

UNIVERSITAT DE GIRONA

Ciências Ambientales

ANÁLISIS DE FÁRMACOS Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN PECES Y MOLUSCOS DESTINADOS AL CONSUMO HUMANO

Presentado por

Carlos E. Gil Arroyo

Periodo de trabajo: del 8.5.2015 a 24.7.2015

TUTOR/A: VICTÒRIA SALVADO

COTUTOR/A: DIANA ÁLVAREZ

El presente trabajo fue realizado en el grupo de Calidad del Agua en el Instituto Catalá de Recerca del Agua (ICRA) en Girona, España. Fue supervisado por la Dr. Diana Álvarez-Muñoz como parte del proyecto ECsafeSEAFOOD.

RESUMEN	pp. 4-5
RESUM	pp. 6-7
ABSTRACT	pp. 8-9
1. INTRODUCCIÓN	pp. 10-13
1.1. OBJECTIVES	p. 13
2. METODOLOGIA	pp. 14-22
2.1. MUESTREO DE ORGANISMOS	pp. 14-16
2.2. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	p. 17
2.2.1. ANÁLISIS DE EDCs EN ORGANISMOS MARINOS	pp. 17-19
2.2.2. ANÁLISIS DE PhACs EN ORGANISMOS MARINOS	pp. 19-22
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	pp. 23-32
3.1. CONCENTRACIÓN DE EDCs EN ORGANISMOS	pp. 23-29
3.1.1. FIRST ROUND	pp. 23-26
3.1.2. SECOND ROUND	pp. 27-29
3.2 CONCENTRACIÓN DE PhACs EN ORGANISMOS FIRST ROUND	pp. 30-32
4. CONCLUSIONS	p. 33
5. BIBLIOGRAFÍA	pp. 34-37

RESUMEN

En los últimos años se ha detectado la presencia de farmacéuticos y disruptores endocrinos en medios acuáticos. Estos compuestos pueden acumularse en organismos marinos como peces y moluscos si se produce una exposición a largo plazo y el consumo de dichos organismos podría causar un riesgo para su salud humana. Con el principal objetivo de valorar este riesgo nace el proyecto Europeo “Priority environmental contaminants in seafood: safety assessment, impact and public perception” (ECsafeSEAFOOD) dentro del cual se ha desarrollado el presente trabajo. En él se han analizado muestras de peces y moluscos destinadas al consumo humano procedentes principalmente de distintas regiones Europeas, aunque también se han incluido algunas muestras de organismos importados. Los compuestos objeto de estudio han sido disruptores endocrinos (EDCs) particularmente triclosan, methylparaben, bisphenol A y TBEP y compuestos farmacológicamente activos (PhACs) como son diazepam, sotalol, azithromycin, carbamazepine, diclofenac, citalopram, venlafaxine y sulfamethoxazole. Se realizaron dos muestreos en diferentes épocas del año y además, en el segundo de ellos parte de las muestras fueron cocinadas al vapor. El análisis de las muestras se realizó mediante dos métodos analíticos multiresiduos. El protocolo seguido para los EDCs se basa en el uso de Quechers (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe [rápido, fácil, económico, eficaz, sólido y seguro]). para la extracción y purificación de la muestra, mientras que para PhACs se utilizó una extracción con disolventes presurizados (PLE) seguida de una etapa de purificación con cromatografía de gel (GPC). En ambos casos la detección y cuantificación final de las muestras fue realizada por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS). Los resultados obtenidos muestran concentraciones de triclosan que alcanzan los 183.8 ng/g peso seco (p.s) en caballa del Mar del Norte, y 36.4 ng/g p.s de bisphenol A en caballa enlatada procedente de Portugal. Además, se ha observado un aumento de la concentración de EDCs cuando las muestras fueron cocinadas al vapor alcanzando hasta 75.4 ng/g p.s de bisphenol A en dorada.

Respecto a los niveles de PhACs el valor más alto fue de 11.72 ng/g p.s de sulfamethoxazole en mejillones procedentes de Holanda. Aunque los niveles detectados en algunos casos son considerables no superan los niveles máximos permitidos por la Unión Europea. Para EDCs los niveles medidos no presentarían riesgo alguno para la salud pública de acuerdo con los valores máximos diarios tolerables recomendados por la organización mundial de la salud (OMS).

RESUM

En els últims anys s'ha detectat la presència de compostos farmacèutics i disruptors endocrins en medis aquàtics. Aquests compostos poden acumular-se en organismes marins com peixos i mol·luscs si es produeix una exposició a llarg termini i el consum d'aquests organismes podria causar un risc per a la salut humana. Amb el principal objectiu de valorar aquest risc neix el projecte europeu "Priority environmental contaminants in seafood: safety assessment, impact and public perception" (ECsafeSEAFOOD) dins el qual s'ha desenvolupament el present treball. En ell s'han analitzat mostres de peixos i mol·luscs destinades al consum humà procedents principalment de diferents regions Europees, encara que també s'han inclòs algunes mostres d'organismes importats. Els compostos objecte d'estudi han estat disruptores endocrins (EDCs) particularment triclosan, methylparaben, bisphenol A i TBEP i compostos farmacològicament actius (PhACs) com són diazepam, sotalol, azithromycin, carbamazepine, diclofenac, citalopram, venlafaxine i sulfamethoxazole. Es van realitzar dos mostrejos en diferents èpoques de l'any i a més, en el segon d'ells part de les mostres van ser cuinades al vapor. L'anàlisi de les mostres es va realitzar mitjançant dos mètodes analítics multiresidus. El protocol seguit per als EDCs es basa en l'ús de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged i Safe [ràpid, fàcil, econòmic, eficaç, sòlid i segur]). per a l'extracció i purificació de la mostra, mentre que per PhACs es va utilitzar una extracció amb dissolvents pressuritzats (PLE) seguida d'una etapa de purificació amb cromatografia de gel (GPC). En ambdós casos la detecció i quantificació final de les mostres va ser realitzada per cromatografia de líquids acoblat a espectrometria de masses (UHPLC-MS). Els resultats obtinguts mostren concentracions de triclosan que arriben als 183.8 ng/g p.s en verat del Mar del Nord, i 36.4 ng/g p.s de bisphenol A en verat en llauna procedent de Portugal. A més, s'ha observat un augment de la concentració de EDCs quan les mostres van ser cuinades al vapor arribant fins 75.4 ng/g p.s de bisphenol A en daurada. Pel que fa als nivells de PhACs el valor més alt va ser de 11.72 ng/g p.s de sulfamethoxazole en

musclos procedents d'Holanda. Tot i que els nivells detectats en alguns casos són considerables no superen els nivells màxims permesos per la Unió Europea. Per EDCs els nivells mesurats no presentarien cap risc per a la salut pública d'acord amb els valors màxims diaris tolerables recomanats per l'organització mundial de la salut (OMS).

