>Separaciones analíticas</b>				
Cama de pollo	Drogas veterinarias	HPLC-DAD/FLD	Cuantificación	[63]
Plasma humano	Péptidos y proteínas	HPLC-ESI/MS-MS	Separación y cuantificación	[66,77]
	Antibióticos	FIA-DAD		
Solución acuosa	Fluoroquinolonas, PPIs	HPLC-UV	Separaciones quirales	[64,65]
	β-bloqueadores	CE-DAD		
	Anticoagulantes			
<b>Pretratamiento de muestras</b>				
Jugo de frutas y frutas frescas	Insecticidas piretroides	LLME homogénea	Extracción ácido-base	[67]
Plasma humano	Vasodilatadores, vasopresores, broncodilatadores y bloqueadores H <sub>2</sub>	Extracción líquido-sólido mediante membrana artificial	Extracción de complejos iónicos para la eliminación de fosfolípidos	[78]
Leche	Antibióticos	HF-LPME	Preconcentración y <i>clean up</i>	[79]
<b>Ensayos biológicos</b>				
Secreción biliar lipídica	Ácidos biliares	HPLC-ELSD	Estudios de lipofilidad	[80]
Piel humana	NSAID	Células de difusión <i>side-by-side</i>	Estudios de permeabilidad de la piel	[69]
Membranas artificiales	Drogas humanas	Espectrofotometría UV en placa de microtitulación	Permeabilidad y perfiles de absorción del tracto-GI	[81]

**Tabla 3 (continuación).** Procesos analíticos, biológicos y ambientales en los que el conocimiento del pK<sub>a</sub> tiene un rol preponderante.

Sistema/Matriz	Analitos	Métodos	Objetivo	Ref. <sup>a</sup>
Solución acuosa	Alcaloides	Espectroscopia UV y de fluorescencia	Estudios de actividad biológica dependiente del pH	[82,83]
Orina humana	Anfetamina	GC-MS	Evaluación de velocidad de excreción	[84]
Células de fibroblastos embrionarios de ratón	Pesticidas, drogas humanas y toxinas	Ensayo de toxicidad	Análisis de mecanismos de toxicidad	[85]
<b>Procesos ambientales</b>				
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Antidepresivos, β-bloqueadores y antiarrítmicos	Espectrofotometría UV de microtitulación	Evaluación de métodos toxicocinéticos	[72]
<i>Daphnia magna</i>	Antibióticos	Ensayo de toxicidad /LC-MS/MS	Estudios de bioconcentración y toxicidad	[73]
Suelo	Antibióticos, β-bloqueadores y anticonvulsivos	LC-MS/MS	Evaluación de adsorción de drogas	[74]
Solución acuosa y aguas residuales	Antibióticos Hormonas estrogénicas	Tecnología de hierro cero-valente Extracción asistida por microondas	Estudios de eliminación de drogas	[75,76]

<sup>a</sup> Referencias

PPIs: inhibidores de la bomba de protones ( *Proton Pump Inhibitors*), LLME: microextracción líquido-líquido (*Liquid-liquid microextraction*), HF-LPME: microextracción en fase líquida basada en fibra hueca (*Hollow fiber- liquid phase microextraction*); ELSD: detector de dispersión de luz evaporativa (*Evaporative Light Scattering Detector*); NSAID: Drogas antiinflamatorias no-esteroides (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) ; GI: gastrointestinal; GC-MS: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (*Gas Chromatography-mass spectrometry*)

Existen diversos métodos para la determinación de la constante de disociación de drogas farmacéuticas que involucran potenciometría [70], electroforesis capilar (*CE: Capillary Electrophoresis*) con DAD [86,87], resonancia magnética nuclear (*RMN: Resonance Magnetic Nuclear*) [88], espectroscopia de absorción UV-Vis [89,90], cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC: High Performance Liquid Chromatography*) con DAD [91] y acoplado a MS [92], y FIA-DAD [77,93].

La manera más tradicional y comúnmente empleada de calcular el  $pK_a$  es a través de la ecuación de Henderson-Hasselbalch [94], que relaciona el pH del medio y el  $pK_a$  del analito con la concentración de equilibrio entre la forma no ionizada [HA] y la forma ionizada [A<sup>-</sup>]:

$$pH = pK_a + \log \left( \frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad (10)$$

Generalmente, para determinar los valores de  $pK_a$ , algunos parámetros, tales como absorbancia [89], intensidad de fluorescencia [95] y vida media de fluorescencia [96], se miden en función del pH. La señal registrada se usa para construir el diagrama de distribución de especies a partir del cual se determina el  $pK_a$  [97].

Una estrategia alternativa para determinar esta constante de disociación ácida consiste en emplear algoritmos quimiométricos para analizar datos espectrofotométricos de segundo-orden, como, por ejemplo, espectros UV registrados en función del pH. En este sentido, MCR-ALS es uno de los algoritmos que ha mostrado una mayor versatilidad para calcular el  $pK_a$  a partir de datos obtenidos de diferentes instrumentos tales como espectroscopia UV-Vis [98,99], FIA-DAD [90,93], CE-DAD [87] y espectroscopia de fluorescencia molecular [98,100].

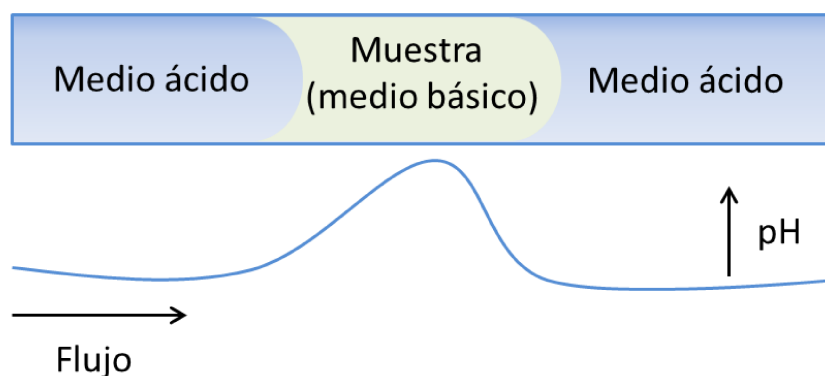
Teniendo en cuenta la importancia que supone el conocimiento de las constantes de disociación, se realizó una búsqueda detallada de los valores de  $pK_a$  y las condiciones experimentales informadas en la literatura para 3TC, d4T, AZT, ABC, EFV y NVP, observándose que los datos disponibles en la literatura respecto a las condiciones experimentales eran escasos e incompletos [93,101-107]. Por lo tanto, se determinaron las constantes de disociación ácida de estas drogas en condiciones experimentales controladas, con el fin de desarrollar métodos analíticos que permitieran la cuantificación simultánea de estas drogas en matrices ambientales de agua, aprovechando el conocimiento de sus propiedades ácido-base.



En cuanto al desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de ARVs, en la literatura se encuentran descritas diferentes metodologías de cuantificación simultánea en productos farmacéuticos, fluidos biológicos, tejidos animales, mezclas sintéticas y, más recientemente, matrices ambientales, a partir de métodos que incluyen espectroscopia en el infrarrojo cercano [108], HPLC [109], UHPLC-MS/MS [110] y FIA-DAD [111].

Tal como se expuso anteriormente, dada la amplia variedad de residuos farmacéuticos que son descargados al ambiente y las posibles consecuencias negativas que puede ocasionar la entrada continua de drogas tales como los antirretrovirales en los compartimentos ambientales, es importante desarrollar métodos sensibles que permitan su cuantificación. Por lo tanto, teniendo en cuenta las propiedades ácido-base de estas drogas y sus diferencias espectrales, se propuso el desarrollo de un método de FIA-DAD, considerando las ventajas que aporta desde el punto de vista de simplicidad, factibilidad de uso, reproducibilidad, bajo consumo de reactivos y alto grado de automatización [112].

Un sistema FIA se basa en la inyección de una muestra líquida en un flujo líquido transportador continuo que genera una zona, o bolo de muestra, que se transporta a través de un capilar y que, posteriormente, es monitoreada por un sistema de detección [48]. En dependencia de las características de la solución transportadora y la muestra, es posible obtener un sistema lineal o un sistema de gradiente de pH. Para el caso donde el pH de la solución transportadora es diferente al pH de la solución muestra se puede generar un sistema de doble gradiente de pH, a partir de la mezcla y dispersión controlada de la muestra dentro de un flujo transportador. En la Fig. 4 se esquematiza este tipo de sistema FIA, que fue el empleado en este estudio, y que representa el perfil de elución obtenido de la inyección de una muestra alcalina en un flujo transportador ácido.



**Figura 4.** Representación esquemática de un sistema FIA para el análisis de una muestra básica en un flujo transportador ácido.

En general, en los métodos basados en FIA los analitos son arrastrados/impulsados por el líquido transportador y llegan al detector al mismo tiempo. Por lo tanto, para el análisis de muestras complejas o sistemas multicomponentes son necesarios mecanismos alternativos que aseguren la identificación de cada compuesto. La resolución de los distintos componentes presentes en una mezcla se puede llevar a cabo a partir del empleo de algoritmos matemáticos que procesan de manera eficiente los complejos datos instrumentales. Uno de los algoritmos que puede ser utilizado con este propósito es MCR-ALS, que permite la discriminación de los analitos de interés en base a sus diferencias espectrales y temporales a partir del análisis de datos de segundo orden.

## 1.2. Objetivos

- Determinar los valores de  $pK_a$  de 3TC, d4T, AZT, ABC, EFV y NVP por titulación espectrofotométrica UV-Vis y MCR-ALS.
- Desarrollar un método analítico mediante FIA-DAD y posterior análisis de datos de segundo orden por MCR-ALS para la cuantificación simultánea de las drogas ARVs en matrices ambientales de agua.

## 1.3. Materiales y métodos

### *1.3.1. Reactivos y soluciones*

Se utilizaron drogas de calidad analítica de 3TC, d4T, AZT, ABC, EFV y NVP suministradas por Laboratorios DOSA S.A. (Buenos Aires, Argentina). Se emplearon los siguientes reactivos de calidad analítica: cloruro de potasio (KCl) obtenido de Merck (New York, Estados Unidos), ácido clorhídrico (37%, HCl) e hidróxido de potasio (KOH) ambos comprados en Anedra (San Fernando, Argentina). También se utilizó metanol (MeOH) grado HPLC, Biopack (Buenos Aires, Argentina) y agua ultrapura obtenida a partir de un sistema de agua milliQ marca Millipore (Bedford, Estados Unidos). Los reactivos utilizados en la preparación de las soluciones básicas y ácidas fueron hidróxido de sodio (NaOH), fosfato de sodio dibásico ( $Na_2HPO_4$ ) y ácido fosfórico (85%,  $H_3PO_4$ ), obtenidos de Anedra (San Fernando, Argentina).

Se prepararon seis soluciones madres de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  a partir de la disolución de cantidades apropiadas de 3TC y ABC en agua ultrapura, y NVP, d4T, AZT, y EFV en MeOH. Las soluciones madres se almacenaron en la oscuridad a  $4^\circ\text{C}$ . Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de la adecuada dilución de estas soluciones en el solvente correspondiente.

La solución ácida o transportadora, ( $0.2 \text{ mol L}^{-1}$ ) se preparó transfiriendo volúmenes apropiados de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a un matraz de 500.0 mL, ajustando el pH a 2.4 con NaOH  $8.0 \text{ mol L}^{-1}$  y enrasando con agua ultrapura. La solución básica, ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) o de acondicionamiento de la muestra, se preparó disolviendo cantidades adecuadas de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en agua ultrapura, ajustando el pH a 11.0 con NaOH  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$ , y enrasando con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen final de 100.0 mL.

Las muestras ambientales de agua se obtuvieron de diferentes regiones de Argentina y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su análisis. Las muestras de agua de pozo y potable se tomaron de las ciudades de Coronda y Santa Fe, respectivamente, ambas localizadas en la provincia de Santa Fe. Las muestras de aguas de ríos se recolectaron de distintas zonas de la provincia de Santa Fe (Río Santa Fe, Río Cuculucito, Río Colastiné, Río Salado y Río San Javier) y de las provincias de San Luis, Entre Ríos y Buenos Aires (Río Boca del Río, Río Gualeguay y Río Luján, respectivamente).

### *1.3.2. Instrumentación*

Las titulaciones espectrofotométricas se realizaron utilizando un potenciómetro Orion 410A equipado con un electrodo de vidrio combinado Orion ROSS Ultra (Massachusetts, Estados Unidos). Las mediciones se realizaron usando una cubeta de cuarzo de 1.00 cm de paso óptico. Los espectros de absorción se registraron empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis (Massachusetts, Estados Unidos) utilizando un rango de longitudes de onda de 200-400 nm cada 0.5 nm, a una velocidad de barrido  $480 \text{ nm min}^{-1}$  y amplitud de ranura de 2 nm. El tamaño de las matrices generadas resultó de 401 sensores en la dimensión espectral, y 25 a 32 sensores en el modo de pH, dependiendo del procedimiento experimental.

El sistema FIA se desarrolló usando un HPLC Agilent 1100 Series LC (Waldbronn, Alemania). La solución transportadora consistió en una solución reguladora de  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 2.4) y la solución de acondicionamiento, en una solución reguladora de  $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 11.0). La solución

transportadora se bombeó a través de un capilar flexible de 800 mm de longitud y 0.5 mm de diámetro interno, a un flujo de  $0.3 \text{ mL min}^{-1}$ . Se empleó una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Los espectros se registraron en un rango de 230-430 nm cada 1 nm durante 1.9 min.

### *1.3.3. Procedimiento experimental*

#### *1.3.3.1. Caracterización ácido-base por titulación espectrofotométrica*

##### *UV-Vis*

Todas las mediciones se realizaron en soluciones de  $0.06 \text{ mol L}^{-1}$  de fuerza iónica inicial, ajustada con  $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ , y a una temperatura constante de  $25^\circ\text{C}$ , utilizando un baño termostatzado de agua circulante. La titulación se realizó partiendo de una solución de concentración  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para cada analito, en medio ácido ( $\text{pH} \sim 2$ ) acondicionado con  $\text{HCl}$ . El procedimiento general consistió en la adición de pequeñas alícuotas de  $\text{KOH}$  de concentración  $0.1$ ,  $1.0$  o  $3.0 \text{ mol L}^{-1}$ , según fuese apropiado, en un vaso de precipitado conteniendo  $50.0 \text{ mL}$  de la solución ácida inicial, en agitación constante, con el objetivo de obtener pequeños incrementos de  $\text{pH}$ . Una vez alcanzado cada valor de  $\text{pH}$ , se registró el espectro correspondiente a partir de la extracción de  $2.0 \text{ mL}$  de la solución, que fueron posteriormente restablecidos a la solución original hasta alcanzar un  $\text{pH} \sim 13$ .

Los espectros de absorción de referencia de las especies ácidas y básicas para cada analito se obtuvieron a partir de experimentos realizados en las condiciones de  $\text{pH}$  seleccionadas:  $\text{pH } 2.0$  y  $13.0$ .

Teniendo en cuenta las matrices de datos generadas a partir del espectro registrado para cada valor de  $\text{pH}$ , se realizó la determinación del  $\text{pK}_a$  por modelado quimiométrico mediante MCR-ALS a partir del diagrama de distribución de especies. Adicionalmente, para corroborar los resultados de  $\text{pK}_a$  obtenidos, se utilizó otra metodología de cálculo que involucró el ajuste sigmoideal de la absorbancia medida a una longitud de onda específica en función del  $\text{pH}$  y, posteriormente, se calculó el  $\text{pK}_a$  a partir del punto de inflexión empleando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

### 1.3.3.2. Cuantificación de ARVs mediante FIA-DAD

#### Muestras de calibración y validación

Para cada analito, se prepararon un conjunto de seis muestras de calibración por triplicado transfiriendo alícuotas apropiadas de las soluciones de trabajo de 3TC, AZT, ABC, EFV y NVP ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a matraces de 10.0 mL. Para el caso de las drogas AZT, EFV y NVP, las alícuotas se llevaron a sequedad primeramente bajo flujo suave de nitrógeno hasta evaporar el MeOH y se sonicaron con aproximadamente 5 mL de agua ultrapura por 10 min. Posteriormente, se adicionó 1.0 mL de  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  de la solución de acondicionamiento  $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\text{pH} = 11.0$ ) en matraces de 10.0 mL, y se enrasó con agua ultrapura. Las concentraciones finales de las muestras de calibración se encontraron en el rango de  $50.0 - 500.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para cada analito. Al finalizar, se procedió a la inyección de  $100.0 \mu\text{L}$  en el sistema FIA.

Para la validación, se evaluaron un conjunto de cinco muestras compuestas por una mezcla de los cinco analitos en concentraciones diferentes a las usadas en la calibración, preparadas siguiendo un diseño aleatorio (Tabla 4). En todos los casos, las muestras se prepararon por duplicado, excepto para la muestra 3, que se preparó por quintuplicado.

**Tabla 4.** Composición de las muestras de validación.

Muestras de validación	Concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				
	3TC	AZT	ABC	EFV	NVP
1 <sup>a</sup>	450	150	350	450	250
2 <sup>a</sup>	350	250	450	150	350
3 <sup>b</sup>	300	300	300	300	300
4 <sup>a</sup>	250	350	150	250	450
5 <sup>a</sup>	150	450	250	350	150

<sup>a</sup> preparada por duplicado

<sup>b</sup> preparada por quintuplicado

#### Muestras reales

Las muestras ambientales se prepararon fortificando las aguas de ríos, pozo y potable con cada analito en cinco niveles de concentración diferentes (Tabla 5). Primeramente, las muestras de agua se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min y se filtraron a través de membranas de nylon de  $0.2 \mu\text{m}$ . Posteriormente, se procedió a la preparación de la muestra tal como se describió anteriormente, pero enrasando con agua de río, pozo o potable según correspondiera. El procedimiento se realizó por duplicado.

**Tabla 5.** Composición de las muestras reales conteniendo los cinco analitos.

Muestras ambientales de agua <sup>a</sup>	Concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				
	3TC	AZT	ABC	EFV	NVP
1	150	450	250	350	150
2	450	150	350	450	250
3	450	150	350	450	250
4	300	300	300	300	300
5	250	350	150	250	450
6	35	250	450	150	350
7	300	300	300	300	300
8	250	150	150	250	450
9	450	350	350	450	250
10	350	450	450	150	350

<sup>a</sup> preparadas por duplicado

### 1.3.4. Programas informáticos y algoritmos para análisis de los datos

El procesamiento de datos se realizó en MATLAB 7.10. [113] Los algoritmos necesarios para operar MCR-ALS se encuentran disponibles en Internet accediendo a la página web <http://www.mcrals.info/>.

## 1.4. Resultados y discusión

### 1.4.1. Caracterización ácido-base por titulación espectrofotométrica UV-Vis

#### 1.4.1.1. Consideraciones generales

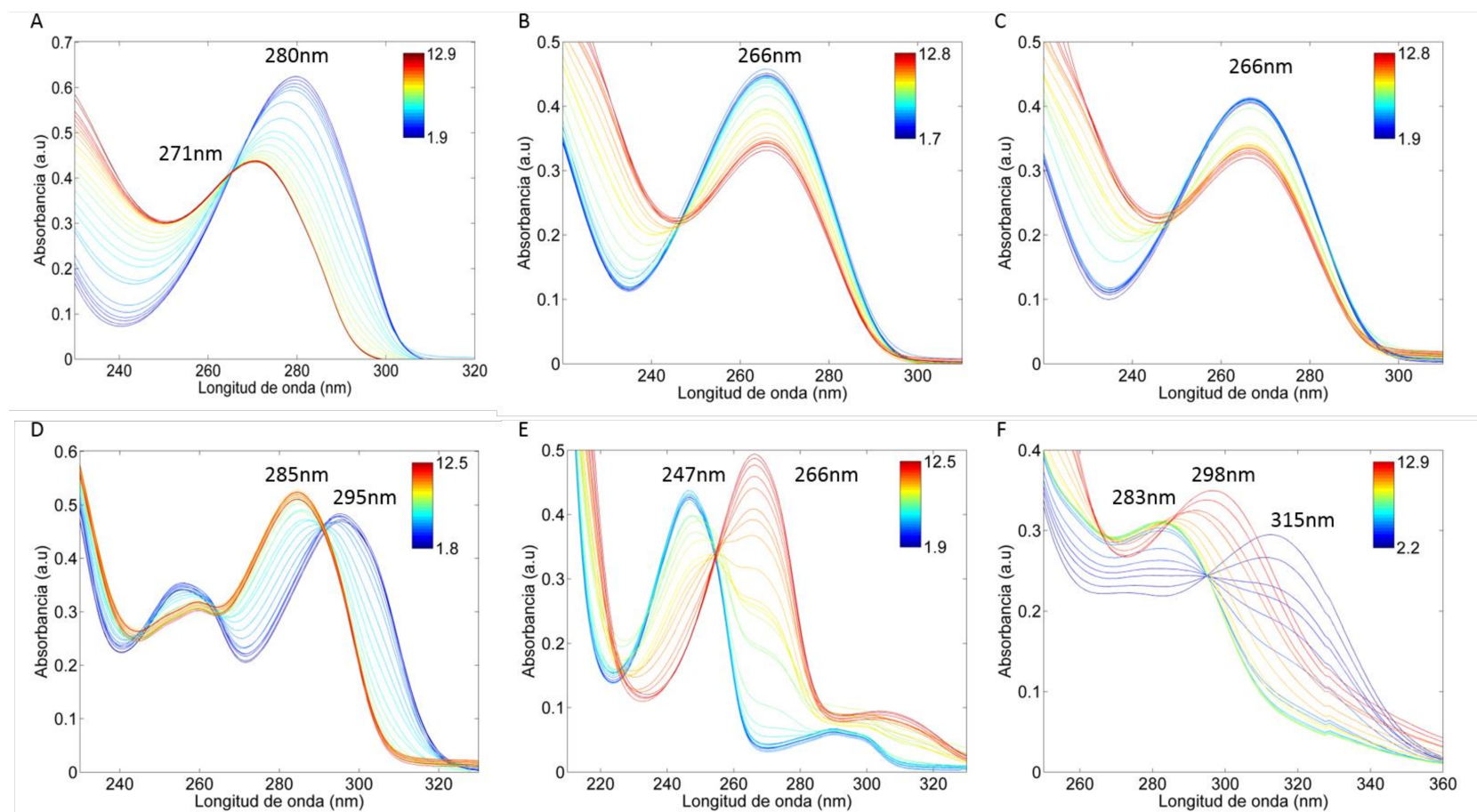
En la literatura se encuentra ampliamente estudiada la dependencia del  $\text{pK}_a$  con respecto a la temperatura, la fuerza iónica y la constante dieléctrica del medio [114]. Sin embargo, algunos trabajos de determinación de valores de  $\text{pK}_a$  de ARVs no mantienen controlados estos parámetros durante los experimentos o simplemente omiten esta información, tal como se describe en la Tabla 6. Es importante señalar, que las determinaciones de  $\text{pK}_a$  a una fuerza iónica constante requieren de la preparación de

diferentes soluciones para realizar las mediciones a cada valor de pH, lo que resulta poco práctico desde el punto de vista experimental y económico, debido al alto consumo de solventes, la generación de residuos, los tiempos de análisis prolongados, y la introducción de errores sistemáticos, entre otros.

Por lo tanto, considerando que el objetivo de este trabajo es la caracterización ácido-base de estos analitos con un fin analítico, las condiciones experimentales se establecieron manteniendo la fuerza iónica controlada ( $0.06 \text{ mol L}^{-1}$ ) para cada solución al inicio de la titulación y la temperatura constante en  $25^\circ\text{C}$

#### *1.4.1.2. Espectros de absorción UV-Vis*

En la Fig. 5 se muestran los espectros de absorción de 3TC, d4T, AZT, ABC, EFV y NVP en solución acuosa en función del pH, observándose una notable variación espectral dependiente de los valores de pH para todos los analitos. Para el caso de 3TC, se observa un máximo de absorbancia a 280 nm a pH ácido, mientras a pH básico se presenta un cambio hipsocrómico a 271 nm con una marcada disminución de la intensidad (Fig. 5A). Por otro lado, los analitos d4T y AZT muestran un único máximo de absorción a 266 nm, observándose un decrecimiento de la intensidad de absorbancia de pH ácido a pH alcalino (Fig. 5B y C). Cabe destacar que ambas drogas poseen espectros de absorción análogos, lo que puede deberse a su similitud estructural (Fig. 1). La principal variación espectral de ABC se observa de 295 nm a 285 nm al producirse el cambio de las condiciones ácidas hacia las básicas (Fig. 5D). Adicionalmente, el EFV exhibe una banda máxima de absorción a 247 nm en condiciones ácidas, que disminuye con los incrementos de pH, apareciendo al mismo tiempo una nueva banda a 266 nm (Fig. 5E). Para finalizar, en el perfil espectral de la NVP se observan dos puntos isobécticos en diferentes rangos de pH, a 295 nm (para el rango de pH ácido) y a 285 nm para (el rango de pH básico) (Fig. 5F), sugiriendo la existencia de dos valores de  $pK_a$ .

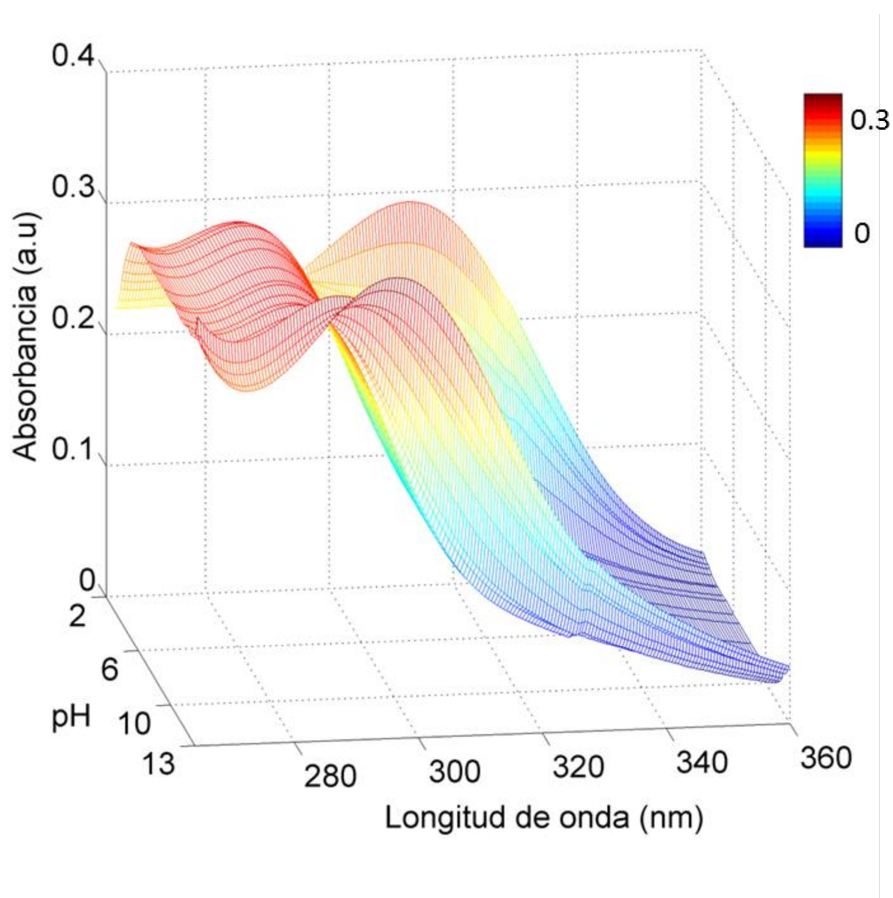


**Figura 5.** Perfiles espectrales UV-Vis de soluciones acuosas conteniendo  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de (A) 3TC, (B) d4T, (C) AZT, (D) ABC (E) EFV y (F) NVP a diferentes valores de pH.



### 1.4.1.3. Determinación de constantes de disociación empleando MCR-ALS

Con el objetivo de determinar las constantes de disociación de los analitos 3TC, d4T, AZT, ABC, EFV y NVP a partir de sus características espectrales, se realizó una titulación espectrofotométrica registrándose los espectros UV-Vis correspondientes a los diferentes valores de pH en el rango de 2.0 a 13.0, con los que se generaron datos de segundo orden (Fig. 6).

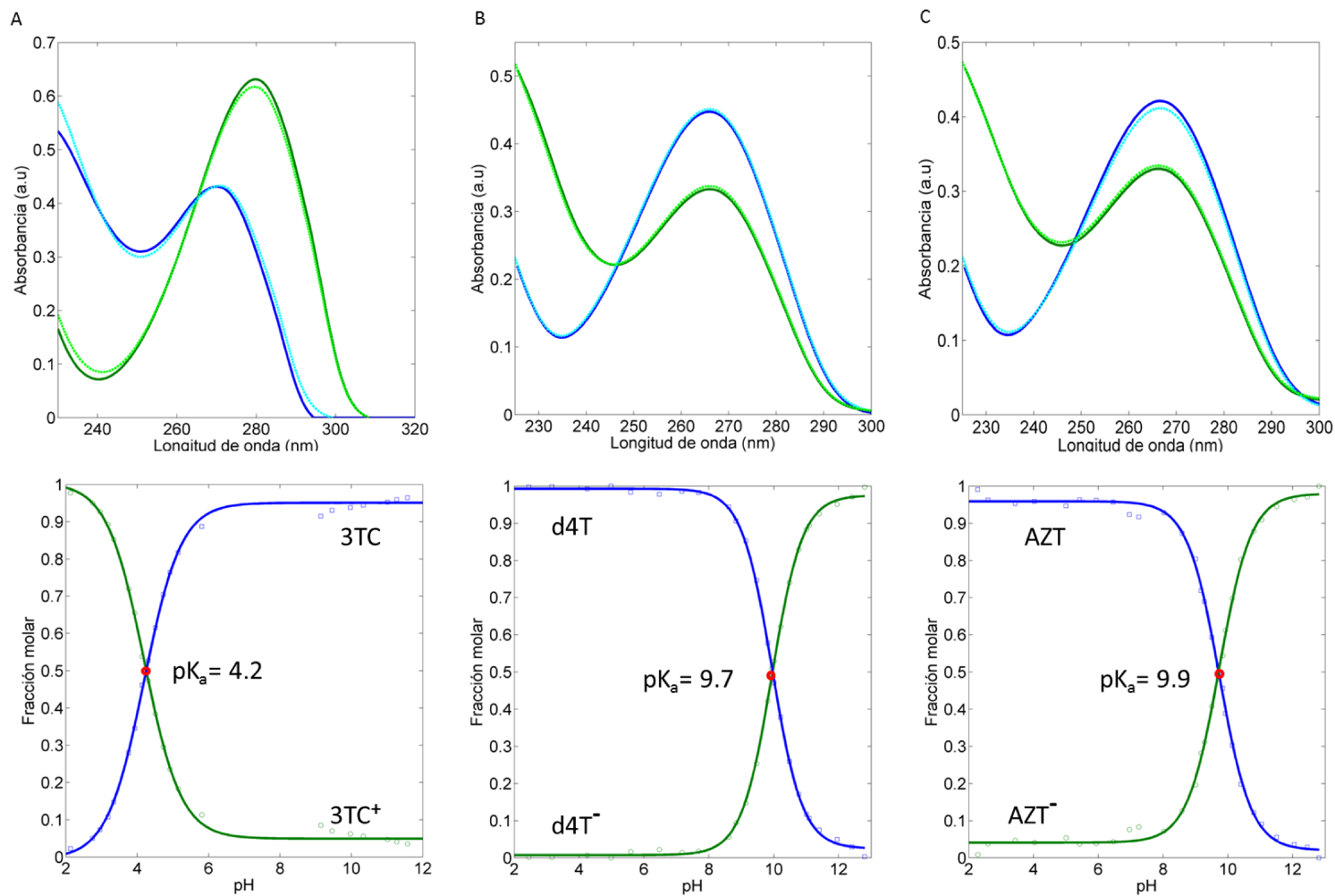


**Figura 6.** Representación tridimensional de datos experimentales obtenidos por titulación espectrofotométrica UV-Vis para NVP.

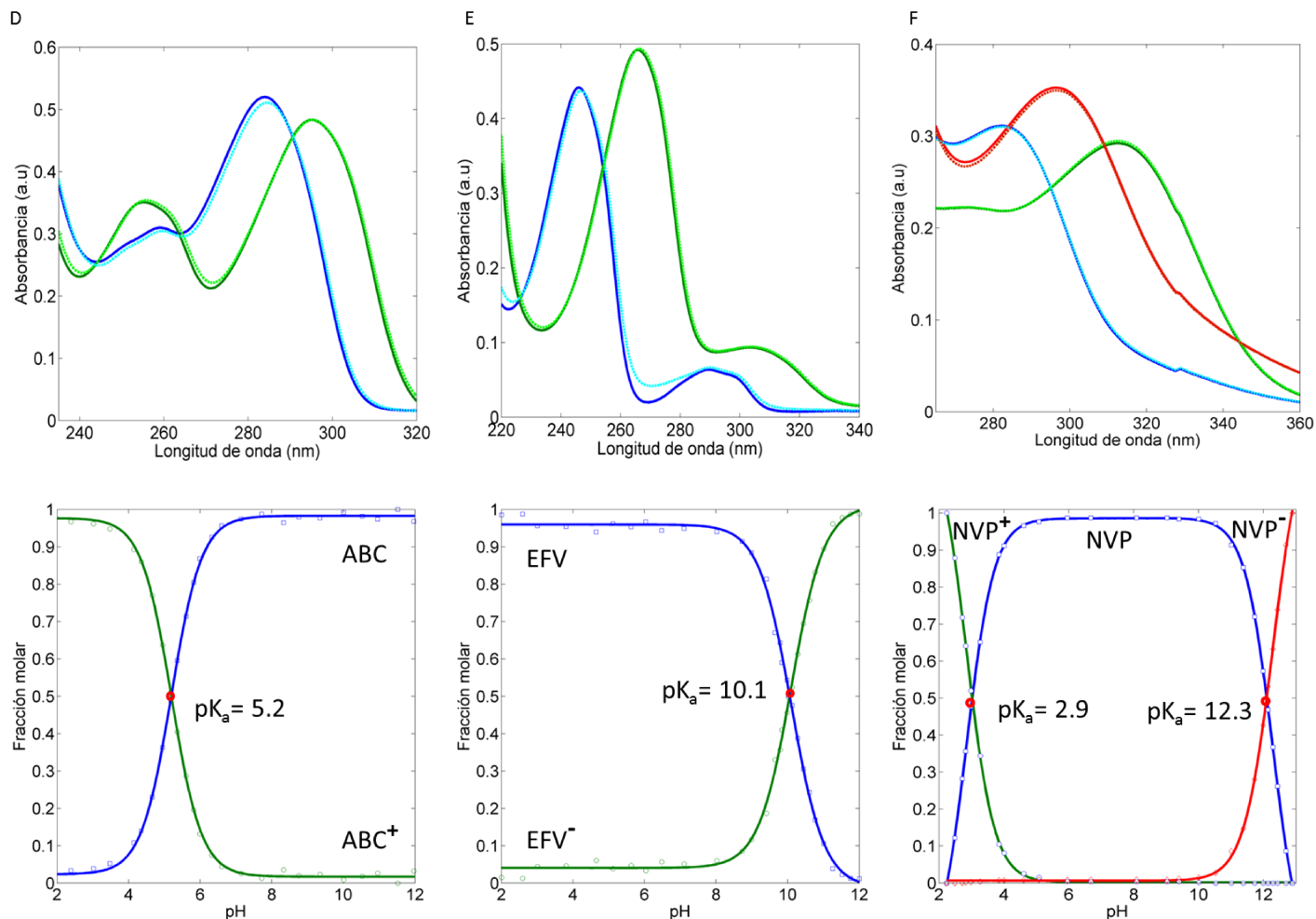
Las constantes de disociación se obtuvieron procesando los datos de segundo orden mediante MCR-ALS. El primer paso en la resolución por MCR-ALS consistió en la estimación del número de componentes espectroscópicamente activos involucrados en el sistema a partir de análisis por SVD, obteniéndose dos factores o componentes para los analitos 3TC, d4T, AZT, ABC y EFV, mientras que para la NVP se observaron tres componentes. Las estimaciones espectrales iniciales se obtuvieron empleando una

metodología basada en SIMPLISMA. Finalmente, con el objetivo de minimizar la ambigüedad de los resultados obtenidos, se aplicaron las siguientes restricciones: no negatividad en el modo espectral y de concentración, y condición de sistema cerrado. Esta última restricción se aplicó para garantizar el balance de masa entre las especies involucradas en cada equilibrio ácido-base. Luego de la descomposición de la matriz **D** por MCR-ALS, se realizó un ajuste sigmoïdal a partir de la información de concentración contenida en **C** (curva de distribución de especies) y se determinó el valor de  $pK_a$  a partir del punto de intersección de las especies.

