



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudi de processos de degradació de contaminants orgànics ambientals mitjançant tècniques cromatogràfiques i d'espectrometria i de mètodes quimiomètrics

Marc Marín García

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# **ESTUDI DE PROCESSOS DE DEGRADACIÓ DE CONTAMINANTS ORGÀNICS AMBIENTALS MITJANÇANT TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES I D'ESPECTROMETRIA I DE MÈTODES QUIMIOMÈTRICS**

**MARC MARÍN GARCÍA**



**UNIVERSITAT DE  
BARCELONA**



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Marc Marín García

Tesi Doctoral

2022

Estudi de processos de degradació de  
contaminants orgànics ambientals  
mitjançant tècniques cromatogràfiques  
i d'espectrometria i de mètodes  
quimiomètrics

Marc Marín García







UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

FACULTAT DE QUÍMICA  
DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA I QUÍMICA ANALÍTICA

Programa de doctorat: QUÍMICA ANALÍTICA i MEDI AMBIENT

**ESTUDI DE PROCESSOS DE DEGRADACIÓ DE  
CONTAMINANTS ORGÀNICS AMBIENTALS MITJANÇANT  
TÈCNiques CROMATOGRÀFIQUES I D'ESPECTROMETRIA  
I DE MÈTODES QUIMIOMÈTRICS**

Memòria presentada per

**Marc Marín García**

Per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

**Director**

**Dr. Romà Tauler i Ferré**

Departament de Química Ambiental

Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis del Aigua (IDAEA)

Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC)

**Tutora**

**Dra. Ana de Juan Capdevila**

Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica

Universitat de Barcelona



Jo, Romà Tauler i Ferré, *Professor d'Investigació de l'IDAEA-CSIC,*

FAIG CONSTAR:

Que la present Tesis Doctoral titulada:

***Estudi de processos de degradació de contaminants orgànics ambientals mitjançant tècniques cromatogràfiques i d'espectrometria i de mètodes quimiomètrics***

ha estat realitzat sota la meva direcció pel Sr. *Marc Marín García* en els laboratoris del Departament de Química Ambiental de l'Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua (IDAEA) del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), i també que tots els resultats presentats en aquest manuscrit són conseqüència del treball de recerca de l'esmentat doctorand.

Barcelona, 5 de maig del 2022

A handwritten signature in black ink is written over a blue circular stamp. The stamp contains the text 'CENTRO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS' and 'INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO AMBIENTAL Y ESTUDIOS DEL AGUA' around the perimeter, with 'IDAEA-CSIC' in the center.

Romà Tauler i Ferré





# AGRAÏMENTS

És difícil resumir totes les vivències ocorregudes durant els darrers 5 anys de doctorat. Així que intentaré, fer un resum general per a no deixar-me a ningú. Primer de tot, m'agradaria expressar la meva gratitud al director de la Tesi, el Dr. Romà Tauler per haver-me proposat realitzar la tesi doctoral amb ell, dins el grup de recerca del que forma part, podent així començar la meva carrera investigadora a l'IDAEA-CSIC. També a la meva tutora, la Dra. Ana de Juan, per la paciència que ha tingut amb mi, sobretot aquests darrers estressants dies. I, en general, a tot el grup de recerca, per acollir-me amb les mans obertes i suportar durant les hores de dinar i les pauses del cafè les meves lliçons d'Història Eurovisiva, especialment a la Míriam, en Carlos, l'Albert, l'Aina, en Jaume, la Paula i en David i totes les persones que han passat pel grup de recerca.

De la meva estada infructuosa al sud d'Itàlia, agrair a les noies del laboratori de Farmàcia, Maria, Jenni, Miriam i Alessia, per fer-me sentir com a casa. També als amics que vaig conèixer allà i que em van fer passar una estància més agradable, l'Ana, la Celia, la Catalina, la Inés, en Pacôme i en Luca. Les rialles a *Mensa* seran difícils d'oblidar.

Agrair també el recolzament dels amics i companys de carrera que m'han acompanyat, no només en aquesta etapa final sinó des dels inicis. Sense vosaltres no hauria estat el mateix. Però sobretot a la meva família, els meus pares, que m'han suportat en els moments de més estrès. A tots ells: Gràcies per tot!

Vorrei anche ringraziare il Dott. Michele de Luca, la Dott.ssa Giuseppina Iole e il Prof. Gaetano Ragno e tutto il loro gruppo di ricerca dell'Università della Calabria per avermi accolto e essersi preoccupati per me quando è scoppiata la pandemia di COVID19.