ABSTRACT

In recent years it has detected the presence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in aquatic environments. These compounds may accumulate in marine organisms such as fish and shellfish if long-term exposure and consumption of these organisms occurs could cause a risk to human health. With the main objective to assess this risk arises the European project "Priority environmental contaminants in seafood: safety assessment, impact and public perception" (ECsafeSEAFOOD) within which development has this work. It has analyzed samples of fish and shellfish for human consumption, mainly from different European regions, but have also included some samples of imported organisms. The compounds under study were diruptores endocrine compounds (EDCs) particularly triclosan, methylparaben, bisphenol A and TBEP and pharmacologically active compounds (PHACS) such as diazepam, sotalol, azithromycin, carbamazepine, diclofenac, citalopram, venlafaxine and sulfamethoxazole. Two samplings were conducted at different times of year and also the second one of the samples were steamed. The analysis of samples was performed using two analytical methods multiresidue. The protocol followed for EDCs is based on the use of QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe [fast, easy, economical, efficient, robust and secure]). for extraction and purification sample, while for PHACS pressurized extraction with solvents (PLE) followed by a purification step with gel chromatography (GPC) was use. In both cases the detection and quantification of samples end was performed by chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS) liquid. The results show concentrations of triclosan reaching 183.8 ng/g d.w in North Sea mackerel, and 36.4 ng/g d.w of bisphenol A in canned mackerel from Portugal. Furthermore, there has been an increasing concentration of EDCs when samples were steamed until reaching 75.4 ng/g d.w of bisphenol A in gold. Regarding levels PHACS the highest value was 11.72 ng/g d.w sulfamethoxazole of mussels from Holland. Although the levels detected in some cases are considerable not exceed the maximum levels permitted by the EU. To EDCs measured levels would not present any risk to public health in

accordance with the tolerable daily maximum values recommended by the World Health Organization (WHO).

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día existen miles de compuestos químicos presentes en el medio ambiente marino debido a actividades de origen humano. En cualquier sociedad industrializada, una amplia variedad de contaminantes orgánicos son liberados al medio ambiente después de su uso industrial, comercial o residencial. Todos ellos dan lugar a un complejo “cocktel” de contaminantes que poseen un riesgo potencial no solo para la vida salvaje sino también para la salud humana. Además, con el gran crecimiento de la población y los avances tecnológicos, nos encontramos con infinidad de compuestos nuevos de los que en muchos casos se desconoce su comportamiento ambiental y/o no cuentan con un programa de vigilancia. De entre la multitud de contaminantes presentes a bajas concentraciones en el medio acuático, y que interaccionan con los organismos bioacumulándose; en este trabajo nos centraremos en el estudio de los compuestos disruptores endocrinos (EDCs) y compuestos farmacéuticos activos (PhACs).

Los EDCs son compuestos que tienen la habilidad de interferir con el sistema endocrino de los organismos causando importantes alteraciones en su desarrollo normal. Pueden producir efectos negativos en la reproducción, sistema neurológico, e inmune tanto de humanos como de organismos salvajes. EDCs comprende un amplio grupo de compuestos químicos con una elevada heterogeneidad en estructuras moleculares y diferentes propiedades físico-químicas dependiendo del tipo de contaminante. EDCs incluye sustancias como insecticidas, fungicidas, herbicidas, hormonas, contaminantes industriales, etc.

Los compuestos farmacéuticos (PhACs) están diseñados para tener efectos biológicos específicos a bajas concentraciones. En muchos casos los receptores humanos y de organismos salvajes se conservan por lo que estos compuestos pueden alterar rutas metabólicas de organismos no “diana”. Los PhACs incluye distintas familias terapéuticas

tales como analgésicos, antiinflamatorios, tranquilizantes, antidepresivos, antibióticos, etc.

Las principales fuentes de PhACs y EDCs en ambientes marinos son los efluentes de aguas residuales, la eliminación de basuras, la acuicultura, la ganadería y la horticultura [1]. Estas fuentes proporcionan una carga incesante de estos compuestos en el sistema acuático y como resultado se han detectado concentraciones que oscilan de nanogramos a gramos por litro en agua de mar [2-6]. Debido a la exposición continua de los organismos acuáticos a estos compuestos una de las principales preocupaciones es su posible transferencia entre medio ambiente y la biota, y en consecuencia, su potencial de bioacumulación.

Los riesgos asociados a la exposición a PhACs y EDCs son por ejemplo la bien conocida feminización de ciertas especies de peces macho debido a la exposición de estrógenos [7], o la resistencia a los antibióticos [8, 9]. Estos efectos deben tenerse en cuenta no sólo a nivel de especie sino también a nivel de consumidor a través de la posible ingestión de organismos marinos contaminados. Con el fin de proteger la salud pública, la Comunidad Europea fijó en 2009 los límites máximos de residuos (LMR) de una variedad de estos productos químicos en alimentos de origen animal, incluyendo especies marinas [10]. Esta lista debe actualizarse regularmente y para este propósito la información con respecto a la presencia de PhACs y EDCs en mariscos debe ser proporcionada. Este es el objetivo principal del proyecto en el que se desarrolla el presente trabajo denominado “Priority environmental contaminants in seafood: safety assessment, impact and public perception” (ECsafeSEAFOOD) [11]. El proyecto proporciona información sobre la presencia de contaminantes prioritarios en peces y moluscos ya sean salvajes o de piscifactoría, nacionales o de importación, enfatizando las sustancias que pueden ser relevantes para la salud humana. Además, también se investiga el efecto del cocinado sobre las concentraciones de los compuestos detectados en los peces y moluscos, y su posible transferencia a humanos una vez estos productos son consumidos. El proyecto

incluye además una fase de seguimiento, estrategias para disminuir los riesgos (con directrices y reglamentos), y desarrollo de métodos de detección rápida para los contaminantes más relevantes. Los resultados obtenidos se diseminaron con artículos científicos, informes, talleres y a través de la red, con la finalidad de llegar al mayor público posible incluyendo a consumidores, políticos, productores de alimentos y público en general.

La información previa de la que se dispone en cuanto a la presencia y niveles de PhACs y EDCs en especies marinas destinadas al consumo humano es escasa. En cuanto a EDCs en un estudio previo realizado por. Álvarez-Muñoz et al [12] los análisis llevados a cabo revelan la presencia de 10 EDCs en bivalvos, entre los cuales se encuentran el bisfenol A, triclosan, tris (2-butoxiethyl) fosfato (TBEP), y la progesterona. Las concentraciones de TBEP (retardante de llama) fueron las más elevadas alcanzando hasta 98.4 ng/g peso seco en rodaballo procedente del estuario del Tajo.

El trabajo desarrollado por Vandermeersch et al [13] consiste una base de datos recopilada por varias instituciones a nivel europeo donde se presentan los niveles de contaminantes emergentes medidos en organismos marinos disponibles hasta la fecha. Los niveles de triclosan (potente antibacteriano) encontrados en moluscos fueron de los más relevantes alcanzando una concentración de 507 ng/g peso lipídico (p.l) en moluscos [13]. Los parabenos, son compuestos muy utilizados como conservantes en alimentos y en la industria farmacéutica [13]. En el estudio realizado por Vandermeersch, G. et al. se detectó una concentración de 3600 ng/g p.s de methylparaben en muestras de marisco de Filipinas, concretamente de la Bahía de Manila [13]

En PhACs los estudios disponibles en especies marinas son muy limitados. Se han publicado algunos artículos que están recogidos en la base de datos citada anteriormente [13] donde se pueden encontrar datos de concentraciones de fármacos. Analgésicos y antiinflamatorios han sido encontrados en peces y moluscos marinos, concretamente se midieron concentraciones de diclofenac de entre 4'1 y 490 ng/g p.s [14-16]. Las drogas psiquiátricas son el grupo de fármacos más estudiado. Carbamazepina fue detectada en

muestras de moluscos marinos alcanzando concentraciones entre 0'8 y 5'3 ng/g peso húmedo (p.h) [17], también se han medido concentraciones de diazepam de entre 110 y 545 ng/g p.h em muestras de peces marinos [18]

1.1. OBJECTIVES

The main objectives of this study were on one hand to detect the possible presence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in commercially available fish and shellfish samples, and on the other hand to establish whether the measured levels were below the maximum levels established by the European Union in commercial animal products [19]. For these purpose a selection of fish and shellfish species, both wild and farm organisms from different European areas and even organisms imported from other continents such as Asia or Africa were analyzed. In these countries the regulation is less restrictive and there is less control in the use of chemicals (such as antibiotics and anti-parasite agents) to prevent pests and diseases therefore their analysis is of great interest. Besides, both raw and cooked samples (by steamed) have been analyzed in order to investigate the effect of this culinary process on possible concentration present in the samples.