La Fig. 7 (panel superior) muestra la resolución obtenida por MCR-ALS para cada uno de los analitos, observándose que los perfiles espectrales resueltos son muy similares a los espectros experimentales puros, lo que indica el buen desempeño de MCR-ALS en la resolución de ese tipo de datos. Adicionalmente, se obtuvo el diagrama de distribución de especies ajustando los datos a través de una curva sigmoïdal y se determinaron los valores de  $pK_a$  a partir de las intersecciones de las especies presentes en cada caso (Fig. 7, panel inferior). Cabe destacar, que para el caso de NVP se observa la aparición de tres especies y, por consiguiente, dos valores de  $pK_a$  asociados. Este segundo valor de  $pK_a$  no había sido informado previamente en la literatura [101,105,106].



**Figura 7.** Perfiles espectrales resueltos por MCR-ALS (líneas sólidas) y espectros experimentales puros (líneas punteadas) (panel superior), y diagrama de distribución de especies (panel inferior), obtenido por MCR-ALS para (A) 3TC, (B) d4T, (C) AZT, (D) ABC, (E) EFV, (F) NVP (los valores experimentales se indican en círculos y las curvas ajustadas se muestran en azul para las especies no ionizadas o neutras, y verde y rojo para las especies ionizadas).



**Figura 7 (continuación).** Perfiles espectrales resueltos por MCR-ALS (líneas sólidas) y espectros experimentales puros (líneas punteadas) (panel superior), y diagrama de distribución de especies (panel inferior), obtenido por MCR-ALS para (A) 3TC, (B) d4T, (C) AZT, (D) ABC, (E) EFV, (F) NVP (los valores experimentales se indican en círculos y las curvas ajustadas se muestran en azul para las especies no ionizadas o neutras, y verde y rojo para las especies ionizadas).

Por otro lado, con el objetivo de confirmar los valores de  $pK_a$  obtenidos por MCR-ALS se utilizó otra metodología de cálculo basada en el ajuste sigmoideal de la absorbancia medida a una longitud de onda específica en función del pH y, posteriormente, se calculó el  $pK_a$  a partir del punto de inflexión de la curva empleando la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Es importante remarcar que el cálculo de las constantes de disociación a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch emplea las absorbancias medidas a una longitud de onda específica. En principio, cualquier longitud de onda puede ser utilizada en el cálculo, excepto la longitud de onda correspondiente al punto isobéptico, en la que ambas formas poseen igual absorptividad molar. Sin embargo, la longitud de onda empleada, generalmente, es aquella que presenta la mayor diferencia de absorptividad molar [114]. Por lo tanto, se empleó la longitud de onda máxima correspondiente a la forma ionizada, que fue la especie que mostró mayor diferencia de absorptividad molar en todos los casos aquí analizados. Los resultados obtenidos por esta metodología y por MCR-ALS se muestran en la Tabla 6, junto con los valores informados en la literatura. Se observa que los valores de  $pK_a$  calculados empleando ambas metodologías fueron muy similares entre sí, e incluso con los valores de referencia. Esta analogía entre todos los resultados demuestra, por lo tanto, que la estrategia quimiométrica utilizada es una herramienta adecuada para la determinación del  $pK_a$  de estos ARVs.

Es importante destacar que, tradicionalmente, los valores de  $pK_a$  se determinan a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, la cual constituye una metodología de cálculo simple, que involucra la determinación de la constante de disociación a partir de los valores de absorbancia correspondientes a una longitud de onda específica en función del pH [115]. El empleo de datos de segundo orden generados a partir de una matriz de espectros de absorbancia-pH constituye una metodología alternativa muy útil, que provee resultados confiables y que, adicionalmente, brinda información de los perfiles espectrales de las especies involucradas en el equilibrio ácido-base [98,116]. Otra de las ventajas del uso del algoritmo quimiométrico MCR-ALS es que permite establecer el número de componentes espectroscópicamente activos presentes, lo que permitiría detectar interferencias de las soluciones usadas en la titulación o impurezas de los analitos estudiados.

**Tabla 6.** Resumen de los valores de pK<sub>a</sub> obtenidos en este trabajo y los informados en la literatura.

Analito	Método	Procedimiento experimental			pK <sub>a</sub>	Ref. <sup>c</sup>
		Rango de pH	T (°C)	I (mol L <sup>-1</sup> )		
3TC	-	-	-	-	4.3	[101]
	Electroforesis capilar	2-11	25	0.05(NaCl)	4.24	[103]
	Espectroscopia UV	2-13	25	0.06 (KCl)	4.19 (2) <sup>a</sup> 4.18 (1) <sup>b</sup>	[este estudio]
d4T	-	-	-	-	10	[101]
	Espectroscopia UV	2-13	25	0.06 (KCl)	9.73 (2) <sup>a</sup> 9.97 (4) <sup>b</sup>	[este estudio]
AZT	-	-	-	-	9.7	[101]
	FIA-DAD	3.5-10.5	-	-	9.55	[93]
	Potenciometría	-	-	-	9.85	[102]
	Potenciometría de barrido diferencial	-	25	-	9.42	[107]
	Espectroscopia UV	2-13	25	0.06 (KCl)	9.90 (1) <sup>a</sup> 9.91 (3) <sup>b</sup>	[este estudio]
ABC	-	-	-	-	5.1	[101]
	Electroforesis capilar	2-11	25	0.05(NaCl)	5.04	[103]
	Espectroscopia UV	2-13	25	0.06 (KCl)	5.20 (1) <sup>a</sup> 5.21 (4) <sup>b</sup>	[este estudio]
EFV	-	-	-	-	10.2	[101]
	Solubilidad	1-13	-	-	10.1	[104]
	Espectroscopia UV	1-13	-	0.15	10.2 <sup>c</sup>	[este estudio]
	Espectroscopia UV	2-13	25	0.06 (KCl)	10.11 (2) <sup>a</sup> 10.04 (2) <sup>b</sup>	[este estudio]
NVP	-	-	-	-	2.8	[101]
	Solubilidad	1-6	25	-	2.65	[105,106]
	Espectroscopia UV	2-13	25	0.06 (KCl)	2.85 (1) <sup>a</sup> 2.82 (1) <sup>b</sup> 12.27 (2) <sup>a</sup> , 12.27 (3) <sup>b</sup>	[este estudio]

<sup>a</sup> pK<sub>a</sub> calculado por MCR-ALS. La desviación estándar experimental se informa en la última cifra significativa entre paréntesis

<sup>b</sup> pK<sub>a</sub> calculado por ajuste de una curva sigmoideal usando la longitud de onda de máxima absorbancia, correspondiente a la especie ionizada. La desviación estándar experimental se informa en la última cifra significativa entre paréntesis

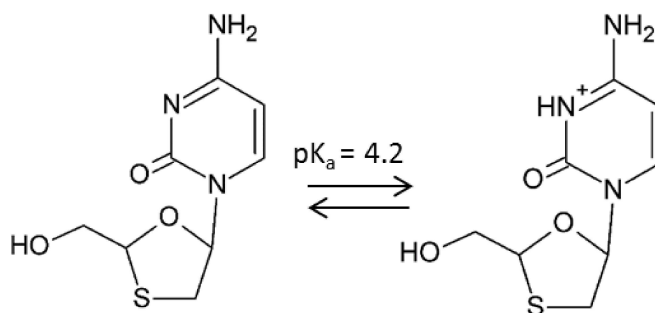
<sup>c</sup> Referencias

#### 1.4.1.4. Sitios de ionización

En base a los valores de  $pK_a$  obtenidos y analizando las estructuras químicas de cada analito se puede sugerir que 3TC y ABC se encontrarían protonados en condiciones ácidas, mientras que d4T, AZT y EFV se encontrarían desprotonados en condiciones alcalinas. Por el contrario, NVP puede sufrir protonación y desprotonación, en dependencia del medio en el que se encuentre.

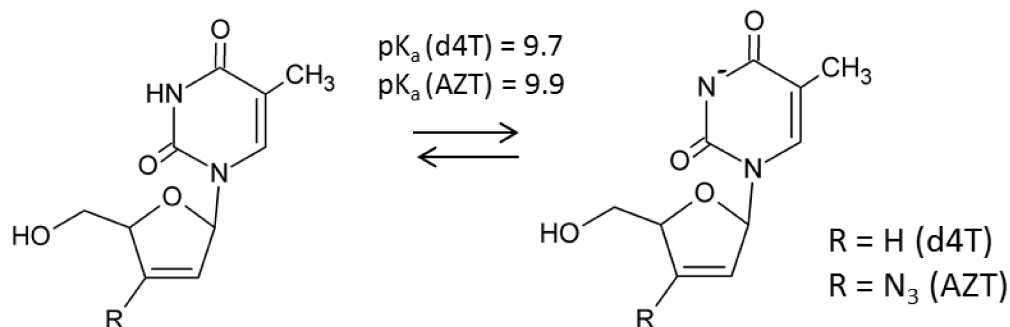
En vista a lo anterior, se realizó un análisis teórico de los sitios de protonación-desprotonación más probables para estas moléculas, basado en la información bibliográfica publicada para moléculas análogas o compuestos químicamente semejantes a las drogas ARVs.

La 3TC es un análogo del nucleósido citidina, donde la base nitrogenada es la citosina, un derivado de la pirimidina. Para la citidina, la protonación del nitrógeno en posición 3' del anillo pirimidínico está asociada con su  $pK_a = 4.2$  [117,118]. Por lo tanto, en base a la analogía estructural de ambas moléculas, así como a la similitud en sus valores de  $pK_a$ , se sugiere que los cambios espectrales observados en 3TC se deben a la protonación del átomo de nitrógeno pirimidínico en condiciones ácidas, tal como se muestra en la Fig. 8.



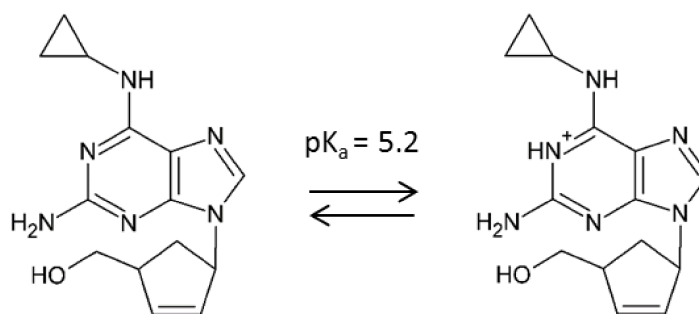
**Figura 8.** Posible sitio de ionización de 3TC

La d4T y la AZT son análogos del nucleósido timidina, cuya base nitrogenada es la timina, un derivado de la pirimidina. Para la timidina se encuentra informada en la literatura la desprotonación del nitrógeno en posición 3' en condiciones alcalinas, y la consiguiente correlación con su valor de  $pK_a$  de 9.6 [117], suponiéndose, por lo tanto, que para ambos analitos aquí analizados a valores de pH básicos ocurriría la ionización en los sitios indicados en la Fig. 9.



**Figura 9.** Posible sitio de ionización de d4T y AZT.

El ABC es un análogo del nucleósido guanosina, cuya base nitrogenada es la guanina, un derivado de la purina. En la literatura se encuentra descrito que para las aminopurinas el sitio de ionización más favorable es el nitrógeno en posición 1', en este sentido se reportó un valor de  $pK_a=5.09$  para la 2,6 diaminopurina [117,119]. Por lo tanto, se podría sugerir que el sitio más probable de protonación para ABC es el nitrógeno en posición 1', tal como se muestra en la Fig. 10.



**Figura 10.** Posible sitio de ionización de ABC.



Para el caso del EFV, se encuentra definido específicamente que su  $pK_a$  está relacionado con la desprotonación del nitrógeno en posición 1' en condiciones alcalinas (Fig. 11) [104].

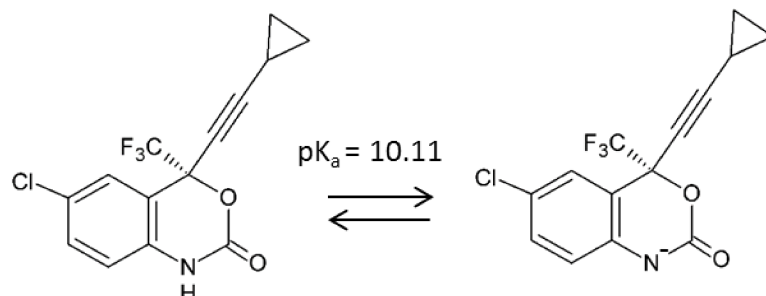


Figura 11. Sitio de ionización de EFV [104].

La NVP es una molécula anfótera [120], no análogo de los nucleósidos. Se encuentra informado en la literatura que el sitio de protonación más probable es el nitrógeno del anillo de piridina en condiciones ácidas [121]. Esta molécula posee también un hidrógeno débilmente ácido en el grupo amida [120], por lo que se podría sugerir que en condiciones alcalinas puede ocurrir la pérdida de este protón, y que esta desprotonación sea la responsable del segundo valor de  $pK_a$  encontrado en este trabajo ( $pK_{a2} = 12.27$ ) (Fig. 12). Es importante destacar que para moléculas análogas como las benzodiazepinas, se encuentran informados valores de  $pK_a \sim 12$ , también asociados con la desprotonación del hidrógeno del grupo amida [122]

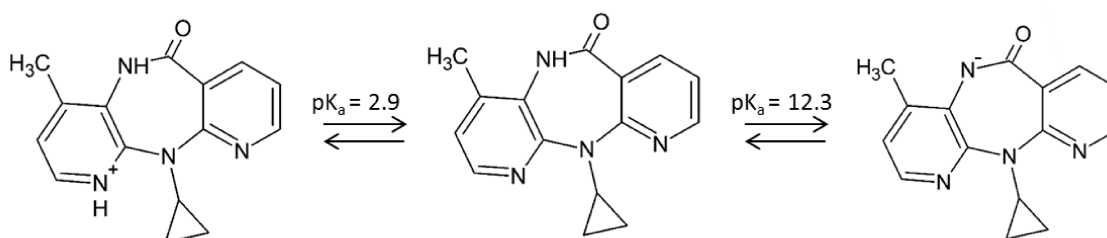


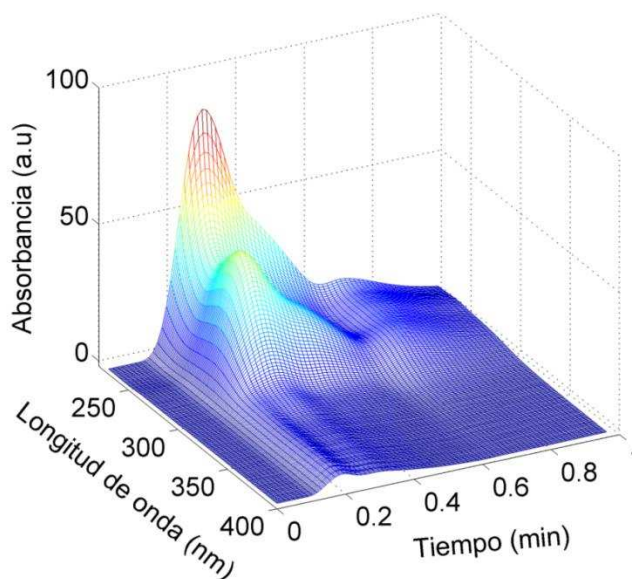
Figura 12. Posibles sitios de ionización de NVP.

## ***1.4.2. Cuantificación de ARVs mediante FIA-DAD y MCR-ALS***

### ***1.4.2.1. Consideraciones generales***

A partir de la caracterización ácido-base de estas drogas y teniendo en cuenta las variaciones espectrales de las especies con el pH, se procedió al desarrollo de una metodología de cuantificación a partir de la generación de un gradiente de pH en un sistema de inyección en flujo. Es importante señalar que el gradiente de pH se realizó en un rango comprendido entre 2.4 y 11.0, que permitió la protonación y/o desprotonación de las especies involucradas en el equilibrio. Cada analito se evaluó a partir de las dos especies involucradas en el equilibrio ácido-base descrito en el apartado anterior, excepto en el caso de NVP, debido a que el cromatógrafo empleado para llevar a cabo el sistema de inyección en flujo no permite trabajar a valores de pH superiores a 11. Por lo tanto, para NVP se observaron los cambios espectrales asociados a las especies involucradas en uno de los equilibrios ácido-base.

Como se mencionó anteriormente, las variaciones espectrales que se generan a partir de un gradiente de pH permiten, mediante el uso de herramientas quimiométricas, la discriminación de los componentes de una mezcla sin necesidad de someterla a etapas de pretratamiento [48]. En este sentido, a diferencia de los métodos separativos, y teniendo en cuenta el principio de la metodología del sistema FIA, a partir de la generación de datos de segundo orden es posible lograr la resolución de los componentes mediante el empleo de algoritmos quimiométricos apropiados que se basan en sus diferencias espectrales. Por lo tanto, en este estudio se obtuvieron datos de segundo orden, a partir de la generación de un gradiente de pH y el registro de espectros UV-Vis (Fig. 13). La determinación de las drogas ARVs se realizó por modelado quimiométrico utilizando MCR-ALS.



**Figura 13.** Representación tridimensional de los datos experimentales obtenidos para una muestra de validación usando el sistema FIA-DAD.

#### 1.4.2.2. Análisis de las muestras de calibración y validación

Las muestras de validación estaban compuestas por cinco ARVs que son generalmente administrados conjuntamente en el tratamiento HAART y, por lo tanto, resulta de interés su determinación de manera simultánea.

El procesamiento de los datos consistió en la generación de matrices aumentadas en columna ( $\mathbf{D}_{aum}$ ) de dimensiones  $385 \times 121$ , compuestas por la matriz correspondiente a la muestra de validación, las matrices de datos de la curva de calibración y una matriz por cada uno de los demás analitos presentes en la mezcla.

En primer lugar, se determinaron las señales experimentales asociadas al blanco, las que se obtuvieron a partir de la inyección en el sistema FIA de una solución alcalina  $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sin agregado de los analitos. Por lo tanto, los cambios espectrales observados se debieron a los componentes de la solución alcalina  $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Luego, antes de proceder al análisis por MCR-ALS, se determinó el número de factores en las muestras de validación mediante SVD, obteniéndose 12 factores en total, siendo 10 de ellos asignables a las especies involucradas en el equilibrio ácido-base (dos especies espectralmente activas por cada analito) y los dos restantes asociados al blanco.

Las estimaciones iniciales se realizaron por análisis del espectro más puro basado en la metodología SIMPLISMA [53]. Por otra parte, durante la optimización por ALS se aplicaron las

restricciones no-negatividad en los perfiles de concentración y espectrales, y correspondencia entre especies comunes en las diferentes matrices. Luego de la descomposición de la matriz **D** por MCR-ALS, se realizó una regresión pseudo-univariada del área en función de la concentración de cada analito a partir de la información de concentración de las muestras de calibración contenidas en **C**.

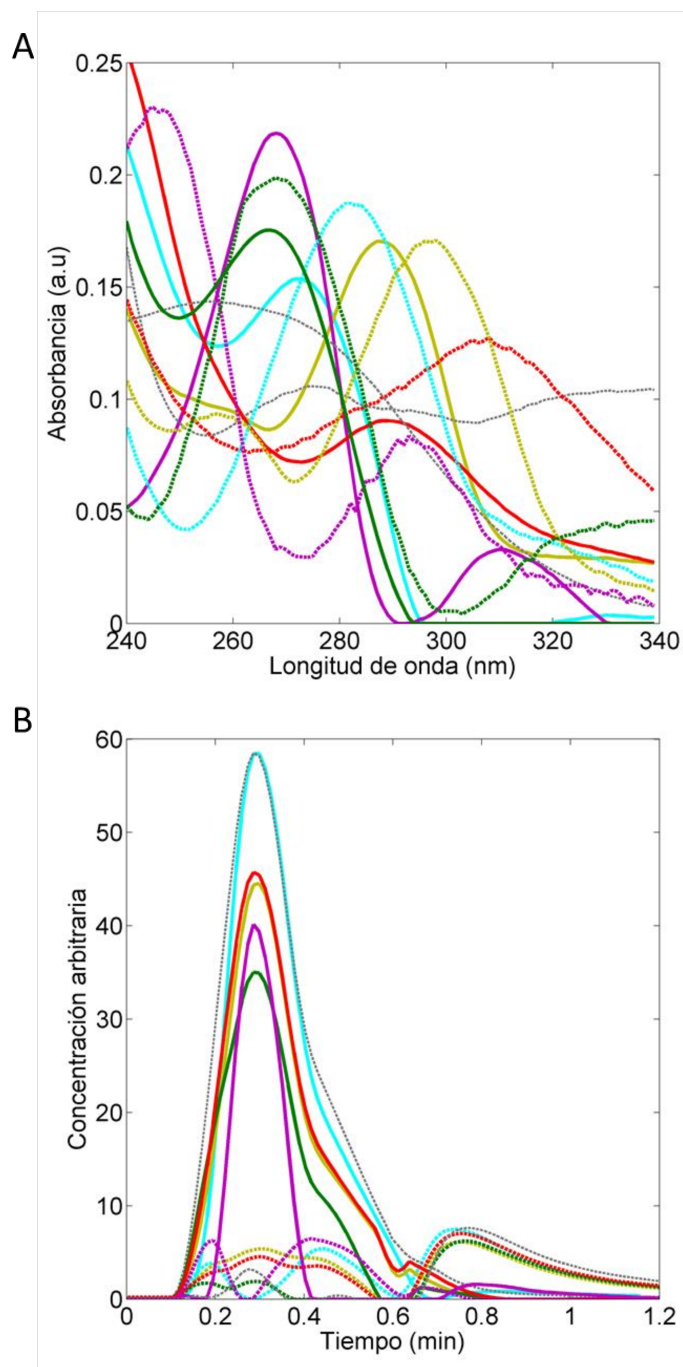
En la Fig. 14 se muestra una representación de la resolución quimiométrica obtenida para una de las muestras de validación, observándose los perfiles espectrales recuperados para cada una de las especies (Fig. 14A), así como los perfiles de concentración (Fig. 14B).

Es importante tener en cuenta que en el sistema FIA la generación del gradiente de pH ocurre a partir de la mezcla y dispersión controlada de la muestra alcalina en el flujo transportador ácido. Es así que se genera una zona bien definida correspondiente al bolo de la muestra (Fig. 13) donde se produce un gradiente de concentración a lo largo de todo el bolo, siendo máxima la concentración de las especies básicas en la zona central del bolo (Fig. 14B, líneas sólidas), y resultando máxima la concentración de las especies ácidas en las dos regiones contiguas a la región básica central (Fig. 14B, líneas punteadas) [123].

Los perfiles espectrales de las especies ácidas y básicas recuperados por MCR-ALS fueron similares a los perfiles espectrales puros obtenidos anteriormente durante la etapa previa de caracterización ácido-base por titulación espectrofotométrica. No obstante, con el objetivo de evaluar la eficiencia y calidad del modelo se realizó una comparación matemática entre el espectro experimental puro ( $\mathbf{s}_1$ ) y el perfil espectral resuelto por MCR-ALS ( $\mathbf{s}_2$ ). Para calcular el grado de solapamiento espectral se empleó la siguiente expresión:

$$s_{12} = \frac{\|\mathbf{s}_1^T \mathbf{s}_2\|}{\|\mathbf{s}_1\| \|\mathbf{s}_2\|} \quad (11)$$

Los valores de  $s_{12}$  oscilan en un rango desde 0 hasta 1, lo que corresponde a una situación extrema de ausencia de solapamiento y solapamiento completo, respectivamente [124]. Los valores  $s_{12}$  obtenidos para las especies básicas y ácidas fueron: 0.9972 y 0.9966 para 3TC, 0.9929 y 0.9937 para AZT, 0.9960 y 0.9909 para ABC, 0.9968 y 0.9962 para EFV y 0.9904 y 0.9760 para NVP, respectivamente. Estos resultados indican un alto grado de solapamiento entre el espectro experimental puro y el perfil espectral resuelto.



**Figura 14.** Perfiles espectrales (A) y de concentración (B) resueltos por MCR-ALS para los datos de una muestra de validación generados mediante el sistema FIA. Las especies básicas y ácidas de 3TC (celeste), AZT (verde), ABC (amarillo), EFV (violeta) y NVP (rojo) se encuentran representadas en líneas sólidas y punteadas, respectivamente. Las contribuciones correspondientes al blanco se muestran en líneas punteadas grises.

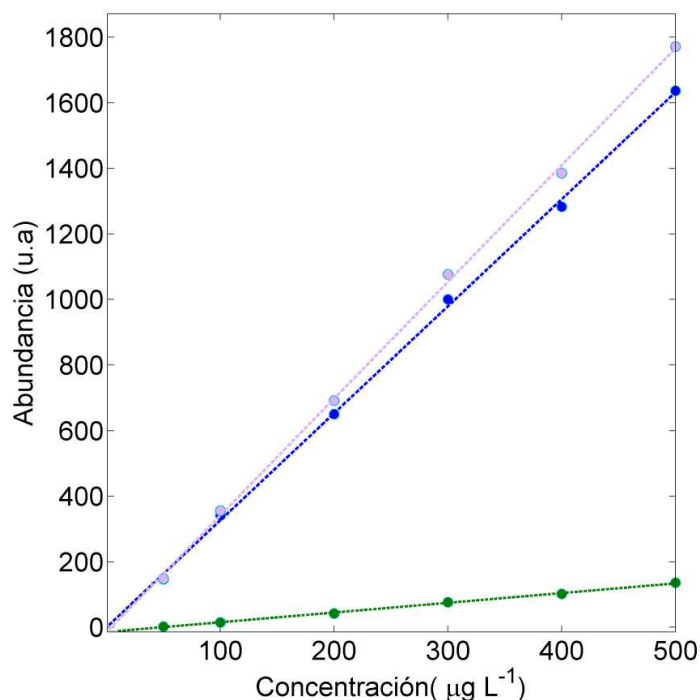
La cuantificación de cada analito se llevó a cabo teniendo en cuenta el cumplimiento del balance de masa o conservación de masa (condición de sistema cerrado). Por consiguiente, en el equilibrio ácido-base de las drogas en estudio la concentración analítica total del analito ( $C_{total}$ ) es igual a la suma de las concentraciones correspondientes a la especie ácida y básica:

$$C_{total} = [Especie\ ácida] + [Especie\ básica] \quad (12)$$

Por lo tanto, teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, la descomposición bilineal de este sistema provee dos componentes (especie ácida y básica), de manera que pueden seguirse dos estrategias para la predicción de la concentración de cada analito en estudio. La primera estrategia consiste en la selección del componente que demuestre mejores parámetros analíticos, tales como mayor sensibilidad y mejor ajuste de linealidad, mientras que la segunda utiliza la información obtenida para ambos componentes; es decir, se considera como respuesta analítica a la sumatoria de las contribuciones individuales de cada uno.

Es importante destacar que el cálculo de SEN para datos de segundo orden requiere de la información espectral correspondiente al componente evaluado. Por lo tanto, para la primera estrategia, esta información se puede extraer fácilmente de la matriz **S**. Sin embargo, para la segunda estrategia, el cálculo de SEN se realiza utilizando la combinación lineal de los perfiles espectrales obtenidos para cada componente [125].

Por consiguiente, considerando que el componente correspondiente a la especie básica de cada uno de los analitos presentó mayor sensibilidad (Fig. 15) con respecto a la especie ácida, así como a la simplicidad de los cálculos y la ausencia de diferencias significativas en cuanto a los resultados de predicción obtenidos por ambas estrategias, el análisis cuantitativo se llevó a cabo siguiendo la primera estrategia, utilizándose la información obtenida para la especie básica.



**Figura 15.** Representación de curvas de abundancia de 3TC con respecto a la concentración obtenida por MCR-ALS para la especie ácida (verde), básica (azul) y para la suma de contribuciones individuales (violeta). En líneas punteadas se muestran las curvas ajustadas de regresión.

La Tabla 7 resume las concentraciones predichas u obtenidas por el algoritmo quimiométrico MCR-ALS para las muestras de validación, observándose valores adecuados de recuperación entre 90-112%, así como de errores de predicción relativa (*REP: Relative Error Prediction*) entre 3-6%.

Por otro lado, con el objetivo de corroborar la capacidad de predicción del modelo para los compuestos analizados en las muestras de validación, se realizó el test estadístico de las regiones elípticas de confianza conjunta (*EJCRs: Elliptical Joint Confidence Regions*). Como puede observarse en la Fig. 16, aunque existe una ligera dispersión de los valores predichos por MCR-ALS con respecto a la recta de regresión ideal, las elipses obtenidas en todos los casos incluyen al valor teórico esperado (pendiente igual a 1, ordenada al origen igual a 0), indicando la exactitud de las predicciones.

**Tabla 7.** Determinación de 3TC, AZT, ABC, EFV y NVP en muestras de validación por FIA-DAD.

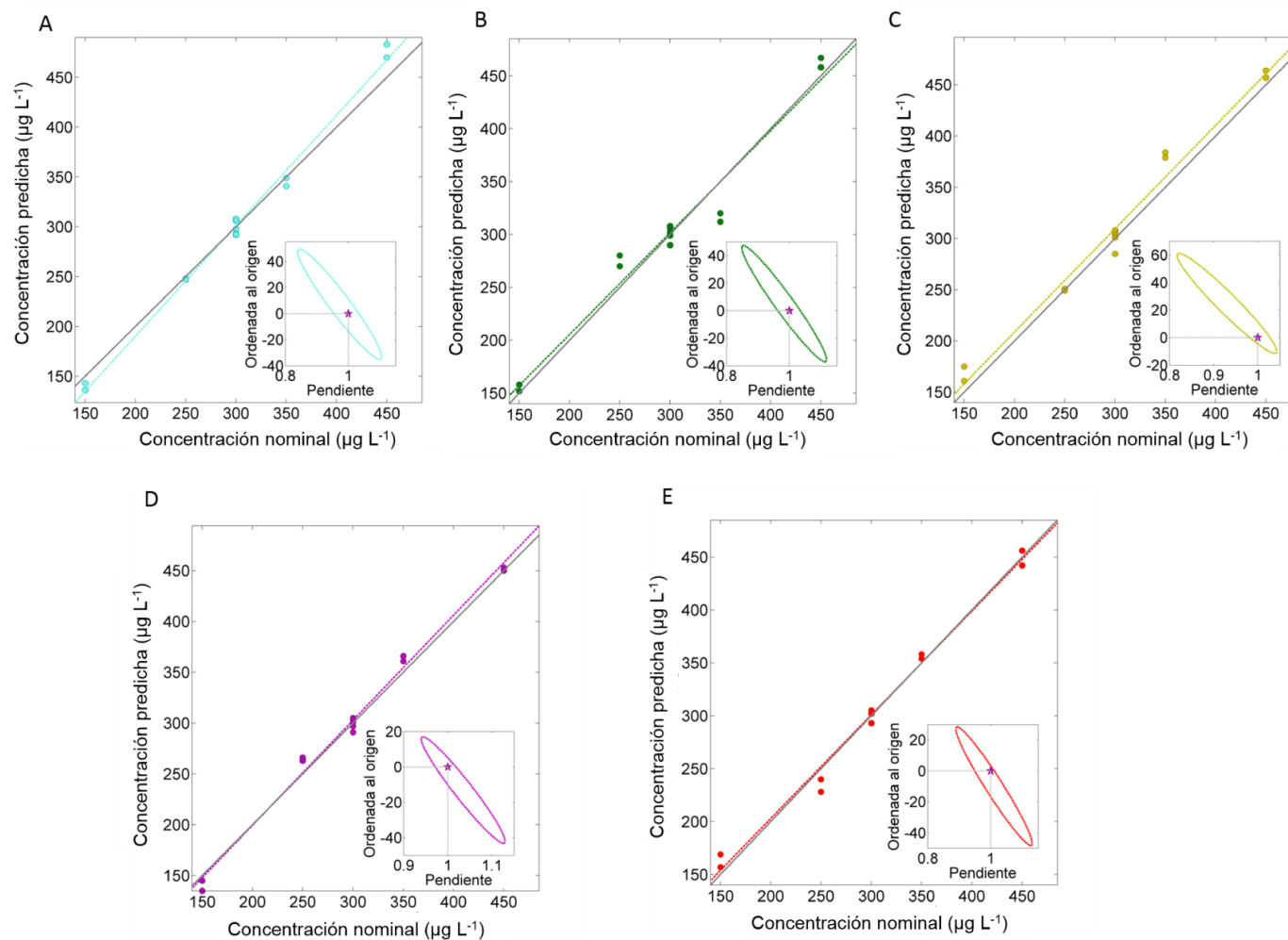
Muestras de validación	Concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )									
	3TC <sup>a</sup>		AZT <sup>a</sup>		ABC <sup>a</sup>		EFV <sup>a</sup>		NVP <sup>a</sup>	
	Nominal	Predicha	Nominal	Predicha	Nominal	Predicha	Nominal	Predicha	Nominal	Predicha
1	450	476 (9) [106]	150	155 (4) [103]	350	381 (4) [109]	450	451 (2) [100]	250	234 (8) [94]
2	350	345 (6) [99]	250	275 (7) [110]	450	461 (5) [102]	150	140 (7) [93]	350	356 (3) [102]
3	300	299 (7) [100]	300	301 (7) [100]	300	301 (9) [100]	300	299 (6) [100]	300	302 (5) [101]
4	250	247 (1) [99]	350	316 (6) [90]	150	168 (9) [112]	250	264 (2) [106]	450	449 (9) [100]
5	150	139 (5) [93]	450	463 (6) [103]	250	250 (1) [100]	350	363 (4) [104]	150	163 (8) [109]
REP% <sup>b</sup>	4.2		6.0		5.3		3.1		3.3	

<sup>a</sup> Los valores se encuentran expresados como el promedio de las réplicas correspondientes. Las desviaciones estándares experimentales se muestran en la última cifra significativa entre paréntesis y las recuperaciones porcentuales entre corchetes

<sup>b</sup> REP%: Error de predicción relativa,  $REP = 100 \frac{RMSE}{\bar{c}}$ , donde  $\bar{c}$  es la media de las concentraciones de calibración y  $RMSE =$

$$\sqrt{\frac{1}{l} \sum_{i=1}^l (c_{nom} - c_{pred})^2} \text{ para } l=13$$





**Figura 16.** Gráficos de concentraciones predichas por MCR-ALS en función de los valores nominales de (A) 3TC, (B) AZT, (C) ABC, (D) EFV, (E) NVP para las muestras de validación (la línea sólida gris representa la regresión ideal y líneas punteadas la regresión predicha) y las correspondientes regiones elípticas de confianza conjunta para un 95% de confianza. Las estrellas marcan el punto teórico de ordenada al origen igual a 0, pendiente igual a 1.