*Hi ha una força motriu més poderosa que el vapor,  
l'electricitat i l'energia atòmica: la voluntat.*

**ALBERT EINSTEIN**



# ÍNDEX

<b>ABREVIATURES I ACRÒNIMS .....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUM .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>CAPÍTOL 1: OBJECTIUS I ESTRUCTURA DE LA TESI .....</b>	<b>1</b>
1.1. OBJECTIUS DE LA TESI DOCTORAL .....	3
1.2. ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA.....	4
<b>CAPÍTOL 2: INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>7</b>
2.1. LA PROBLEMÀTICA DE LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL.....	9
2.2. ELS CONTAMINANTS EMERGENTS .....	11
2.2.1. ELS FÀRMACS COM A CONTAMINANTS EMERGENTS .....	12
2.3. LEGISLACIÓ SOBRE CONTAMINACIÓ AMBIENTAL I DEL MEDI AQUÀTIC. REGULACIÓ SOBRE PRODUCTES FARMACÈUTICS EN EL MEDI AMBIENT .....	17
2.4. ELS FÀRMACS A LES AIGÜES RESIDUALS I AL MEDI AMBIENT. APARICIÓ, MOBILITAT I PROBLEMÀTICA .....	24
2.5. ELIMINACIÓ/TRANSFORMACIÓ DELS FÀRMACS AL MEDI AQUÀTIC .....	32
2.5.1. PROCESSOS BIÒTICS .....	38
<i>Metabolisme humà</i> .....	38
<i>Degradació microbiana (biodegradació)</i> .....	39
2.5.2. PROCESSOS ABIÒTICS .....	42
<i>Hidròlisi química</i> .....	43
<i>Degradació química: cloració</i> .....	43
<i>Tractament químic: Processos d'oxidació avançada (AOPs)</i> .....	45
2.5.2. PROCESSOS ALTERNATIUS .....	49
<i>Bioremediació</i> .....	49
<i>Zones humides i aiguamolls artificials</i> .....	49
2.6. PROCESSOS DE TRANSFORMACIÓ: FOTODEGRADACIÓ .....	52
2.6.1. FOTODEGRADACIÓ SOLAR DE PRODUCTES FARMACÈUTICS I VIES DE REACCIÓ ..	58

2.6.2. MÈTODES DE DETECCIÓ DELS ESTUDIS DE FOTODEGRADACIÓ DE FÀRMACS EN EL MEDI AQUÀTIC .....	61
2.6.3. EL PAPER DE LA QUIMIOMETRIA EN ELS ESTUDIS DELS PROCESSOS DE FOTODEGRADACIÓ.....	67
2.7. CARACTERITZACIÓ DE LA MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA PRESENT A LES AIGÜES SUPERFICIALS.....	74
2.7.1. MÈTODES DE DETECCIÓ DE LA DOM .....	76
2.7.2. EL PAPER DE LA QUIMIOMETRIA EN ELS ESTUDIS DE CARACTERITZACIÓ DE LA DOM .....	80
<b>CAPÍTOL 3: PART EXPERIMENTAL.....</b>	<b>83</b>
<b>BLOC 1: ESTUDI DELS PROCESSOS DE FOTODEGRADACIÓ DE FÀRMACS</b>	
3.1. FÀRMACS ESTUDIATS.....	85
<i>Tamoxifè (TAM)</i> .....	85
<i>Sulfametoxazol (SMX)</i> .....	87
3.2. TÈCNiques DE FOTODEGRADACIÓ APLICADES.....	90
3.2.1. FONT DE RADIACIÓ EMPRADA.....	90
3.2.2. SEGUIMENT CINÈTIC DE LA FOTODEGRADACIÓ MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA D'ABSORCIÓ MOLECULAR .....	92
3.2.3. SEGUIMENT CINÈTIC MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA (LC-DAD-MS)....	93
<b>BLOC 2: CARACTERITZACIÓ DE LA MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA DEL RIU LLOBREGAT</b>	
3.3. DESCRIPCIÓ DE LA CONCA HIDROGRÀFICA DEL LLOBREGAT I DELS PUNTS DE MOSTRA .....	97
3.4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	99
3.4.1. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES D'AIGUA.....	99
3.4.2. INSTRUMENTACIÓ I SOFTWARE .....	100
<b>CAPÍTOL 4: ANÀLISI DE LES DADES .....</b>	<b>101</b>
4.1. ESTRUCTURA DE LES DADES EN ELS PROCESSOS QUÍMICS ESTUDIATS .....	103
<i>Matriu senzilla</i> .....	104
<i>Matriu de dades augmentada per files, per columnes i per files i columnes</i> .....	106

4.2.	TRACTAMENT PRELIMINAR DE LES DADES .....	108
4.2.1.	COMPRESSIÓ I SINCRONITZACIÓ DE LES DADES .....	108
4.2.2.	CORRECCIONS DE LA LÍNIA BASE .....	111
4.2.3.	CORRECCIONS DEL SCATTERING DE FLUORESCÈNCIA .....	111
4.2.4.	ESCALAT DE LES DADES .....	112
4.3.	MÈTODES QUIMIOMÈTRICS D'ANÀLISI MULTIVARIANT .....	114
4.3.1.	MÈTODE DE RESOLUCIÓ MULTIVARIANT DE CORBES (MCR) .....	118
4.3.1.1.	MÈTODE DE RESOLUCIÓ MULTIVARIANT DE CORBES PER MÍNIMS QUADRATS ALTERNATS (MCR-ALS) .....	122
	<i>Determinació del nombre de components químics del sistema.....</i>	123
	<i>Determinació de les estimacions inicials.....</i>	127
	<i>Selecció de restriccions.....</i>	129
	<i>Optimització iterativa dels perfils de concentració i dels espectres purs .....</i>	134
4.3.2.	INCERTESA EN LES SOLUCIONS MCR .....	137
4.3.3.	DEFICIÈNCIA DE RANG I ALTRES LIMITACIONS DELS MODELS MCR .....	140
4.3.4.	MÈTODES DE MODELITZACIÓ HÍBRIDA RÍGIDA I FLEXIBLE (HS-MCR).....	141
<b>CAPÍTOL 5: RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>		<b>145</b>