2. METODOLOGIA

2.1. MUESTREO DE ORGANISMOS

Las muestras fueron recolectadas por diferentes instituciones europeas que participan en el proyecto ECsafeSEAFOOD como son: Instituto Portugués do Mar e da Atmosfera (IPMA), Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria (IRTA), Aeiforia srl (AEIF), Danmarks Tekniske Univeritet (DTU), Instituto de Ciencias e Tecnologías Agrárias e Agroalimentares (ICETA), Eigen Vermogen Van Het Instituut Voor Landbouw en Visserijonderzoek (ILVO) y Stichting Dienst Landbouwkunding Onderzoek (IMARES).

En este estudio se realizaron dos tandas de análisis de las muestras, el primero llamado First Round que se llevó a cabo en el mes de noviembre y el segundo, llamado Second Round que se realizó entre mayo y junio. En el First Round se analizaron exclusivamente muestras crudas y los resultados tanto para PhACs como para EDCs se presentan en este trabajo. En el Second Round sin embargo el objetivo era comparar las concentraciones detectadas en los organismos en crudo y una vez cocinados pero debido a la limitación de tiempo de las practicas realizadas solo se han podido procesar las muestras correspondientes a EDCs cuyos resultados se presentan en esta memoria.

Los organismos y la procedencia de las muestras es muy variable, a continuación se muestra dos tablas con la institución, el organismo y el lugar de recogida de las muestras:

Table. 1. Instituciones, organismo (origen) de las muestras

PARTNERS	ORGANISM (ORIGIN)	PARTNERS	ORGANISM (ORIGIN)
ICET0001	Cod (Pacific)	AEIF0005	Mackerel (North Sea)
ICET0003	Atlantic Cod (Denmark)	AEIF0006a	Mackerel (Denmark)
IPMA0004	Farmed seabream (Greece)	IMAR0003a	Mackerel (Channel)
IPMA0007a	Plaice Small (North Sea)	IMAR0003b	Canned tuna (Portugal)
IPMA0007b	Plaice Large (North Sea)	IMAR0004	Pacific Tuna Small (Pacific)
IPMA0008	Sole large (Italy)	IMAR0005	Pacific Tuna Large (Pacific)
IPMA0009	sole small (Italy)	IMAR0006	Scottish farmed salmon (Netherlands)
IPMA0010	Farmed Pangasius (Vietnam)	DTU0001	Norwegian farmed salmon (Denamrk)
IRTA0005	Nile Perch (Lake Victoria)	DTU0002	Mussels (Spain)
IRTA0004	Farmed Shrimp (Asia)	DTU0003	Mussels (Italy)
AEIF0003a	Canned Mackerel (Portugal)	DTU0004	Mussel (Netherlands)
AEIF0003b	Mackerel (Spain)	ILVO0001a	Mussel (Denmark)
AEIF0004	Mackerel (Italy)	ILVO0001b	French Mussel (Channel)

Tabla. 2 Instituciones, organismo (origen) de las muestras crudas y cocinadas

PARTNERS	ORGANISM (ORIGIN)	PARTNERS	ORGANISM (ORIGIN)
AEIF 0007B RAW	Sole large (Italy)	DTU 0008 RAW	mackerel (Denmark)
AEIF 0007B COOKED	Sole large (Italy)	IPMA 0013A RAW	atlantic tuna small (Pacific)
AEIF 0009 RAW	seabream (Other origin)	IPMA 0016a COOKED	Atlantic tuna small (Pacific)
AEIF 0009 COOKED	seabream (Other origin)	IPMA 0013B RAW	Atlantic tuna large (Pacific)
ILVO 001 C2 RAW	Plaice/sole small (Channel)	IPMA 0016b COOKED	Atlantic tuna large (Pacific)
ILVO 001 C2 COOKED	Plaice/sole small (Channel)	ICET 0003 2 R RAW	Tuna canned (Portugal)
ILVO 001 C4 RAW	Plaice/sole large (Channel)	DTU 0006 A RAW	Norwegian salmon (Denmark)
ILVO 001 C4 COOKED	Plaice/sole large (Channel)	AEIF 0010 RAW	mussels (Italy)
IMAR 0009 a RAW	Plaice small (North Sea)	AEIF 00010 COOKED	mussels (Italy)
IMAR 0009 b RAW	Plaice large (North Sea)	IRTA 0007 RAW	mussels(Spain)
AEIF 0008 RAW	Mackerel fresh (Italiy)	IRTA 0007 COOKED	mussels (Spain)
AEIF 0008 COOKED	Mackerel (Italy)	ILVO 0004 R2 RAW	Mussel (France)
IRTA 0009 RAW	Mackerel fresh (Spain)	ILVO 0004 R2 COOKED	mussels (France)
IRTA 0009 COOKED	Mackerel fresh (Spain)	IMAR 00012 RAW	mussels (Netherlands)
ICET 0001 2 R RAW	Mackerel canned (Portugal)	IMAR 00013 RAW	mussels (Ireland)
IMAR 00010 RAW	Mackerel (North Sea)	IMAR 0014A RAW	mussels (Denmark)

La selección de las muestras recogidas se hizo siguiendo varios criterios: a) que los organismos fueran consumidos en el área de estudio; b) que pudieran acumular contaminantes; c) que tuviesen una amplia distribución geográfica; d) que fueran organismos fáciles de identificar; e) Abundantes; f) fáciles de capturar; g) de un tamaño adecuado para su comercialización.

Una vez recolectados los organismos seleccionados se hizo una mezcla (pool) con los ejemplares de cada especie correspondiente de un determinado punto de muestreo, se homogenizó, liofilizo y molido por cada entidad participante en el proyecto y posteriormente se envió al ICRA para su análisis. Además, del procesado de las muestras crudas también se seleccionaron varias que se cocinaron al vapor siguiendo los pasos que se especifican a continuación:

El procedimiento de cocinado al vapor para peces fue el siguiente:

Se añadió sal (2% del peso del filete), para cada porción. Se cocinaron al vapor durante 15 min a 105°C. Se enfriaron (temperatura ambiente). Se clasificaron los filetes según su tamaño y especie (2 tipos de tamaño, grande y pequeño). Se mezclaron correctamente y se colocaron en diferentes recipientes con el mismo peso. Por último se congelaron, se liofilizaron y el destinatario deberá volver a mezclar las muestras.

En el caso de los mejillones, la cocción fue:

Cocinarlos al vapor durante 5 min a 105°C. Enfriarlos a temperatura ambiente. Recoger la carne comestible y pesarla. Clasificarla por peso y especie. Homogeneizarla, colocarlas en diferentes recipientes por su peso. Congelar las muestras totalmente secas y liofilizarlas, El destinatario deberá volver a homogeneizar las muestras.

2.2. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Las muestras fueron analizadas mediante dos métodos distintos para llevar a cabo la detección y cuantificación de fármacos y disruptores endocrinos por separado. Para EDCs las muestras se analizaron siguiendo el método de Jakismka et al. (2013), para PhACs el método aplicado fue el de Huerta et al. (2012) [20]. Ambos protocolos previamente desarrollados por el grupo de investigación en ICRA. El método de EDCs se basa en el uso de QuEChERs (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) tanto para la extracción como para la purificación de las muestras mientras que en el de PhACs se realiza extracción con disolventes presurizados (PLE) seguida de purificación por cromatografía de gel (GPC). En ambos casos la detección y cuantificación final se realiza por cromatografía de líquidos acoplada a espectrómetro de masas (UHPLC-MS).