### 1.4.2.3. Cifras de mérito analíticas

Adicionalmente, se evaluaron las cifras de mérito con el propósito de evaluar el desempeño de esta metodología analítica y discriminar entre sus capacidades de detección. La Tabla 8 resume las cifras de mérito estimadas de acuerdo a Bauza y cols. [59], y siguiendo las recomendaciones de Allegrini y col. [126], observándose valores aceptables para todos los analitos, con LOD entre 25 y 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  y LOQ entre 74 y 122  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Los niveles de concentración de estas drogas en muestras ambientales de agua usualmente se encuentran en el orden de los  $\text{ng L}^{-1}$ ; no obstante, en estudios recientes se informaron valores de concentración de 3TC en aguas residuales y ríos de Kenya entre 30-60  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 167  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente [22]. De igual manera, Afafe y col. [21] obtuvieron resultados similares para AZT (6.9-53  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y EFV (20-34  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) en aguas residuales en Sudáfrica. De acuerdo a lo anteriormente expuesto, la metodología propuesta resulta una alternativa apropiada para monitorear los niveles de estas drogas antirretrovirales de manera simultánea en matrices ambientales de agua a partir de la generación de datos espectroscópicos de segundo orden, sin pasos previos de preconcentración.

**Tabla 8.** Cifras de mérito analíticas

Cifras de mérito	3TC	AZT	ABC	EFV	NVP
SEN ( $\text{AU } \mu\text{g}^{-1} \text{L}$ )	0.038–0.072	0.059–0.075	0.14–0.18	0.050–0.066	0.11–0.14
Sensibilidad analítica ( $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ )	8–14	12–15	27–35	10–13	22–27
LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	24.52–24.53	40.33–40.37	39.72–39.73	39.32–39.33	25.27–25.31
LOQ <sup>b</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	74.31–74.33	122.24–122.33	120.36–120.37	119.15–119.18	76.60–76.70

<sup>a</sup> LOD: límite de detección

<sup>b</sup> LOQ: límite de cuantificación

### 1.4.2.4. Muestras ambientales de agua

Con el propósito de evaluar la aplicabilidad de la metodología desarrollada se realizó un estudio de recuperación en muestras ambientales de agua fortificadas con los analitos, las que no mostraron con anterioridad evidencia de residuos de 3TC, AZT, ABC, EFV y NVP. Las matrices de datos se procesaron siguiendo el procedimiento descrito para el conjunto de las muestras de validación. La selección del número de factores para las muestras reales contemplaron las interferencias presentes en el agua, por lo que se estimaron entre uno y dos componentes más que los utilizados para las muestras de validación (13 -14 componentes), según fuese el caso.

La Tabla 9 muestra las recuperaciones obtenidas para cada droga en diez matrices ambientales de aguas de ríos, pozo y agua potable pertenecientes a diferentes regiones de Argentina, mostrándose errores de predicción satisfactorios, menores, en todos los casos, al 10%.

A continuación, se evaluaron las regiones elípticas de confianza conjunta (Fig.17) para cada uno de los analitos en las distintas muestras de aguas. Como puede observarse, para todos los analitos el valor teórico esperado de pendiente igual a 1 y de ordenada al origen igual a cero se encuentra comprendido dentro de las elipses, confirmándose, por lo tanto, que no hay diferencias significativas entre las concentraciones nominales y predichas. Estos resultados demuestran que, inclusive ante la presencia de interferencias no calibradas presentes en matrices ambientales de agua, la habilidad de resolución y predicción de MCR-ALS es satisfactoria, evidenciándose la ventaja de segundo orden. Por lo tanto, el empleo del algoritmo quimiométrico MCR-ALS da lugar a una metodología apropiada para la cuantificación simultánea de estos antirretrovirales.

**Tabla 9.** Determinación de 3TC, AZT, ABC, EFV y NVP en muestras reales por FIA-DAD.

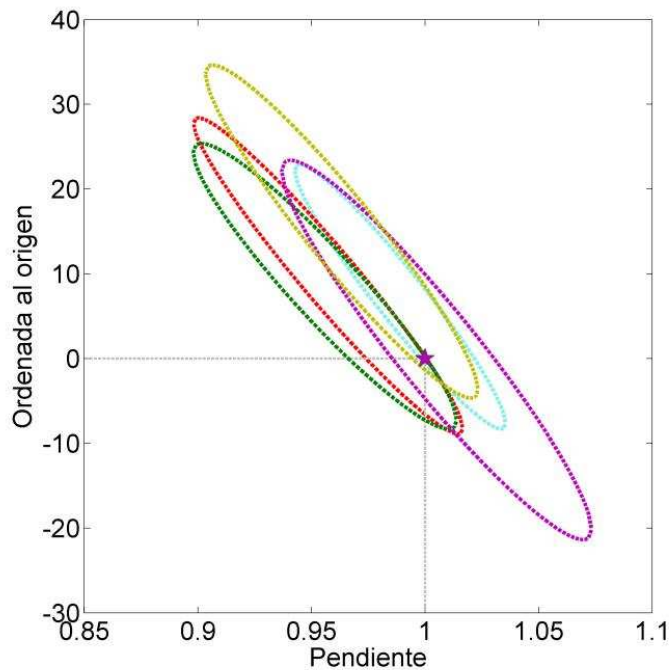
Muestras ambientales de agua	Concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )									
	3TC <sup>a</sup>		AZT <sup>a</sup>		ABC <sup>a</sup>		EFV <sup>a</sup>		NVP <sup>a</sup>	
	Nominal	Predicha	Nominal	Predicha	Nominal	Predicha	Nominal	Predicha	Nominal	Predicha
Agua de pozo <sup>b</sup>	150	172 (3) [115]	450	471 (9) [105]	250	274 (8) [109]	350	326 (8) [93]	150	142 (2) [95]
Agua potable <sup>c</sup>	450	453 (1) [101]	150	171 (6) [114]	350	314 (8) [90]	450	469 (7) [104]	250	284 (4) [114]
Agua de río <sup>d</sup>	450	445 (3) [99]	150	155 (4) [103]	350	343 (1) [98]	450	439 (6) [98]	250	278 (8) [111]
Agua de río <sup>e</sup>	300	282 (3) [94]	300	277 (2) [93]	300	296 (4) [99]	300	332 (1) [111]	300	285 (3) [95]
Agua de río <sup>f</sup>	250	247 (1) [99]	350	356 (4) [102]	150	137 (2) [92]	250	230 (6) [92]	450	457 (6) [102]
Agua de río <sup>g</sup>	350	313 (9) [89]	250	283 (7) [113]	450	473 (4) [105]	150	158 (4) [105]	350	349 (6) [100]
Agua de río <sup>h</sup>	300	289 (6) [96]	300	290 (1) [97]	300	289 (2) [97]	300	304 (6) [101]	300	307 (1) [102]
Agua de río <sup>i</sup>	250	244 (7) [98]	350	345 (1) [99]	150	171 (4) [114]	250	245 (1) [98]	450	383 (6) [85]
Agua de río <sup>j</sup>	450	449 (4) [100]	150	145 (6) [96]	350	364 (8) [104]	450	448 (7) [99]	250	228 (2) [91]
Agua de río <sup>k</sup>	350	331 (2) [95]	250	219 (5) [88]	450	461 (8) [103]	150	162 (1) [108]	350	307 (4) [88]
REP % <sup>l</sup>	5.1		7.3		6.1		5.5		9.8	

<sup>a</sup> Los valores se encuentran expresados como el promedio de las réplicas correspondientes. Las desviaciones estándares experimentales se muestran en la última cifra significativa entre paréntesis y las recuperaciones porcentuales entre corchetes

<sup>b</sup> Ciudad de Coronda (Santa Fe, Argentina); <sup>c</sup> Ciudad de Santa Fe (Santa Fe, Argentina); <sup>d</sup> Río Boca del Río (San Luis, Argentina);

<sup>e</sup> Río Santa Fe (Santa Fe, Argentina); <sup>f</sup> Río Cuculucito (Santa Fe, Argentina); <sup>g</sup> Río Gualeguay (Entre Ríos, Argentina); <sup>h</sup> Río Luján (Buenos Aires, Argentina); <sup>i</sup> Río San Javier (Santa Fe, Argentina); <sup>j</sup> Río Colastiné (Santa Fe, Argentina); <sup>k</sup> Río Salado (Santa Fe, Argentina)

<sup>l</sup> REP%: Error de predicción relativa,  $REP = 100 \frac{RMSE}{\bar{c}}$ , donde  $\bar{c}$  es la media de las concentraciones de calibración y  $RMSE = \sqrt{\frac{1}{I} \sum_1^I (c_{nom} - c_{pred})^2}$  para  $I=20$



**Figura 17.** Región elíptica de confianza conjunta para un 95% de confianza. La estrella marca el punto teórico ordenada al origen igual a 0, pendiente igual a 1. Las elipses representan los analitos 3TC (celestes), AZT (verde), ABC (amarillo), EFV (violeta) y NVP (rojo).

## 1.5. Conclusiones

En esta parte inicial de la tesis se realizó la caracterización ácido-base de seis drogas ARVs mediante titulación espectrofotométrica y posterior análisis por MCR-ALS. Los valores de constantes de disociación obtenidos se utilizaron para el posterior desarrollo de una metodología de cuantificación simultánea de estos ARVs en muestras ambientales de agua.

Las matrices de datos generadas a partir de las variaciones espectrales para cada valor de pH se utilizaron para determinar el  $pK_a$  de estas drogas empleando el algoritmo quimiométrico MCR-ALS. A partir de esta metodología se obtuvieron valores de  $pK_a$  similares a los informados en la literatura. No obstante, se encontró un segundo valor de  $pK_a$  para NVP que no había sido informado con anterioridad, el cual se corroboró a partir de la tradicional ecuación de Hendersson-Hasselbalch. En este sentido, MCR-ALS demostró ser una herramienta muy útil tanto en la determinación de las constantes de disociación, como en la descripción cualitativa

del equilibrio ácido-base a partir de los perfiles espectrales de las especies involucradas en el equilibrio y la correspondiente distribución de las especies ionizadas y no-ionizadas.

Adicionalmente, se sugirieron los posibles sitios de ionización involucrados en las reacciones de protonación/desprotonación de cada una de las drogas, destacándose que el análisis de estos sitios de ionización permitió sugerir para el caso de NVP la relación entre el segundo valor de  $pK_a$  obtenido y asociarlo con los sitios disponibles de desprotonación en la molécula.

Por otro lado, teniendo en cuenta la importancia de determinar la ocurrencia de contaminantes emergentes, tales como los ARVs en muestras ambientales de agua, empleando metodologías de análisis sencillas, sensibles y de fácil adquisición de datos, se desarrolló una metodología para la cuantificación simultánea de cinco antirretrovirales basada en el modelado de datos obtenidos por FIA-DAD mediante MCR-ALS. Es importante remarcar que MCR-ALS demostró su excelente habilidad tanto en la resolución como en la cuantificación de los analitos de interés presentes en muestras complejas. La implementación de este algoritmo permitió discriminar selectivamente los analitos de interés de las interferencias presentes en las muestras ambientales de agua con elevado solapamiento espectral, evidenciándose, por lo tanto, la ventaja de segundo orden. En términos generales, esta metodología mostró ser simple, rápida y capaz de predecir de manera exacta y precisa la concentración de estas drogas en matrices complejas con límites de detección y cuantificación en el orden de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sin recurrir a pasos previos de extracción o preconcentración, por lo que podría ser empleada como una alternativa para el monitoreo de estos contaminantes emergentes en muestras ambientales de agua.

## ***CAPÍTULO 2***

*Determinación de abacavir en muestras ambientales de agua a partir de datos cinéticos-espectroscópicos de tercer orden*

## 2.1. Introducción

El ABC, un análogo de la guanosina que pertenece a la familia de los NRTIs, es una de las drogas principales usadas en la terapia HAART. Este analito se ha determinado principalmente en dosis farmacéuticas y/o matrices biológicas, tales como plasma, fluido cerebroespinal, suero sanguíneo, orina o tejidos, mediante HPLC-DAD, LC-MS/MS y voltametría anódica [127-130]. En las últimas décadas también se lo ha cuantificado en muestras ambientales, debido a la preocupación global relacionada con sus potenciales efectos negativos en el ambiente y su impacto en la salud humana y ecológica. La metodología analítica más empleada en el análisis de este tipo de muestras es LC-MS/MS, ya que permite la determinación simultánea de múltiples componentes con alta sensibilidad. Cabe destacar que, si bien esta técnica proporciona resultados exactos y confiables, requiere de un equipamiento altamente sofisticado.

En las últimas décadas, la espectroscopia de fluorescencia molecular ha demostrado también sus potencialidades en el monitoreo de diversos compuestos fluorescentes en ecosistemas acuáticos, debido a que brinda una serie de ventajas tales como sensibilidad, rapidez, bajos costos, bajo consumo de reactivos, así como una preparación de la muestra relativamente sencilla. [131]. Los métodos más comunes para el registro de datos en muestras ambientales de agua se basan en la obtención de matrices de excitación-emisión de fluorescencia (*EEFMs: Excitation-Emission Fluorescence Matrices*) y espectros de fluorescencia sincrónica (*SFS: Synchronous Fluorescence Spectra*).

En estudios preliminares, se investigaron las propiedades fluorescentes de todos los ARVs en estudio, observándose que el ABC presentaba fluorescencia nativa débil en soluciones acuosas y que la señal de fluorescencia aumentaba con el tiempo de irradiación, siendo un indicativo de la formación de un producto de fotólisis con elevada señal de fluorescencia. Por lo tanto, teniendo en cuenta los hallazgos anteriores, se focalizó en el desarrollo de un método que involucre el seguimiento de la cinética de la reacción mediante la generación de datos de orden superior; particularmente EEFMs obtenidas a distintos tiempos de irradiación.

Para el análisis de las EEFMs existen varios algoritmos de procesamiento de datos de tercer orden, tales como PARAFAC [132,133] y MCR-ALS [133,134], entre otros. Se encuentra ampliamente descrito que los métodos de análisis de datos multivariados son especialmente útiles en análisis cuantitativos de muestras complejas, ya que permiten la extracción de las señales específicas de cada analito en presencia de componentes no



esperados. De similar manera, se encuentra informado en la literatura que la introducción de una dimensión adicional a los datos de segundo orden permitiría una mejora en la habilidad predictiva de los modelos debido a la “ventaja de tercer orden” [45]. En principio, esta “ventaja de tercer orden” aporta beneficios adicionales a la “ventaja de segundo orden”, que plantea que los analitos de interés pueden cuantificarse incluso en presencia de posibles interferencias no incluidas en el conjunto de calibración. Entre las ventajas adicionales se pueden mencionar mejoras en la resolución de datos colineales, y aumento en la sensibilidad y la selectividad [45].

Por ende, en virtud del aumento de la señal de fluorescencia inducido por irradiación UV, se propone la determinación de ABC en matrices ambientales de agua a partir de un método cinético de fluorescencia basado en la generación de datos de tercer orden y modelado con MCR-ALS y PARAFAC.

## 2.2. Objetivos

- Optimizar las condiciones experimentales de la reacción de fotólisis de manera de obtener una señal de fluorescencia óptima.
- Obtener datos de tercer orden mediante la adquisición de EEFMs generadas a partir de la evolución temporal de la reacción.
- Generar datos de segundo orden mediante la adquisición de EEFMs una vez finalizada la reacción y comparar el desempeño de PARAFAC y MCR-ALS con las resoluciones obtenidas a través del modelado de los datos de tercer orden en muestras de validación.
- Evaluar la metodología propuesta en el análisis de muestras ambientales de agua.

## 2.3. Materiales y métodos

### 2.3.1. Reactivos y soluciones

El acetato de sodio (NaAc), el ácido acético (HAc) y el MeOH grado HPLC se adquirieron de Biopack (Buenos Aires, Argentina) y Cicarelli (Rosario, Argentina), respectivamente. El hexano p.a que se utilizó fue provisto por Carlo Erba (Val-de-Reuil, Francia). El agua ultrapura se obtuvo de un sistema Millipore (Bedford, Estados Unidos).

La preparación y el almacenamiento de la solución madre de ABC se preparó como se describe en el Capítulo 1 inciso 1.3.1. La solución de trabajo se preparó por dilución adecuada de la solución madre en agua ultrapura para alcanzar una concentración final de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Las muestras ambientales de agua se obtuvieron de diferentes regiones de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos de Argentina, y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

### 2.3.2. Instrumentación

Todas las mediciones se realizaron empleando un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) provisto de una lámpara de *flash* de xenón. La fuente de radiación UV utilizada fue la propia lámpara de xenón, la cual se operó a una longitud de onda de excitación constante ( $\lambda_{\text{exc}}=222\text{nm}$ ) durante cada ciclo de irradiación de la muestra. Las mediciones se realizaron empleando cubetas de cuarzo con un paso de luz de  $1 \text{ cm} \times 10 \text{ mm}$ , y se registraron las EEFMs en un rango de longitudes de onda de excitación de 210 a 270 nm y de emisión de 300 a 430 nm, cada 2 nm para ambos casos, y empleándose una velocidad de barrido de  $9600 \text{ nm min}^{-1}$ . El voltaje del fotomultiplicador utilizado fue de 1000V y las ranuras de excitación y emisión fueron de 5 y 20 nm, respectivamente.

La caracterización UV-Vis del producto de fotólisis se realizó por análisis cromatográfico en un sistema Agilent 1260 Infinity Ultra HPLC (UHPLC) (Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba binaria, membrana desgasificadora, inyector automático, compartimento de horno para columna, detector de arreglo de diodos UV-Vis y de fluorescencia, y el software OpenLab CDS Chemstation (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) para controlar el instrumento y realizar la adquisición de los datos y su posterior análisis.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 Zorbax Eclipse XDB de 75 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 3.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Agilent, Waldbronn, Alemania). La temperatura de columna que se fijó en 35°C y la velocidad de flujo en 0.8 mL  $\text{min}^{-1}$ . Las fases móviles A y B consistieron en agua ultrapura y MeOH, respectivamente. El gradiente de UHPLC empleado se describe en la Tabla 10. Se inyectó un volumen de muestra de 100  $\mu\text{L}$ . El tiempo total de análisis fue de 6 min, con 2 min para el lavado de la columna y re-establecimiento de las condiciones iniciales. Los datos de absorción se registraron en el rango espectral de 200 a 400 nm con incrementos de 1 nm durante el período de tiempo de elución de 0.0 a 6.0 min. Para la detección por fluorescencia se utilizó una longitud de onda de excitación de 222nm y se registraron las longitudes de onda de emisión en un rango de 300 a 550 nm cada 10nm empleando una ganancia del fotomultiplicador de 18.

**Tabla 10.** Gradiente de elución utilizado en la corrida cromatográfica.

Tiempo (min)	% A (Agua ultrapura)	% B (MeOH)
0.0–1.0	70	30
1.0–3.0	10	90
3.0–6.0	10	90

### 2.3.3. Optimización mediante diseño de experimentos

Con el objetivo de seleccionar los factores influyentes en la exaltación de la señal de fluorescencia se realizó un diseño factorial fraccionado (FFD), (Tabla 11) considerándose tres factores y dos niveles por cada factor: (a) molaridad de la solución reguladora HAc/NaAc (5 y 15  $\text{mmol L}^{-1}$ ), (b) pH de la solución reguladora HAc/NaAc (pH=4 y pH=5), (c) tiempo de irradiación (5 y 10 min). La respuesta seleccionada fue la intensidad de fluorescencia a  $\lambda_{em} = 370 \text{ nm}$  ( $\lambda_{exc} = 222 \text{ nm}$ ).

Las combinaciones sugeridas por el diseño de experimentos se prepararon a partir de la transferencia de alícuotas adecuadas de la solución de trabajo de ABC a matraces de 5.0 mL. Posteriormente, se adicionaron cantidades apropiadas de la solución reguladora de HAc/NaAc 0.1  $\text{mol L}^{-1}$  de pH=4 o pH=5, según correspondiera.

**Tabla 11.** Diseño factorial fraccional  $2^k$

Corrida	Factor 1 A: Molaridad de HAc/NaAc ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Factor 2 B: pH	Factor 3 C: Tiempo de irradiación (min)
1	15	4.0	5.0
2	5	4.0	5.0
3	5	4.0	10.0
4	5	5.0	10.0
5	5	5.0	5.0
6	15	4.0	10.0
7	15	5.0	10.0
8	15	5.0	5.0

Los factores influyentes se determinaron a partir del análisis de los diagramas de Pareto, y el análisis de los efectos de las variables en la respuesta permitió concluir que los factores pH de la solución reguladora HAc/NaAc y tiempo de irradiación mostraron una influencia significativa en la exaltación de la señal de fluorescencia. Una vez determinados estos factores, se realizó un diseño central compuesto (CCD) con tres puntos centrales y un valor de  $\alpha$  de 1.41 (compatible con la distribución rotatoria de la varianza de predicción), incluyendo réplicas, con el propósito de encontrar los valores óptimos de pH y tiempo de irradiación. Los niveles evaluados para cada factor se muestran en la Tabla 12 junto con las diferentes combinaciones de ambos factores que generan las diferentes corridas.

**Tabla 12.** Diseño central compuesto para optimización de condiciones experimentales.

Corridas	Factor 1 A: pH	Factor 2 B: Tiempo de irradiación (min)
1	6.2	12.0
2	5.0	14.0
3	4.8	12.0
4	5.0	14.0
5	5.5	9.2
6	6.0	14.0
7	5.0	10.0
8	5.0	10.0
9	5.5	9.2
10	6.0	14.0
11	5.5	12.0
12	6.0	10.0
13	5.5	12.0
14	6.0	10.0
15	5.5	14.8
16	5.5	14.8
17	6.2	12.0
18	4.8	12.0
19	5.5	12.0

### 2.3.4. Procedimiento experimental

#### 2.3.4.1. Muestras de calibración y validación

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas, se procedió a preparar un conjunto de calibración compuesto de cinco soluciones patrones de ABC, por triplicado, transfiriendo alícuotas adecuadas de la solución de trabajo de ABC a matraces de 5.0 mL. Posteriormente, se adicionaron 500.0  $\mu\text{L}$  de solución reguladora HAc/NaAc ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=5.9$ ) a matraces de 5.0 mL y se enrasó con agua ultrapura. Las concentraciones finales de las muestras de calibración se encontraron en el rango de 5.0 a  $50.0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Se evaluaron tres muestras de validación que consistieron en mezclas de ABC (concentraciones diferentes a las utilizadas en la curva de calibración) con interferencias potenciales como fenilefrina (FEN), ofloxacina (OFL) y piridoxina (PYR) por triplicado y siguiendo un diseño aleatorio (Tabla 13).

**Tabla 13.** Composición de las muestras de validación conteniendo ABC y las interferencias seleccionadas.

Muestras de validación <sup>a</sup>	Concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	ABC	FEN	OFL	PYR
1	20	60	30	10
2	33	80	20	20
3	45	100	10	30

<sup>a</sup> preparación por triplicado

#### 2.3.4.2. Muestras reales

Las muestras reales obtenidas de agua de ríos, pozo y red se evaluaron luego de ser fortificadas con ABC en los mismos tres niveles de concentración evaluados en las muestras de validación. Primeramente, se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min y se filtraron a través de membranas de nylon de  $0.2 \mu\text{m}$  con el objetivo de eliminar sedimentos y material particulado. Posteriormente, las muestras reales se prepararon transfiriendo alícuotas apropiadas de la solución de trabajo de ABC,  $20.0 \mu\text{L}$  de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de la solución reguladora HAc/NaAc ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=5.9$ ) y completando a  $200.0 \mu\text{L}$  de volumen final con agua de río, pozo o red, según correspondiera. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

En una primera instancia se detectó la presencia de una señal de fluorescencia muy elevada perteneciente a los interferentes de las matrices de agua, por lo que se desarrolló un procedimiento de limpieza. La metodología de limpieza consistió en la adición de 500.0  $\mu\text{L}$  de hexano a las muestras reales fortificadas (200  $\mu\text{L}$ ). A continuación, esta mezcla se agitó por 3 min y luego se centrifugó a 8000 rpm por 2 min. Al finalizar, se eliminó la capa superior orgánica y se secó la fase acuosa con una corriente suave de nitrógeno durante 1 min para eliminar cualquier resto de hexano. Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras.

Adicionalmente, con el propósito de comprobar que la metodología de limpieza no afectara las recuperaciones de ABC, se evaluaron diferentes niveles de concentración (20, 33 y 45  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de una muestra ambiental de agua de río fortificada sometida al procedimiento de extracción líquido-líquido con hexano y del analito disuelto en agua ultrapura y posteriormente se realizó una comparación de las pendientes obtenidas a partir de la regresión de las señales.

#### *2.3.4.3. Generación de EEFMs*

Los datos de segundo orden se adquirieron a partir de las mediciones de las EEFMs para el tiempo final de irradiación UV seleccionado previamente (9.17 min), mientras que los datos de tercer orden se obtuvieron a partir de las mediciones de las EEFMs a diferentes tiempos de irradiación (cada 1 min durante 9.17 min) para cada muestra.

#### *2.3.5. Programas informáticos y algoritmos para el análisis de los datos.*

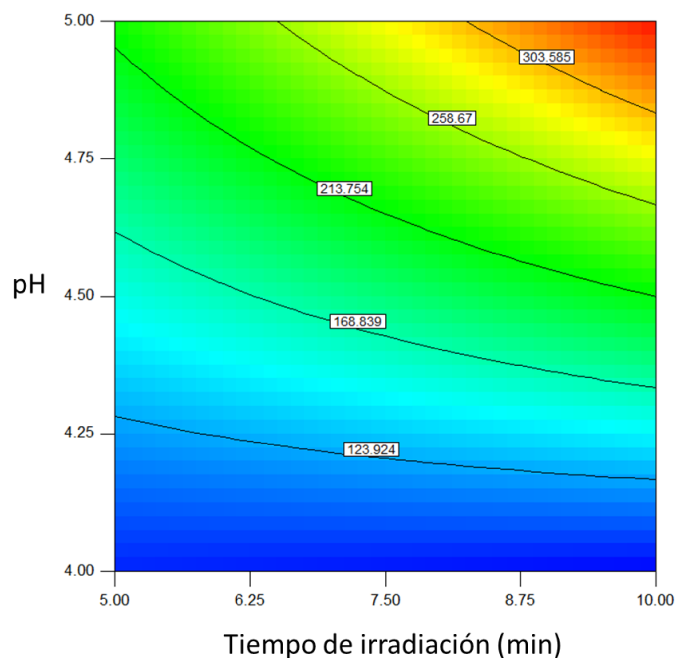
El software Cary Eclipse se utilizó para el control del instrumento y la adquisición de los datos. Los algoritmos MCR-ALS y PARAFAC se implementaron en MATLAB 7.10 [113], usando una interface para la entrada de los datos y ajuste de los parámetros escrita por Olivieri y col. [135], y descargada de [www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc3.rar](http://www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc3.rar)

## 2.4. Resultados y discusión

### 2.4.1. Optimización mediante diseño de experimentos

Inicialmente, se construyó un FFD para identificar los factores que afectaban la exaltación de la señal de fluorescencia del ABC. El diseño consistió en ocho experimentos correspondientes a la combinación de factores numéricos para molaridad de la solución reguladora HAc/NaAc, el pH de la solución reguladora HAc /NaAc y tiempo de irradiación (Tabla 11). La respuesta evaluada fue la intensidad de fluorescencia obtenida a la longitud de onda de emisión de 370 nm ( $\lambda_{exc} = 222$  nm).

Los efectos de los factores estudiados se analizaron utilizando el diagrama de Pareto. Se consideraron como significativos a los efectos que excedían el límite estadístico de Bonferroni, y como no significativos a los que se encontraban por debajo del límite del valor de  $t$ . En este sentido, el análisis del diagrama de Pareto reveló que los factores pH de la solución reguladora NaAc/HAc y tiempo de irradiación mostraron efectos significativos en el incremento de la señal de fluorescencia. Adicionalmente, al analizar la interacción de ambos factores, se observó un incremento significativo en la respuesta de fluorescencia al combinarse los niveles superiores de pH (5) y tiempo de irradiación (10 min) (Fig.18).

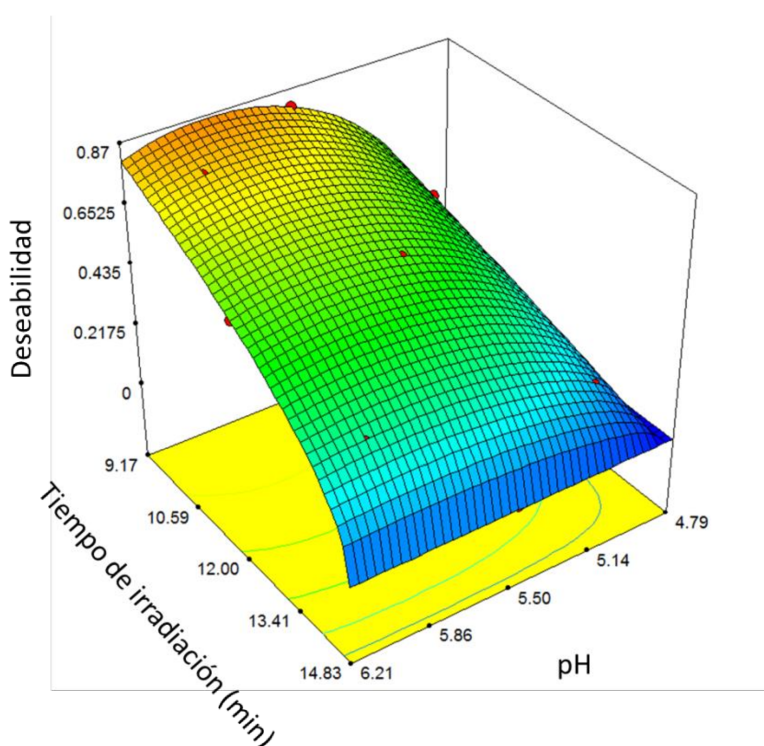


**Figura 18.** Contorno obtenido del diseño factorial fraccionado a partir de la interacción entre los factores pH y tiempo de irradiación.

Con el fin de establecer la mejor combinación de factores que asegurara la señal de fluorescencia óptima, se evaluó un diseño central compuesto fraccionado empleando rangos de pH entre 5.0 y 6.0 y de irradiación entre 10.0 – 14.0 min, tal como se detalla en la Tabla 12. La respuesta evaluada, al igual que en el diseño factorial, fue la intensidad de fluorescencia utilizando  $\lambda_{\text{emisión}} = 370 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 222 \text{ nm}$ ).

Posteriormente, los datos experimentales se ajustaron empleando un modelo cuadrático y usando regresión múltiple *backward*, y se validaron a partir de un ANOVA que mostró que el modelo era significativo ( $p = 0.0004$ ) y que la falta de ajuste no era significativa ( $p = 0.4038$ ) para un nivel de significación de  $\alpha = 0.05$ .

La respuesta se optimizó usando la función de deseabilidad de Derringer (Ec. 9). El criterio que se siguió para la optimización de la respuesta fue su maximización. Las condiciones experimentales correspondientes al valor máximo en la función de Deseabilidad ( $D = 0.861$ ) bajo los criterios de optimización utilizados fueron los siguientes: pH = 5.86 y tiempo de irradiación = 9.17 min (Fig. 19).