## BLOC 1: ESTUDI DELS PROCESSOS DE FOTODEGRADACIÓ DE FÀRMACS

5.1.	DISPOSICIÓ DE Matrius EN ELS SISTEMES ESTUDIATS .....	147
5.1.1.	ARRANJAMENTS DE Matrius DE DADES PROCEDENTS D'UNA DETECCIÓ INSTRUMENTAL ÚNICA (UV O MS).....	147
5.1.2.	CONCATENACIÓ I AUGMENT DE Matrius DE DADES DE DETECCIONS INSTRUMENTALS MÚLTIPLES (UV I MS): FUSIÓ DE DADES COMPLETES DE SEGUIMENT UV, LC-DAD I LC-MS .....	152
5.1.3.	CONCATENACIÓ I AUGMENT DE Matrius DE DADES DE DETECCIONS INSTRUMENTALS MÚLTIPLES (UV I MS): FUSIÓ DE DADES INCOMPLETES.....	154
5.2.	DESCOMPOSICIONS BILINEALS DELS SISTEMES ESTUDIATS .....	155
5.3.	DISCUSSIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS EN ELS PROCESSOS DE DEGRADACIÓ ESTUDIATS .....	169
5.3.1.	FOTODEGRADACIÓ DEL TAMOXIFÈ (TAM) .....	169
	<i>Anàlisi del seguiment espectrofotomètric UV de la reacció de fotodegradació.....</i>	169

<i>Anàlisi cromatogràfica (LC-DAD i LC-MS) del procés de fotodegradació .....</i>	172
<i>Anàlisi simultània del seguiment espectrofotomètric UV de la fotodegradació i les dades LC-DAD. Resolució de les espècies i interpretació dels perfils cinètics.....</i>	176
<i>Anàlisi simultània de les dades LC-DAD-MS. Identificació i confirmació dels fotoproductes trobats.....</i>	181
<i>Anàlisi global de les dades (blocs incomplets). Estudi posterior per espectroscòpia de fluorescència i LC-DAD-FLD.....</i>	186
<b>5.3.2. FOTODEGRADACIÓ DEL SULFAMETOXAZOL (SMX) .....</b>	<b>190</b>
<i>Anàlisi de les dades de la valoració àcid-base.....</i>	190
<i>Anàlisi del seguiment espectrofotomètric UV de la reacció de fotodegradació .....</i>	193
<i>Anàlisis de les dades cromatogràfiques LC-DAD-MS .....</i>	197
<b>ARTICLE I: TAMOXIFÈ (TAM) .....</b>	<b>209</b>
<b>ARTICLE II: SULFAMETOXAZOL (SMX).....</b>	<b>225</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARI ARTICLE II: SULFAMETOXAZOL (SMX) .....</b>	<b>243</b>
<b>BLOC 2: CARACTERITZACIÓ DE LA MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA DEL RIU LLOBREGAT</b>	
<b>5.4. ESTRUCTURA DE LES DADES MESURADES .....</b>	<b>253</b>
5.4.1. DADES ESPECTROFOTOMÈTRIQUES UV-VISIBLE .....	253
5.4.2. DADES FLUORIMÈTRIQUES MULTIDIMENSIONALS (EEM) .....	254
<b>5.5. MÈTODE QUIMIOMÈTRIC PROPOSAT (MCR-ALS) .....</b>	<b>257</b>
<b>5.6. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS EN L'ESTUDI DE CARACTERITZACIÓ DE LA CDOM REALITZAT .....</b>	<b>265</b>
<i>Espectres UV-Visible.....</i>	265
<i>Fluorescència multidimensional d'excitació-emissió (EEM).....</i>	269
<b>ARTICLE III: MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA (DOM) .....</b>	<b>283</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARI ARTICLE III: MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA (DOM) .....</b>	<b>297</b>
<b>CAPÍTOL 6: CONCLUSIONS .....</b>	<b>311</b>
6.1. PHOTODEGRADATION OF TAMOXIFEN (TAM).....	313
6.2. PHOTODEGRADATION OF SULFAMETHOXAZOLE (SMX) .....	317
6.3. CHARACTERIZATION OF DISSOLVED ORGANIC MATTER (DOM) FROM THE LLOBREGAT RIVER .....	321

<b>CAPÍTOL 7: REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES .....</b>	<b>323</b>
<b>LLISTAT DE TAULES I FIGURES .....</b>	<b>356</b>