2.2.1 ANÁLISIS DE EDCs EN ORGANISMOS MARINOS

La característica principal del método de análisis de EDCs es su rapidez en el procesamiento de las muestras. Para ello se usan QuEChERs (acrónimo inglés de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe [rápido, fácil, económico, eficaz, sólido y seguro]). Es una técnica de preparación de muestras sencilla y directa, ideal para el análisis multiresiduos de pesticidas, fármacos veterinarios y micotoxinas en una amplia gama de productos agrícolas y alimentarios. El procedimiento está basado en una extracción inicial de fase única que utiliza una cantidad determinada de muestra y disolvente de manera que se crea una partición líquido-líquido agregando un exceso de sales y tampones al extracto. Tras una centrifugación se recoge la capa de disolvente que contiene la sustancia de interés y se somete a una etapa de purificación .

Se pesaron 0.5 g de cada muestra previamente liofilizada y molturada por triplicado y a continuación se añadieron en el tubo QuEChERS usado para la extracción (tubos de extracción AOAC de agilent). Se adicionaron 5 mL de agua calidad HPLC a cada muestra y se agitaron en el vortex durante 30 segundos. Seguidamente se añadieron otros 10 mL de acetonitrilo (ACN) y se volvió a agitar durante 1 minuto. Se añadió una mezcla de sales compuesta por NaCl y MgSO_4 y se volvieron a agitar manualmente durante 1 minuto. A continuación se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Una vez terminada la centrifugación se traspasó el disolvente a los tubos falcon del siguiente Quechers (dispersivos 15 mL, para muestras grasas, EN, W/CH, de agilent) para realizar la etapa de purificación mediante una extracción dispersiva en fase sólida (dSPE). Se volvieron a centrifugar las muestras a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se cogieron 6 mL de muestra que se traspasaron a tubos de vidrio para su posterior evaporación bajo corriente de nitrógeno. Finalmente las muestras fueron reconstituidas en 1 mL de metanol y guardadas en el congelador hasta su inyección en UHPLC-MS. En el momento de la inyección se las muestras se volvieron a evaporar, se redisolviéron en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (1:1) y se les adicionó 10 μL de patrón interno.

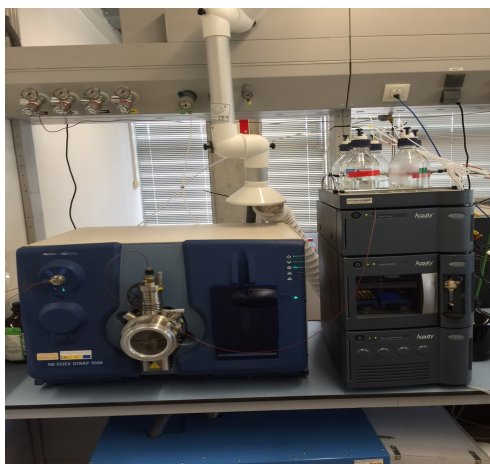


Fig. 1: UHPLC (Waters) acoplado a triple cuadrupolo MS

La cuantificación de las muestras se hizo de forma interna usando el correspondiente patrón interno marcado isotópicamente, y además, las rectas de calibrado se construyeron en matriz. Se prepararon 4 rectas diferentes de calibrado en matriz dependiendo de la cantidad de grasa de los peces y mejillones. La primera de ellas para peces con entre 0.8 y 3% de contenido graso (lenguado, rodaballo y bacalao), la segunda para peces con 15-20% de grasa (caballa y atún), la tercera para peces con más

de un 30% de grasa (salmón), y la cuarta para mejillones que aunque suelen tener un contenido en grasa bajo tienen características distintas. La detección final y cuantificación

de los analitos se realizó utilizando un sistema de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (Q-trap de Waters). La columna utilizada fue Acquity BEH C18 (50 mm x 2.1 mm, 1.7 μ m de tamaño de partículas), para ambos modos de ionización. Las condiciones de separación fueron las siguientes: disolvente (A) metanol y disolvente (B) agua (ajustando el pH a 9 con amoníaco), a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min. El gradiente de elución para el modo positivo fue: 0-3 min, 30 a 100% A; 3-4,75 min, 100% A; 4.75-5.75 min con retorno a las condiciones iniciales; 5.75-7 min, para el equilibrado de la columna y para el modo de negativo: 0-4 min, 30-100% A; 4-5 min, 100% A; 5-6 min con retorno a las condiciones iniciales; 6-7.5 min, para el equilibrado de la columna.. El volumen inyectado fue de 5 μ L para ambos modos [21].

2.2.2. ANÁLISIS DE PhACs EN ORGANISMOS MARINOS

Para el análisis de fármacos se utilizo extracción presurizada con disolventes (PLE). Esta técnica consiste en la extracción de los analitos con un disolvente a elevada temperatura y presión. Las altas temperaturas permiten acelerar la cinética del proceso extractivo mientras que las altas presiones evitan que el disolvente alcance su punto de ebullición. Esto permite una rápida y segura extracción de los analitos de interés, aunque en el caso de los fármacos la temperatura usada no puede ser demasiado alta ya que algunos de los compuestos son termolábiles y podrían degradarse durante la extracción. La muestra se coloca en una celda que se sella, se llena de disolvente y se calienta en un horno, lo que provoca un aumento de la presión. Al final de la extracción, el disolvente se expulsa de la celda con la ayuda de nitrógeno y se transfiere automáticamente a un vial. Esta técnica permite el uso de disolventes de distinta polaridad y utiliza un intervalo de presiones de 5 a 200 atm y temperaturas de hasta 200°C empleadas para acelerar dicho proceso de extracción [22].



Fig. 2: ASE 350 de Dionex

Se pesaron 0.5 g de cada muestra previamente liofilizada y molturada por triplicado, A continuación se prepararon las celdas metálicas para la extracción (22mL) insertando un filtro de celulosa en la parte inferior, seguido de 2 g alumina, que funciona como una primera barrera para el paso de lípidos, y a continuación se adiciono la muestra. Luego se mezclo con hidromatrix hasta llenar la celda, esto se hizo para mejorar la compactación y reducir el uso de disolvente, y finalmente se puso otro filtro en la parte superior.

El equipo que se utilizo es un ASE 350 de Dionex que se programo de la siguiente manera. Se programaron 4 ciclos de extracción de 5 min cada uno a 50°C, a 1500 psi de presión y el disolvente usado fue metanol. Una vez se extrajeron las muestras el eluyente fue evaporado hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno. A continuación las muestras se redisolvieron en 1 ml de metanol previo a su inyección en GPC.

Debido al elevado contenido en grasas de ciertos peces que puede interferir en el análisis se requiere una etapa de purificación exhaustiva. Para ello se uso el GPC que consiste en la separación de los componentes de una mezcla, aprovechando la distribución de dichos componentes entre dos fases: la fase móvil y la fase estacionaria. Generalmente, mediante el empleo de una columna que contiene la fase estacionaria, los compuestos a separar son arrastrados por la fase móvil y son analizados a su paso por el detector. Si la fase móvil es un gas, da lugar a la cromatografía de gases, mientras que si es un líquido, se denomina cromatografía líquida. La cromatografía de exclusión es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es sólida y la fase móvil es líquida. Se utiliza el término de “Cromatografía de exclusión por tamaño”. También se denomina “cromatografía de permeabilidad sobre gel” (GPC) o de permeación en gel. Su principal

aplicación es la separación de las moléculas en función de su tamaño con la finalidad de estudiar el peso molecular y distribución de los polímeros [23].