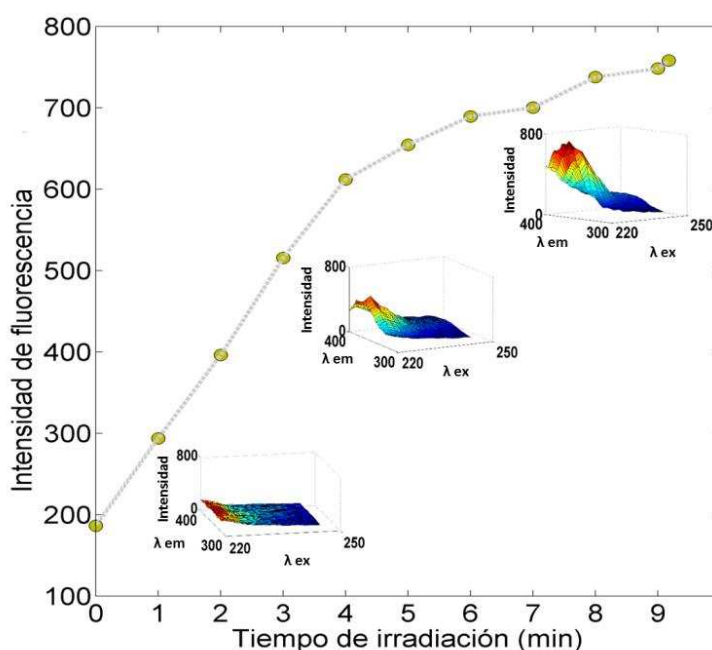


**Figura 19.** Superficie de respuesta del diseño central compuesto del método de fluorescencia en función del pH y del tiempo de irradiación.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas que permitieron incrementar la señal de fluorescencia del ABC, se sometieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de ABC de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$

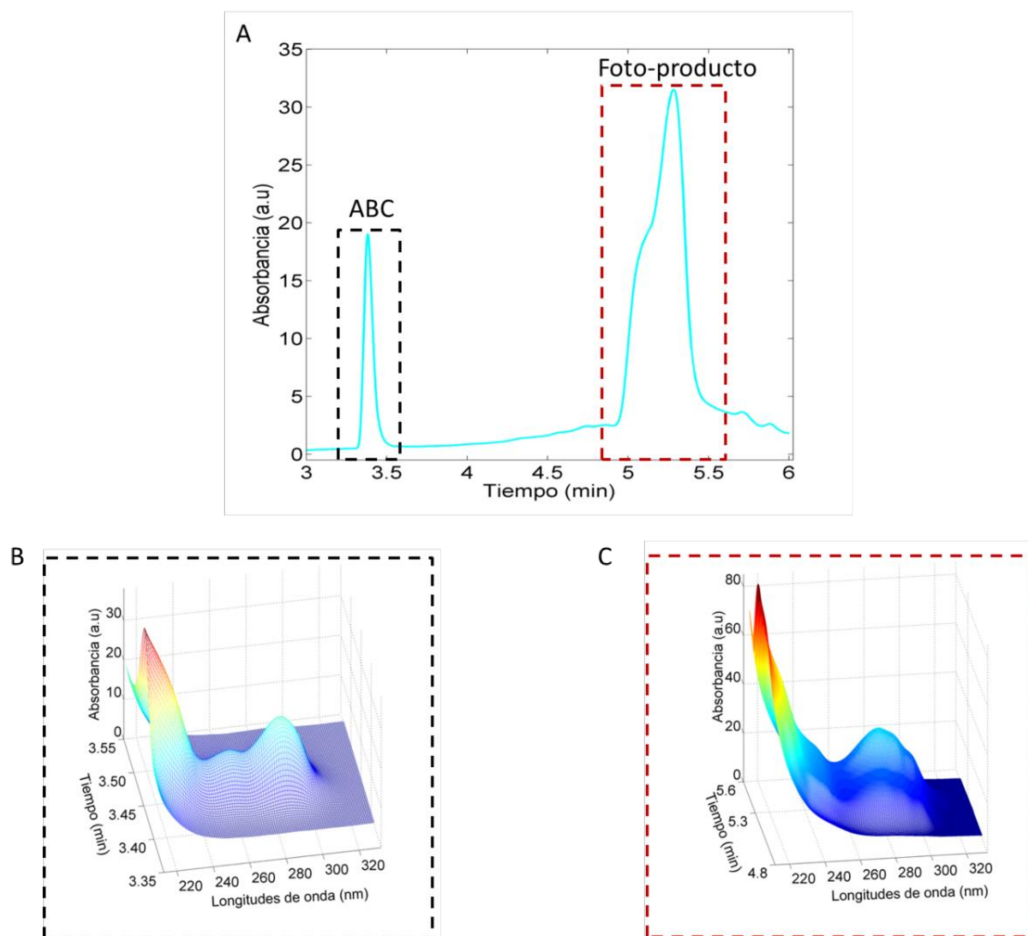


ajustada a pH = 5.9 con HAc/NaAc 0.01mol L<sup>-1</sup> a un ciclo de irradiación a temperatura ambiente. En la Fig. 20 se muestra la evolución de la intensidad de fluorescencia ( $\lambda_{exc}= 222$  nm,  $\lambda_{em}= 370$  nm), así como los cambios experimentados en cada EEFM a medida que avanzaba la reacción de fotólisis. Como puede observarse, la señal de fluorescencia se va incrementando significativamente a medida que transcurre la reacción. De manera similar, puede constatarse que alrededor de los 8 min de irradiación se alcanzó una zona de meseta, garantizándose un nivel de intensidad de fluorescencia máximo y estable, que asegura la reproducibilidad de los resultados.



**Figura 20.** Evolución de la intensidad de fluorescencia de ABC ( $\lambda_{exc}= 222$  nm,  $\lambda_{em}= 370$  nm) en función del tiempo de irradiación.

Adicionalmente, se realizó una caracterización UV-Vis del producto de fotólisis obtenido a partir de irradiación UV, observándose la formación de un foto-producto (Fig. 21 A) con tiempo de retención de 5.2 min, con espectro UV diferente al de la molécula de ABC original (Figs. 21 B y C), y con elevada señal de fluorescencia, sugiriéndose, por lo tanto, que este foto-producto es el responsable de la señal de fluorescencia observada.



**Figura 21.** (A) Perfil cromatográfico monitoreado mediante detección UV-Vis (285 nm) obtenido para  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ABC irradiado a 222 nm durante 9.17 min. Perfiles espectrales UV-Vis obtenidos para (B) ABC y (C) foto-producto obtenido de la reacción de fotólisis.

### 2.4.2. Muestras de validación

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de este trabajo es demostrar que el incremento del número de modos produce una mejora en la habilidad predictiva del método, obteniéndose incrementos en la precisión y la sensibilidad como resultado de la ganancia en selectividad y del uso de un gran número de sensores respectivamente, se procedió a realizar una comparación entre los datos de segundo orden y tercer orden adquiridos y empleando, a su vez, dos algoritmos quimiométricos diferentes.

Por lo tanto, el análisis de muestras de validación se realizó por MCR-ALS y PARAFAC con el propósito de evaluar la habilidad predictiva de ambos modelos a partir de la discriminación entre el analito de interés, ABC, y potenciales interferencias no calibradas presentes en la muestra.

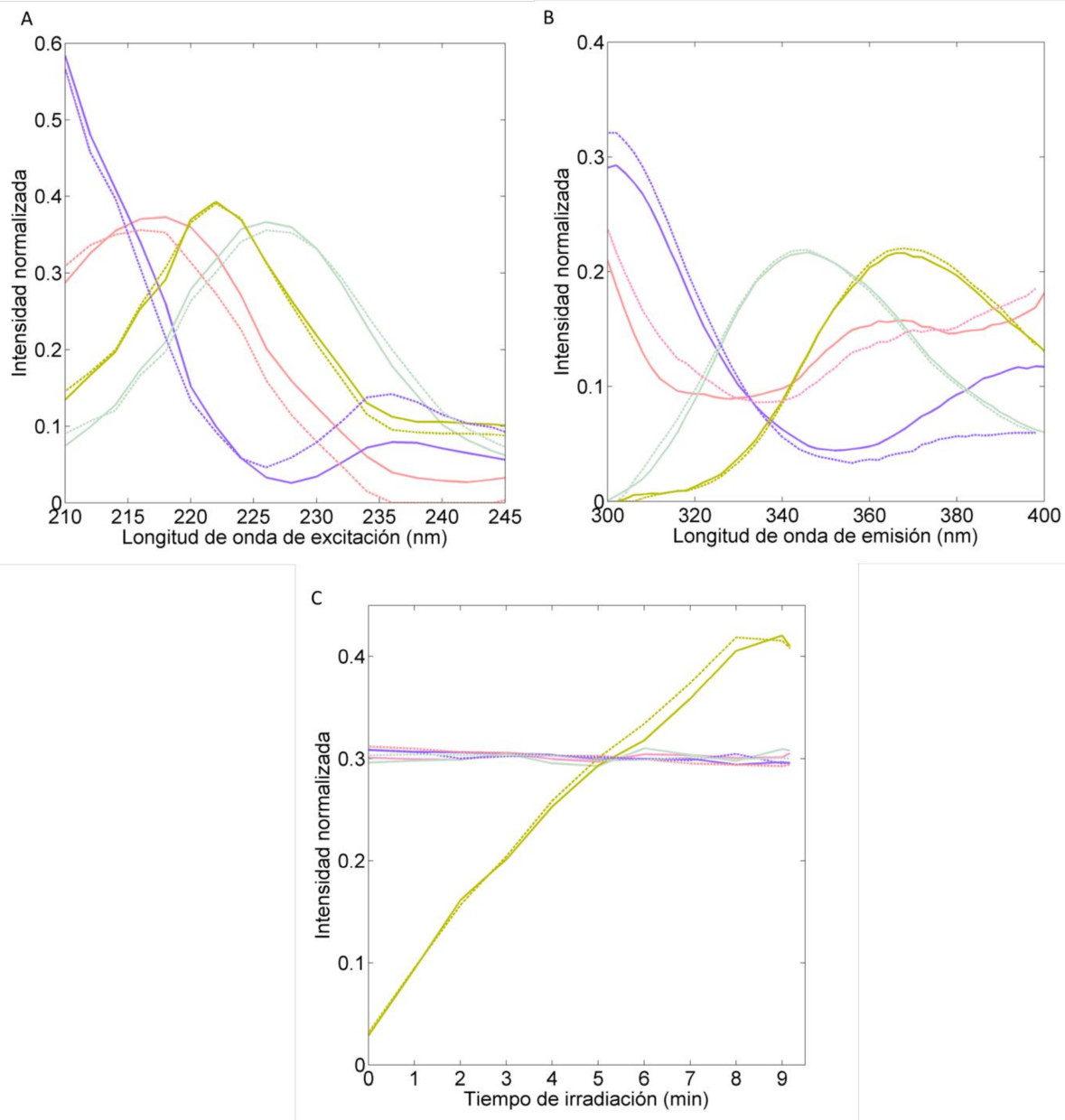
### 2.4.2.1. Análisis de los datos por PARAFAC

Para el modelado con PARAFAC los datos se arreglaron de dos formas: a) para segundo orden se usaron las EEFMs correspondientes al último tiempo de irradiación (9.17 min) de las cinco muestras de calibración de ABC (por triplicado) y la muestra de validación, generándose un arreglo de tres vías. La matriz generada resultó de dimensión  $16 \times 31 \times 66$ , correspondiendo cada número a la suma de las muestras de calibración y validación, las longitudes de onda de excitación y las longitudes de onda de emisión, respectivamente; b) para tercer orden se usaron las once EEFMs registradas a los 11 tiempos (a tiempo inicial ( $t_0$ ), cada 1 min, y al tiempo final ( $t_f$ )) para las 15 muestras de calibración y la muestra de validación, generándose un arreglo de cuatro vías ( $16 \times 31 \times 66 \times 11$ ). Para ambas calibraciones, de segundo y tercer orden, el primer paso del modelado por PARAFAC consistió en el establecimiento del número correcto de componentes presentes en la muestra. Este número se seleccionó aplicando el llamado análisis de consistencia central (*CORCONDIA: Core Consistency Diagnostic*) [136], resultando en cuatro componentes, correspondiendo uno de ellos al foto-producto de ABC y los otros tres a las interferencias. Posteriormente, se aplicó la restricción de no-negatividad en todos los modos.

La Fig. 22 (A-C) muestra los perfiles de excitación, emisión y cinéticos obtenidos al modelar los datos de tercer orden por PARAFAC, superpuestos con los perfiles de los estándares puros resueltos por PARAFAC.

Como puede apreciarse en la Fig. 22 A y B, los perfiles de excitación y emisión recuperados por PARAFAC para las muestras de validación son muy similares a los espectros de los estándares puros.

Por otro lado, la Fig. 22 C muestra los perfiles de tiempo extraídos por PARAFAC, haciéndose evidente la evolución de la señal correspondiente al analito (producto de la reacción de fotólisis del ABC), mientras que las potenciales interferencias permanecieron constantes. Teniendo en cuenta esta última observación, es de esperar que la adición de un modo adicional (evolución del tiempo) proporcione un incremento en la selectividad. Es importante mencionar, que los perfiles espectrales obtenidos del análisis de los datos de segundo orden resultaron similares a los de tercer orden.



**Figura 22.** Perfiles de (A) excitación, (B) emisión y (C) cinéticos obtenidos por PARAFAC para arreglos de cuatro vías formados por muestras de validación y estándares puros. Resolución por PARAFAC / estándar puro: ABC (líneas amarillas punteadas / sólidas), OFL (líneas celeste punteadas / sólidas), FEN (líneas rosadas punteadas/ sólidas), PYR (líneas violetas punteadas / sólidas)

#### *2.4.2.2. Análisis de datos por MCR-ALS*

MCR-ALS es un modelo ampliamente extendido y versátil, que permite, al igual que PARAFAC, el modelado de datos de tercer orden. Para su implementación, los datos se organizaron en arreglos de tres y cuatro vías. Para el caso de los datos de segundo orden, el arreglo se realizó de manera similar al empleado en PARAFAC. Sin embargo, para datos de tercer orden, primeramente se desdoblaron los datos originales de tercer orden en matrices, luego se reordenaron conformando una matriz bilineal super-aumentada. Posteriormente, para el procesamiento de los datos por MCR-ALS se construyó una matriz super-aumentada con cada muestra de validación y las muestras de calibración. Se estimaron cuatro componentes correspondientes al analito y las tres interferencias por análisis de componentes principales. Los perfiles iniciales empleados para comenzar el modelado por MCR-ALS se obtuvieron a partir de la estimación de las variables más puras (SIMPLISMA) [53], en el dominio concatenado de excitación-tiempo. Se aplicaron restricciones de no-negatividad en ambos modos (aumentado y no-aumentado) y correspondencia entre los componentes en las muestras. Una vez que se logró la convergencia de la optimización de ALS, se identificó el ABC de acuerdo a su perfil de excitación, y su cuantificación se llevó a cabo a través de una curva de calibración pseudo-univariada.

Los perfiles de excitación, emisión y cinéticos obtenidos por MCR-ALS fueron muy similares a los obtenidos por PARAFAC, observándose una alta concordancia con los espectros de los estándares puros, lo que demuestra su capacidad de discriminar entre el analito de interés y las potenciales interferencias.

En la Tabla 14 se muestran los resultados de las concentraciones predichas y los valores de recuperación obtenidos para ABC en las muestras de validación, mediante PARAFAC y MCR-ALS, empleando datos de segundo y tercer orden. Como puede observarse, los resultados obtenidos permitieron concluir que las predicciones de ABC en muestras conteniendo compuestos desconocidos fueron satisfactorias en las condiciones estudiadas y con errores de predicción relativa menores al 10% en todos los casos.

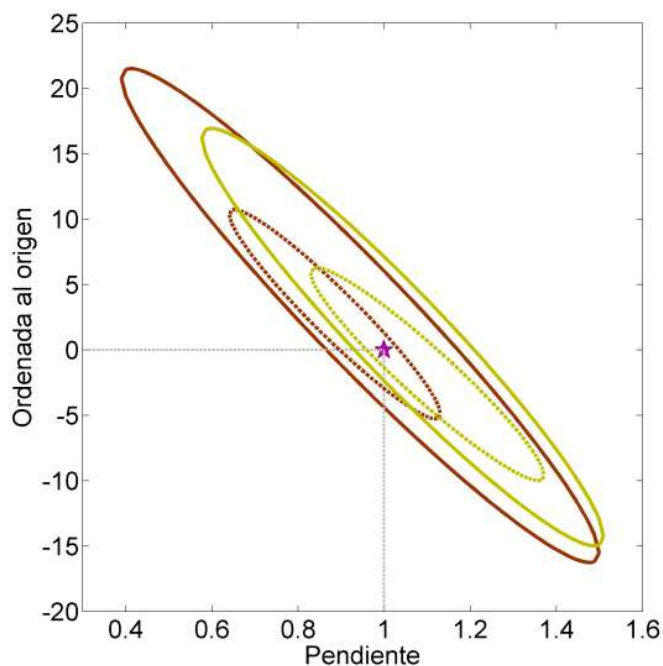
**Tabla 14.** Concentraciones predichas de ABC en muestras de validación.

Nominal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentraciones predichas ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>			
	Calibración de segundo orden		Calibración de tercer orden	
	MCR-ALS	PARAFAC	MCR-ALS	PARAFAC
20	21.6 (0.9) [108]	21.3 (0.7) [107]	21 (2) [103]	20 (2) [102]
33	31 (3) [95]	32 (1) [98]	32 (2) [96]	34 (1) [104]
45	45 (4) [100]	46 (2) [102]	43 (1) [95]	43 (2) [96]
REP % <sup>b</sup>	9.1	7.5	5.9	5.8

<sup>a</sup> Los valores se encuentran expresados como el promedio de las réplicas correspondientes. Las desviaciones estándares experimentales se muestran en la última cifra significativa entre paréntesis y las recuperaciones porcentuales entre corchetes

<sup>b</sup> REP%: Error de predicción relativa,  $REP = 100 \frac{RMSE}{\bar{c}}$ , donde  $\bar{c}$  es la media de las concentraciones de calibración y  $RMSE = \sqrt{\frac{1}{I} \sum_1^I (c_{nom} - c_{pred})^2}$  para  $I=9$ .

Con el propósito de comparar ambos algoritmos quimiométricos, se realizó una prueba de precisión y exactitud evaluando las regiones elípticas de confianza conjunta. En la Fig. 23 puede apreciarse que las concentraciones predichas obtenidas por calibración de segundo y tercer orden usando PARAFAC y MCR-ALS contienen los valores teóricos de pendiente igual a 1 y ordenada al origen igual a 0, asegurándose, por lo tanto, la exactitud del método. Es importante señalar, que las elipses correspondientes a la calibración de segundo orden por PARAFAC y MCR-ALS son más grandes que las obtenidas para los datos de tercer orden, lo que podría sugerir una menor precisión, mientras que las elipses pertenecientes al arreglo de datos de cuatro vías presentan tamaños semejantes, lo que indica una precisión análoga entre ambos algoritmos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que ambos modelos son adecuados para ser empleados en el análisis cuantitativo de muestras reales, que pueden contener interferencias adicionales.



**Figura 23.** Región elíptica de confianza conjunta para un 95% de nivel de confianza para calibración de segundo/tercer orden usando PARAFAC (líneas amarillas sólidas/ punteadas) y MCR-ALS (líneas marrones sólidas /punteadas). La estrella marca el punto teórico ordenada al origen = 0, pendiente = 1.

### 2.4.2.3. Cifras de mérito analíticas

En la Tabla 15 se resumen las cifras de mérito analíticas calculadas de acuerdo a Bauza y col. [59] para los datos de segundo y tercer orden correspondientes a las muestras de validación analizadas empleando ambos algoritmos. Todas las cifras de mérito revelaron mejoras en la calibración de tercer orden con respecto a segundo orden, y, a su vez, ambos algoritmos quimiométricos proveyeron resultados similares. Cabe destacar que, aunque la sensibilidad aumentó en la calibración de tercer orden en comparación con la calibración de segundo orden, esto no se vio reflejado en menores límites de detección. El límite de detección es inversamente proporcional a la sensibilidad; es decir, los límites de detección disminuyen a medida que la sensibilidad aumenta, sin embargo tiende a nivelarse en algún punto para sensibilidades más altas debido a la contribución de un término independiente de la sensibilidad en el cálculo del LOD [137].

**Tabla 15.** Cifras de mérito analíticas obtenidas para las muestras de validación.

Cifras de mérito	Calibración de segundo orden		Calibración de tercer orden	
	MCR-ALS	PARAFAC	MCR-ALS	PARAFAC
Sensibilidad (AU $\mu\text{g}^{-1}$ L)	62–70	77–84	170–180	190–200
Sensibilidad analítica ( $\mu\text{g}^{-1}$ L)	3.4–3.6	4.5–5.2	5.1–7.7	9.3–9.9
LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	6–7	5–6	4–5	3–4
LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	18–20	18–19	13–14	11–12

En vista a los resultados obtenidos se puede concluir que la introducción de una dimensión adicional (datos de tercer orden) no genera diferencias significativas, en términos de habilidad predictiva de los algoritmos empleados, con respecto al análisis de los datos de segundo orden. Sin embargo, las concentraciones predichas por PARAFAC y MCR-ALS para datos de tercer-orden mostraron una mayor precisión de los resultados, lo que es consistente con las mejoras observadas en las cifras de mérito.

### 2.4.3. Muestras reales

Teniendo en cuenta la preocupación global de la determinación de drogas ARVs en matrices ambientales de agua debido a su potencial impacto negativo en el ambiente, se procedió a evaluar la aplicabilidad de esta metodología de cuantificación en muestras reales de agua de red, pozo, lagunas y ríos fortificadas previamente con ABC. Debido a la complejidad de este tipo de matrices y a la sensibilidad de la técnica utilizada, durante estudios preliminares se detectó la presencia de interferencias con elevada señal de fluorescencia, que saturaban la señal de fluorescencia permitida por el instrumento.

Por lo tanto, se implementó un simple procedimiento de limpieza utilizando hexano para eliminar algunos de los compuestos orgánicos de las muestras reales (Sección 2.3.4.2).

Con el objetivo de evaluar la presencia de efecto matriz para el ABC en las muestras reales, se realizó un análisis de las pendientes obtenidas de la regresión de las señales para el analito presente en una de las muestras ambientales (agua de río) luego de la limpieza con hexano y en agua ultrapura, mediante una prueba *t de Student*, asumiendo una prueba de hipótesis:  $H_0$ : pendiente = 1 y  $H_1$ : pendiente  $\neq$  1. Los valores de  $t_{exp}$  se calcularon a partir de la Ec. 13:



$$t_{exp} = \frac{|1-Pendiente|\sqrt{n}}{S_R} \quad (13)$$

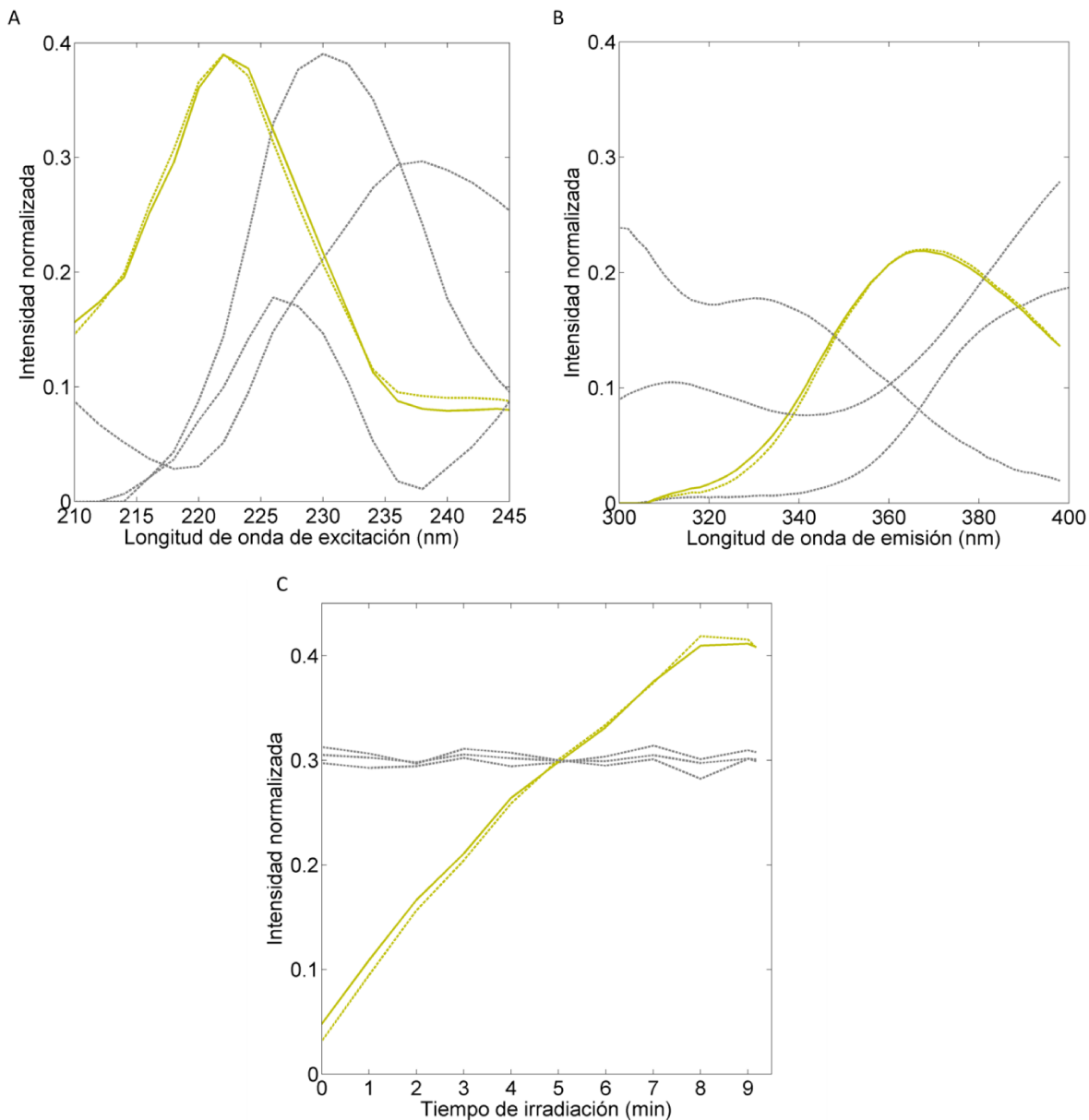
donde  $n$  es el número de muestras ( $n=9$ ) y  $S_R$  es la desviación estándar de las pendientes.

Las pendientes se consideran estadísticamente diferentes de 1 cuando el valor de  $t_{exp}$  excede el valor de  $t_{teórico}(\alpha, u)$  para un determinado nivel  $\alpha$ ,  $u=n-1$  grados de libertad y  $n$  muestras [138]. Por lo tanto, siendo que, para un 95 % de confianza, el valor de  $t_{exp}$  (0.07) fue menor que el valor  $t_{teórico}(0.025, 8)$  (2.31),  $H_0$  es aceptada, lo que demuestra ausencia de efecto matriz.

Estos resultados corroboran que el hexano puede ser empleado como un sencillo procedimiento de limpieza para interferentes altamente apolares presentes en las muestras ambientales de agua. Desde el punto de vista analítico, esto constituye una ventaja destacable pues evita un pretratamiento trabajoso de la muestra.

La determinación de ABC en muestras reales se realizó de manera similar a las muestras de validación, aplicándose los algoritmos quimiométricos PARAFAC y MCR-ALS y empleando datos de segundo y tercer orden. El número de componentes totales requeridos por ambas metodologías varió entre cuatro y seis, en dependencia de la cantidad de interferentes presentes en cada muestra. Se aplicaron las mismas restricciones descritas para las muestras de validación. La Fig. 24 muestra los perfiles obtenidos del análisis de datos de tercer orden en los modos excitación, emisión y temporal para una de las muestras reales (agua de Laguna Setúbal), observándose cuatro espectros diferentes en los perfiles de excitación y emisión, uno de ellos pertenecientes al ABC y los restantes a las interferencias presentes en esta matriz.

Adicionalmente, se observó un solapamiento entre las interferencias no calibradas con respecto al analito de interés, particularmente en el perfil de excitación, mostrándose la complejidad de la matriz analizada incluso con los pasos previos de limpieza. Sin embargo, en el modo cinético solamente aumentó la intensidad de fluorescencia para ABC, evidenciándose una vez más la mejora en la selectividad al introducir una dimensión adicional.



**Figura 24.** Perfiles de (A) excitación, (B) emisión y (C) cinéticos obtenidos por PARAFAC para arreglos de cuatro vías en muestra real de agua de Laguna Setúbal y estándares puros. Resolución por PARAFAC / estándar puro: ABC (líneas amarillas punteadas/ sólidas), interferencias (líneas punteadas grises).

Las concentraciones predichas usando arreglos de tres y cuatro vías por PARAFAC y MCR-ALS se muestran en la Tabla 16. Se pueden apreciar altos porcentajes de recuperación, entre 85 y 115%, para todos los casos y errores de predicción relativa entre 7.6 y 10.5%. Con el objetivo de demostrar que las recuperaciones obtenidas no eran significativamente diferentes del 100%, se aplicó un análisis estadístico asumiendo la

siguiente prueba de hipótesis:  $H_0: \bar{R}_{exp} = 100\%$  y  $H_1: \bar{R}_{exp} \neq 100\%$ . Los valores de  $t_{exp}$  se estimaron de acuerdo a la siguiente expresión:

$$t_{exp} = \left| 100 - \bar{R}_{exp} \right| \frac{\sqrt{n}}{s_R} \quad (14)$$

donde  $\bar{R}_{exp}$  es la recuperación experimental promedio y  $s_R$  es la desviación estándar de las recuperaciones. Las recuperaciones se consideran estadísticamente diferentes del 100% cuando el valor de  $t_{exp}$  excede el valor  $t_{teórico}(\alpha, u)$  para un nivel  $\alpha$ ,  $u = n-1$  grados de libertad y  $n$  muestras [138]. Como puede observarse en la Tabla 16, para todos los casos  $t_{exp}$  fue menor que  $t_{teórico}(0.025, 44)$  con un 95% de confianza, por lo que se aceptó  $H_0$ . Estos resultados, por lo tanto, refuerzan el buen desempeño de MCR-ALS y PARAFAC para discriminar el analito de interés en presencia de interferencias desconocidas. Cabe destacar que en las muestras reales sin fortificación previa de ABC no se detectó este analito al menos en los límites admitidos por esta metodología. No obstante, es importante señalar que recientemente Abafe y col. detectaron ABC en órdenes de  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $14 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en aguas residuales en Sudáfrica [21], lo que demuestra la factibilidad de aplicar la metodología desarrollada en la detección de este analito en ambientes altamente contaminados sin pasos previos de preconcentración.

**Tabla 16.** Concentraciones predichas de ABC en muestras ambientales de agua.

Muestras ambientales de agua	Nominal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentraciones predichas ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>			
		Calibración de segundo orden		Calibración de tercer orden	
		MCR-ALS	PARAFAC	MCR-ALS	PARAFAC
Agua de red <sup>b</sup>	0	ND	ND	ND	ND
	20	21 (1) [105]	19 (2) [96]	20.92 (0.01) [105]	21(3) [105]
	33	36.3 (0.8) [110]	37 (2) [111]	32.0 (0.2) [97]	31 (4) [95]
	45	40 (4) [89]	46 (3) [103]	45 (5) [100]	43 (2) [94]
Agua de laguna <sup>c</sup>	0	ND	ND	ND	ND
	20	21 (1) [105]	20 (1) [99]	21 (2) [105]	19 (2) [95]
	33	30.9 (0.6) [94]	36 (2) [109]	30 (2) [90]	32.4 (0.9) [98]
	45	47(3) [104]	44 (2) [97]	41 (1) [92]	41 (3) [92]
Agua de pozo <sup>d</sup>	0	ND	ND	ND	ND
	20	23 (1) [114]	21 (2) [105]	20 (3) [101]	23 (3) [114]
	33	31 (5) [93]	31 (1) [93]	35 (2) [107]	35.11 (0.03) [106]
	45	49 (6) [108]	43 (2) [95]	47 (1) [104]	49 (3) [109]
Agua de río <sup>e</sup>	0	ND	ND	ND	ND
	20	19.7 (0.7) [99]	21 (1) [105]	20 (3) [101]	21 (2) [105]
	33	29 (1) [87]	36 (3) [109]	31 (3) [92]	36 (2) [108]
	45	51 (3) [113]	47 (3) [105]	44 (2) [98]	43.9 (0.8) [98]
Agua de río <sup>f</sup>	0	ND	ND	ND	ND
	20	19.2 (0.6) [96]	21 (2) [107]	20 (4) [101]	2 (3) [98]
	33	28 (2) [86]	29.7 (0.7) [90]	32 (3) [98]	31 (3) [94]
	45	50 (3) [111]	43 (2) [96]	43. (5) [96]	42 (2) [93]
REP% <sup>g</sup>		10.5	9.3	8.3	7.6
$t_{exp}$		1.27	1.33	1.08	0.89
$t_{teórico}$ (0.025,44)		2.02	2.02	2.02	2.02

<sup>a</sup> Los valores se encuentran expresados como el promedio de las réplicas correspondientes. Las desviaciones estándar experimentales se muestran en la última cifra significativa entre paréntesis y las recuperaciones porcentuales entre corchetes

<sup>b</sup> Ciudad de Santa Fe (Santa Fe, Argentina), <sup>c</sup> Laguna Setúbal (Santa Fe, Argentina), <sup>d</sup> Ciudad de Rincón (Santa Fe, Argentina), <sup>e</sup> Río Paraná (Entre Ríos, Argentina), <sup>f</sup> Río Cuculucito (Santa Fe, Argentina)

<sup>g</sup> REP%: Error de predicción relativa,  $REP = 100 \frac{RMSE}{\bar{c}}$ , donde  $\bar{c}$  es la media de las concentraciones de calibración y  $RMSE = \sqrt{\frac{1}{I} \sum_1^I (c_{nom} - c_{pred})^2}$  para  $I=45$

## 2.5. Conclusiones

En este capítulo se desarrolló una metodología analítica para la determinación de ABC en muestras ambientales de agua en base a sus propiedades de fluorescencia inducidas por irradiación UV, empleando espectroscopia de fluorescencia y los algoritmos quimiométricos PARAFAC y MCR-ALS.

Primeramente se optimizaron las condiciones experimentales a partir de un diseño experimental, obteniéndose mejoras significativas de la señal de fluorescencia al encontrarse las condiciones óptimas. Estos resultados sugieren la aplicabilidad del diseño experimental empleando la metodología de superficie de respuesta como una excelente estrategia para obtener las mejores condiciones que garanticen una respuesta óptima, minimizándose sustancialmente el número de experimentos a realizar, y disminuyéndose, por lo tanto, el uso de reactivos y las horas de uso de los instrumentos.

Adicionalmente se realizó una caracterización UV del foto-producto obtenido de la reacción de fotólisis mediante UHPLC-DAD-FLD, evidenciándose que la formación de este foto-producto provoca cambios estructurales en la molécula original, lo cual se vio reflejado en los cambios espectrales.

La cuantificación de ABC se llevó a cabo empleando dos estrategias de análisis de datos con el objetivo de establecer las ventajas comparativas del uso de datos de tercer orden con respecto a los de segundo orden. En este sentido, se obtuvieron resultados similares en cuanto a la resolución y cuantificación del ABC para ambos tipos de datos utilizando PARAFAC y MCR-ALS e incluso en presencia de potenciales interferentes. No obstante, las cifras de mérito analíticas para el caso de los datos de tercer orden mostraron mejoras con respecto a los datos de segundo orden, lo cual pone en evidencia que la introducción de un modo adicional aporta ventajas especialmente desde el punto de vista de la selectividad del método.