## ABREVIATURES I ACRÒNIMS

<b>AA-EQS</b>	Concentracions Mitjanes Anuals dels Estàndards de Qualitat Ambiental, <i>Environmental Quality Standards-Annual Average concentrations</i>
<b>ACA</b>	Agència Catalana de l'Aigua, <i>Catalan Water Agency</i>
<b>AF</b>	Factor d'Avaluació, <i>Assessment Factor</i>
<b>AMB</b>	Àrea Metropolitana de Barcelona, <i>Barcelona Metropolitan Area</i>
<b>AOPs</b>	Processos d'Oxidació Avançada, <i>Advanced Oxidation Processes</i>
<b>APCI</b>	Ionització química a pressió atmosfèrica, <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
<b>API</b>	Principi Actiu, <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
<b>APPI</b>	Fotoionització a pressió atmosfèrica, <i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
<b>ALS</b>	Mínims quadrats alternats, <i>Alternating Least-Squares</i>
<b>AsLS</b>	Mínims quadrats asimètrics, <i>Asymmetric Least-Squares</i>
<b>BOE</b>	Butlletí Oficial de l'Estat, <i>Official State Gazette</i>
<b>CAG</b>	Carbó Actiu Granulat, <i>Granular Activated Carbon</i>
<b>CDF</b>	Acrònim de l'extensió d'arxius Common Data Format
<b>CDOM</b>	Matèria Orgànica Dissolta de color, <i>Coloured Dissolved Organic Matter</i>
<b>CE</b>	Comissió Europea, <i>European Commission</i>
<b>CEE</b>	Comunitat Econòmica Europea, <i>European Economic Community</i>
<b>CHMP</b>	Comitè per a Productes Medicinals d'Ús Humà, <i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i>
<b>DAD</b>	Detecció de matriu de díodes, <i>Diode Array Detector</i>
<b>DBO</b>	Demanda Biològica d'Oxigen, <i>Biological Oxygen Demand</i>
<b>DBPs</b>	Subproductes de Desinfecció, <i>Disinfection By-Product</i>
<b>DMA</b>	Directiva Marc de l'Aigua, <i>Water Framework Directive</i>
<b>DDT</b>	Diclorodifeniltricloroetà, <i>Dichlorodiphenyltrichloroethane</i>
<b>DOM</b>	Matèria Orgànica Dissolta, <i>Dissolved Organic Matter</i>
<b>ECHA</b>	Agència Europea de Productes Químics, <i>European Chemicals Agency</i>
<b>EDAR</b>	Estació Depuradora d'Aigües Residuals, <i>Wastewater Treatment Plant</i>
<b>EEM</b>	Matriu de fluorescència d'excitació-emissió, <i>Excitation-Emission Matrix</i>
<b>EFA</b>	Anàlisi de Factors Emergents, <i>Evolving Factor Analysis</i>

<b>EMA</b>	Agència Europea de Medicaments, <i>European Medicines Agency</i>
<b>EPA</b>	Agència per a la Protecció del Medi Ambient dels Estats Units, <i>Environmental Protection Agency</i>
<b>EPFIA</b>	Federació Europea d'Indústries i Associacions Farmacèutiques, <i>European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations</i>
<b>EQS</b>	Estàndards de Qualitat Ambiental, <i>Environmental Quality Standards</i>
<b>ERA</b>	Avaluació de Risc Ambiental, <i>Environmental Risk Assessment</i>
<b>FDA</b>	Administració d'Aliments i Fàrmacs del Estats Units, <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FDOM</b>	Matèria orgànica dissolta fluorescent, <i>Fluorescent Dissolved Organic Matter</i>
<b>FLD</b>	Detector de fluorescència, <i>Fluorescence Detector</i>
<b>FT-ICR</b>	Ressonància ciclotrònica d'ions per transformada de Fourier, <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
<b>GC-MS</b>	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses, <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>
<b>HAA</b>	Àcids Haloacètics, <i>Haloacetic Acid</i>
<b>HDPE</b>	Polietilè d'alta densitat, <i>High density polyethylene</i>
<b>(H)ESI</b>	Ionització (escalfada) d'electrosprai, <i>Heat Electro-Spray Ionization</i>
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida d'alta resolució, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HR</b>	Alta Resolució, <i>High Resolution</i>
<b>HRMS</b>	Espectrometria de masses d'alta resolució, <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
<b>ICH</b>	Conferència Internacional d'Harmonització, <i>International Conference on Harmonization</i>
<b>IFE</b>	Efecte de filtre intern, <i>Inner Filter Effect</i>
<b>IR</b>	Infraroig, <i>Infrared</i>
<b>IT-MS</b>	Trampa d'ions quadrupol, <i>Quadrupole Ion Trap</i>
<b>IUPAC</b>	Unió Internacional de Química Pura i Aplicada, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>LC</b>	Cromatografia líquida, <i>Liquid Chromatography</i>
<b>LC-MS</b>	Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses, <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>