El equipo utilizado en este caso fue un cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a un detector diode array (HPLC-DAD) Agilent 1260 Infinity. El volumen inyectado en este equipo fue de 250 μ L por muestra. Se siguió un régimen isocrático consistente en diclorometano:metanol (90:10) a un flujo de 5 ml por minuto. La duración total de cada inyección fue de 40 minutos. Se recolectaron 3 fracciones de cada muestra entre 13.5 y 26 minutos después de su paso una columna semipreparativa del tipo EnviroPrep (300 mm x 21.2 mm). Estas tres fracciones se dejaron evaporar y se redisolvieron en metanol. Las muestras se guardaron en el congelador hasta el momento de su inyección cuando se volvieron a redisolver en MeOH:H₂O (10:90) y se les adiciono en patrón interno correspondiente a fármacos.



Fig. 3: Cromatógrafo de líquidos Agilent con columna GPC

Para llevar a cabo el análisis en UHPLC-MS se siguió el mismo procedimiento que para los EDCs. Se prepararon 4 rectas de calibrado distintas en función del contenido graso de los organismos analizados.

La columna usada fue una BEH C18 (50 mm x 2.1 mm, 1.7 μ m de tamaño de partículas) para compuestos analizados en modo negativo, y una columna Acquity HSS T3 (50 mm x 2.1 mm 1.8 μ m de tamaño de partículas) para los analizados en el modo de ionización

positiva. Para el análisis en el modo de ionización positivo, las condiciones fueron las siguientes: disolvente (A) de metanol, el disolvente (B) 10 mM formiato de amonio con ácido fórmico (pH=3.2) a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Para el modo de ionización negativo se usó acetonitrilo (A) y (B) 5 mM de acetato de amonio con adición de amoníaco (pH=8) a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min. El volumen inyectado de muestra fue de 5 μ L en ambos casos [24].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados correspondientes a EDCs del primer y segundo muestreo (first and second round) y de PhACs solo para el primer muestreo (esto se debe a una limitación de tiempo para realizar el análisis como se ha comentado anteriormente). Aunque los métodos de análisis aplicados son métodos multiresiduo incluyendo un alto número de analitos que se pueden medir de forma simultánea, en este trabajo nos hemos centrado en una selección de ellos. Esta selección se realizó de acuerdo con la información previa disponible en la literatura, en función de las concentraciones y frecuencia de detección previamente encontradas en pescados y mariscos procedentes de zonas costeras europeas [12]. Los compuestos seleccionados para su estudio fueron triclosan, methylparaben, bisphenol A y TBEP para EDCs, y diazepam, sotalol, azithromycin, carbamazepine, diclofenac, citalopram, venlafaxine y sulfamethoxazole para PhACs.

3.1. CONCENTRACIÓN DE EDCs EN ORGANISMOS

3.1.1. FIRST ROUND

La figura 4 muestra las concentraciones detectadas (ng/g p.s) en las diferentes muestras de peces y mejillones analizadas correspondientes al primer muestreo. Los detalles sobre el tipo de organismo analizado y su origen (especificado entre paréntesis) pueden observarse en el eje de las x. En la mayoría de los organismos los niveles medidos se encuentran por debajo del límite de detección y/o cuantificación del método. Estos límites se especifican en la tabla 3.

En los casos en los que los valores fueron cuantificables, estos oscilan entre los 0.77 ± 0.2 ng/g p.s de triclosan medidos en la perca del Nilo y 183.8 ± 14.4 ng/g peso seco del mismo compuesto encontrados en rodaballo procedente del Mar del Norte. Como se puede apreciar en la fig. 4 los niveles más elevados corresponden al triclosan en rodaballo tanto de tamaño grande como pequeño del mismo área de captura (Mar del Norte). El segundo compuesto detectado a concentraciones altas fue el bisphenol A con 36.2 ± 4.2 ng/g p.s medidos en caballa enlatada procedente de Portugal y 17.74 ± 1.6 ng/g p.s para el atún en lata procedente de Portugal. El bisphenol A normalmente es usado para revestir el metal de las latas donde se realizan conservas de alimentos y evitar el contacto directo del alimento con el metal. Sin embargo, este compuesto puede migrar del revestimiento al alimento enlatado y de ahí las altas concentraciones detectadas en estas muestras. Methylparaben fue detectado a concentraciones menores en muestras de mejillón oscilando entre los 4.4 ± 0.5 ng/g p.s procedente de España y 5.9 ± 0.3 ng/g p.s en mejillones procedentes de Holanda. El TBEB fue el único EDC con concentraciones por debajo del límite de detección o cuantificación medidas para todos los organismos (ver tabla 3).

El termino MDL hace referencia a la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco: $YLD = Y_B + 3 S_B$
Siendo S: el señal del compuesto

El término MQL hace referencia a la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco mas diez veces la desviación estándar del blanco: $YLQ = Y_B + 10 S_B$

Table 3. MDL y MQL en ng/g p.s para EDCs

MDL (ng/g)				
Matrix match	M1	M2	M3	M4
Organisms type	Sole, Seabream, Plaice, cod,Pangasius, Perch, Shrimp	Mackerel and Tunna	Salmon	mussel
EDCs				
Bisphenol A	0.008	0.02	0.02	0.06
Triclosan	0.001	0.004	0.02	0.04
Methylparaben	0.002	0.001	0.01	0.004
TBEP	0.001	0.003	0.01	0.03
MQL (ng/g)				
Matrix match	M1	M2	M3	M4
Organisms type	Sole, Seabream, Plaice, cod,Pangasius, Perch, Shrimp	Mackerel and Tunna	Salmon	mussel
EDCs				
Bisphenol A	0.028	0.06	0.08	0.19
Triclosan	0.002	0.01	0.07	0.14
Methylparaben	0.006	0.003	0.03	0.01
TBEP	0.003	0.008	0.03	0.09

Comparando las concentraciones máximas detectadas en este trabajo con los niveles reportados en la base de datos previamente citada [13], los niveles medidos en muestras destinadas al consumo humano son considerablemente menores que los detectados en muestras ambientales. Los niveles encontrados para estos 4 compuestos en biota ambiental según Vandermeersch et. al [13] fueron: 224 ng/g p.s en muestras de peces de mar procedentes del sur de China para el bisphenol A, 507 ng/g p.l en muestras de moluscos para el Triclosan, 3600 ng/g p.s para muestras de mariscos de Methylparaben.. En cuanto al TBEP los niveles también son menores; un estudio previo [12] reporta la presencia de este compuesto en pez mújol procedente de estuario del Tajo una zona con elevados aporte de contaminación de tipo industrial pero en este caso las muestras no eran comerciales sino ambientales.