En este sentido, MCR-ALS y PARAFAC constituyen una estrategia quimiométrica altamente confiable y eficiente para la resolución de analitos específicos en presencia de componentes no modelados, demostrándose una vez más la ventaja de segundo orden.

Por lo tanto, esta metodología de cuantificación empleando datos de tercer orden constituye una alternativa muy útil en la determinación de ABC en muestras ambientales de agua, en niveles de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , inclusive sin pasos previos de preconcentración y donde solamente sería necesario un procedimiento previo de limpieza de estas matrices debido a la presencia de compuestos altamente fluorescentes.

## ***CAPÍTULO 3***

*Bioacumulación y efectos toxicológicos  
de ARVs en renacuajos *Rhinella  
arenarum**

## 3.1. Introducción

En las últimas décadas, la presencia de drogas farmacéuticas en el ambiente ha generado una gran atención a nivel mundial, debido a los posibles efectos adversos que pueden ocasionar en diversos organismos. Los efectos adversos de un contaminante pueden correlacionarse con las concentraciones químicas internas en tejidos debido a su bioacumulación [139]. Idealmente, las concentraciones de efecto predicho (*PEC: Predicted Effect Concentration*) son una manera aceptable de identificar contaminantes de alta prioridad ambiental, así como los datos de exposición, persistencia, bioacumulación y toxicidad. Sin embargo, en muchas ocasiones, esta información resulta escasa para los contaminantes emergentes [24].

Las drogas ARVs se detectaron en una gran variedad de cuerpos de agua, como, por ejemplo, aguas residuales, subterráneas, superficiales e incluso agua potable en niveles de concentración de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$  [16,29,140]. También se encontraron en el lodo de tanques de sedimentación primaria en ordenes de  $\text{mg kg}^{-1}$  [25].

La presencia sistemática de contaminantes en ambientes acuáticos puede alterar la homeostasis en los organismos acuáticos expuestos, generar toxicidad aguda, y/o desarrollar resistencia en microorganismos debido a la exposición crónica a bajas concentraciones [24]. En este sentido, para EFV, AZT y NVP se informaron potenciales riesgos ambientales en peces, dáfnidos y algas [15,23,38].

La evaluación de la posible toxicidad causada por la presencia de contaminantes emergentes en organismos acuáticos, generalmente, se realiza a partir de estudios de toxicidad aguda o crónica en organismos modelos que son susceptibles a la contaminación debido a sus características morfológicas. En este contexto, los anfibios son considerados organismos modelos y se emplean habitualmente en estudios de exposición a contaminantes ambientales debido a que poseen una piel altamente permeable, capaz de absorber una gran variedad de compuestos químicos, siendo especialmente sensibles a los efectos que producen los contaminantes [141]. Algunos de los efectos que pueden ocasionar los contaminantes ambientales incluyen fallas en la eclosión de larvas, así como grados variables de deformidades anatómicas en una amplia variedad de organismos [34]. Adicionalmente, los anfibios se emplean como especies de experimentación toxicológica dadas ciertas ventajas, tales como fácil mantenimiento en el laboratorio, baja tasa de mortalidad natural y relativamente corto tiempo de desarrollo.



Cabe destacar que los vertebrados marinos en etapas tempranas de desarrollo son más sensibles a compuestos tóxicos que durante la etapa adulta [142]. Los anfibios en etapa larval son altamente susceptibles a contaminantes acuáticos debido a que, además de la permeabilidad de su piel y branquias, necesitan un alto grado de requerimientos energéticos para su crecimiento y metamorfosis. Esta vulnerabilidad puede ser un factor importante que conduce al debilitamiento de poblaciones de anfibios, y contribuye, así, al extenso fenómeno de la disminución de la población mundial de anfibios. Por lo tanto, es importante enfatizar acerca de la necesidad de investigar en relación a la bioacumulación y los efectos toxicológicos en las etapas sensibles del desarrollo larvario como consecuencia de la exposición a contaminantes emergentes [143].

La bioacumulación es el proceso por el cual un químico es absorbido por un organismo desde un entorno ambiental, solamente a través de las superficies dérmicas y respiratorias, constituyendo el resultado neto de tasas competitivas de absorción química y eliminación en un organismo en condiciones de exposición definidas [144]. Las rutas principales de la absorción química incluyen la exposición en la superficie de las branquias, mientras que las rutas clave de eliminación química incluyen el intercambio respiratorio, evacuación y biotransformación metabólica de la droga. El grado en que ocurre la bioacumulación generalmente se expresa como factor de bioconcentración (*BCF: Bioconcentration Factor*) y puede solamente medirse en condiciones controladas de laboratorio en donde la ingesta del químico no se incluye. El BCF es la relación entre la concentración de un químico absorbido por un organismo ( $C_B$ ) y la concentración nominal del químico en el agua ( $C_{WD}$ ) bajo condiciones estables [145], tal como se describe en la Ec. 15:

$$BCF = \frac{C_B}{C_{WD}} \quad (15)$$

Es importante señalar que la determinación de concentraciones de ARVs en muestras biológicas complejas requiere del empleo de metodologías sensibles y exactas, tales como HPLC-DAD/FLD o HPLC-MS/MS. Sin embargo, debido a la presencia de interferencias dadas por compuestos propios de las matrices, así como a los límites de detección requeridos para determinarlos a nivel de trazas, en general, se necesita someter las muestras a pasos previos de pretratamiento. En este sentido, muy frecuentemente, es necesario implementar etapas de extracción/preconcentración antes de la separación cromatográfica. Se pueden mencionar tres tipos principales de técnicas

de preparación de la muestra que incluyen extracción en fase sólida (*SPE: Solid Phase Extraction*), extracción líquido-líquido (*LLE: Liquid-Liquid Extraction*) y precipitación de proteínas (PP), las que se seleccionan dependiendo de las características de la muestra y los tipos de drogas a evaluar. La LLE es una excelente alternativa para la extracción de NNRTIs, mientras que no lo es para NRTIs debido a las propiedades hidrofílicas de estas drogas [146,147]. Como resultado, las drogas NRTIs son extraídas y/o separadas con mayor éxito por técnicas de SPE y PP. Estas últimas tienen la ventaja de ser procedimientos rápidos, que, por lo general, usan muy pocas cantidades de solventes orgánicos y son relativamente económicas [147].

Como se mencionó, los análisis químicos de contaminantes en matrices ambientales o biológicas están ligados tanto a la complejidad inherente de estas matrices complejas como a los bajos niveles en los que se encuentran los analitos a ser cuantificados. Para optimizar las condiciones experimentales y alcanzar los elevados niveles de sensibilidad requeridos, se pueden emplear metodologías de diseño experimental, las que contribuyen de manera significativa a incrementar los límites de detección y cuantificación de los analitos de interés. En relación a las interferencias propias de las matrices biológicas, las determinaciones de analitos en muestras complejas se llevan a cabo, generalmente, mediante técnicas cromatográficas combinadas con esquemas de detección específicos. Sin embargo, algunas de estas metodologías pueden ser relativamente costosas, consumir mucho tiempo y requerir tratamientos de muestras extremadamente laboriosos. Además, cuando se desarrollan métodos separativos con detección espectroscópica, puede ocurrir que compuestos químicos altamente similares y/o interferencias provenientes de matrices complejas coeluyan, afectándose la selectividad requerida para la adecuada cuantificación analítica. Este problema de falta de selectividad puede resolverse mediante la aplicación de algoritmos quimiométricos apropiados [39].

Es importante remarcar, que el empleo de estas metodologías analíticas permite establecer los niveles de bioacumulación de contaminantes en organismos acuáticos, lo que posteriormente puede correlacionarse con potenciales efectos adversos. En este sentido, la absorción de contaminantes emergentes por parte de organismos acuáticos puede causar alteraciones en el metabolismo oxidativo a partir de la generación de radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno con potencialidad de dañar tejidos y componentes celulares, lo cual es conocido como estrés oxidativo en sistemas biológicos.

El balance entre pro-oxidantes endógenos y factores exógenos, tales como los contaminantes ambientales y el sistema de defensa antioxidante (enzimático y no enzimático) en sistemas biológicos puede ser empleado para evaluar efectos tóxicos bajo condiciones ambientales estresantes, especialmente el daño oxidativo inducido por diferentes clases de contaminantes químicos [148].

En la literatura existen estudios que informan los datos de ecotoxicidad desde el punto de vista de concentraciones letales medias (LC50) para un número considerable de drogas farmacéuticas, usando organismos modelos de distintos niveles tróficos. Sin embargo, esta información *per se* no resulta útil para abordar específicamente la cuestión de efectos ambientales y, por consiguiente, no se pueden usar en los procesos de evaluación de riesgos. La información disponible relacionada con los efectos toxicológicos de residuos farmacéuticos en ecosistemas es bastante escasa.

La evaluación del riesgo de las drogas farmacéuticas y otros contaminantes en los ecosistemas acuáticos se puede evaluar a partir de ensayos de toxicidad empleando distintos niveles de exposición en dependencia del objetivo de cada estudio [9,19].

En este contexto, los biomarcadores enzimáticos pueden emplearse en la evaluación de riesgo ambiental, ya que se definen como cualquier respuesta biológica a químicos presentes en el ambiente y que son medidos en un organismo, indicando una desviación de los niveles normales, y constituyendo, por lo tanto, herramientas útiles que son usadas como indicadores tempranos de contaminación ambiental. Los biomarcadores enzimáticos de diferentes vías metabólicas, tales como función neuronal, metabolismo y estrés oxidativo, pueden ser empleados para evaluar la respuesta de contaminantes ambientales [149]. Entre las enzimas neuronales, la acetilcolinesterasa (AChE) se usa ampliamente como biomarcador de contaminación ambiental debido a que juega un papel clave en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en colina y ácido acético en el espacio sináptico de las sinapsis colinérgicas y las uniones neuromusculares. La AChE permite detectar la neurotoxicidad asociada a un contaminante específico, lo que resulta extremadamente importante en términos de consecuencias e impacto ecológico [150].

Por otro lado, el estrés oxidativo puede ser medido por una serie de biomarcadores enzimáticos, tales como la glutatión S transferasa (GST), que proporciona la primera línea de defensa celular del organismo. Estas enzimas catalizan la conjugación de glutatión con una diversidad de compuestos xenobióticos electrofílicos reactivos, neutralizando así sus sitios electrofílicos activos y convirtiéndolo en conjugados menos reactivos, solubles en agua, que pueden excretarse con mayor facilidad del cuerpo. La expresión de GST puede

encontrarse aumentada en varias especies como respuesta al estrés oxidativo, actuando, como un mecanismo de protección [151]. La GST también actúa como una glutatión peroxidasa, protegiendo a las células de la toxicidad del oxígeno y suprimiendo la apoptosis [152].

Por lo tanto, en base a todo lo anteriormente mencionado y teniendo en cuenta la escasa información en términos de bioacumulación y datos de toxicidad experimental asociados con ARVs en organismos acuáticos, este trabajo se basó en la hipótesis de que la exposición de organismos acuáticos, tales como renacuajos, a ARVs en concentraciones ambientales y subletales puede causar bioacumulación, e incluso alteraciones en el metabolismo (sistema antioxidante) de estas especies de anfibios, fundamentalmente a elevados niveles de exposición.

## 3.2. Objetivos

- Desarrollar un procedimiento de extracción para la separación de 3TC, d4T, AZT, ABC, EFV y NVP de la matriz de los renacuajos.
- Desarrollar metodologías analíticas para evaluar la bioacumulación de 3TC, d4T, AZT, ABC, EFV y NVP en renacuajos.
- Optimizar mediante diseño experimental las condiciones experimentales de UHPLC-MS/MS para aumentar la sensibilidad de este método.
- Utilizar el algoritmo quimiométrico MCR-ALS para discriminar analitos altamente solapados con las interferencias asociadas a la matriz de los renacuajos.
- Determinar los efectos toxicológicos de la exposición a 3TC, d4T, AZT y NVP a partir de la evaluación de biomarcadores enzimáticos.

## 3.3. Materiales y métodos

### 3.3.1. Reactivos y soluciones

Se emplearon reactivos de calidad analítica, tales como sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), obtenido de Merck (New York, Estados Unidos), y tris(hidroximetil)aminometano (Tris) , sacarosa, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), yoduro de acetiltiocolina (AcSCh), ácido dinitrobenzoico (DTNB) y glutatión, los que se

obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos) y ácido clorhídrico (HCl) que se obtuvo de Cicarelli (Rosario, Argentina).

Para las corridas cromatográficas se empleó agua ultrapura, que se obtuvo a partir de un sistema Millipore (Bedford, Estados Unidos), MeOH grado HPLC marca Biopack (Buenos Aires, Argentina), y ACN y ácido fórmico, ambos grado LC/MS, marca Fisher Scientific (New Hampshire, Estados Unidos).

La preparación y el almacenamiento de las soluciones madres de los analitos se realizaron como se describe en el Capítulo 1, sección 1.3.1 y las soluciones de trabajo se prepararon a partir de diluciones adecuadas de las soluciones madres para alcanzar una concentración final de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

La preparación de las soluciones de trabajo para los ensayos de toxicidad se realizaron a partir de diluciones adecuadas de las soluciones madres para alcanzar concentraciones finales de 0.5, 1.0, 2.0,  $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en el caso del ensayo de toxicidad a concentraciones subletales, y 0.5, 1.0,  $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para el ensayo de toxicidad a concentraciones ambientales.

### ***3.3.2. Especies analizadas***

Se emplearon renacuajos *Rhinella arenarum* como organismos modelos para los ensayos. Esta especie de anfibio tiene una amplia distribución neotropical, principalmente en bosques, humedales, tierras agrícolas y territorios urbanos. Se considera “no amenazada” en Argentina y se encuentra extensivamente distribuida en las provincias de Buenos Aires, Formosa, Chaco, Corrientes, Santiago del Estero, Entre Ríos y Santa Fe. Los huevos se recolectaron en estanques temporales en llanuras de inundación naturales del río Paraná ( $31^{\circ} 11' 31'' \text{ S}$ ,  $60^{\circ} 9' 29'' \text{ W}$ , Argentina) con autorización del Ministerio de Medio Ambiente (Santa Fe, Argentina) (EXP. N° 02101-0018518-1). Este sitio no ha sufrido contaminación, ni ha sido tratado con pesticidas químicos o biológicos. Los huevos se transportaron al laboratorio conservados en agua de red sin cloro ( $\text{pH} = 7.4$ , conductividad =  $165 \mu\text{S cm}^{-1}$ , oxígeno disuelto =  $6.5 \text{ mg L}^{-1}$ , dureza =  $50.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  a  $22^{\circ}\text{C}$ ), y se dejaron desarrollar hasta que los renacuajos alcanzaron los estadios 26-28 de Gosner [153] para realizar los ensayos de toxicidad.

### 3.3.3. Instrumentación

Los experimentos cromatográficos se desarrollaron en un sistema Agilent 1260 Infinity Ultra HPLC (Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba binaria, membrana desgasificadora, inyector automático, compartimento de horno para columna, detector de arreglo de diodos UV-Vis y el software OpenLab CDS Chemstation (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) para controlar el instrumento, la adquisición de los datos y su posterior análisis. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 Poroshell 120 de 50 mm de longitud, 3 mm de diámetro interno y 2.7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Agilent, Waldbronn, Alemania). Se empleó una temperatura de columna de 35°C y la velocidad de flujo fue de 0.8 mL  $\text{min}^{-1}$ . Las fases móviles A y B consistieron en agua ultrapura y ACN, respectivamente. El gradiente empleado se describe en la Tabla 17. Se inyectó un volumen de muestra de 100  $\mu\text{L}$ . El tiempo total de análisis fue de 6 min, con 2 min para el lavado de la columna y re-establecimiento de las condiciones iniciales. Las matrices de datos de tiempo-absorbancia (MTA) se registraron en el rango espectral de 200-400 nm cada 1 nm, durante el período de tiempo de elución de 0.0 a 6.0 min. De este modo, las dimensiones de las MTAs fueron 3601  $\times$  201, correspondientes a tiempo de elución y perfiles espectrales, respectivamente.

**Tabla 17.** Gradiente de elución utilizado en UHPLC-DAD.

Tiempo (min)	% A (Agua ultrapura)	% B (ACN)
0.0–1.0	97.0	3.0
1.0–2.0	96.8	3.2
2.0–4.0	40.0	60.0
4.0–5.0	40.0	60.0
5.0–6.0	97.0	3.0

Las actividades enzimáticas de AChE y GST se evaluaron en un espectrofotómetro Jenway 6405 UV-Vis (Staffordshire, Reino Unido).

Los experimentos de cuantificación por UHPLC-MS/MS se realizaron en un sistema ACQUITY UPLC™ (Waters Corporation, Massachussets, Estados Unidos) equipado con una bomba binaria, inyector automático y compartimento de horno para columna acoplado a un espectrómetro de masa de triple cuadrupolo (MS/MS) equipado con una fuente de ionización ortogonal- *Z-spray* (ESI: *Electrospray Ionization*) capaz de operar en modo positivo y negativo (TQD, Acquity Micromass, Reino Unido). El manejo de datos de

espectrometría de masas y cromatografía se realizó utilizando el software MassLynx versión 4.1 (Waters, Manchester, Reino Unido). Se utilizó una columna cromatográfica ACQUITY UPLC BEH Shield RP 18 de 100 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 1.7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Waters Corporation, Massachussets, Estados Unidos). Se empleó una temperatura de columna de 40°C y la velocidad de flujo fue de 0.4 mL min<sup>-1</sup>. Las fases móviles A y B consistieron en agua ultrapura: ACN: ácido fórmico (98%:2%:0.1%) y ACN: ácido fórmico (100:0.1%), respectivamente. El gradiente de UHPLC-MS/MS empleado se describe en la Tabla 18. Se inyectó un volumen de muestra de 10  $\mu\text{L}$ .

**Tabla 18.** Gradiente de elución empleado en UHPLC-MS/MS.

Tiempo (min)	% A	%B
0.0–1.0	100.0	0.0
1.0–3.0	50.0	50.0
3.0–6.5	50.0	50.0
6.5–7.5	100.0	0.0

Los parámetros específicos de MS/MS para cada una de las drogas se describen a continuación en la Tabla 19, mientras que los parámetros comunes para ambas drogas consistieron en: voltaje del extractor (2 V), caudal de desolvatación (1000 L h<sup>-1</sup>) y caudal del cono (5 L h<sup>-1</sup>)

**Tabla 19.** Parámetros empleados para la detección por espectrometría de masa de ABC y EFV.

Parámetros	ABC	EFV
Modo de ionización	Positivo (+)	Negativo (-)
Voltaje del capilar (kV)	3.00	3.66
Temperatura de la fuente (°C)	110	120
Temperatura de desolvatación (°C)	400	340
Tiempo de retención (min)	2.47	5.12
Ion precursor ( <i>m/z</i> )	287.2	314.0
Ion fragmento 1 ( <i>m/z</i> )	150.2	69.0
<i>Dwell</i> (s)	0.1	0.5
Cono (V)	25	35
Energía de colisión (eV)	30	30

**Tabla 19 (continuación).** Parámetros empleados para la detección por espectrometría de masa de ABC y EFV.

Parámetros	ABC	EFV
Ion fragmento 2 ( <i>m/z</i> )	174.2	244.0
<i>Dwell</i> (s)	0.1	0.5
Cono (V)	25	35
Energía de colisión (eV)	31	20
Ion fragmento 3 ( <i>m/z</i> )	191.2	-
<i>Dwell</i> (s)	0.1	-
Cono (V)	25	-
Energía de colisión (eV)	20	-

### 3.3.4. Ensayo de toxicidad

Se realizaron dos ensayos estáticos de corta duración, uno de 48 h y otro de 96 h usando recipientes estériles de vidrio (85 mm de diámetro y 110 mm de altura) conteniendo 200.0 mL de cada solución de ARVs. Los períodos de observación y volumen de la solución de ensayo se seleccionaron basados en estudios previos [154-156]. Las condiciones de laboratorio para los ensayos de toxicidad fueron de ciclos de luz/oscuridad de 12/12h (luz >100 Lx) a  $22 \pm 2$  °C empleando agua de red declorada naturalmente (pH = 7.4, conductividad =  $165 \mu\text{S cm}^{-1}$ , oxígeno disuelto =  $6.5 \text{ mg L}^{-1}$ , dureza =  $50.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  a 22 °C). La temperatura y el fotoperíodo se seleccionaron con el objetivo de simular las condiciones esperadas en el ambiente [157]. Las propiedades fisicoquímicas del agua declorada permanecieron estables durante los estudios de toxicidad.

La evaluación de riesgo ecológico de drogas farmacéuticas para especies sensibles *non-target* puede realizarse a partir de datos de toxicidad con concentraciones de exposición previstas en el ambiente en el peor de los casos, así como a concentraciones ambientales informadas [9]. Sin embargo, los datos de toxicidad de ARVs en organismos acuáticos son muy limitados y las concentraciones ambientales informadas alrededor del mundo difieren en dependencia del área (ríos, lagunas) y del tipo (efluentes, aguas residuales, etc) de descarga [17,22-24,29,36]



Por lo tanto, se realizaron dos ensayos de toxicidad estáticos agudos. El primer ensayo (48 h) empleando concentraciones subletales de 3TC, d4T, AZT y NVP, teniendo en cuenta la dosis letal media (LC50) informada para peces ( $65\text{-}100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) [158-160], y el segundo ensayo (96 h) que contempló concentraciones ambientalmente relevantes de ABC y EFV, las que se encontraban informadas en la literatura [16,21,22,24,25].

Para el primer estudio de toxicidad las larvas se expusieron a 3TC, d4T, AZT y NVP a cuatro niveles de concentración nominal ( $0.5$ ,  $1.0$ ,  $2.0$  y  $4.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y un control negativo conteniendo agua de red declorada. Todas las soluciones se prepararon con la misma agua declorada empleada para criar los renacuajos. Las concentraciones nominales evaluadas representan un escenario extremo debido a la falta de datos reales de ARVs en los estanques de reproducción (sistemas acuáticos lénticos) de anfibios. Cada tratamiento de ARV y control negativo se realizaron por triplicado usando cinco renacuajos por acuario ( $n=15$ ). En este estudio se utilizaron un total de 255 renacuajos (peso= $0.020 \pm 0.006$  g).

Para el segundo ensayo de toxicidad, las larvas se expusieron a ABC y EFV a tres niveles de concentración nominal ambientalmente relevantes ( $0.5$ ,  $1.0$  y  $10.0\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) y a un control negativo conteniendo agua de red declorada. Cada tratamiento de ARV y control negativo se realizó por triplicado usando cinco renacuajos por acuario ( $n=15$ ), empleándose un total de 95 renacuajos (peso= $0.026 \pm 0.008$  g).

Los ensayos de toxicidad se realizaron a  $22 \pm 2\ ^\circ\text{C}$  con ciclos de luz-oscuridad de 12/12h. Las larvas tratadas y control se mataron de acuerdo a los criterios de la Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos (*ASIH: American Society of Ichthyologist and Herpetologist*) [161], y con la aprobación del comité de bioética animal de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL, Res. N°: 388/06). Al finalizar los experimentos (48 h y 96 h, según fuese el caso), cada renacuajo se secó suavemente para eliminar el exceso de agua y se pesó utilizando una balanza analítica. Posteriormente, cada renacuajo se colocó individualmente en tubos Eppendorf y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

### 3.3.5 Optimización del diseño experimental

Con el propósito de establecer los parámetros óptimos de la detección MS/MS, que permitieran un mayor grado de sensibilidad, se realizó un diseño experimental inicial empleando la RSM.

Primeramente se determinaron los factores influyentes en la señal del detector a partir de un diseño factorial fraccional considerándose seis factores: voltaje del capilar (1 y 4 kV), voltaje del extractor (2 y 6 V), temperatura de la fuente (120 y 150 °C), temperatura de desolvatación (350 y 450 °C), caudal de desolvatación (800 y 1000 L h<sup>-1</sup>), caudal del cono (5 y 20 L h<sup>-1</sup>). El diseño factorial empleado fue un diseño factorial 2<sup>k-2</sup> donde *k* es el número de factores a evaluar. La respuesta seleccionada para ambos analitos fue área bajo la curva correspondiente a los iones fragmentos con mayor sensibilidad (191.2 *m/z* para ABC y 69.0 *m/z* para EFV).

Los factores significativos se determinaron a partir de los diagramas de Pareto y, posteriormente, se realizó un CCD con seis puntos centrales y un valor de  $\alpha$  de 1.68 (compatible con la distribución rotatoria de la varianza de predicción). Los niveles evaluados para cada factor consistieron en valores codificados -1 a +1 en los rangos de 3-4 kV, 110-130 °C y 300-375 °C para los factores voltaje del capilar, temperatura de la fuente y temperatura de desolvatación, respectivamente, como se describe a continuación en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Diseño central compuesto para optimización de condiciones experimentales.

Corrida	Factor 1	Factor 2	Factor 3
	A: Voltaje del capilar (kV)	B: T de la fuente (°C)	C: T de desolvatación (°C)
1	3.5	120	337.5
2	3.5	120	337.5
3	4.0	130	375.0
4	3.0	130	300.0
5	2.7	120	337.5
6	3.0	110	375.0
7	3.5	120	274.0
8	3.5	120	400.0
9	3.5	120	337.5
10	4.0	110	375.0
11	3.5	120	337.5

**Tabla 20 (continuación).** Diseño central compuesto para optimización de condiciones experimentales.

Corrida	Factor 1	Factor 2	Factor 3
	A: Voltaje del capilar (kV)	B: T. de la fuente (°C)	C: T. de desolvatación (°C)
12	3.5	137	337.5
13	3.0	130	375.0
14	4.0	110	300.0
15	4.3	120	337.5
16	3.5	103	337.5
17	3.0	110	300.0
18	4.0	130	300.0
19	3.5	120	337.5
20	3.5	120	337.5

### 3.3.6. Procedimiento experimental

#### 3.3.6.1 Muestras de calibración

Para el ensayo de toxicidad aguda a 48 h se preparó un conjunto de cinco muestras de calibración compuestas por combinaciones de 3TC, d4t, AZT y NVP, por triplicado, a partir de la transferencia de alícuotas apropiadas de cada solución de trabajo ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a matraces de 5.0 mL, y enrasando con agua ultrapura. Las concentraciones finales de las muestras de calibración estuvieron en el rango de 20.0 a 250.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para 3TC, d4T y AZT, y 20.0 a 800.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para NVP. Se realizaron inyecciones de 100  $\mu\text{L}$  en el sistema cromatográfico UHPLC-DAD.

Para el ensayo de toxicidad aguda a 96 h se prepararon un conjunto de cinco y seis muestras de calibración por triplicado para ABC y EFV, respectivamente. Las muestras estaban compuestas por cada estándar, y se prepararon a partir de la transferencia de alícuotas apropiadas de la solución de trabajo ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a matraces de 5.0 mL, que se enrasaron con ACN: ácido fórmico (99:1%). Las concentraciones finales de las muestras de calibración estuvieron en el rango de 0.05 a 15.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para ABC, y 0.5 a 100.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para EFV. Se realizaron inyecciones de 10  $\mu\text{L}$  en el sistema UHPLC-MS/MS.

### 3.3.6.2 Método de extracción y análisis

Para desarrollar un método de extracción de los ARVs a partir de la matriz de los renacuajos, se pesaron las larvas control y se transfirieron a viales Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, se fortificaron con cantidades adecuadas de cada solución de trabajo evaluándose diferentes niveles de concentración incluidos en la curva de calibración; es decir, 50.0, 140.0 y 225.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para 3TC, d4T y AZT; 100.0, 410.0 y 700.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para NVP; 1.0, 5.0 y 10.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para ABC y 5.0, 10.0 y 100.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para EFV. Con el objetivo de simular las condiciones experimentales, las muestras fortificadas se mantuvieron por 48 h y 96 h, según fuese el caso, a 4°C antes de llevar a cabo la extracción. Este procedimiento de extracción consistió en la adición de una solución reguladora de homogeneización (pH = 7.4) compuesta por 25 mmol L<sup>-1</sup> de sacarosa, 20 mmol L<sup>-1</sup> de Tris-HCl y 1 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA en una relación 1:10 (m/v). Las muestras se mezclaron manualmente usando un homogeneizador *polytron*® hasta obtener una mezcla homogénea. El primer paso de la extracción consistió en la adición de 1.0 mL de ACN frío a la mezcla homogénea y agitación con *vortex* durante 2 min. A continuación, las muestras se sometieron a agitación a baja velocidad durante 15 min, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo Khan. Posteriormente, este sobrenadante se secó empleando una corriente suave de nitrógeno a 75°C en un baño de agua. Al finalizar, las muestras se reconstituyeron con 140.0  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura para el caso de 3TC, d4T, AZT y NVP, mientras que para ABC y EFV se resuspendieron en 25.0  $\mu\text{L}$  de ACN: ácido fórmico (99:1%) y se centrifugaron a 14000 rpm por 2 min. El sobrenadante se transfirió a viales de inyección para su posterior análisis por UHPLC-DAD y UHPLC-MS/MS. Todo el procedimiento analítico se realizó por triplicado.

Este método de extracción se empleó para todas las muestras de renacuajos a evaluar. Para el caso de las muestras evaluadas por UHPLC-MS/MS debido a la baja concentración absorbida por los renacuajos se realizó un *pool* de renacuajos correspondiente a cada una de las concentraciones de exposición (0.5, 1.0, 10.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) en el caso de ABC y para los niveles de exposición de 0.5 y 1.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de EFV. Las muestras de cada *pool* se reconstituyeron en 25.0  $\mu\text{L}$ , mientras que para la concentración de exposición de 10.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de EFV se resuspendieron en 50.0  $\mu\text{L}$ .

Adicionalmente, para ambos estudios de toxicidad se evaluó la ausencia de efecto matriz a partir de un análisis de pendientes que se realizó comparando las matrices de renacuajos previamente extraídas y fortificadas con los analitos con soluciones estándares de los analitos disueltos en agua ultrapura o ACN: ácido fórmico (99:1%),

según fuese el caso, empleando los mismos niveles de concentración descritos anteriormente.

### *3.3.6.3 Evaluación de bioacumulación de antirretrovirales en renacuajos *R. arenarum**

La cuantificación de ARVs en los renacuajos se realizó utilizando dos metodologías. La determinación de d4T, AZT y NVP se llevó a cabo usando datos univariados; es decir, se utilizaron los valores del área bajo la curva correspondiente a cada longitud de onda (266 nm para d4T y AZT, y 283 nm para NVP). Por otro lado, la cuantificación de 3TC se realizó usando datos multivariados; es decir, matrices construidas con los espectros UV registrados a diferentes tiempos de elución empleando el algoritmo quimiométrico MCR-ALS. Esta última metodología se desarrolló con el propósito de resolver el solapamiento entre la señal de 3TC y las inherentes a la matriz de los renacuajos.

La cuantificación de ABC y EFV se realizó a partir de datos univariados, empleando los valores de área bajo la curva correspondientes a los iones fragmentos con mayor sensibilidad (191.2  $m/z$  para ABC y 69.0  $m/z$  para EFV).

### *3.3.6.4 Evaluación de toxicidad por biomarcadores enzimáticos*

La evaluación toxicológica se llevó a cabo empleando biomarcadores enzimáticos y se realizó a partir de la homogeneización de los renacuajos, empleando la solución reguladora de homogeneización anteriormente descrita en una relación 1:10 (m/v) usando un homogeneizador polytron®. Una vez que se obtuvo una mezcla homogénea, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a  $4 \pm 1$  °C, y se almacenó a - 80°C hasta el análisis enzimático.

La actividad de la AChE se determinó colorimétricamente de acuerdo a Ellman y col. [162]. La mezcla de reacción consistió en 920.0  $\mu\text{L}$  de solución reguladora Tris-HCl 25  $\text{mmol L}^{-1}$  conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1  $\text{mmol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 7.6$ ), 10.0  $\mu\text{L}$  de AcSCh 20  $\text{mmol L}^{-1}$ , 50.0  $\mu\text{L}$  de DTNB 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , y 20.0  $\mu\text{L}$  de la muestra. La variación de la densidad óptica se midió por duplicado a 410 nm y 25 °C por 1 min. La concentración total de proteína se determinó usando el método de Biuret [163], y la actividad de la AChE se expresó en nmol de AcSCh hidrolizado por minuto por miligramo de proteína usando un coeficiente de extinción molar de  $13.6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Por otra parte, la actividad de GST se determinó espectrofotométricamente usando el método descrito por Habig y col. [164] y adaptado por Habdous y col. [165] para la actividad de GST en suero de mamíferos. El ensayo enzimático se realizó a 340 nm en una mezcla de reacción conteniendo 910.0  $\mu\text{L}$  de solución reguladora de fosfato de sodio 100  $\text{mmol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 6.5$ ), 20.0  $\mu\text{L}$  de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0.2  $\text{mmol L}^{-1}$ , 50.0  $\mu\text{L}$  de glutatión reducido 5  $\text{mmol L}^{-1}$ , y 20.0  $\mu\text{L}$  de la muestra. El ensayo de cinética enzimática se desarrolló a una temperatura de 25 °C y la actividad de GST se expresó como  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína empleando un coeficiente de extinción molar de  $9.6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### *3.3.7. Análisis estadístico, programas informáticos y algoritmos para el análisis de los datos*

El análisis estadístico se realizó usando el software InfoStat1.1 para Windows [166] Los datos de actividad enzimática se expresaron como una media  $\pm$  error estándar. Se emplearon las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y *Dunn post hoc* para comparar las actividades enzimáticas entre el control y los animales expuestos debido a la falta de normalidad de los datos. Se utilizó un criterio de significancia de  $p < 0.05$ .

MCR-ALS se implementó en MATLAB 7.10 [113]. Los algoritmos para aplicar MCR-ALS se encuentran disponibles de manera online en <http://www.mcrals.info/>.