<b>LIT</b>	Trampa d'ions lineal, <i>Linear Ion Trap</i>
<b>LR</b>	Baixa Resolució, <i>Low Resolution</i>
<b>MAC-EQS</b>	Concentracions màximes acceptables dels EQS, <i>EQS Maximum Acceptable Concentrations</i>
<b>MBRs</b>	Reactors Biològics de Membrana, <i>Membrane Biological Reactor</i>
<b>MCR-ALS</b>	Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats, <i>Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares</i>
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de masses en tàndem, <i>Tandem mass spectrometry</i>
<b>NDMA</b>	N-nitrosodimetilamina, <i>N-nitrosodimethylamine</i>
<b>N/DOM</b>	Matèria Orgànica Natural o Dissolta, <i>Natural or Dissolved Organic Matter</i>
<b>NOEC</b>	Concentració més baixa sense efectes observats, <i>No-Observed-Effect-Concentration</i>
<b>OCDE</b>	Organització per a la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic, <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut, <i>World Health Organization</i>
<b>ONU</b>	Organització de Nacions Unides, <i>United Nations</i>
<b>PAHs</b>	Hidrocarburs Aromàtics Policíclics, <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
<b>PCA</b>	Anàlisi de Components Principals, <i>Principal Component Analysis</i>
<b>PCBs</b>	Bifenils policlorats, <i>Polychlorinated Biphenyls</i>
<b>PCPs</b>	Productes d'Higiene Personal, <i>Personal Care Products</i>
<b>PECs</b>	Concentracions ambientals previstes, <i>Predicted Environmental Concentrations</i>
<b>PMT</b>	Tubs fotomultiplicadors, <i>Photomultiplier tubes</i>
<b>PNECs</b>	Concentracions ambientals previstes sense efecte, <i>Predicted No Effect Concentrations</i>
<b>PPCP</b>	Productes Farmacèutics i d'Higiene Personal, <i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i>
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetilè, <i>Polytetrafluoroethylene</i>
<b>POPs</b>	Contaminant Orgànic Persistent, <i>Persistent Organic Pollutants</i>
<b>Q</b>	Quadrupol individual, <i>Single Quadrupole</i>
<b>QqLIT</b>	Quadrupol amb trampa lineal d'ions, <i>Quadrupole with Linear Ion Trap</i>
<b>QqQ</b>	Triple-quadrupol, <i>Triple Quadrupole</i>
<b>QToF</b>	Quadrupol amb temps de vol, <i>Quadrupole Time-of-flight</i>

<b>REACH</b>	Acrònim de <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>
<b>RMN</b>	Ressonància Magnètica Nuclear, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>ROIs</b>	Regions d'Interès, <i>Regions Of Interest</i>
<b>RSS</b>	Suma global de quadrats residuals, <i>Residual Squares Sum</i>
<b>SEC</b>	Cromatografia d'exclusió molecular o per grandària, <i>Size-Exclusion Chromatography</i>
<b>SMX</b>	Sulfametoxazol, <i>Sulfamethoxazole</i>
<b>SRM</b>	Monitorització selectiva d'ions, <i>Selected Reaction Monitoring</i>
<b>SVD</b>	Descomposició de Valors Singular, <i>Singular Value Decomposition</i>
<b>TAM</b>	Tamoxifè, <i>Tamoxifen</i>
<b>THM</b>	Trihalometans, <i>Trihalomethanes</i>
<b>TOC</b>	Carboni Orgànic Total, <i>Total Organic Carbon</i>
<b>ToF</b>	Temps de vol, <i>Time-of-flight</i>
<b>TPs</b>	Productes de Transformació, <i>Transformation Products</i>
<b>UE</b>	Unió Europea, <i>European Union</i>
<b>US</b>	Ultrasons, <i>Ultrasound</i>
<b>UV</b>	Ultraviolat, <i>Ultraviolet</i>
<b>Vis</b>	Visible
<b>VUV</b>	Ultraviolat proper (o de buit), <i>Vacuum ultraviolet</i>
<b>WAO</b>	Oxidació d'aire humit, <i>Wet Air Oxidation</i>

# RESUM

En els darrers anys, l'augment en la producció de compostos orgànics sintètics i el seu constant alliberament al medi ambient, sobretot en referència als productes farmacèutics, compostos en els quals s'ha centrat aquesta tesi, ha fet que aquestes substàncies d'origen generalment antropogènic s'hagin anat acumulant als ecosistemes biològics de forma important, extensa i persistent, especialment en el medi aquàtic.

Per aquest motiu, és necessari utilitzar processos de depuració ambiental per tal d'eliminar les substàncies nocives per a la salut i el medi ambient que aquestes puguin ocasionar. Tanmateix, les tecnologies de depuració emprades encara no permeten eliminar aquestes substàncies totalment de forma quantitativa. A més, els possibles efectes perjudicials d'aquestes substàncies pel medi ambient no es produeixen només pels compostos originals, sinó que en molts casos, també pels seus productes de degradació i metabòlits. Conseqüentment, és important conèixer el destí i la transformació que sofreixen els contaminants orgànics un cop entren en l'ecosistema i arriben al medi aquàtic.

Cal, doncs, tenir present que l'aigua és un recurs imprescindible per a la vida que requereix de la millor qualitat sanitària possible per al seu consum. La matèria orgànica dissolta (DOM), present tant en aigües superficials com en subterrànies, i que té un efecte significatiu en els processos bioquímics dels sistemes aquàtics, actua moltes vegades com indicador del nivell de qualitat i salubritat que té l'aigua. Per tant, a l'hora d'optimitzar els processos de purificació realitzats, és també de gran importància conèixer i actuar sobre la concentració i les característiques de la DOM present en ella.