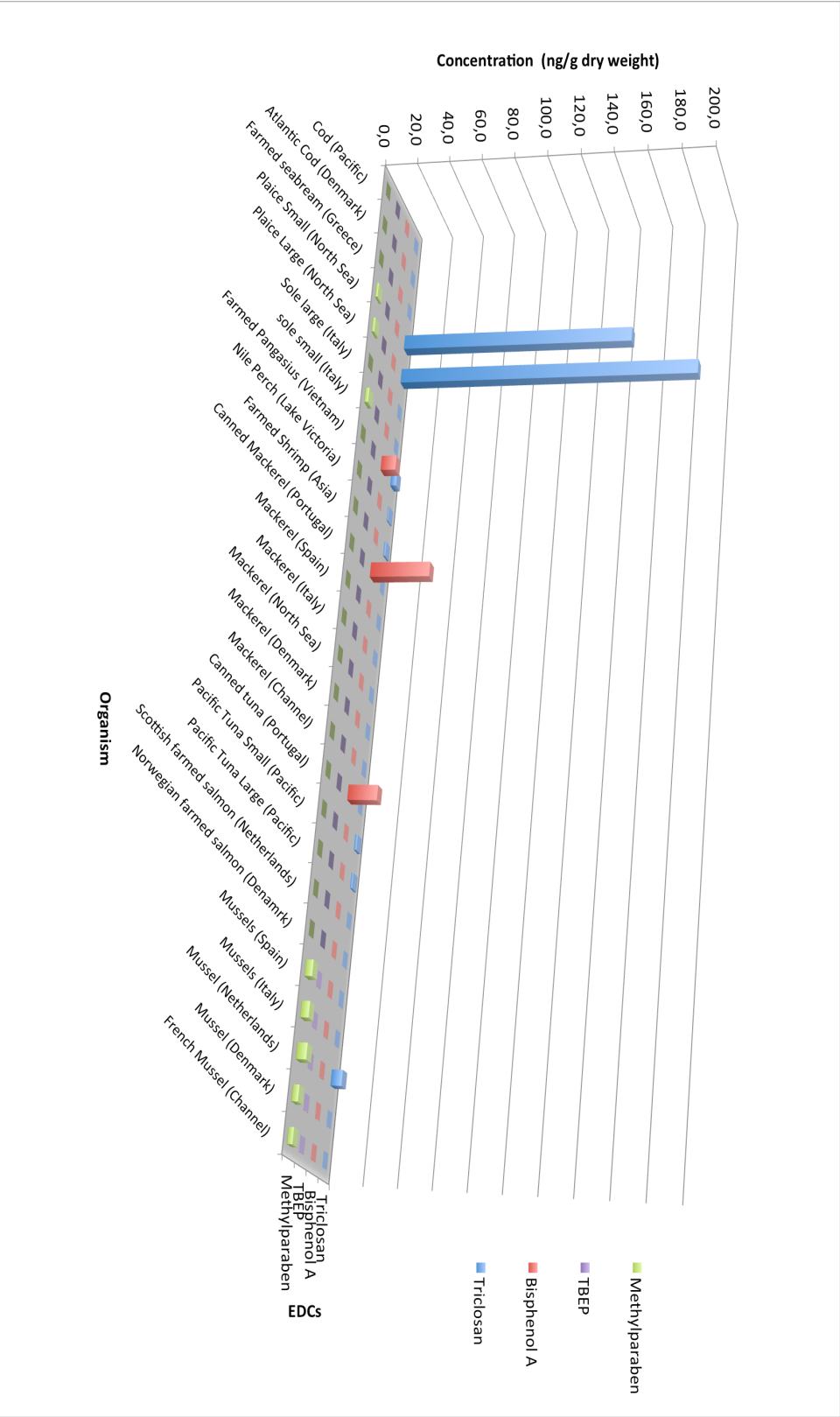


Fig. 4 : Concentración de EDCs de 1st Round en organismos

3.1.2. SECOND ROUND

En la figura 5 se muestran las concentraciones de EDCs medidas (ng/g p.s) en peces y mejillones recolectados en el segundo muestreo. En este muestreo una selección de organismos fueron cocinados al vapor por lo que se presentan los resultados tanto de los organismos crudos como cocinados. Los valores correspondientes a las muestras cocinadas están marcados en el eje de la x con un asterisco (*). Además, las muestras aparecen ordenadas según el tipo de organismo y su origen.

Los resultados obtenidos en este segundo muestreo presentan un número considerable de organismos donde las concentraciones medidas se encuentran por debajo del límite de detección o cuantificación del método analítico (ver tabla 3). Los valores detectados oscilan entre 0.07 ± 0.02 ng/g p.s de TBEP medidos en caballa procedente de Dinamarca y los 75.4 ± 4.4 ng/g p.s de bisphenol A determinados en dorada cocinada al vapor de origen desconocido. Los valores mas elevados observados en la figura 5 corresponden al bisphenol A con concentraciones de 75.4 ± 4.4 ng/g p.s para la dorada como se acaba de comentar, 60.26 ± 14.7 ng/g p.s para caballa enlatada procedente de Portugal, 54.7 ± 1.7 ng/g p.s para los mejillones cocinados procedentes de España, 51.71 ± 0.4 ng/g p.s para mejillones cocinados procedentes de Italia, y 52.02 ± 0.2 ng/g p.s para mejillones cocinados procedentes de Francia. Como se puede observar las concentraciones más elevadas se han encontrados en organismos que han sido cocinados al vapor o bien enlatados. Además, al comparar las concentraciones medidas en el mismo organismo crudo y cocinado se observa un claro incremento. Incluso en ciertos casos donde el compuesto no fue detectado cuando el organismo estaba crudo se encuentra una concentración alta después del cocinado, p.e. methylparaben en mejillones procedentes de España y Francia. Esto refleja la importancia de investigar el efecto que tienen los distintos procesos de cocinado sobre los alimentos de origen animal que consumimos. El aumento de la concentración de ciertos contaminantes después de un proceso de cocción al vapor ha sido previamente descrito por McEneff et al. [25].

Según este artículo la cocción con agua al vapor de mejillones dio como resultado un aumento global en las concentraciones de fármacos en sus tejidos: diclofenac aumentó en un 20% su concentración, y carbamazepina en un 12%. Esto podría ser debido a que cuando los compuestos son incorporados por el organismo en cuestión éste los metaboliza con el objetivo de hacerlos más solubles y fácilmente excretables. Una de las principales vías de metabolización de xenobioticos en organismos es la conjugación con el ácido glucurónico, formándose conjugados glucorónidos del compuesto padre generalmente estables. Debido al aumento de la temperatura durante el cocinado se puede producir una fracturación del enlace éster que une al ácido glucurónico y liberarse el compuesto original aumentando su concentración en la muestra.

Desde el punto de vista de seguridad alimentaria, hasta el momento no existen niveles máximos permitidos establecidos por la unión Europea para EDCs en alimentos de origen animal (aunque si en los hay en otros países como Canadá o Nueva Zelanda). Si se han establecido recomendaciones (valores orientativos) según la organización mundial de la salud que establecen el valor máximo diario tolerable ingerido (tolerable daily intake, TDI) para algunos de estos compuestos. Considerando estos valores no parece que exista un riesgo para la salud al consumir estos productos pero sin duda alguna estos datos demuestran la necesidad de establecer un control más exhaustivo y niveles máximos legales.