## 3.4. Resultado y discusión

### *3.4.1 Ensayo de toxicidad agudo (48 h) a concentraciones de exposición subletales*

#### *3.4.1.1 Método de extracción y evaluación de efecto matriz*

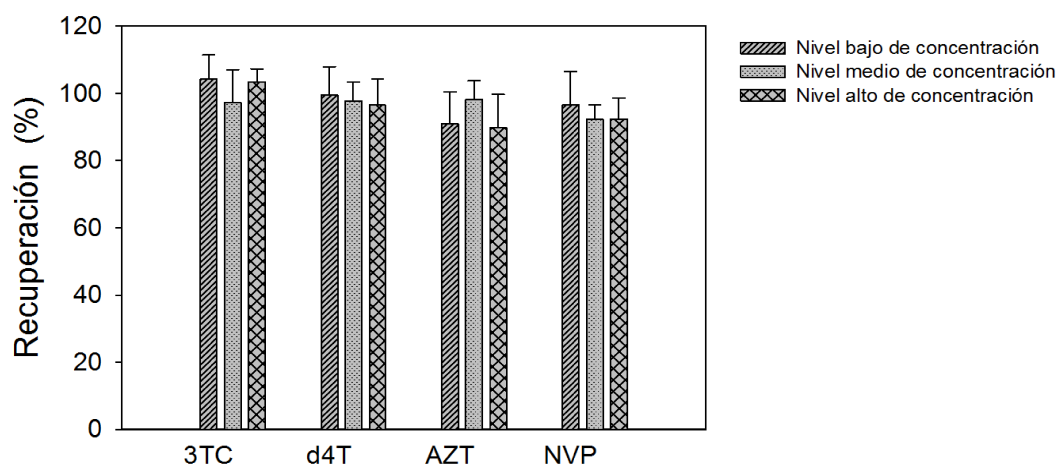
Con el objetivo de establecer un método adecuado para extraer simultáneamente los cuatro analitos (3TC, d4T, AZT y NVP) de los renacuajos, se evaluaron dos métodos de extracción teniendo en cuenta el alto contenido de proteínas presente en las matrices de los renacuajos. En este sentido, los métodos de extracción contemplaron dos alternativas para la precipitación de proteínas, la primera de ellas a partir de una precipitación de proteínas de manera directa utilizando ACN y la segunda empleando una solución

saturada de sulfato de amonio para realizar una precipitación salina de proteína. La Tabla 21 muestra los resultados de recuperación obtenidos para cada método de extracción evaluado, observándose que el método 1 fue más eficiente para la extracción de todos los analitos.

**Tabla 21.** Recuperaciones obtenidas para los métodos de extracción

Analitos	Recuperación (%)	
	Método de extracción 1 (ACN)	Método de extracción 2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
3TC	97	50
d4T	98	73
AZT	98	97
NVP	103	76

A continuación, con el propósito de corroborar que este método de extracción era adecuado en todo el rango de la curva de calibración, se evaluaron tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) para cada analito, obteniéndose los resultados que se muestran en la Fig. 25.



**Figura 25.** Recuperación obtenida luego de la aplicación del método de extracción para 3TC, d4T, AZT y NVP a partir de las matrices de renacuajos.

Como puede observarse, se obtuvieron valores de recuperación cercanos al 100 % en todos los casos, lo que asegura la exactitud de este método y su capacidad para extraer los analitos de la matriz de los renacuajos prácticamente en su totalidad e independientemente de la concentración en la que se encuentren.

Adicionalmente, se comprobó la ausencia de efecto matriz a partir de un análisis de las pendientes de las matrices de renacuajos fortificadas con los analitos y los analitos

disueltos en agua ultrapura mediante una prueba *t de Student* asumiendo una prueba de hipótesis:  $H_0$ : pendiente =1 y  $H_1$ : pendiente  $\neq$  1. Los valores de  $t_{exp}$  se calcularon a partir de la Ec. 13. Como se muestra en la Tabla 22, para un 95 % de confianza, el valor de  $t_{exp}$  fue menor que el valor  $t_{teórico (0.025,8)}$ , y, por lo tanto, se acepta  $H_0$ , demostrándose que no existe efecto matriz.

**Tabla 22.** Evaluación de efecto matriz para 3TC, d4T, AZT y NVP

Análisis de pendientes	Analitos			
	3TC	d4T	AZT	NVP
Pendiente	1.05	0.96	0.97	0.96
$t_{exp}$	1.33	1.98	1.73	1.96
$t_{teórico (0.025,8)}$	2.31	2.31	2.31	2.31

También se evaluó la precisión de este método de extracción a partir del análisis de la repetibilidad de las muestras evaluadas, obteniéndose valores de coeficiente de variación de 6.9, 7.5, 4.9 y 7.15 % para 3TC, d4T, AZT y NVP respectivamente, lo que asegura la precisión intermuestras de esta metodología.

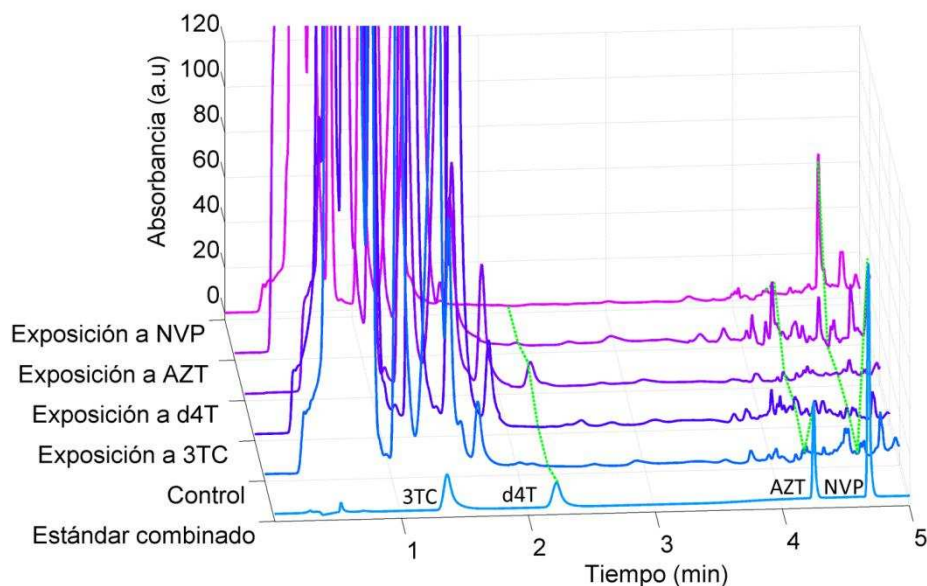
Por lo tanto, una vez demostrada la exactitud, ausencia de efecto matriz y precisión de este procedimiento de extracción, se utilizó en el posterior procesamiento de los renacuajos.

### 3.4.1.2 Desarrollo del método analítico para el análisis de ARVs en renacuajos

La Fig. 26 muestra los perfiles cromatográficos de la mezcla estándar de ARVs y los extractos obtenidos de los renacuajos sin tratamiento (muestra control) y aquellos expuestos a cada analito individualmente. En el cromatograma correspondiente a la muestra control puede observarse la ausencia de señal significativa en el tiempo de retención de los analitos d4T, AZT y NVP; sin embargo, se evidencia una señal elevada en el tiempo de retención de 3TC (1.35 min) perteneciente a las interferencias inherentes a la matriz de los renacuajos. De manera similar, al analizar el perfil cromatográfico de los renacuajos expuestos a estos analitos se aprecia visualmente la presencia de d4T, AZT y NVP, lo que corrobora la absorción de estos analitos por parte de los renacuajos. No obstante, para el caso de 3TC no fue posible realizar una evaluación directa dado el gran solapamiento entre la señal de este analito y la de los componentes de la matriz. Por lo



tanto, se propuso una estrategia quimiométrica para cuantificar 3TC, mientras que el resto de los ARVs se analizaron empleando calibración univariada.



**Figura 26.** Perfil cromatográfico de una solución estándar combinada ( $140.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de 3TC, d4T, AZT, y  $410.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de NVP), y una matriz de renacuajo antes y después de la exposición a cada ARV.

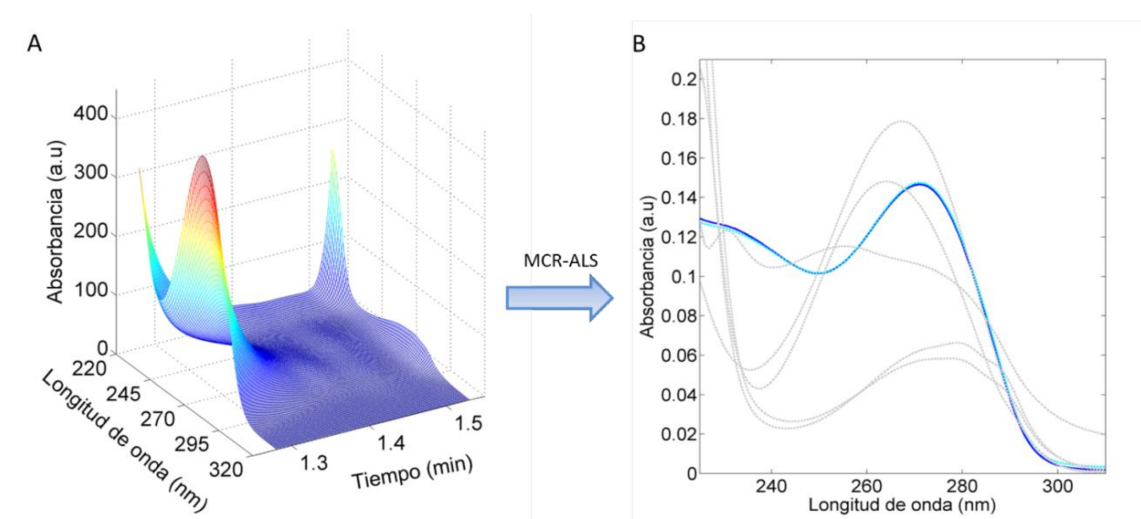
### *Resolución quimiométrica de 3TC por MCR-ALS*

Como se mencionó anteriormente, con el objetivo de resolver el solapamiento espectral entre 3TC y las interferencias de la matriz de los renacuajos, se empleó el algoritmo quimiométrico MCR-ALS usando datos de segundo orden.

Primeramente se procedió a reducir la matriz inicialmente registrada con el propósito de trabajar únicamente con los datos de interés; es decir, aquellos que involucraban a 3TC. Por lo tanto, se empleó una matriz de datos de tiempo-absorbancia de  $151 \times 101$  correspondiente a los rangos de tiempo de elución de 1.28-1.53 min y espectral de 220-320 nm (Fig. 27 A) para cada una de las muestras de calibración y las muestras a cuantificar. A continuación, el procesamiento de datos se realizó a partir de una matriz **D** aumentada en columna, compuesta por la matriz correspondiente a la muestra a cuantificar y las matrices de datos de la curva de calibración. El número de factores involucrados en el sistema se estimó por SVD, obteniéndose entre cinco y seis factores, correspondientes, uno de ellos a 3TC y los restantes a las interferencias presente en la matriz de renacuajo. Las estimaciones iniciales, que consistieron en perfiles espectrales, se obtuvieron a través de un procedimiento basado en la metodología SIMPLISMA [53].

Por otra parte, durante la optimización por ALS se aplicaron las restricciones de no negatividad en los perfiles de concentración y espectrales, y correspondencia entre especies comunes en las diferentes matrices. Luego de la descomposición de la matriz **D** por MCR-ALS, se realizó una regresión pseudo-univariada del área bajo el pico cromatográfico en función de la concentración de 3TC a partir de la información de concentración de las muestras de calibración contenidas en **C**.

Una vez realizada la resolución quimiométrica por MCR-ALS para las matrices de renacuajos expuestos a 3TC, se apreciaron varias señales espectrales correspondientes a los componentes presentes en la matriz de los renacuajos altamente superpuestos con el perfil espectral de 3TC, tal como se muestra en la Fig. 27B. No obstante, al comparar el perfil espectral puro de 3TC y el adquirido por MCR-ALS se puede observar claramente el alto grado de solapamiento espectral, lo que indica el buen desempeño de este algoritmo.



**Figura 27.** (A) Matriz de datos de segundo orden obtenida de matriz de renacuajo expuesto a 3TC, empleada en la resolución por MCR-ALS y (B) perfiles espectrales de 3TC (línea celeste punteada) e interferencias desconocidas (líneas punteadas grises) obtenidas por MCR-ALS, comparados con el perfil espectral experimental puro de 3TC (línea sólida azul).

Adicionalmente, con el propósito de evaluar más exhaustivamente la calidad del modelo, se realizó una comparación entre ambos espectros: el espectro experimental puro ( $s_1$ ) y el perfil espectral obtenido por MCR-ALS ( $s_2$ ). La cuantificación del grado de solapamiento espectral ( $s_{12}$ ) se realizó utilizando la Ec. 11, obteniéndose un valor de 0.999, lo que corrobora que esta metodología quimiométrica es adecuada para resolver analitos presentes en matrices complejas.

*Cifras de mérito analíticas*

Finalmente, en orden de evaluar el desempeño de esta metodología analítica empleando datos univariados y multivariados, se evaluó la linealidad de este método cromatográfico para cada uno de los analitos a partir de una prueba F, obteniéndose para todos los casos valores de  $p > 0.05$ , observándose, por lo tanto, linealidad de los datos en todo el rango de calibración evaluado. Además, se evaluaron las capacidades de detección de este método analítico, a partir de la estimación de las cifras de mérito de acuerdo a Bauza y col.[59] para 3TC y de acuerdo a Slutsky [167] para d4T, AZT y NVP.

Como se observa en la Tabla 23, para todos los casos se obtuvieron valores aceptables. En relación a 3TC, la sensibilidad y la sensibilidad analítica fueron mayores que para d4T, AZT y NVP. Esta mejora en las cifras de mérito, sobre todo en los parámetros sensibilidad y sensibilidad analítica obtenidas para 3TC podrían ser atribuidas al uso de datos de segundo orden sobre datos de orden cero, ya que se encuentra descrito en la literatura que el incremento en el orden de los datos provoca mejoras sustanciales en las cifras de mérito analíticas. Por lo tanto, estos resultados avalan el uso de los datos multivariados y el análisis por MCR-ALS para la cuantificación de 3TC en este tipo de muestras complejas.

**Tabla 23.** Cifras de mérito analíticas

Cifras de mérito	Segundo orden	Orden cero		
	MCR-ALS	d4T <sup>b</sup>	AZT <sup>b</sup>	NVP <sup>b</sup>
	3TC <sup>a</sup>			
SEN (AU $\mu\text{g}^{-1}$ L)	0.52–0.98	0.23	0.24	0.19
Sensibilidad analítica ( $\mu\text{g}^{-1}$ L)	103.0–196.0	0.3	0.4	0.1
LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	7–9	8	9	18
LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	22–28	22	26	51

<sup>a</sup> Calculado de acuerdo a [59] y expresado de acuerdo a las recomendaciones de [126]

<sup>b</sup> Calculado de acuerdo a [167]

### 3.4.1.3 Cuantificación de ARVs en renacuajos después de ensayo estático de toxicidad aguda

La Tabla 24 muestra los resultados del ensayo de toxicidad aguda con respecto a la absorción de ARVs por parte de los renacuajos. En todos los casos, se observó un incremento de la bioacumulación de los ARVs asociado con un aumento en los niveles de exposición. La NVP exhibió la mayor bioacumulación, con valores entre  $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$  y  $4.6 \mu\text{g g}^{-1}$ , sugiriéndose una alta permeabilidad de este analito, lo que podría correlacionarse con su coeficiente de partición ( $\log P$ , que es calculado como el coeficiente de partición octanol-agua de la droga en su forma neutra) de 3.9 (ver Tabla 1) [11]. Este último es una medida de la lipofilicidad de compuestos activos que resulta útil en la predicción de permeabilidad o bioacumulación de organismos expuestos a compuestos químicos [168].

Para el caso de d4T, se observó un nivel de bioacumulación ligeramente menor; es decir, entre  $0.32$  y  $1.40 \mu\text{g g}^{-1}$ . Con respecto a AZT y 3TC, se obtuvieron valores bajos de concentración absorbida por parte de los renacuajos, lo que podría sugerir una baja permeabilidad. Es importante señalar que los valores de  $\log P$  informados para 3TC (-2.6), d4T (-0.8), y AZT (0.2) ( ver Tabla 1) [11] se contraponen a los resultados de bioacumulación obtenidos en este estudio. Es decir, si solamente se considera la relación entre bioacumulación y lipofilicidad, se esperaría que los niveles de concentración absorbida se ordenaran en orden descendente para AZT, d4T y 3TC, y que los valores de bioacumulación para 3TC fueran significativamente menores. Sin embargo, los resultados de la Tabla 24 presentan a d4T como el segundo analito más absorbido después de NVP, mientras que AZT y 3TC muestran valores más bajos de bioacumulación y bastante similares entre sí. En este sentido, en la literatura existen investigaciones con observaciones semejantes a las obtenidas en este trabajo; es decir, compuestos con bajos  $\log P$  que se bioacumulan en altas cantidades (por ejemplo, atenolol e hidroclorotiazida en *Gambusia affinis*) [169]. Por lo tanto, es probable que otros mecanismos, tales como las interacciones de unión al receptor o diferencias en las tasas de biotransformación, podrían estar involucradas en la acumulación de drogas farmacéuticas polares en organismos acuáticos [170].

**Tabla 24.** Concentraciones de ARVs absorbidos por los renacuajos en el ensayo de toxicidad aguda.

Concentración nominal en agua ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	3TC		d4T		AZT		NVP	
	Conc. <sup>a</sup>	BCF <sup>b</sup>	Conc. <sup>a</sup>	BCF <sup>b</sup>	Conc. <sup>a</sup>	BCF <sup>b</sup>	Conc. <sup>a</sup>	BCF <sup>b</sup>
Control	ND <sup>c</sup>		ND <sup>c</sup>		ND <sup>c</sup>		ND <sup>c</sup>	
0.5	ND <sup>c</sup>		0.32 (8)		0.11 (2) <sup>d</sup>		0.3 (2) <sup>d</sup>	
1.0	0.21 (1)	0.16(4)	0.7 (3)	0.5(2)	0.17 (6)	0.18(5)	1.5 (1)	1.2(3)
2.0	0.25 (4)		0.8 (1)		0.33 (3)		2.7 (5)	
4.0	0.62 (7)		1.4 (3)		0.7 (2)		4.6 (9)	

<sup>a</sup> Conc: Concentración expresada en  $\mu\text{g g}^{-1}$

Todos los valores están expresados como el promedio de las réplicas correspondientes.

La desviación estándar experimental se muestra en la última cifra significativa entre paréntesis.

<sup>b</sup> BCF: Factor de bioconcentración ( $\text{mL g}^{-1}$ )

<sup>c</sup> ND: No detectable

<sup>d</sup> Detectable pero no cuantificable

Adicionalmente, se calcularon los BCF a partir de la Ec. 15 descrita en la sección 3.1. Los resultados de BCF obtenidos para todos los ARVs (Tabla 24) fueron bajos. Estos valores bajos podrían considerarse usualmente como “ausencia de bioacumulación potencial para una sustancia determinada” de acuerdo a la legislación Europea de Registro, Evaluación y Autorización de Químicos (*REACH: Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals*) teniendo en cuenta que un químico es considerado bioacumulativo si el BCF es mayor a  $2000 \text{ mL g}^{-1}$  [145]. Sin embargo, el BCF no debe ser usado únicamente como un predictor de bioacumulación potencial, sino más bien para estimar las tasas de biotransformación metabólica [144]. En este sentido, algunos autores han detectado la presencia de ARVs en organismos acuáticos. Rimayi y col. [24] informaron valores de  $0.15 \text{ ng g}^{-1}$  de 3TC en músculo de *Cyprinus carpio*. De manera similar Swaneopel y col. [36] encontraron d4T en concentraciones de  $95\text{-}110 \text{ ng L}^{-1}$  en plasma sanguíneo de *Clarias gariepinus*. Por otro lado, Ngumba y col. [23] calcularon el coeficiente de riesgo (*RQ: Risk Quotient*) en organismos modelos a partir de la relación entre la concentración ambiental medida (*MEC: Measured Environmental Concentration*) y la concentración predicha que no produce efecto (*PNEC: Predicted No Effect Concentration*), y obtuvieron un alto riesgo ambiental ( $\text{RQ} > 1$ ) para NVP y AZT en alga, dáfidos y peces.

En este contexto, es particularmente relevante el hecho de que las algas presenten altos coeficientes de riesgo ambiental asociados a estos ARVs, debido a que las larvas de anfibios no solo estarían potencialmente influenciadas por la presencia directa de ARV en

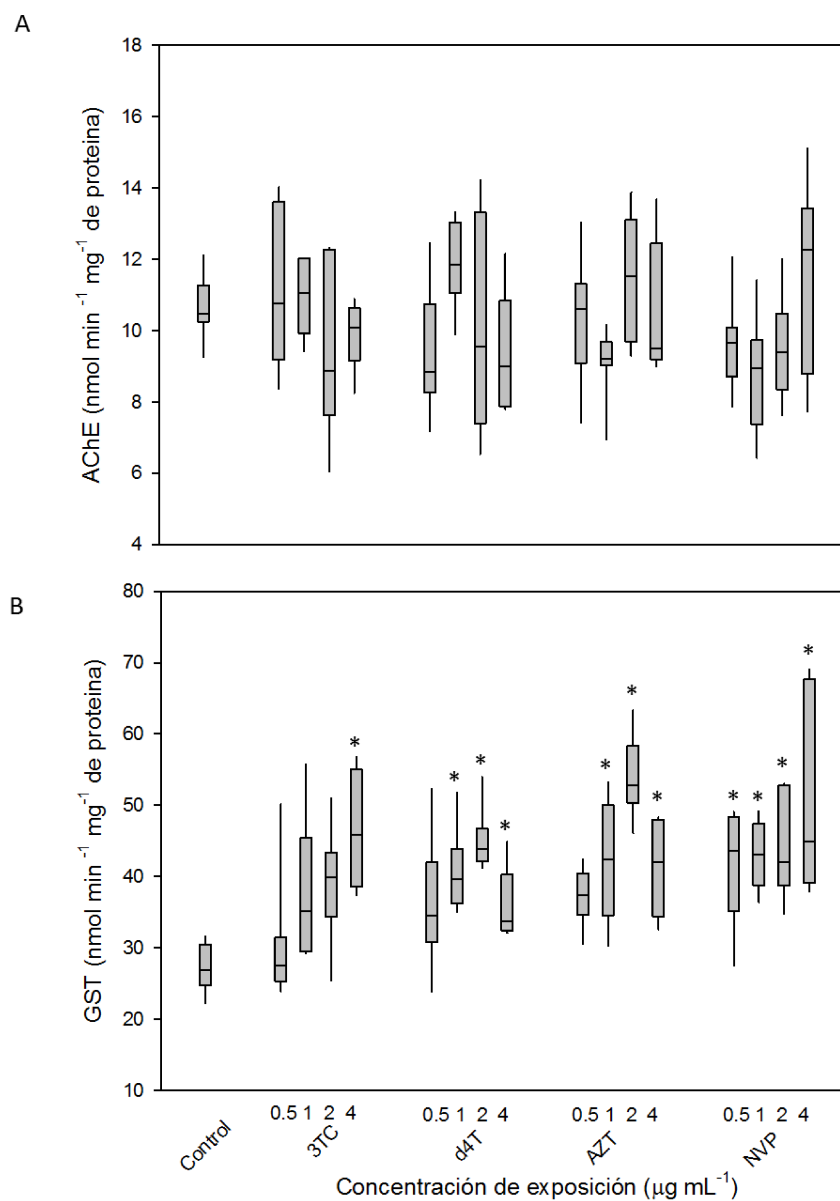
aguas superficiales, sino que también son herbívoras y, por consiguiente, se alimentan de algas [171]. De esta manera, se refuerzan las preocupaciones sobre el efecto de bioacumulación de los compuestos emergentes [172].

Todos estos hallazgos corroboran, por lo tanto, nuestros resultados con respecto a la habilidad de bioacumulación de estas drogas en renacuajos y especies simpátricas, incluso en las bajas concentraciones ambientales observadas en aguas superficiales.

#### *3.4.1.4. Análisis de biomarcadores de toxicidad*

Las drogas farmacéuticas en el ambiente pueden ocasionar efectos adversos en organismos *non-target*, similares a los que provocan en humanos [38]. En este sentido, la toxicidad distintiva de la terapia de ARVs en humanos es la toxicidad mitocondrial, la que puede manifestarse como neuropatía periférica, miopatía, lipoatrofia y/o un tipo de esteatosis hepática con acidosis láctica en NRTIs [173] o toxicidad hepática en NNRTIs [13]. Por lo tanto, con el objetivo de evaluar los efectos toxicológicos en los renacuajos, se midieron dos biomarcadores enzimáticos involucrados en la toxicidad celular, tales como AChE y GST. La actividad AChE en los renacuajos *Rhinella arenarum* mostró similitud entre los organismos controles y aquellos con los diferentes tratamientos de 3TC, d4T, AZT y NVP, lo que podría sugerir que la exposición a ARVs no afecta la transmisión de la señal neuronal, al menos en las condiciones estudiadas (Fig. 28 A).

Por el contrario, la Fig. 28 B exhibe la respuesta de la enzima GST para cada analito a los distintos niveles de concentración. Como puede apreciarse, la exposición a 3TC produce una modificación significativa en la actividad de GST, pero únicamente al mayor nivel de concentración evaluado ( $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Por otro lado, d4T y AZT mostraron incrementos significativos de la actividad de esta enzima para los tres últimos tratamientos. Para finalizar, la exposición a NVP causó aumentos significativos de la actividad de GST en los cuatro tratamientos con respecto a la actividad de esta enzima en los organismos controles.



**Figura 28.** Actividad de AChE (A) y GST (B) en renacuajos expuestos a 3TC, d4T, AZT y NVP. Los gráficos de caja indican la mediana, el primer (25%) y tercer cuartil (75%) (bordes de la caja), y el rango de valores (bigotes). Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ , *Dunn post-hoc test*)

Posteriormente, se calculó el porcentaje de inducción de la actividad de GST causada por estas drogas ARVs en comparación con la actividad basal de GST en renacuajos, obteniéndose valores de 77% para 3TC, 39-56% para d4T, 57-105% para AZT y 57-102% para NVP. Por lo tanto, en base a estos resultados, es posible confirmar la toxicidad provocada por estas drogas.

En la literatura existen numerosos estudios que plantean la activación de enzimas antioxidantes en organismos acuáticos, como parte de un sistema de defensa antioxidante contra los contaminantes [174,175], a través de mecanismos de detoxificación.

El proceso de detoxificación de los xenobióticos involucra una primera reacción de transformación de sustancias endógenas y exógenas, que tiene como objetivo disminuir la toxicidad del compuesto, y donde las principales enzimas involucradas en esta Fase I de detoxificación son los miembros de la familia de la enzima citocromo P450.

Posteriormente, ocurre la Fase II de detoxificación, que involucra una reacción de conjugación con la molécula GST, con el objetivo de incrementar la solubilidad del xenobiótico y sus metabolitos. Para finalizar este proceso de detoxificación, generalmente ocurre la excreción del compuesto conjugado hacia el exterior de la célula, donde participan diferentes proteínas transportadoras dependientes de ATP (*ATP-binding cassette transporters*), las cuales pertenecen a una de las más grandes súper familias de proteínas [176,177].

En este sentido, la enzima GST es uno de los biomarcadores más comúnmente usados para evaluar daño por potencial estrés oxidativo. Esta enzima antioxidante está condicionada por la actividad transcripcional de los genes GST, cuya expresión puede estar estimulada o inhibida dependiendo de varios factores, tales como estructura química del xenobiótico, concentración y tiempo de exposición [176]. Estos cambios en la actividad de GST revelan daño oxidativo y constituyen respuestas y mecanismos a través de los cuales los organismos se protegen contra la toxicidad de contaminantes a partir de procesos de biotransformación [174]. En el contexto del presente estudio, la toxicidad producida por estos ARVs se vio reflejada a partir de las variaciones en las actividades de GST, involucrada estrechamente a mecanismos de detoxificación.

Es importante remarcar que los organismos son capaces de incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (*ROS: Reactive Oxygen Species*) a partir de incrementos en la regulación de la defensa antioxidante [178]. Los aumentos de la actividad de GST en renacuajos *R. arenarum* puede estar relacionada con la fase II de detoxificación y su papel antioxidante en la reducción de un amplio rango de hidroperóxidos orgánicos a partir del glutatión [179]. En este estudio, los ARVs produjeron un desequilibrio bioquímico entre la generación de ROS y los sistemas antioxidantes [179] para las concentraciones estudiadas ( $0.5-4.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Por lo tanto, se demostró que los ARVs provocan inducción de estrés oxidativo inducido a partir de ROS [180].



### 3.4.1.5. Correlación entre bioacumulación y variables bioquímicas

La concentración de ARVs y la evidencia de bioacumulación en renacuajos podrían explicar las respuestas bioquímicas que ocurren en los biomarcadores enzimáticos. En este sentido, se evaluó la correlación entre las variables: concentración nominal de exposición a los ARVs, concentración absorbida por los renacuajos después de exposición a los ARVs y actividades enzimáticas de ambos biomarcadores a través de la correlación de Spearman. La actividad de la AChE no se encontró correlacionada ( $p > 0.05$ ) con el nivel de exposición a ninguno de los ARV evaluados, ni con la concentración de ARV absorbido, lo cual es de esperar, según lo observado en resultados previos.

Para el caso de la actividad de la GST, se observó una correlación positiva y significativa entre todas las variables ( $r_s = 0.504$  a  $0.652$ ;  $p < 0.05$ ) (Tabla 25). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la exposición de renacuajos a ARVs causa su bioacumulación. Al mismo tiempo, esta bioacumulación activa indicadores del sistema antioxidante y la consecuente inducción de enzimas GST. Esta inducción desempeña un papel decisivo en la línea de defensa antioxidante debido a que promueve procesos como eliminación de radicales libres, reducción de peróxidos y detoxificación de compuestos electrofílicos [174], previniendo, por lo tanto, una mayor bioacumulación de xenobióticos en los organismos acuáticos.

**Tabla 25.** Correlación de Spearman entre la actividad de la GST con respecto a la bioacumulación y la concentración nominal de exposición en renacuajos.

Analitos	Actividad de enzima GST (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> de proteína)			
	Concentración de exposición (µg mL <sup>-1</sup> )		Bioacumulación (µg g <sup>-1</sup> )	
	$r_s^a$	Valor de $p^b$	$r_s^a$	Valor de $p^b$
3TC	0.622	0.001	0.652	< 0.001
d4T	0.538	0.004	0.504	0.009
AZT	0.618	0.000	0.598	0.001
NVP	0.594	0.001	0.613	0.001

<sup>a</sup>  $r_s$ : Coeficiente de correlación de Spearman.

<sup>b</sup> Nivel estadístico de significancia para  $\alpha = 0.05$

A manera de resumen y comparando con los estudios informados sobre contaminantes emergentes en anfibios, es importante considerar que, a pesar de la gran aparición de productos farmacéuticos de preocupación emergente en los sistemas acuáticos, se han realizado muy pocos estudios sobre las respuestas de las larvas de anfibios a estos productos químicos [181]. Por ejemplo, Veldhoen y col. [182] estudiaron la exposición de los renacuajos *Lithobates catesbeianus* al ibuprofeno en concentraciones

que varían de 1.5 a 15  $\mu\text{g L}^{-1}$  y descubrieron que este fármaco potencia la transcripción de ARN<sub>m</sub> de los receptores de hormona tiroidea por inducción de tri-iodotironina (T3).

Además, Foster y col [183] mostraron que el antidepresivo farmacéutico fluoxetina causa trastornos en el desarrollo de los renacuajos. Asimismo, Peltzer y col [184] observaron, recientemente, disminución en el desarrollo, crecimiento, ritmo y función cardíaca, como respuestas del sistema antioxidante en *Trachycephalus venulosus* y *Physalaemus albonotatus*. después de la exposición a diclofenaco. Además, se ha evidenciado variación de las actividades de la enzima  $\beta$ -esterasa en *Rhinella arenarum* luego de la exposición de corta duración a dos antibióticos (ciprofloxacina y enrofloxacina) provocando muerte ecológica [185]. Este último concepto ha llamado la atención entre la conservación de los herpetozoos porque muchos anfibios expuestos a contaminantes emergentes modifican o suprimen una o más funciones ecológicas como el forrajeo o la reproducción [186]. En consecuencia, estos efectos no solo producen mortalidades puntuales sino también la extinción regional de los anfibios. Por lo tanto, asumiendo que los ARV podrían estar presentes en un escenario real, los renacuajos podrían tener graves consecuencias para la supervivencia si se altera el desarrollo, el metabolismo y el comportamiento de forrajeo y la natación. Por esta razón, es de suma importancia integrar puntos finales biológicos en los ensayos toxicológicos estándares, principalmente considerando que no hay datos disponibles sobre el monitoreo regular de ARV en ríos, lagunas y pantanos, luego de su liberación como efluentes, y sus efectos sobre organismos acuáticos.

Finalmente, es importante mencionar que todos los estudios realizados hasta el momento en compuestos emergentes, incluidos los productos farmacéuticos (diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, acetaminofeno, progesterona, ranitidina y testosterona), antibióticos (amoxicilina), productos agrícolas y pesticidas (atrazina, fipronil, glifosato), narcóticos y drogas ilegales (cocaína, benzoilecgonina), derivados de la industria alimentaria (bisfenol A y cafeína) y productos para el cuidado personal (triclosán, champú, etc.), mostraron efectos nocivos en los organismos acuáticos, e incluso el impacto en agua potable para los humanos. Por lo tanto, la determinación y caracterización del riesgo ecotoxicológico en especies vulnerables como los anfibios constituye un tema prioritario en estudios ambientales.

### *3.4.2. Ensayo de toxicidad agudo (96 h) a concentraciones de exposición ambientales*

#### *3.4.2.1. Consideraciones generales*

Es importante señalar que este estudio de toxicidad, a diferencia del anterior, se realizó a concentraciones de exposición ambientalmente relevantes, con el objetivo de evaluar la posible bioacumulación de ABC y EFV. En este sentido, debido a las bajas concentraciones de exposición estudiadas se hizo necesaria la aplicación de una metodología con un elevado grado de sensibilidad como lo es UHPLC-MS/MS, así como la aplicación de metodologías de diseño experimental para aumentar aún más los niveles de sensibilidad requeridos. Otra consideración importante en este estudio es que no se evaluaron biomarcadores enzimáticos debido a que los niveles de exposición eran muy bajos y, teniendo en cuenta los resultados anteriores, era muy poco probable que las concentraciones de enzimas en los renacuajos expuestos fuesen significativamente diferentes a los controles, debido a las bajas concentraciones de ARVs absorbidas.

#### *3.4.2.2. Optimización del diseño experimental*

En una primera instancia, se realizó un diseño factorial fraccional con el objetivo de identificar los factores influyentes en la respuesta evaluada; en este caso, el área bajo la curva de cada uno de los analitos. El diseño consistió en 16 experimentos correspondientes a la combinación de 6 factores (voltaje del capilar, voltaje del extractor, temperatura de la fuente, temperatura de desolvatación, caudal de desolvatación y caudal del cono), los que constituyen parámetros fundamentales durante el proceso de ionización de las moléculas y, por consiguiente, en los niveles de sensibilidad detectados.