Per aquest motiu, en la present Tesi s'han realitzat els següents estudis:

D'una banda, per tal de conèixer i entendre millor el procés de fotodegradació de fàrmacs, s'ha estudiat el procés de degradació de dos d'ells. En un primer estudi, diferents mostres d'un medicament citostàtic (tamoxifè) es sotmeten a una font de radiació UV controlada en el laboratori, que simula la radiació solar ambiental (suntest), emprant dues potències d'irradiació diferents. Al mateix temps, es realitza el seguiment de la seva fotodegradació a partir de mesures espectrofotomètriques UV-Visible i de fluorescència multidimensional (matrius d'excitació-emissió, EEM). Seguidament, diferents alíquotes de mostra al llarg de la degradació són analitzades mitjançant LC-DAD, LC-MS i/o LC-FLD. Aquestes anàlisis, que generen una quantitat de dades molt elevada, es fusionen i tracten simultàniament a partir de procediments quimiomètrics avançats (especialment amb el mètode de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats (MCR-ALS)), que permeten descriure el procés i la reacció de degradació, resoldre els diferents productes de transformació (TPs), fer la seva

identificació i fer l'avaluació de la cinètica associada al procés estudiat. Com a resultat d'aquest estudi, 3 TPs i 1 isòmer del tamoxifè van ser caracteritzats.

Un segon estudi amb el mateix objectiu va ser realitzat sobre l'antibiòtic sulfametoxazol, present en rius i efluent de tot Europa en concentracions destacables. Addicionalment, un estudi de les propietats àcid-base d'aquesta substància va ser dut a terme per tal de veure com el pH pot afectar a l'especiació d'aquest compost. De la mateixa manera, per tal de conèixer si la fotodegradació del fàrmac es troba influenciada per aquest paràmetre, el procés de degradació va ser estudiat emprant solucions de mostra a pH diferents. Com a resultat de l'anàlisi quimiomètrica de les dades d'aquest segon estudi, un isòmer conformacional, un fotoproducte desconegut i 4 TPs van ser caracteritzats. D'altra banda, 3 formes diferents de l'antibiòtic van ser detectades en la corresponent valoració àcid-base.

D'altra banda, per conèixer la qualitat de les aigües superficials dels rius, diferents mostres d'aigua superficial procedents de la conca del riu Llobregat han estat analitzades i caracteritzades mitjançant la fluorescència multidimensional (EEM). En aquest estudi, el seguiment de la qualitat de l'aigua a partir de la combinació de les mesures fluorimètriques d'EEM i de la seva modelització quimiomètrica flexible, per mitjà també del MCR-ALS, ha permès obtenir informació sobre la naturalesa de les fraccions de la DOM (origen húmich, fúlvic, proteínic, etc.) presents al riu Llobregat i de la seva distribució geogràfica al llarg de la conca en diferents campanyes de mostreig ambientals.

Així doncs, atès que avui dia existeix una necessitat urgent per desenvolupar noves eines de tractament de dades multivariants, tals com les que s'han obtingut en aquesta Tesi en els diferents casos d'interès ambiental estudiats, la memòria que es presenta vol contribuir a resoldre aquest coll d'ampolla a partir de l'ús de la quimiometria, i en especial del mètode MCR-ALS, el qual pot jugar un paper molt important en la resolució de molts dels problemes associats a l'anàlisi de dades en diferents àmbits d'aplicació química i ambiental.

**Paraules clau:** Fotodegradació, Contaminants Ambientals, Fotoproductes, LC-DAD-MS, LC-DA-FLD, Espectrofotometria UV-Visible, Fluorescència Multidimensional, MCR-ALS, Sulfametoxazol, Tamoxifè, DOM, Qualitat de l'Aigua.

# ABSTRACT

In recent years, the increase in the production of synthetic organic compounds and their constant release into the environment, especially in reference to pharmaceuticals, compounds on which this thesis has focused, has meant that these substances of origin generally anthropogenic have been accumulating in biological ecosystems in an important, extensive, and persistent way, especially in the aquatic environment.

For this reason, it is necessary to use environmental purification processes to eliminate substances that are harmful to health and the environment. However, the purification technologies used today do not yet allow these substances to be completely eliminated in a quantitative way. In addition, the potentially harmful effects of these substances on the environment are not only due to the original compounds, but in many cases also to their degradation products and metabolites. Consequently, it is important to know the fate and transformation that organic pollutants undergo once they enter the ecosystem and reach the aquatic environment.

We must therefore keep in mind that water is an essential resource for life that requires the best possible sanitary quality for its consumption. Dissolved organic matter (DOM), present in both surface and groundwater, and which has a significant effect on the biochemical processes of aquatic systems, often acts as an indicator of the level of quality and health of water. Therefore, when optimizing the purification processes carried out, it is also very important to know and act on the concentration and characteristics of the DOM present in it.

For this reason, the following studies have been performed in this Thesis:

On the one hand, to better understand the process of photodegradation of drugs, the degradation process of two of them has been studied. In a first study, different samples of a cytostatic drug (tamoxifen) were subjected to a controlled source of UV radiation in the laboratory, which simulates solar radiation (suntest), using two different irradiation powers. At the same time, its photodegradation is monitored using UV-Visible spectrophotometric measurements and multidimensional fluorescence (excitation-emission matrices, EEM). Then, different sample aliquots along the degradation are analyzed by LC-DAD, LC-MS and / or LC-FLD. These analyzes, which generate a very high amount of data, are merged and treated simultaneously using advanced chemometric procedures (especially with multivariate curve resolution alternating least squares method (MCR-ALS)), which describe the process and the degradation reaction, solve the different transformation products (TPs), identify them and evaluate the kinetics associated with the process studied. As a result of this study, 3 TPs and 1 isomer of tamoxifen were characterized.