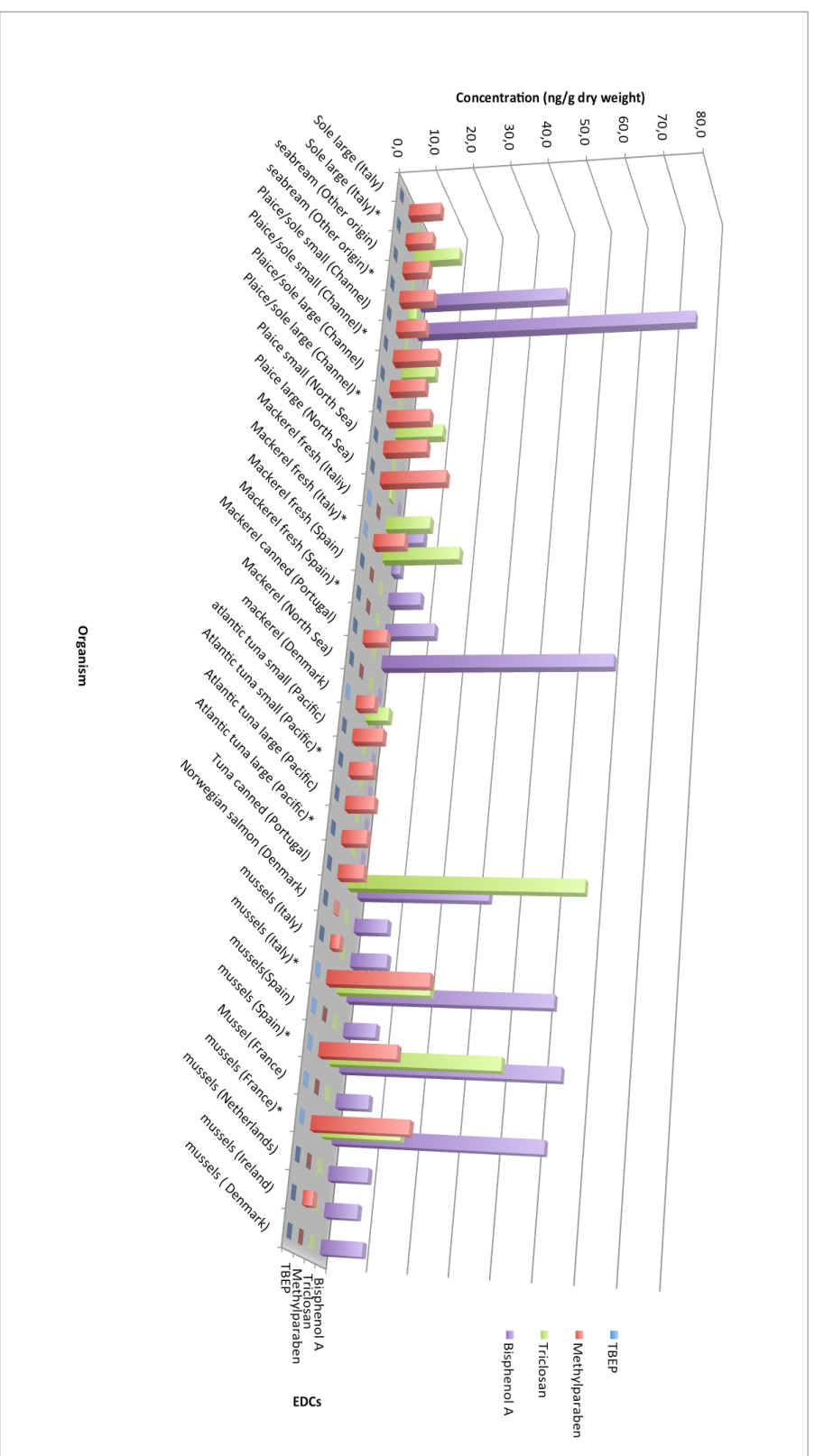


Fig. 5: Concentración de EDCs de 2nd Round en organismos comparando muestras crudas y cocinadas *

3.2. CONCENTRACIÓN DE PhACs EN ORGANISMOS: FIRST ROUND

La figura 6 presenta los resultados de PhACs obtenidos en los organismos correspondientes al primer muestreo. La mayoría de los organismos analizados presentaron niveles por debajo del límite de detección o cuantificación del método. Estos límites están especificados por compuestos en la tabla 4. Concretamente, los valores observados en la figura 6 para citalopram corresponden a el límite de detección para este compuesto. Así mismo, los valores representados para venlafaxine, carbamazepine y diclofenac se corresponden con sus límites de cuantificación en los distintos organismos.

Table 4. MDL y MQL en ng/g p.s para PhACs

MDL (ng/g)				
Matrix match	M1	M2	M3	M4
Organisms type	Sole, Seabream, Plaice, cod, Pangasius, Perch, Shrimp	Mackerel and Tunna	Salmon	mussel
PhACs				
Diclofenac	0.04	0.01	0.02	n.m.
Azithromycin	0.02	0.02	0.01	0.01
Sulfamethoxazole	0.04	0.01	0.17	0.01
Sotalol	0.01	0.01	0.00	n.m
Diazepam	0.01	0.01	0.01	n.m
Carbamazepine	0.04	0.03	0.03	0.03
Venlafaxine	0.26	0.04	0.02	0.01
Citalopram	0.16	0.22	0.001	0.06
MQL (ng/g)				
Matrix match	M1	M2	M3	M4
Organisms type	Sole, Seabream, Plaice, cod, Pangasius, Perch, Shrimp	Mackerel and Tunna	Salmon	mussel
PhACs				
Diclofenac	0.14	0.05	0.06	n.m.
Azithromycin	0.06	0.08	0.02	0.02
Sulfamethoxazole	0.13	0.05	0.55	0.02
Sotalol	0.04	0.05	0.01	n.m
Diazepam	0.03	0.03	0.03	n.m
Carbamazepine	0.12	0.11	0.11	0.11
Venlafaxine	0.86	0.14	0.06	0.03
Citalopram	0.54	0.73	0.002	0.21

Para las muestras en las que se detectaron niveles por encima de estos límites las concentraciones oscilan entre 0.95 ± 0.04 ng/g p.s de diazepam atún del Pacífico, ejemplares de tamaño grande, y 11.72 ± 3.7 ng/g p.s de sulfamethoxazole (antibiótico) en mejillones de Holanda. En esta misma muestra también se observó el valor más alto de venlafaxine (antidepresivo) 2.76 ± 0.8 ng/g p.s. Los valores más elevados de sotalol y diazepam fueron encontrados en muestras de atún (ejemplares de pequeño tamaño) procedentes del Pacífico alcanzando 2 ng/g p.s.

En el caso de compuestos farmacéuticos si existe legislación Europea vigente que controla los máximos niveles que puede haber presentes en alimentos de origen animal [2]. Sin embargo, para productos de origen marino está limitado a antibióticos y agentes antiparasitarios. De entre los compuestos presentes en este estudio sulfamethoxazole, perteneciente al grupo de las sulfonamidas, es el único compuesto presente en esta legislación con valores máximos permitidos de 100 ng/g. El valor más elevado de sulfomethoxazole en el presente trabajo se encuentra muy por debajo de este límite no suponiendo por tanto riesgo alguno para la población.