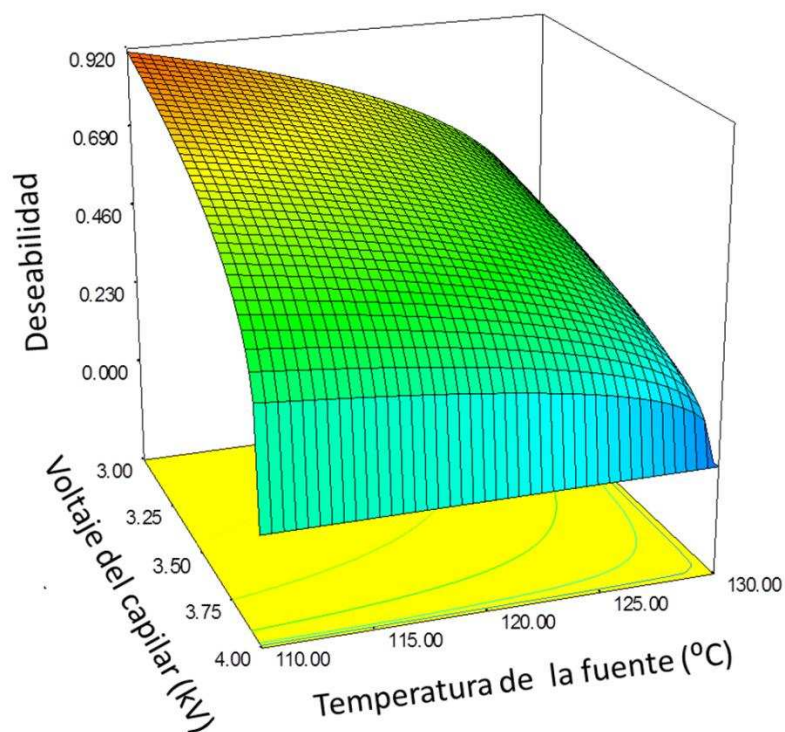
Los efectos de los factores estudiados se analizaron utilizando el diagrama de Pareto, resultando significativos los factores voltaje del capilar, temperatura de la fuente y temperatura de desolvatación para ambos analitos. A partir del gráfico de interacciones se determinaron las mejores condiciones para los restantes factores, que se establecieron en niveles fijos adecuados.

A continuación, se evaluó un diseño central compuesto fraccionado empleando los rangos descritos en la Tabla 20 y empleando como factores fijos el caudal de desolvatación (1000 L h<sup>-1</sup>), caudal del cono (5L h<sup>-1</sup>) y voltaje del extractor en 2 V,

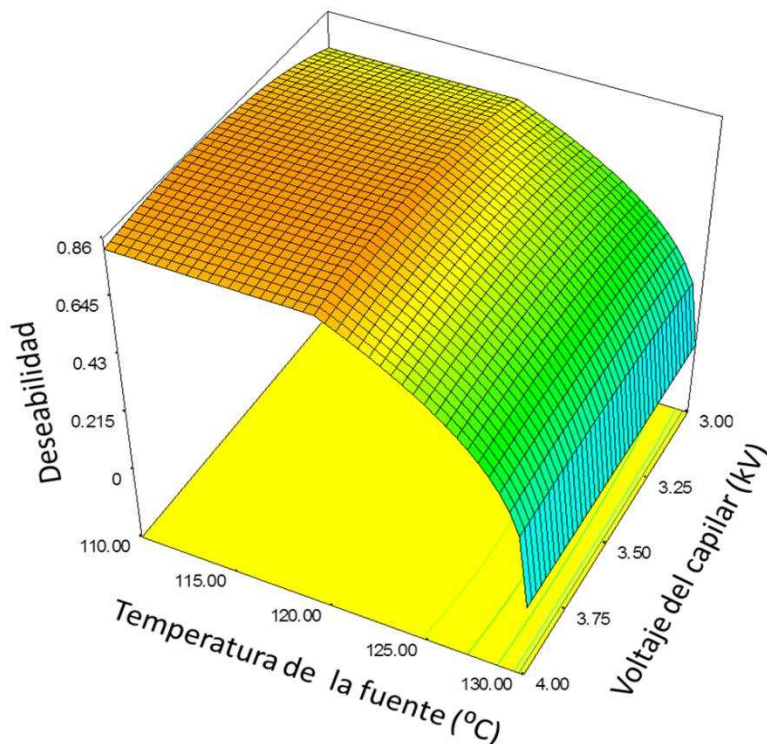
utilizando como respuesta el área bajo la curva de los iones fragmentos de mayor sensibilidad de ABC y EFV (191.2  $m/z$  y 69.0  $m/z$ , respectivamente)

Los datos experimentales obtenidos se ajustaron empleando un modelo cuadrático usando regresión múltiple *backward* y se validaron a partir de un ANOVA que mostró que el modelo era significativo para ABC y EFV ( $p = 0.0181$  y  $p = 0.0191$ , respectivamente) y que la falta de ajuste no era significativa ( $p = 0.9724$  y  $p = 0.8381$ , respectivamente), para un nivel de significación de  $\alpha=0.05$ .

Posteriormente, se optimizó la respuesta usando la función deseabilidad de Derringer, como se define en la Ec. 9. El criterio que se siguió para la optimización de la respuesta fue su maximización, obteniéndose valores de deseabilidad para ABC de 0.911 (Fig. 29). y para EFV de 0.853 (Fig. 30). Las condiciones experimentales de optimización obtenidas en cada caso fueron: voltaje del capilar (3.00 kV), temperatura de desolvatación (400 °C) y temperatura de la fuente (110 °C) para ABC, mientras que para EFV el voltaje del capilar fue de 3.66 kV, la temperatura de desolvatación de 340°C y la temperatura de la fuente de 120°C.



**Figura 29.** Superficie de respuesta del diseño central compuesto realizado para la optimización del método de UHPLC-MS/MS para ABC.



**Figura 30.** Superficie de respuesta del diseño central compuesto realizado para la optimización del método de UHPLC-MS/MS para EFV.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas, se emplearon durante todo el procedimiento experimental para la determinación de las concentraciones absorbidas de ARVs en los renacuajos.

### 3.4.2.3. Evaluación del método de extracción y efecto matriz

Primeramente, tal como se realizó en el estudio anterior de toxicidad, se evaluó el procedimiento de extracción de los ARVs a partir de la matriz de los renacuajos, obteniéndose valores de recuperación entre el  $90 \pm 2\%$  para ABC y  $95 \pm 3\%$  para EFV, en los niveles evaluados, y coeficientes de variación entre las muestras evaluadas de 5.9 y 7.4 %, respectivamente.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la metodología de UHPLC-MS/MS puede provocar supresión o intensificación de la señal debido al efecto matriz, se comprobó si existían o no variaciones en la respuesta asociadas a estos fenómenos. Por lo tanto, se realizó un análisis de las pendientes obtenidas del análisis de las matrices de renacuajos fortificadas con los analitos y los analitos disueltos en ACN: ácido fórmico (99:1%) mediante una prueba *t de Student* asumiendo una prueba de hipótesis:  $H_0$ : pendiente = 1 y

H<sub>1</sub>: pendiente ≠ 1. Los valores de  $t_{exp}$  se calcularon a partir de la Ec. 13. Los resultados obtenidos mostraron que no existe efecto matriz, ya que el valor de  $t_{exp}$  fue menor en ambos casos (0.68 para ABC y 0.01 para EFV) que el valor  $t_{teórico (0.025,8)} = 2.31$ .

Por consiguiente, en base a los resultados anteriores, durante todo el estudio se empleó esta metodología de extracción simple para el procesamiento de las muestras de renacuajos.

#### 3.4.2.4. Determinación de EFV y ABC en renacuajos

Es importante destacar que, con el objetivo de evaluar el desempeño de la metodología de cuantificación por UHPLC-MS/MS, se evaluó la linealidad del método analítico para ambos analitos a partir de una prueba F, obteniéndose valores de  $p > 0.05$  (0.328 y 0.298 para ABC y EFV, respectivamente), lo que asegura la linealidad de la curva de calibración en todo el rango evaluado. Además, se estimaron las cifras de mérito analíticas de acuerdo a Slutsky [167], obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 26.

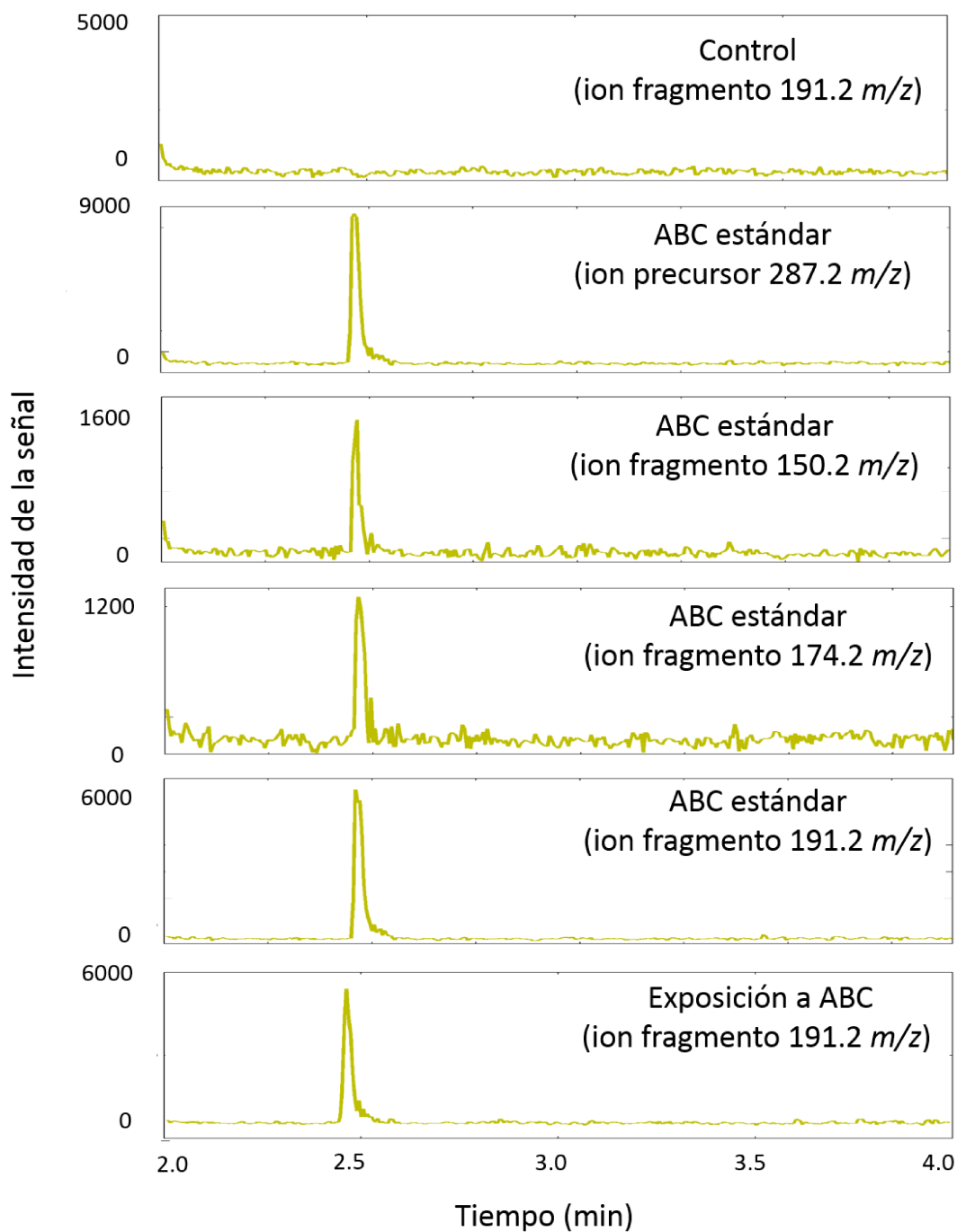
**Tabla 26.** Cifras de mérito analíticas para el método desarrollado mediante UHPLC-MS/MS

Cifras de mérito	ABC	EFV
SEN (AU $\mu\text{g}^{-1}$ L)	79.53	7.44
Sensibilidad analítica ( $\mu\text{g}^{-1}$ L)	7.83	1.16
LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.3	1.9
LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.9	5.6

Como se observa en la Tabla 26, para todos los casos se obtuvieron valores adecuados, especialmente para ABC, donde la sensibilidad y la sensibilidad analítica fueron superiores y, por lo tanto, sus límites de detección y cuantificación asociados. De esta manera, se mostró la elevada sensibilidad de este método, una vez que las condiciones experimentales se optimizaron.

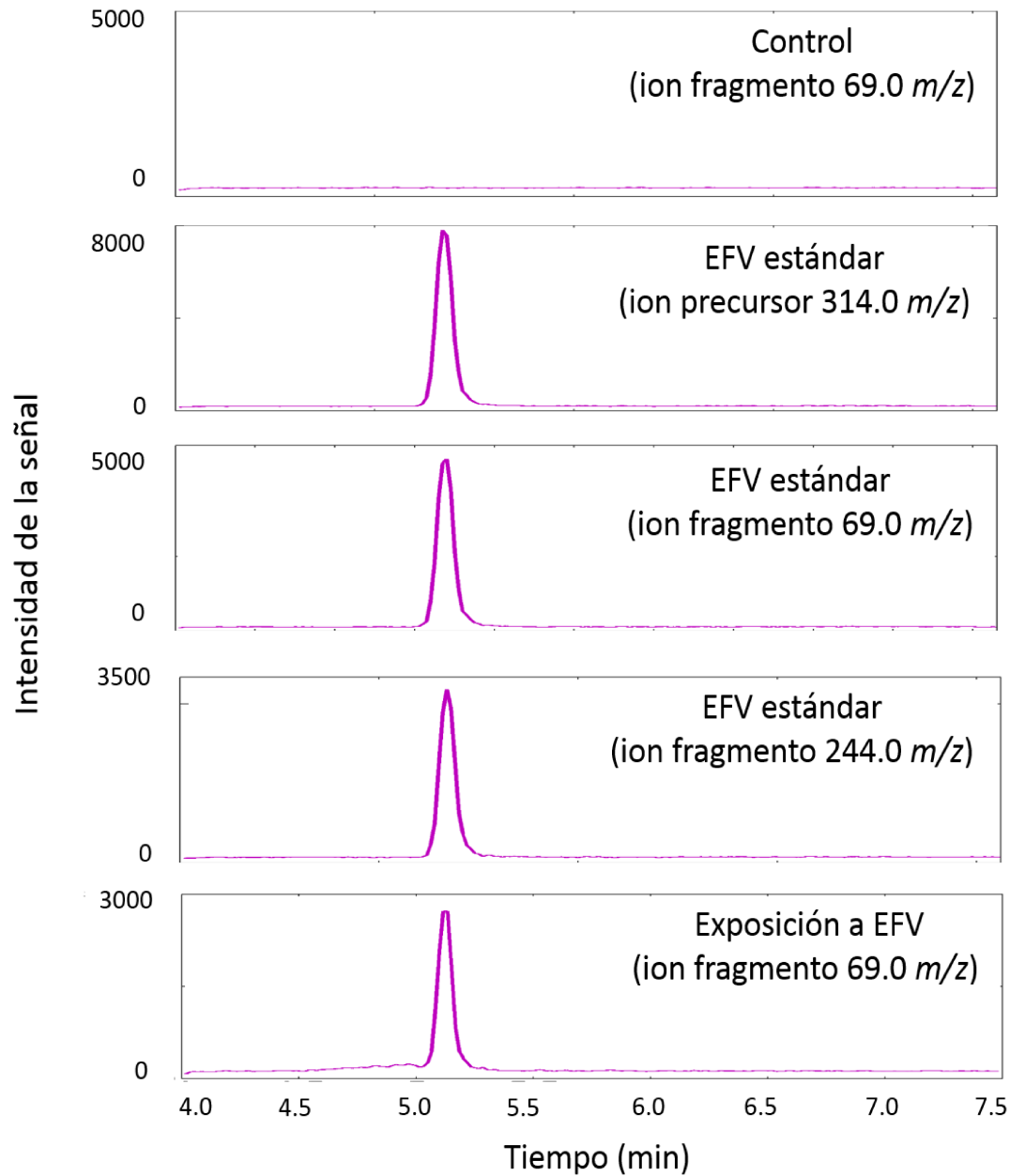
En las Figs. 31 y 32 se muestran los perfiles cromatográficos de los iones precursores y fragmentos obtenidos para los estándares de ABC y EFV, respectivamente, así como los perfiles cromatográficos de los iones fragmentos de mayor sensibilidad empleados en la cuantificación de estos ARVs. Como puede observarse, se identificaron ambos ARVs en los renacuajos expuestos a estas drogas, los que fueron inequívocamente identificados a partir de la similitud de los tiempos de retención de los iones de confirmación de estas

muestras con respecto a los estándares. De igual manera, se evidenció la ausencia de estos ARVs en los renacuajos controles, así como interferencias pertenecientes a la matriz de los renacuajos.



**Figura 31.** Perfil cromatográfico obtenido por UHPLC-MS/MS para una solución estándar de  $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$  ABC (ion precursor e iones fragmentos), y matriz de renacuajo antes y después de exposición a ABC (ion fragmento empleado en la cuantificación).





**Figura 32.** Perfil cromatográfico obtenido por UHPLC-MS/MS para una solución estándar de  $50.0 \mu\text{g L}^{-1}$  EFV (ion precursor e iones fragmentos), y matriz de renacuajo antes y después de exposición a EFV (ion fragmento empleado en la cuantificación).



La Tabla 27 muestra las concentraciones absorbidas por los renacuajos durante el estudio de exposición a concentraciones ambientales, así como los BCFs obtenidos. Es importante señalar que debido a las bajas concentraciones de ARVs absorbidos por los renacuajos y teniendo en cuenta los LOD y LOQ alcanzados por esta metodología, las muestras fueron previamente pre-concentradas empleando los factores informados en la Tabla 27.

**Tabla 27.** Concentraciones de ABC y EFV absorbidos por los renacuajos a niveles de exposición ambientales

Concentración nominal en agua ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	ABC <sup>a</sup>			EFV <sup>a</sup>		
	Conc. ( $\text{ng g}^{-1}$ )	FP <sup>b</sup>	BCF( $\text{mL g}^{-1}$ )	Conc. ( $\text{ng g}^{-1}$ )	FP <sup>b</sup>	BCF( $\text{mL g}^{-1}$ )
Control	ND <sup>c</sup>			ND <sup>c</sup>		
0.5	0.04 (6) <sup>d</sup>	40	0.08 (3)	3.3 (6)	40	4.1 (2)
1.0	0.10 (7) <sup>d</sup>			4.7 (7)		
10.0	0.45 (6)			36 (2)	20	

<sup>a</sup> La desviación estándar experimental se muestra en la última cifra significativa entre paréntesis

<sup>b</sup> Factor de preconcentración

<sup>c</sup> No detectable

<sup>d</sup> Detectable pero no cuantificable

Los resultados obtenidos en la Tabla 27 muestran incrementos en las concentraciones absorbidas por los renacuajos dependientes de los niveles de exposición, de manera similar a los resultados obtenidos para el estudio de toxicidad aguda a concentraciones subletales. Durante este estudio, el EFV fue el analito que mostró mayores niveles de bioacumulación ( $3.3\text{--}36.0 \text{ ng g}^{-1}$ ), sugiriéndose una alta permeabilidad de este analito incluso a concentraciones de exposición muy bajas, lo que podría correlacionarse con la elevada lipofilicidad de esta molécula ( $\log P=5.4$ ) (ver Tabla 1). Para el caso del ABC, se observó que esta droga es débilmente absorbida en comparación con el EFV, lo que podría sugerir una menor permeabilidad para atravesar las barreras lipídicas de la piel de los renacuajos. Es importante destacar, en este punto, que si se observa el valor de  $\log P$  de ABC (1.6) descrito en la Tabla 1, podría esperarse una mayor absorción por parte de los renacuajos. No obstante, tal como se explicó anteriormente, en el caso de drogas farmacéuticas polares es probable que otros mecanismos, tales como interacciones de unión al receptor o diferencias en las tasas de biotransformación, estén también involucrados en su acumulación en organismos acuáticos.

Por otro lado, los valores de BCF obtenidos mostraron bioacumulación incluso en las bajas concentraciones de exposición evaluadas. En especial para el caso de EFV, estos resultados podrían considerarse alarmantes, dado que las concentraciones evaluadas son representativas de la ocurrencia de este ARV en el ambiente. Como se mencionó anteriormente, en la literatura existen escasos estudios relacionados con la presencia de ARVs en organismos acuáticos. Swanepoel y col. detectaron ABC y EFV en niveles de 36 ng L<sup>-1</sup> y 135 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente, en plasma de *Clarias gariepinus* [36]. Por otro lado, Robson y col. estudiaron las consecuencias de las exposiciones agudas a niveles ambientales en peces (*Oreochromis mossambicus*) detectando daño hepático que incluyó esteatosis y necrosis [38].

Por consiguiente, los resultados obtenidos corroboran el riesgo de bioacumulación potencial que representan estos ARVs en organismos acuáticos, en particular el EFV, por sus altos niveles de bioacumulación y posibles efectos nocivos asociados. Es importante destacar el hecho de que este estudio involucró concentraciones ambientalmente relevantes, por lo que las implicancias asociadas a la presencia de EFV en aguas superficiales son preocupantes. Además, es importante considerar que estos estudios contemplaron la respuesta frente a exposición aguda (96 h), y que los organismos acuáticos pueden encontrarse expuestos crónicamente a estos niveles de ARVs durante su ciclo de vida. Esto último, por lo tanto, representaría una cuestión de riesgo ambiental que debería ser particularmente investigada en estudios posteriores.

## 3.5. Conclusiones

El presente estudio permitió la determinación de la bioacumulación de los ARVs en renacuajos *R. arenarum* en dos ensayos de toxicidad aguda en niveles de exposición subletales y ambientales, así como la evaluación de los efectos toxicológicos para los ARVs expuestos a concentraciones subletales (3TC, d4T, AZT y NVP) a través de la evaluación de biomarcadores enzimáticos.

Con el objetivo de determinar la bioacumulación de estas drogas en los renacuajos, se desarrollaron dos metodologías de cuantificación, considerando los niveles de exposición y los niveles de sensibilidad requeridos para determinar la concentración absorbida por los renacuajos. En este sentido, se empleó UHPLC-DAD para determinar 3TC, d4T, AZT y NVP y UHPLC-MS/MS para cuantificar ABC y EFV. Para el caso de 3TC se utilizó el algoritmo quimiométrico MCR-ALS como herramienta complementaria de cálculo,

demostrándose una vez más la habilidad de MCR-ALS para discriminar compuestos con iguales tiempos de retención cromatográficos basándose en sus diferencias espectrales. Esto último, avala, por lo tanto, su uso en la cuantificación de analitos específicos en matrices altamente complejas. Para el caso de ABC y EFV, se optimizaron previamente las condiciones experimentales de la metodología de UHPLC-MS/MS mediante diseño experimental, obteniéndose incrementos en los niveles de sensibilidad para ambos analitos, y alcanzándose límites de detección y cuantificación apropiados. Por consiguiente, se evidenciaron nuevamente las potencialidades del diseño experimental a partir de la metodología de superficie de respuesta en la maximización de las respuestas, con un número reducido de experimentos y, por lo tanto, con menor consumo de solventes.

Los resultados obtenidos para cada uno de los analitos permitió sugerir que estos ARVs podrían ser potencialmente bioacumulados en renacuajos *R. arenarum*. La NVP y el EFV, en particular, poseen las mayores probabilidades de ser bioacumulados por parte de estos organismos acuáticos. Es importante remarcar en este punto, que los altos niveles de bioacumulación obtenidos para EFV deberían constituir una alarma para la comunidad científica, teniendo en cuenta que los niveles de exposición evaluados se encuentran en un rango de concentraciones detectadas en el ambiente, lo que indica la potencialidad que tiene esta droga de ser absorbida por organismos acuáticos *non-target* en el lapso de días.

Adicionalmente, para el estudio de niveles de exposición subletales se evaluaron los efectos toxicológicos de 3TC, d4T, AZT y NVP empleando los biomarcadores enzimáticos AChE y GST, obteniéndose solamente cambios significativos para la enzima GST con respecto a los organismos controles sin exposición a ARVs. Estos resultados estuvieron en correspondencia con los obtenidos para bioacumulación, lo que demuestra la relación entre la bioacumulación de estos ARVs y la inducción de indicadores del sistema antioxidante, con el posterior cambio en la actividad de la enzima GST. Por lo tanto, a partir de este estudio puede concluirse que la presencia de ARVs en ecosistemas acuáticos podría ocasionar su absorción y bioacumulación por parte de organismos *non-target*, tales como los renacuajos, y que la inducción de GST constituye un mecanismo de defensa de estos organismos para disminuir, en alguna medida, una mayor bioacumulación. Además, la GST mostró ser un biomarcador enzimático que puede ser utilizado para monitorear el estrés químico generado por la exposición a ARVs en renacuajos.

# ***CONCLUSIONES GENERALES***

***“La ciencia más útil es aquella cuyo  
fruto es el más comunicable”***

***Leonardo da Vinci***

Los resultados obtenidos en la presente tesis ponen en evidencia la importancia que reviste el desarrollo de metodologías para la determinación de contaminantes emergentes, tales como los antirretrovirales en ambientes acuáticos y en muestras biológicas, así como las consecuencias en términos de bioacumulación y toxicidad que ocasiona la presencia de estos fármacos en el ambiente para organismos acuáticos *non-target*.

La caracterización inicial de las moléculas en estudio constituyó un paso de vital importancia para el conocimiento de las principales propiedades de las drogas. En este sentido, es importante destacar que la alternativa empleada para el cálculo de las constantes de disociación a partir del empleo del algoritmo quimiométrico MCR-ALS resultó una excelente estrategia, ya que permitió, además de determinar el  $pK_a$ , la obtención de información relacionada con los perfiles espectrales y distribución de las especies involucradas en el equilibrio ácido-base. Cabe destacar que esta última información resulta de mucha utilidad en la predicción de permeabilidad a través de las barreras lipídicas. Otro hallazgo significativo encontrado durante la caracterización de estas moléculas fue el segundo valor de  $pK_a$  obtenido para NVP, que no se encontraba informado en la literatura científica.

Por otro lado, el desarrollo de las metodologías analíticas para la determinación de ARVs en muestras ambientales de agua se llevó a cabo considerando las diferentes propiedades de las moléculas. En este sentido, se evaluaron dos estrategias de cuantificación: la primera de ellas basada en las propiedades ácido-base de las moléculas, y la segunda contemplando las propiedades de fluorescencia inducidas por irradiación UV. Además, se desarrollaron dos estrategias analíticas para determinar las concentraciones absorbidas de ARVs por parte de organismos acuáticos *non-target*, empleando separación cromatográfica a partir de UHPLC-DAD y UHPLC-MS/MS. En todas las metodologías analíticas desarrolladas, excepto para UHPLC-MS/MS, se emplearon algoritmos quimiométricos como herramientas complementarias, que permitieron el procesamiento de señales solapadas, y, por lo tanto, la discriminación del analito de interés en matrices altamente complejas, como lo son las muestras ambientales de agua y las muestras biológicas. Los resultados obtenidos avalan la gran habilidad predictiva de los modelos generados, poniéndose en evidencia que representan una alternativa muy útil y confiable para el monitoreo de ARVs y estudios de bioacumulación y toxicidad en muestras complejas.

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de metodologías analíticas es lograr las condiciones experimentales óptimas que permitan obtener la respuesta deseada. En este sentido, el empleo de diseño experimental utilizando la metodología de la superficie de respuesta jugó un papel clave desde el punto de vista de la optimización de las condiciones experimentales para conseguir una respuesta máxima, así como una reducción notable de los tiempos dedicados al desarrollo de los métodos analíticos.

Durante el transcurso de esta tesis se comprobó exhaustivamente el empleo de algoritmos quimiométricos como herramientas eficientes de análisis, demostrándose su utilidad para predecir con elevada exactitud y precisión las concentraciones de analitos específicos, incluso ante la presencia de interferentes desconocidos en matrices complejas. Adicionalmente, los resultados obtenidos expusieron como la introducción de modos extras en las matrices de datos conllevan a mejoras de sensibilidad, así como de límites de detección y cuantificación. En este sentido, es importante remarcar la potencialidad que representa la adquisición de datos de orden superior para lograr mayores niveles de sensibilidad y, por consiguiente, mejores niveles de detección y cuantificación del analito de interés.

Con respecto, a los posibles impactos negativos de los ARVs en organismos acuáticos, quedó demostrada la bioacumulación potencial de estas drogas, especialmente para el caso de NVP y EFV, esta última altamente absorbida por los renacuajos, incluso a concentraciones ambientales, así como las consecuencias a nivel de toxicidad. Estos efectos a nivel toxicológico solamente se manifestaron a partir de incrementos en la enzima GST, no ocurriendo así para la enzima AchE, la cual parece no ser afectada por estos fármacos. Cabe destacar que estos aumentos en la actividad de la enzima GST presuponen más allá de una respuesta al estrés oxidativo, un mecanismo de defensa antioxidante, que se activa en la célula al reconocer compuestos tóxicos. Por lo tanto, constituye una línea de defensa celular que permite reducir en alguna medida los niveles de bioacumulación en organismos acuáticos. En este sentido, la enzima GST podría sugerirse, por lo tanto, como un biomarcador de contaminación ambiental por ARVs en organismos acuáticos *non-target*, tales como los renacuajos y especies simpátricas.

De manera global, las estrategias analíticas desarrolladas en la presente tesis constituyen metodologías sencillas, sensibles y con equipamientos de relativamente fácil adquisición, que podrían ser empleadas para monitorear la ocurrencia de estas drogas en el ambiente, lo cual resultaría especialmente eficaz en países del continente africano, con alta incidencia de VIH y, por consiguiente, mayor vertimiento de ARVs al ambiente. En

este sentido, es importante tener en cuenta que, aunque los niveles ambientales de estas drogas se encuentran en el orden de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , son continuamente descargados en los ecosistemas acuáticos, lo que representa una situación de exposición crónica para los organismos que los habitan, que podría conducir a la bioacumulación potencial de estas drogas con consecuentes efectos ecotoxicológicos.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las consecuencias negativas que ocasionan los ARVs en ecosistemas acuáticos, y que esta situación podría generar resistencia viral a los únicos fármacos desarrollados para el tratamiento del VIH, resulta vital la generación de una concientización global desde el punto de vista social, que involucre a profesionales de la salud, comunidad científica, productores de medicamentos, organismos gubernamentales y sociedad en general, a partir del establecimiento de regulaciones que permitan el control de las descargas ambientales de estas drogas. Además, sería importante contar con el apoyo y la infraestructura necesaria para el desarrollo de tecnologías y/o procesos eficientes para la remoción de estos ARVs en las plantas de tratamientos de aguas residuales.

# ***BIBLIOGRAFÍA***



- [1] HC Poynton, WE Robinson (2018) Chapter 3.7 - Contaminants of Emerging Concern, With an Emphasis on Nanomaterials and Pharmaceuticals. En: *Green Chemistry*, Elsevier, p. 291-315.
- [2] NJ Morley (2009) Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships. *Environ Toxicol Pharm* 27 (2):161-175.
- [3] X Peng, C Wang, K Zhang, Z Wang, Q Huang, Y Yu, W Ou (2014) Profile and behavior of antiviral drugs in aquatic environments of the Pearl River Delta, China. *Sci Total Environ* 466-467:755-761.
- [4] TP Wood, CSJ Duvenage, E Rohwer (2015) The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. *Environ Pollut* 199:235-243.
- [5] I Usach, V Melis, J-E Peris (2013) Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review on pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability. *J Int AIDS Soc* 16 (1):1-14.
- [6] A Yilmaz, V Watson, L Dickinson, D Back (2012) Efavirenz pharmacokinetics in cerebrospinal fluid and plasma over a 24-hour dosing interval. *Antimicrob Agents Chemother* 56 (9):4583-4585.
- [7] UNAIDS (2019) Global HIV & AIDS statistics — 2019 fact sheet (<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>). (accessed July 2019).
- [8] AMN Tsibris, MS Hirsch (2015) 130 - Antiretroviral Therapy for Human Immunodeficiency Virus Infection. En: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, Philadelphia, p. 1622-1641.e1626.
- [9] MJ Bebianno, M Gonzalez-Rey (2015) Chapter 16 - Ecotoxicological Risk of Personal Care Products and Pharmaceuticals. En: *Aquatic Ecotoxicology*, Academic Press, p. 383-416.
- [10] T Cihlar, AS Ray (2010) Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antivir Res* 85 (1):39-58.
- [11] J Fick, RH Lindberg, M Tysklind, DGJ Larsson (2010) Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharm* 58 (3):516-523.
- [12] BJ Eckhardt, RM Gulick (2017) 152 - Drugs for HIV Infection. En: *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, Elsevier, p. 1293-1308.e1292.
- [13] AMN Tsibris, MS Hirsch (2010) Antiretroviral Therapy in the Clinic. *J Virol* 84 (11):5458.
- [14] K Kummerer (2009) The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use--present knowledge and future challenges. *J Environ Manage* 90 (8):2354-2366.
- [15] S Ncube, LM Madikizela, L Chimuka, MM Nindi (2018) Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives. *Water Res* 145:231-247.
- [16] J Funke, C Prasse, TA Ternes (2016) Identification of transformation products of antiviral drugs formed during biological wastewater treatment and their occurrence in the urban water cycle. *Water Res* 98:75-83.
- [17] C Prasse, MP Schlüsener, R Schulz, TA Ternes (2010) Antiviral Drugs in Wastewater and Surface Waters: A New Pharmaceutical Class of Environmental Relevance? *Environ Sci Technol* 44 (5):1728-1735.