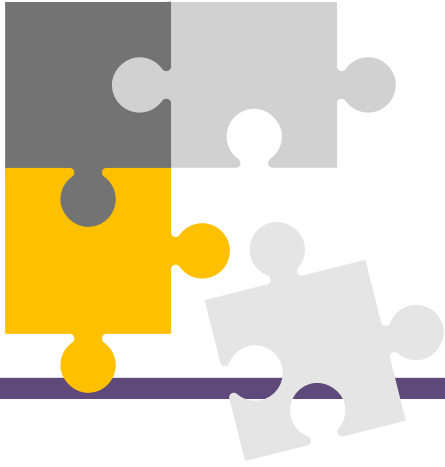


A second study with the same aim was carried out on the antibiotic sulfamethoxazole, present in rivers and effluents from all over Europe in remarkable concentrations. Additionally, a study of the acid-base properties of this substance was conducted to see how pH can affect the speciation of this compound. Similarly, to know whether the photodegradation of the drug is influenced by this parameter, the degradation process was studied using sample solutions at different pH. As a result of the chemometric analysis of the data from this second study, a conformational isomer, an unknown photoproduct, and 4 TPs were characterized. On the other hand, 3 different forms of the antibiotic were detected in the corresponding acid-base titration.

On the other hand, to know the quality of the surface water of the rivers, different samples of surface water from the Llobregat river basin have been analyzed and characterized by multidimensional fluorescence (EEM). In this study, the monitoring of water quality from the combination of the fluorimetric measurements of EEM and its flexible chemometric modeling, also through the MCR-ALS, has made it possible to obtain information on the nature of the fractions of the DOM (humic, fulvic, protein origin, etc.) present in the Llobregat river and its geographical distribution along the basin in different environmental sampling campaigns.

Therefore, given that there is an urgent need today to develop new multivariate data processing tools, such as those obtained in this Thesis in the different cases of environmental interest studied, the presented report aims to contribute to solve this bottleneck from the use of chemometrics, and especially the MCR-ALS method, which can play a very important role in solving many of the problems associated with data analysis in different areas of chemical and environmental application.

**Keywords:** Photodegradation, Environmental pollutants, Photoproducts, LC-DAD-MS, LC-DA-FLD, UV-Visible spectrophotometry, Multidimensional Fluorescence, MCR-ALS, Sulfamethoxazole, Tamoxifen, DOM, Water Quality.



## **CAPÍTOL 2**

# **OBJECTIUS I ESTRUCTURA DE LA TESI**

---



## 1.1. OBJECTIUS DE LA TESI DOCTORAL

El propòsit d'aquesta Tesi s'emmarca dins la investigació dels processos de fotodegradació de compostos químics orgànics d'interès ambiental, més concretament, dels productes farmacèutics, a partir de metodologies experimentals combinades de cromatografia de líquids, espectrofotometria UV-Visible, fluorescència, espectrometria de masses i de mètodes quimiomètrics de tractament de dades. Paral·lelament, emprant també tècniques espectroscòpiques i mètodes quimiomètrics, s'ha realitzat un estudi d'avaluació de la qualitat de l'aigua superficial dels rius, prenent d'exemple el riu Llobregat, a partir de la caracterització de la Matèria Orgànica Dissolta (DOM) present en el mateix.

La present memòria es troba dividida en dos grans blocs diferenciats. Conseqüentment, per a cadascun d'ells, existeixen objectius generals i específics que a continuació es detallen:

El primer gran bloc, té com a objectiu principal proporcionar una metodologia de seguiment experimental, tractament quimiomètric de les dades i interpretació de resultats que sigui vàlida per a estudiar els processos de fotodegradació de contaminants orgànics ambientals, en concret, dels productes farmacèutics trobats en el medi aquàtic. La metodologia que es proposa utilitza diferents tècniques instrumentals (espectroscòpiques i cromatogràfiques) per al seguiment dels processos implicats en la fotodegradació i descriu i profunditza en la utilització dels mètodes quimiomètrics de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats (MCR-ALS), per al tractament de les dades obtingudes. Aquest tractament quimiomètric de les dades permet, per un costat, estimar els perfils de concentració i dels espectres purs dels diferents productes de degradació formats, així com l'elucidació del mecanisme de reacció. A partir dels resultats obtinguts es pot fer l'avaluació de les constants cinètiques associades als processos de degradació. D'altra banda, la metodologia proposada s'orienta també a la gestió i la interpretació d'estructures de dades més complexes, que impliquen els acoblaments cromatogràfics amb una doble detecció (per mitjà d'un detector de díodes en sèrie, DAD, amb un d'espectrometria de masses, MS, o amb un detector de fluorescència, FLD), i també d'altres acoblaments de dades cromatogràfiques i espectroscòpiques més innovadors, que impliquin blocs de dades incomplets.

Com a objectius específics d'aquest bloc, es pretén aplicar aquestes metodologies desenvolupades a l'estudi dels processos de fotodegradació i transformació química dels fàrmacs tamoxifè (TAM) i sulfametoxazol (SMX). En ambdós casos, es pretén assolir el coneixement del mecanisme d'aquests processos i la caracterització dels productes de transformació (TPs) formats, així com avaluar l'efecte de diversos factors en el desenvolupament de la degradació, tals com l'efecte de la potència de la font de radiació que indueix la fotodegradació, en referència al TAM, i el del pH del medi en que es desenvolupa la reacció, en el cas del SMX.