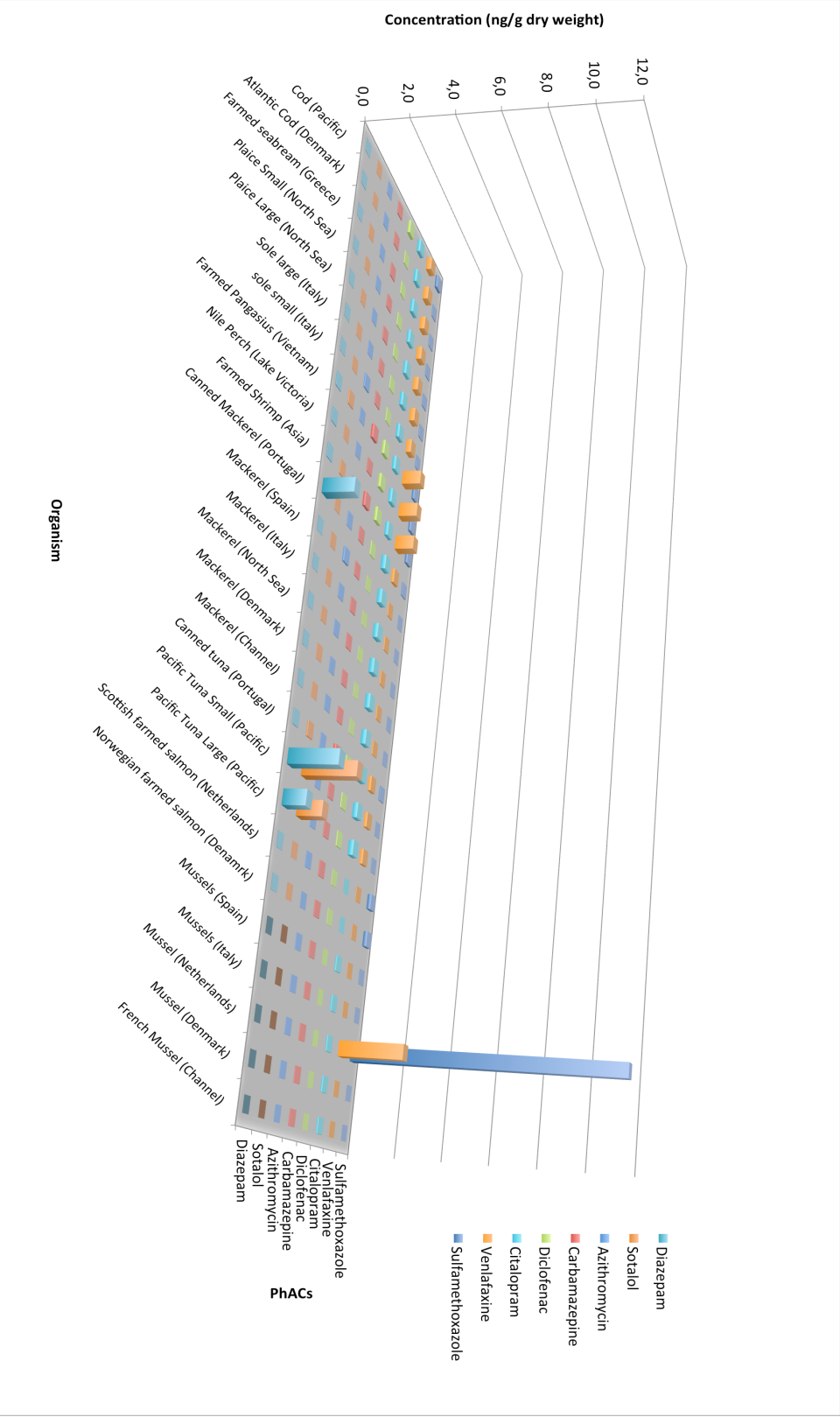


Fig. 6: Concentración de fármacos en organismos

5. CONCLUSIONS

The occurrence and levels of PhACs and EDCs in commercially available seafood species from different areas in Europe have been studied in the present work. Fish and shellfish from two different samplings campaigns (1st and 2nd round) were analysed and here we present the main conclusions:

- In a high number of samples the compounds presented levels below the method detection or quantification limits. In the cases where the levels were quantifiable they ranged between 0.77 ng/g d.w of triclosan in Nile perch and 183.8 ng/g d.w of the same compound in plaice from the North Sea for EDCs sampled in the 1st round. For the 2nd round the levels ranged from 0.07ng/g d.w of TBEP in mackerel from Denmark to 7.4 ng/g d.w of bisphenol A in cooked seabream. Regarding PhACs the levels found ranged between 0.95 ng/g d.w of diazepam in tuna from the Pacific Ocean and 11.72 ng/g d.w of sulfamethoxazole in mussels from Netherlands.
- The levels reported for commercial samples are lower than others previously published for the same compounds in environmental samples of biota.
- An increase in the measured concentrations have been observed for EDCs when the organisms are cooked by steaming. However, the levels reached after cooking do not seem to present a risk for the population if the tolerable daily intake following a normal diet is considered.
- For PhACs sulfamethoxazole was the only compound detected in the present work that is already included in the regulation on pharmacologically active substances regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. The level measured for this compound was considerably lower than the limit established, therefore, a potential risk for the population is not foreseen.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Gaw, S.; K. V. Thomas and Philos, T. H. (2014). "Hutchinson, Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment", pp. 369(1656).
2. Nodler, K.; D. Voutsas, and T. Licha (2014). "Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems. Mar Pollut Bull", p 85 and pp. 50-59.
3. Bayen, S.; Zhang, H.; Desai, M. M.; Ooi, S. K.; Kelly, B. C. (2013). "Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: influence of hydrodynamics and physical-chemical properties. Environ Pollut", pp. 1-8.
4. Arditoglou, A. and Voutsas, D. (2012). "Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. Mar Pollut Bull", pp. 2443-52.
5. Lolic, A.; Paiga, P.; Santos, H. M.; Ramos, S.; Correia, M.; Delerue-Matos, C. (2015). "Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: occurrence and environmental risk. Science of the Total Environment", pp. 240-250.
6. Moreno-González, R.; Rodriguez-Mozaz, S.; Gros, M.; Barceló, D.; León, V.M. (2015). "Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a Mediterranean Coastal Lagoon (SE Spain). Environ Res", in preparation.
7. Sumpter, J.P. (1995). "Feminized responses in fish to environmental estrogens. Toxicol Lett", pp. 82-83: pp. 737-42.
8. Cabello, F. C. (2006). "Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol", pp. 1137-44.

9. Sapkota, A.; Kucharski, M.; Burke, J.; McKenzie, S.; Walker, P.; Lawrence, R. (2008). "Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities, *Environ Int*", pp. 1215-26.
10. Commission regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuff of animal origin, in Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuff of animal origin 2010.
11. <http://www.ecsafeseafood.eu/>, accessed at 11.07.20145.
12. Álvarez-Muñoz, D.; Rodríguez-Mozaz, S.; Maulvault, A. L.; Tediosi, A.; Fernández-Tejedor, M.; Van den Heuvel, F.; Kotterman, M.; Marques, A.; Barceló, D. (2015). "Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. pp 8-14.
13. Vandermeersch, G.; Lourenço, H. M.; Alvarez-Muñoz, D; Cunha, Sara; Diogène, J.; Cano-Sancho, G.; Sloth, Jens J.; Kwadijk, C.; Barcelo, D.; Allegaert, W.; Bekaert, K.; Fernandes, J. O.; Marques, A.; Robbens, J. "Environmental contaminants of emerging concern in seafood – European database on contaminant levels", in preparation.
14. Wille, K.; Kiebooms, J.A.; Claessens, M.; Rappé, K.; Vanden Bussche, J.; Noppe, H.; Van Praet, N.; De Wulf, E.; Van Caeter, P.; Janssen, C.R.; De Brabander, H.F.; Vanhaecke, L. (2011). "Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms", pp. 1459-1472.
15. Huerta, B.; Jakimska, A.; Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. (2012b). "Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry", pp. 63-72.
16. Ramirez, A.J.; Mottaleb, M.A.; Brooks, B.W.; Chambliss, C.K. (2007). "Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry", pp. 3155-3163.

17. Klosterhaus, S.L.; Grace, R.; Hamilton, M.C.; Yee, D. (2013). "Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary". *Environ. Int.* 54, pp. 92–99.
18. Maruya, K. A.; Vidal-Dorsch, D. E.; Bay, S. M.; Kwon, J. W.; Xia, K.; Armbrust, K.L. (2012). "Organic contaminants of emerging concern in sediments and flatfish collected near outfalls discharging treated wastewater effluent to the Southern California Bight". *Environ. Toxicol. Chem.* 31(12), pp. 2683–2688.
19. Commission regulation (EU) No 37/2010 of 22 December (2009). "On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin".
20. Huerta, B.; Jakimska, A.; Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. (2012a), "Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry", pp 66.
- 21 Jakimska A.; Huerta, B.; Barganska, Z.; Kot-Wasik, A.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. (2013). "Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers", pp 49.
22. Albero Romano, M. B. (2009). "Deteminación de residuos de contaminantes orgánicos en miel y zumos". pp 39-40.
23. M.C. Gutiérrez-Bouzán, M. C.; Burdó, A.; Cegarra, J. (2009). "Cromatografía de exclusión: Análisis de al distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC", pp 34-35.
24. Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló D. (2012). "Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry", pp. 105-108.

25. McEneff, G.; Barron, L.; Kelleher, B.; Paull, B.; Quinn, B. (2013). "The determination of pharmaceutical residues in cooked and uncooked marine bivalves using pressurised liquid extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry", pp 9-10 and pp 11-12.