- [18] H Sanderson, DJ Johnson, T Reitsma, RA Brain, CJ Wilson, KR Solomon (2004) Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. *Regul Toxicol Pharm* : 39 (2):158-183.
- [19] AJ Ebele, M Abou-Elwafa Abdallah, S Harrad (2017) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg Contam* 3 (1):1-16.
- [20] S Jain, P Kumar, RK Vyas, P Pandit, AK Dalai (2013) Occurrence and Removal of Antiviral Drugs in Environment: A Review. *Water Air Soil Poll* 224 (2).
- [21] OA Afafe, J Späth, J Fick, S Jansson, C Buckley, A Stark, B Pietruschka, BS Martincigh (2018 ) LC-MS/MS determination of antiretroviral drugs in influents and effluents from wastewater treatment plants in KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere*: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.1002.1105> (in press).
- [22] KO K'Oreje, L Vergeynst, D Ombaka, P De Wispelaere, M Okoth, H Van Langenhove, K Demeestere (2016) Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. *Chemosphere* 149:238-244.
- [23] E Ngumba, A Gachanja, T Tuhkanen (2016) Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi River Basin, Kenya. *Sci Total Environ* 539:206-213.
- [24] C Rimayi, D Odusanya, JM Weiss, J de Boer, L Chimuka (2018) Contaminants of emerging concern in the Hartbeespoort Dam catchment and the uMngeni River estuary 2016 pollution incident, South Africa. *Sci Total Environ* 627:1008-1017.
- [25] C Schoeman, M Dlamini, OJ Okonkwo (2017) The impact of a Wastewater Treatment Works in Southern Gauteng, South Africa on efavirenz and nevirapine discharges into the aquatic environment. *Emerg Contam* 3 (2):95-106.
- [26] Y Aminot, X Litrico, M Chambolle, C Arnaud, P Pardon, H Budzinski (2015) Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water, sediment, and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 407 (28):8585-8604.
- [27] OA Afafe, J Spath, J Fick, S Jansson, C Buckley, A Stark, B Pietruschka, BS Martincigh (2018) LC-MS/MS determination of antiretroviral drugs in influents and effluents from wastewater treatment plants in KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere* 200:660-670.
- [28] IJ Fisher, PJ Phillips, KM Colella, SC Fisher, T Tagliaferri, WT Foreman, ET Furlong (2016) The impact of onsite wastewater disposal systems on groundwater in areas inundated by Hurricane Sandy in New York and New Jersey. *Mar Pollut Bull* 107 (2):509-517.
- [29] E Ngumba, P Kosunen, A Gachanja, T Tuhkanen (2016) A multiresidue analytical method for trace level determination of antibiotics and antiretroviral drugs in wastewater and surface water using SPE-LC-MS/MS and matrix-matched standards. *Anal Methods* 8 (37):6720-6729.
- [30] ST Glassmeyer, ET Furlong, DW Kolpin, AL Batt, R Benson, JS Boone, O Conerly, MJ Donohue, DN King, MS Kostich, HE Mash, SL Pfaller, KM Schenck, JE Simmons, EA Varughese, SJ Vesper, EN Villegas, VS Wilson (2017) Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States. *Sci Total Environ* 581-582:909-922.
- [31] JR Masoner, DW Kolpin, ET Furlong, IM Cozzarelli, JL Gray, EA Schwab (2014) Contaminants of emerging concern in fresh leachate from landfills in the conterminous United States. *Environ Sci Process Impacts* 16 (10):2335-2354.

- [32] CP Woodbury (2012) *Biochemistry for the Pharmaceutical Sciences*. Jones and Bartlett Learning, Ontario, Canada.
- [33] M Wooding, ER Rohwer, Y Naudé (2017) Determination of endocrine disrupting chemicals and antiretroviral compounds in surface water: A disposable sorptive sampler with comprehensive gas chromatography – Time-of-flight mass spectrometry and large volume injection with ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1496:122-132.
- [34] PK Jjemba (2006) Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotox Environ Safe* 63 (1):113-130.
- [35] TM Murray (2014) PBT (Persistent, Bioaccumulative, and Toxic) Chemicals. En: *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, Oxford, p. 762-764.
- [36] C Swanepoel, H Bouwman, R Pieters, C Bezuidenhout (2015) Presence, concentrations and potential implications of hiv-anti-retrovirals in selected water resources in South Africa. WRC Report No 2144/1/14. *Water Research Commission*.
- [37] C Rimayi, D Odusanya, JM Weiss, J de Boer, L Chimuka (2018) Contaminants of emerging concern in the Hartbeespoort Dam catchment and the uMngeni River estuary 2016 pollution incident, South Africa. *Sci Total Environ* 627:1008-1017.
- [38] L Robson, IEJ Barnhoorn, GM Wagenaar (2017) The potential effects of efavirenz on *Oreochromis mossambicus* after acute exposure. *Environ Toxicol Pharmacol* 56:225-232.
- [39] S Mas, A de Juan, R Tauler, AC Olivieri, GM Escandar (2010) Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review. *Talanta* 80 (3):1052-1067.
- [40] DL Massart, BGM Vandeginste, LMC Buydens, S De Jong, PJ Lewi, J Smeyers-Verbeke (1998). En: *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier.
- [41] L Paradina Fernández, R Brasca, MR Alcaráz, MJ Culzoni (2018) High-throughput chemometrically assisted flow-injection method for the simultaneous determination of multi-antiretrovirals in water. *Microchem J* 141:80-86.
- [42] MR Alcaraz, L Vera-Candioti, MJ Culzoni, HC Goicoechea (2014) Ultrafast quantitation of six quinolones in water samples by second-order capillary electrophoresis data modeling with multivariate curve resolution-alternating least squares. *Anal Bioanal Chem* 406 (11):2571-2580.
- [43] GM Escandar, AC Olivieri, NM Faber, HC Goicoechea, A Muñoz de la Peña, RJ Poppi (2007) Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *TrAC Trend Anal Chem* 26 (7):752-765.
- [44] AC Olivieri, GM Escandar (2014) Chapter 2 - Data Properties. En: *Practical Three-Way Calibration*, Elsevier, Boston, p. 11-26.
- [45] X-H Zhang, X-D Qing, H-L Wu (2019) Discussion on the superiority of third-order advantage: Analytical application for four-way data in complex system. *Microchem J* 145:1078-1085.
- [46] AC Olivieri (2014) Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration. *Chem Rev* 114 (10):5358-5378.
- [47] AC Olivieri, GM Escandar (2014) Chapter 3 - Experimental Three-way/Second-order Data. En: *Practical Three-Way Calibration*, Elsevier, Boston, p. 27-45.
- [48] J Saurina (2010) Flow-injection analysis for multi-component determinations of drugs based on chemometric approaches. *TrAC Trend Anal Chem* 29 (9):1027-1037.

- [49] GM Escandar, HC Goicoechea, A Muñoz de la Peña, AC Olivieri (2014) Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial. *Anal Chim Acta* 8 806:8-26.
- [50] R Bro (1997) PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemom Intell Lab Syst* 38 (2):149-171.
- [51] R Tauler (1995) Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom Intell Lab Syst* 30 (1):133-146.
- [52] N Kumar, A Bansal, GS Sarma, RK Rawal (2014) Chemometrics tools used in analytical chemistry: an overview. *Talanta* 123:186-199.
- [53] W Windig, J Guilment (1991) Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal Chem* 63 (14):1425-1432.
- [54] A de Juan, SC Rutan, R Tauler (2009) 2.19 - Two-Way Data Analysis: Multivariate Curve Resolution – Iterative Resolution Methods. En: *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, p. 325-344.
- [55] R Tauler, M Maeder, A de Juan (2009) 2.24 - Multiset Data Analysis: Extended Multivariate Curve Resolution. En: *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, p. 473-505.
- [56] RB Martí, JF Baldrich (2015) Chapter 1 - Fundamentals of PARAFAC. En: *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier, p. 7-35.
- [57] MC Ortiz, LA Sarabia, MS Sánchez, A Herrero, S Sanllorente, C Reguera (2015) Chapter 2 - Usefulness of PARAFAC for the Quantification, Identification, and Description of Analytical Data. En: *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier, p. 37-81.
- [58] AC Olivieri, GM Escandar (2014) Chapter 6 - Analytical Figures of Merit. En: *Practical Three-Way Calibration*, Elsevier, Boston, p. 93-107.
- [59] MC Bauza, GA Ibanez, R Tauler, AC Olivieri (2012) Sensitivity equation for quantitative analysis with multivariate curve resolution-alternating least-squares: theoretical and experimental approach. *Anal Chem* 84 (20):8697-8706.
- [60] D Robinson (2006) Statistical Design: Chemometrics By R. E. Bruns, I. S. Scaramino, and B. De Barros Neto. Elsevier: Amsterdam. *Organic Process Research & Development* 10 (5):1082-1083.
- [61] MA Bezerra, RE Santelli, EP Oliveira, LS Villar, LA Escaleira (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76 (5):965-977.
- [62] MM Pandey, A Jaipal, A Kumar, R Malik, SY Charde (2013) Determination of pKa of felodipine using UV–Visible spectroscopy. *Spectrochim Acta Part A* 115:887-890.
- [63] CM Teglia, PM Peltzer, SN Seib, RC Lajmanovich, MJ Culzoni, HC Goicoechea (2017) Simultaneous multi-residue determination of twenty one veterinary drugs in poultry litter by modeling three-way liquid chromatography with fluorescence and absorption detection data. *Talanta* 167:442-452.
- [64] C Lin, J Fan, W-n Liu, Y Tan, W-g Zhang (2014) Comparative HPLC enantioseparation on substituted phenylcarbamoylated cyclodextrin chiral stationary phases and mobile phase effects. *J Pharm Biomed Anal* 98:221-227.
- [65] P Nowak, M Garnysz, MP Mitoraj, F Sagan, M Woźniakiewicz, P Kościelniak (2015) Analytical aspects of achiral and cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis of warfarin and its two main derivatives assisted by theoretical modeling. *J Chromatogr A* 1377:106-113.
- [66] Y Yang, RI Boysen, J Chowdhury, A Alam, MTW Hearn (2015) Analysis of peptides and protein digests by reversed phase high performance liquid chromatography–

electrospray ionisation mass spectrometry using neutral pH elution conditions. *Anal Chim Acta* 872:84-94.

[67] M Torbati, MA Farajzadeh, M Torbati, AAA Nabil, A Mohebbi, MR Afshar Mogaddam (2018) Development of salt and pH-induced solidified floating organic droplets homogeneous liquid-liquid microextraction for extraction of ten pyrethroid insecticides in fresh fruits and fruit juices followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 176:565-572.

[68] A Roda, C Cerre, AC Manetta, G Cainelli, A Umani-Ronchi, M Panunzio (1996) Synthesis and physicochemical, biological, and pharmacological properties of new bile acids amidated with cyclic amino acids. *J Med Chem* 39 (11):2270-2276.

[69] D Chantasart, S Chootanasoontorn, J Suksiriworapong, S Kevin Li (2015) Investigation of pH Influence on Skin Permeation Behavior of Weak Acids Using Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *J Pharm Sci* 104 (10):3459-3470.

[70] AR Ribeiro, TC Schmidt (2017) Determination of acid dissociation constants (pKa) of cephalosporin antibiotics: Computational and experimental approaches. *Chemosphere* 169:524-533.

[71] F Wohnsland, B Faller (2001) High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J Med Chem* 44 (6):923-930.

[72] J Neuwoehner, BI Escher (2011) The pH-dependent toxicity of basic pharmaceuticals in the green algae *Scenedesmus vacuolatus* can be explained with a toxicokinetic ion-trapping model. *Aquat Toxicol* 101 (1):266-275.

[73] GG Anskjær, C Rendal, KO Kusk (2013) Effect of pH on the toxicity and bioconcentration of sulfadiazine on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 91 (8):1183-1188.

[74] R Kodešová, R Grabic, M Kočárek, A Klement, O Golovko, M Fér, A Nikodem, O Jakšík (2015) Pharmaceuticals' sorptions relative to properties of thirteen different soils. *Sci Total Environ* 511:435-443.

[75] M Kobayashi, S Kurosu, R Yamaguchi, Y Kawase (2017) Removal of antibiotic sulfamethoxazole by zero-valent iron under oxic and anoxic conditions: Removal mechanisms in acidic, neutral and alkaline solutions. *J Environ Manage* 200:88-96.

[76] H Hamid, C Eskicioglu (2012) Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Res* 46 (18):5813-5833.

[77] MR Alcaráz, AV Schenone, MJ Culzoni, HC Goicoechea (2014) Modeling of second-order spectrophotometric data generated by a pH-gradient flow injection technique for the determination of doxorubicin in human plasma. *Microchem J* 112:25-33.

[78] V Pilařová, M Sultani, KS Ask, L Nováková, S Pedersen-Bjergaard, A Gjelstad (2017) One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction. *J Chromatogr B* 1043:25-32.

[79] H Xu, H-Y Mi, M-M Guan, H-Y Shan, Q Fei, Y-F Huan, Z-Q Zhang, G-D Feng (2017) Residue analysis of tetracyclines in milk by HPLC coupled with hollow fiber membranes-based dynamic liquid-liquid micro-extraction. *Food Chem* 232:198-202.

[80] A Roda, C Cerre, AC Manetta, G Cainelli, A Umani-Ronchi, M Panunzio (1996) Synthesis and physicochemical, biological, and pharmacological properties of new bile acids amidated with cyclic amino acids. *J Med Chem* 39 (11):2270-2276.

[81] F Wohnsland, B Faller (2001) High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J Med Chem* 44 (6):923-930.



- [82] I Ghosh, WM Nau (2012) The strategic use of supramolecular pK(a) shifts to enhance the bioavailability of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 64 (9):764-783.
- [83] Z Miskolczy, M Megyesi, G Tarkanyi, R Mizsei, L Biczok (2011) Inclusion complex formation of sanguinarine alkaloid with cucurbit[7]uril: inhibition of nucleophilic attack and photooxidation. *Org Biomol Chem* 9 (4):1061-1070.
- [84] A Smith-Kielland, B Skuterud, J Morland (1997) Urinary excretion of amphetamine after termination of drug abuse. *J Anal Toxicol* 21 (5):325-329.
- [85] T Huang, L Yan, S Zheng, Y Wang, X Wang, L Fan, C Li, Y Zhao, CJ Martyniuk (2017) Discriminating modes of toxic action in mice using toxicity in BALB/c mouse fibroblast (3T3) cells. *Chemosphere*.
- [86] K Matyjaszczyk, M Kolonko, A Gonciarz-Dytman, I Oszczapowicz, M Lukawska, W Jawien, S Chlopicki, M Walczak (2017) Effects of structural modification of the daunosamine moiety of anthracycline antibiotics on pKa values determined by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1060:44-52.
- [87] CM Teglia, R Brasca, L Vera-Candiotti, HC Goicoechea (2016) A novel approach based on capillary electrophoresis coupled to augmented multivariate curve resolution-alternating least-squares modeling for the determination of pKa of 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine in nicarbazin. *Chemom Intell Lab Syst* 150:1-8.
- [88] J Bezencon, MB Wittwer, B Cutting, M Smiesko, B Wagner, M Kansy, B Ernst (2014) pKa determination by (1)H NMR spectroscopy - an old methodology revisited. *J Pharm Biomed Anal* 93:147-155.
- [89] P Keša, M Antalík (2017) Determination of pKa constants of hypericin in aqueous solution of the anti-allergic hydrotropic drug Cromolyn disodium salt. *Chem Phys Lett* 676:112-117.
- [90] K Musil, V Florianova, P Bucek, V Dohnal, K Kuca, K Musilek (2016) Development and validation of a FIA/UV-vis method for pK(a) determination of oxime based acetylcholinesterase reactivators. *J Pharm Biomed Anal* 117:240-246.
- [91] T Volna, K Motyka, J Hlavac (2017) RP-HPLC determination of dissociation constant using solely aqueous mobile phase. *J Pharm Biomed Anal* 134:143-148.
- [92] L Kubik, W Struck-Lewicka, R Kaliszan, P Wiczling (2015) Simultaneous determination of hydrophobicity and dissociation constant for a large set of compounds by gradient reverse phase high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Chromatogr A* 1416:31-37.
- [93] A Checa, VG Soto, S Hernández-Cassou, J Saurina (2005) Fast determination of pKa values of reverse transcriptase inhibitor drugs for AIDS treatment by using pH-gradient flow-injection analysis and multivariate curve resolution. *Anal Chim Acta* 554 (1):177-183.
- [94] KA Hasselbalch (1916) Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes aus der freien und gebundenen Kohlensäure desselben, und die Sauerstoffbindung des Blutes als Funktion der Wasserstoffzahl. *Biochem Z* 78:112-144.
- [95] FCL Luiz, SRW Louro (2011) Acid-base equilibrium of drugs in time-resolved fluorescence measurements: Theoretical aspects and expressions for apparent pKa shifts. *J Photochem Photobiol A* 222 (1):10-15.
- [96] H-J Lin, P Herman, JS Kang, JR Lakowicz (2001) Fluorescence Lifetime Characterization of Novel Low-pH Probes. *Anal Biochem* 294 (2):118-125.

- [97] P Barták, D Pěchová, P Tarkowski, P Bednář, M Kotouček, Z Stránský, R Vespašec (2000) Determination of the first dissociation constant of 6-benzylaminopurine: A comparison of methods. *Anal Chim Acta* 421 (2):221-229.
- [98] R Gargallo, M Vives, R Tauler, R Eritja (2001) Protonation Studies and Multivariate Curve Resolution on Oligodeoxynucleotides Carrying the Mutagenic Base 2-Aminopurine. *Biophys J* 81 (5):2886-2896.
- [99] M Mirzaei, M Khayat, A Saeidi (2012) Determination of para-aminobenzoic acid (PABA) in B-complex tablets using the Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) method. *Sci Iran* 19 (3):561-564.
- [100] JC Esteves da Silva, R Tauler (2006) Multivariate curve resolution of synchronous fluorescence spectra matrices of fulvic acids obtained as a function of pH. *Appl Spectrosc* 60 (11):1315-1321.
- [101] AD Kashuba, JR Dyer, LM Kramer, RH Raasch, JJ Eron, MS Cohen (1999) Antiretroviral-drug concentrations in semen: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 43 (8):1817-1826.
- [102] SA Teijeiro, MA Raviolo, MI Motura, MC Brinon (2003) 3'-Azido-3'-deoxy-5'-O-isonicotinoylthymidine: a novel antiretroviral analog of zidovudine. II. Stability in aqueous media and experimental and theoretical ionization constants. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22 (9):1789-1803.
- [103] M Shalaeva, J Kenseth, F Lombardo, A Bastin (2008) Measurement of dissociation constants (pKa values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers. *J Pharm Sci* 97 (7):2581-2606.
- [104] SR Rabel, MB Maurin, SM Rowe, M Hussain (1996) Determination of the pKa and pH-Solubility Behavior of an Ionizable Cyclic Carbamate, (S)-6-Chloro-4-(cyclopropylethynyl)-1,4-dihydro-4-(trifluoromethyl)-2H-3,1-benzoxazin-2-one (DMP 266). *Pharm Dev Technol* 1 (1):91-95.
- [105] A Avdeef (2017) Cocrystal solubility product analysis – Dual concentration-pH mass action model not dependent on explicit solubility equations. *Eur J Pharm Sci* 110 (Supplement C):2-18.
- [106] G Kuminek, N Rodriguez-Hornedo, S Siedler, HV Rocha, SL Cuffini, SG Cardoso (2016) How cocrystals of weakly basic drugs and acidic cofomers might modulate solubility and stability. *Chem Commun (Camb)* 52 (34):5832-5835.
- [107] MA Raviolo, MC Brinon (2011) Preformulation studies of Zidovudine derivatives: Acid dissociation constants, differential scanning calorimetry, thermogravimetry, x-ray powder diffractometry and aqueous stability studies. *Sci Pharm* 79 (3):479-491.
- [108] S Grangeiro Junior, L de Moura França, MF Pimentel, MM Albuquerque, DP de Santana, AKM Santana, JAL Souza, SS Simões (2015) A process analytical technology approach for the production of fixed-dose combination tablets of zidovudine and lamivudine using near infrared spectroscopy and chemical images. *Microchem J* 118:252-258.
- [109] ST Pynnönen, TA Tuhkanen (2014) Simultaneous detection of three antiviral and four antibiotic compounds in source-separated urine with liquid chromatography. *J Sep Sci* 37 (3):219-227.
- [110] P Mu, N Xu, T Chai, Q Jia, Z Yin, S Yang, Y Qian, J Qiu (2016) Simultaneous determination of 14 antiviral drugs and relevant metabolites in chicken muscle by UPLC-MS/MS after QuEChERS preparation. *J Chromatogr B* 1023-1024:17-23.

- [111] A Checa, R Oliver, J Saurina, S Hernández-Cassou (2006) Flow-injection spectrophotometric determination of reverse transcriptase inhibitors used for acquired immuno deficiency syndrome (AIDS) treatment. *Anal Chim Acta* 572 (1):155-164.
- [112] RL Carneiro, JW Braga, RJ Poppi, R Tauler (2008) Multivariate curve resolution of pH gradient flow injection mixture analysis with correction of the Schlieren effect. *Analyst* 133 (6):774-783.
- [113] MATLAB 7.10. (2010) The MathWorks Inc., Massachussets, USA.
- [114] J Reijenga, A van Hoof, A van Loon, B Teunissen (2013) Development of Methods for the Determination of pKa Values. *Anal Chem Insights* 8:53-71.
- [115] LEV Salgado, C Vargas-Hernandez (2014) Spectrophotometric Determination of the pKa, Isosbestic Point and Equation of Absorbance vs. pH for a Universal pH Indicator. *Am J Analyt Chem* 5:1290-1301.
- [116] MJ Culzoni, HC Goicoechea, GA Ibañez, VA Lozano, NR Marsili, AC Olivieri, AP Pagani (2008) Second-order advantage from kinetic-spectroscopic data matrices in the presence of extreme spectral overlapping: A multivariate curve resolution—Alternating least-squares approach. *Anal Chim Acta* 614 (1):46-57.
- [117] RM Izatt, JJ Christensen, JH Rytting (1971) Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interaction with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and their constituent bases, nucleosides, and and nucleotides. *Chem Rev* 71 (5):439-481.
- [118] DE Metzler, CM Metzler (2003) *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. Academic Press, New York, USA.
- [119] A Albert, DJ Brown (1954) Purine studies. Part I. Stability to acid and alkali. Solubility. Ionization. Comparison with pteridines. *J Chem Soc* (0):2060-2071.
- [120] K Gallicano (2000) Antiretroviral-drug concentrations in semen. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (4):1117-1118.
- [121] GGG de Oliveira, HG Ferraz, P Severino, EB Souto (2013) Compatibility studies of nevirapine in physical mixtures with excipients for oral HAART. *Mater Sci Eng C* 33 (2):596-602.
- [122] NJK Simpson (2000) *Solid-Phase Extraction. Principles, Techniques and Applications*. Marcel Dekker, NewYork, USA.
- [123] J Saurina, S Hernández-Cassou, R Tauler, A Izquierdo-Ridorsa (1999) Continuous-Flow and Flow Injection pH Gradients for Spectrophotometric Determinations of Mixtures of Nucleic Acid Components. *Anal Chem* 71 (11):2215-2220.
- [124] V Gómez, M Miró, MP Callao, V Cerdà (2007) Coupling of Sequential Injection Chromatography with Multivariate Curve Resolution-Alternating Least-Squares for Enhancement of Peak Capacity. *Anal Chem* 79 (20):7767-7774.
- [125] AC Olivieri, S Bortolato, F Allegrini (2015) Chapter 13 - Figures of Merit in Multiway Calibration. En: *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier, p. 541-575.
- [126] F Allegrini, AC Olivieri (2014) IUPAC-Consistent Approach to the Limit of Detection in Partial Least-Squares Calibration. *Anal Chem* 86 (15):7858-7866.
- [127] B Uslu, SA Özkan (2004) Anodic voltammetry of abacavir and its determination in pharmaceuticals and biological fluids. *Electrochim Acta* 49 (25):4321-4329.
- [128] P Courlet, D Spaggiari, M Cavassini, R Du Pasquier, S Alves Saldanha, T Buclin, C Marzolini, C Csajka, L Decosterd (2018) Determination of nucleosidic/tidic reverse transcriptase inhibitors in plasma and cerebrospinal fluid by ultra-high-pressure liquid



chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry* 8:8-20.

[129] JR Ravitch, CG Moseley (2001) High-performance liquid chromatographic assay for abacavir and its two major metabolites in human urine and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 762 (2):165-173.

[130] SR Lewis, CA White, MG Bartlett (2007) Simultaneous determination of abacavir and zidovudine from rat tissues using HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 850 (1):45-52.

[131] EM Carstea, J Bridgeman, A Baker, DM Reynolds (2016) Fluorescence spectroscopy for wastewater monitoring: A review. *Water Res* 95:205-219.

[132] VA Lozano, A Muñoz de la Peña, I Durán-Merás, A Espinosa Mansilla, GM Escandar (2013) Four-way multivariate calibration using ultra-fast high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation–emission detection. Application to the direct analysis of chlorophylls a and b and pheophytins a and b in olive oils. *Chemometr Intell Lab Syst* 125:121-131.

[133] MR Alcaráz, GG Siano, MJ Culzoni, AM de la Peña, HC Goicoechea (2014) Modeling four and three-way fast high-performance liquid chromatography with fluorescence detection data for quantitation of fluoroquinolones in water samples. *Anal Chim Acta* 809:37-46.

[134] MD Carabajal, JA Arancibia, GM Escandar (2019) Excitation-emission fluorescence-kinetic third-order/four-way data: Determination of bisphenol A and nonylphenol in food-contact plastics. *Talanta* 197:348-355.

[135] AC Olivieri, H-L Wu, R-Q Yu (2012) MVC3: A MATLAB graphical interface toolbox for third-order multivariate calibration. *Chemometr Intell Lab Syst* 116:9-16.

[136] R Bro, HAL Kiers (2003) A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *J Chemom* 17 (5):274-286.

[137] F Allegrini, AC Olivieri (2012) Analytical Figures of Merit for Partial Least-Squares Coupled to Residual Multilinearization. *Anal Chem* 84 (24):10823-10830.

[138] AC Olivieri (2015) Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Anal Chim Acta* 868:10-22.

[139] J-L Zhao, Y-S Liu, W-R Liu, Y-X Jiang, H-C Su, Q-Q Zhang, X-W Chen, Y-Y Yang, J Chen, S-S Liu, C-G Pan, G-Y Huang, G-G Ying (2015) Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a highly urbanized region. *Environ Pollut* 198:15-24.

[140] KO K'Oreje, K Demeestere, P De Wispelaere, L Vergeynst, J Dewulf, H Van Langenhove (2012) From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: Development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi River basin, Kenya. *Sci Total Environ* 437:153-164.

[141] K Ruthsatz, MA Peck, KH Dausmann, NM Sabatino, J Glos (2018) Patterns of temperature induced developmental plasticity in anuran larvae. *J Therm Biol* 74:123-132.

[142] W Zhang, Y Lu, L Huang, C Cheng, S Di, L Chen, Z Zhou, J Diao (2018) Comparison of triadimefon and its metabolite on acute toxicity and chronic effects during the early development of *Rana nigromaculata* tadpoles. *Ecotoxicol Environ Saf* 156:247-254.

[143] SD Melvin (2016) Oxidative stress, energy storage, and swimming performance of *Limnodynastes peronii* tadpoles exposed to a sub-lethal pharmaceutical mixture throughout development. *Chemosphere* 150:790-797.

- [144] JA Arnot, FAPC Gobas (2006) A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ Rev* 14 (4):257-297.
- [145] JA Arnot, S Pawlowski, S Champ (2018) A weight-of-evidence approach for the bioaccumulation assessment of triclosan in aquatic species. *Sci Total Environ* 618:1506-1518.
- [146] WH Kwok, TLS Choi, KY Kwok, GHM Chan, JKY Wong, TSM Wan (2016) Doping control analysis of 46 polar drugs in horse plasma and urine using a 'dilute-and-shoot' ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach. *J Chromatogr A* 1451:41-49.
- [147] M Safari, M Shamsipur, P Zohrabi, H Ebrahimzadeh (2019) Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction/HPLC-UV as a sensitive and efficient method for extraction, pre-concentration and simultaneous determination of antiretroviral drugs nevirapine, efavirenz and nelfinavir in pharmaceutical formulations and biological samples. *J Pharm Biomed Anal* 166:95-104.
- [148] A Valavanidis, T Vlahogianni, M Dassenakis, M Scoullou (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64 (2):178-189.
- [149] LLD Oliveira, SC Antunes, F Gonçalves, O Rocha, B Nunes (2015) Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicol Environ Saf* 119:123-131.
- [150] C Pan, M Yang, H Xu, B Xu, L Jiang, M Wu (2018) Tissue bioconcentration and effects of fluoxetine in zebrafish (*Danio rerio*) and red crucian carp (*Carassius auratus*) after short-term and long-term exposure. *Chemosphere* 205:8-14.
- [151] L Spahiu, J Ålander, A Ottosson-Wadlund, R Svensson, C Lehmer, RN Armstrong, R Morgenstern (2017) Global Kinetic Mechanism of Microsomal Glutathione Transferase 1 and Insights into Dynamic Enzyme Activation. *Biochemistry* 56 (24):3089-3098.
- [152] P Xu, L Huang (2017) Effects of  $\alpha$ -cypermethrin enantiomers on the growth, biochemical parameters and bioaccumulation in *Rana nigromaculata* tadpoles of the anuran amphibians. *Ecotoxicol Environ Saf* 139:431-438.
- [153] KL Gosner (1960) A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica* 16 (3):183-190.
- [154] GV Svartz, J Herkovits, CS Pérez-Coll (2012) Sublethal effects of atrazine on embryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology* 21 (4):1251-1259.
- [155] RC Lajmanovich, CM Junges, MC Cabagna-Zenklusen, AM Attademo, PM Peltzer, M Maglianese, VE Márquez, AJ Beccaria (2015) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. *Environ Res* 136:205-212.
- [156] AM Attademo, RC Lajmanovich, PM Peltzer, CM Junges (2016) Acute Toxicity of Metaldehyde in the Invasive Rice Snail *Pomacea canaliculata* and Sublethal Effects on Tadpoles of a Non-target Species (*Rhinella arenarum*). *Water Air Soil Poll* 227 (11):400.
- [157] B Quinn, W Schmidt, K O'Rourke, R Hernan (2011) Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere* 84 (5):657-663.
- [158] C Jenkins (1995) GR109714X: Acute Toxicity to Rainbow Trout. Pharmacology-LSR. Report No. 95/GLX173/0172

- [159] B Ingelheim (2006) Safety data sheet (Nevirapine) . GmbH internal report U99-1259
- [160] Greenstone (2009) Safety data sheet (stavudine).
- [161] H ASIH, SSAR (2011) Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research, Herpetological Animal Care and Use Committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Washington DC, USA. .
- [162] GL Ellman, KD Courtney, V Andres, RM Featherstone (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7 (2):88-95.
- [163] GR Kingbley (1942) The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual calorimetry. *J Lab Clin Med* 27:5.
- [164] WH Habig, MJ Pabst, WB Jakoby (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249 (22):7130-7139.
- [165] M Haddous, M Vincent-Viry, S Visvikis, G Siest (2002) Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clin Chim Acta* 326 (1-2):131-142.
- [166] JA Di Rienzo, F Casanoves, MG Balzarini, L Gonzalez, M Tablada, CW Robledo (2008) InfoStat versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- [167] B Slutsky (1998) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A By D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. Data Handling in Science and Technology Volume 20A. Elsevier: Amsterdam.
- [168] H Cumming, C Rücker (2017) Octanol–Water Partition Coefficient Measurement by a Simple <sup>1</sup>H NMR Method. *ACS Omega* 2 (9):6244-6249.
- [169] ME Valdés, B Huerta, DA Wunderlin, MA Bistoni, D Barceló, S Rodriguez-Mozaz (2016) Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolization by fish. *Sci Total Environ* 557-558:58-67.
- [170] R Tanoue, K Nomiyama, H Nakamura, T Hayashi, J-W Kim, T Isobe, R Shinohara, S Tanabe (2014) Simultaneous determination of polar pharmaceuticals and personal care products in biological organs and tissues. *J Chromatogr A* 1355:193-205.
- [171] RC Lajmanovich (2000) Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia* 25 (2):71-79.
- [172] T Brodin, S Piovano, J Fick, J Klaminder, M Heynen, M Jonsson (2014) Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems--impacts through behavioural alterations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369 (1656):20130580.
- [173] AM Margolis, H Heverling, PA Pham, A Stolbach (2014) A review of the toxicity of HIV medications. *J Med Toxicol* 10 (1):26-39.
- [174] B Clasen, VL Loro, CR Murussi, TL Tiecher, B Moraes, R Zanella (2018) Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. *Sci Total Environ* 626:737-743.
- [175] F Aouini, C Trombini, M Volland, M Elcafsi, J Blasco (2018) Assessing lead toxicity in the clam *Ruditapes philippinarum*: Bioaccumulation and biochemical responses. *Ecotoxicol Environ Saf* 158:193-203.
- [176] J-L Martínez-Guitarte (2018) Transcriptional activity of detoxification genes is altered by ultraviolet filters in *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol Environ Saf* 149:64-71.

- [177] P Ku, C Wang, X Nie, R Ou, K Li (2018) Regulation of pregnane-X-receptor and microRNAs on detoxification-related genes expressions in *Mugilogobius abei* under the exposure to diclofenac. *Environ Pollut* 233:395-406.
- [178] DR Livingstone (2003) Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Pollution and Aquaculture.
- [179] R van der Oost, J Beyer, NPE Vermeulen (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13 (2):57-149.
- [180] C Akay, M Cooper, A Odeleye, BK Jensen, MG White, F Vassoler, PJ Gannon, J Mankowski, JL Dorsey, AM Buch, SA Cross, DR Cook, M-M Peña, ES Andersen, M Christofidou-Solomidou, KA Lindl, MC Zink, J Clements, RC Pierce, DL Kolson, KL Jordan-Sciutto (2014) Antiretroviral drugs induce oxidative stress and neuronal damage in the central nervous system. *J Neurovirol* 20 (1):39-53.
- [181] M Patel, R Kumar, K Kishor, T Mlsna, CU Pittman, D Mohan (2019) Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chem Rev* 119 (6):3510-3673.
- [182] N Veldhoen, RC Skirrow, LLY Brown, G van Aggelen, CC Helbing (2014) Effects of Acute Exposure to the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Ibuprofen on the Developing North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Tadpole. *Environ Sci Technol* 48 (17):10439-10447.
- [183] HR Foster, GA Burton, N Basu, EE Werner (2010) Chronic exposure to fluoxetine (Prozac) causes developmental delays in *Rana pipiens* larvae. *Environ Toxicol Chem* 29 (12):2845-2850.
- [184] PM Peltzer, RC Lajmanovich, C Martinuzzi, AM Attademo, LM Curi, MT Sandoval (2019) Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: Assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Sci Total Environ* 683:624-637.
- [185] GR Scott, KA Sloman (2004) The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat Toxicol* 68 (4):369-392.
- [186] CM Junges (2017) Acute Toxicity and Etho-toxicity of Three Insecticides Used for Mosquito Control on Amphibian Tadpoles. *Water Air Soil Poll* 228 (4):143.