D'altra banda, en el segon bloc temàtic d'aquesta Tesi, l'objectiu general és l'aplicació d'una metodologia quimiomètrica de tractament de dades, similar a l'anteriorment descrita, en l'anàlisi de les dades obtingudes en el monitoratge de la qualitat de les aigües fluvials. Amb aquesta finalitat, doncs, s'ha realitzat l'aplicació de les metodologies de tractament de dades multi-conjunt i multi-bloc en el seguiment de la qualitat ambiental de les aigües superficials, prenent com a cas d'estudi el riu Llobregat. En aquesta estudi, es mostra l'ús de les mesures espectrals fluorimètriques multidimensionals (matrius d'excitació-emissió, EEM), com a complement de les mesures espectroscòpiques d'absorció UV-Visible, per així poder avaluar millor el canvi en la qualitat de l'aigua superficial del riu Llobregat en funció de la variació en la composició de matèria orgànica present al llarg de la conca hidrogràfica en el transcurs de diferents campanyes de mostreig ambientals.

### 1.2. ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA

La present memòria es presenta a partir de la feina realitzada en la preparació de diferents articles, precedits d'una part introductòria i d'una descripció detallada de la part experimental realitzada i seguida d'una discussió dels resultats obtinguts per als dos blocs anteriorment esmentats. Les publicacions resultants dels estudis realitzats en aquesta Tesi, doncs, es mostren a continuació de l'argumentació dels resultats de cada un dels blocs. Així doncs, la tesi consta de 7 capítols amb la informació que tot seguit es descriu:

En el **PRIMER CAPÍTOL** es presenten els objectius i es detalla l'estructura de la present memòria.

En el **SEGON CAPÍTOL** es fa una introducció sobre la problemàtica de la contaminació ambiental, especialment en referència als contaminants emergents, tipologia de substàncies residuals de la qual els fàrmacs en formen part; posant èmfasi en el medi aquàtic. Seguidament, es parla de la legislació actual sobre aquesta temàtica, tot destacant la regulació existent sobre productes farmacèutics en el medi ambient. En acabar, s'emfatitza la problemàtica associada a l'aparició, mobilitat i destí dels fàrmacs, centrant-se posteriorment en els processos d'eliminació i transformació que aquests tipus de compostos pateixen en el medi aquàtic; especialment, en el processos basats en la fotodegradació. Tot seguit, es descriuen els mètodes de detecció emprats en aquesta tipologia de processos químics i el paper que hi juga la quimiometria en ells. Finalment, respecte a la segona temàtica tractada en la tesi, en aquest capítol també es fa una introducció sobre la problemàtica associada a la matèria orgànica dissolta i els mètodes actuals de detecció existents.

En el **TERCER CAPÍTOL** es descriu de forma general la metodologia experimental utilitzada en cada un dels estudis realitzats. En virtut de la diferent tipologia dels mateixos, s'ha optat per dividir el capítol en els 2 blocs anteriorment esmentats. El primer bloc, on es detallarà el procediment experimental seguit en els processos de fotodegradació de fàrmacs i, més concretament, en tot allò relacionat amb la degradació del tamoxifè (TAM) i el sulfametoxazol (SMX); i el segon bloc, on es descriu la metodologia emprada en relació amb l'estudi de la caracterització de la matèria orgànica dissolta (DOM) del riu Llobregat.

Seguidament, el **QUART CAPÍTOL**, descriu amb detall els mètodes quimiomètrics utilitzats en la present Tesi per al tractament de les dades obtingudes en les dues tipologies d'estudis realitzats, incloent una generalització de les diferents estructures en que les dades experimentals obtingudes es poden disposar (matrius senzilla o augmentada), així com en els pretractaments més usuals que s'apliquen a les mateixes.

En el **CINQUÈ CAPÍTOL** es descriuen detalladament els resultats obtinguts en els treballs que s'han realitzat en aquesta tesi en els dos blocs anteriorment mencionats, en els que s'agrupen aquests treballs per les temàtiques estudiades. El primer bloc, referent als processos de fotodegradació de fàrmacs, engloba els treballs científics realitzats sobre les fotodegradacions del tamoxifè i el sulfametoxazol. En primer lloc,

en aquests estudis, es fa una descripció de les possibles estructures de les dades, tenint en compte els diferents arranjaments de matrius augmentades i de fusió de dades (completes i incompletes). A continuació, es discuteix l'aplicació del mètode quimiomètric per a cada una d'aquestes estructures de les dades i, finalment, es discuteixen individualment els resultats obtinguts per a cada fàrmac estudiat, descrivint la determinació analítica dels fotoproductes formats en cada cas.

Posteriorment, en el **SISÈ CAPÍTOL**, es recullen les conclusions generals més importants de la present Tesi per a cadascuna de les tipologies d'estudi realitzades.

Finalment, en el **SETÈ** i últim **CAPÍTOL** es recullen totes les referències emprades en aquesta Tesi.

### RELACIÓ DELS TREBALLS CIENTÍFICS PRESENTATS EN LA MEMÒRIA

- **ARTICLE I:** Marín-García, M.; Ioele, G.; Franquet-Griell, H.; Lacorte, S.; Ragno, G.; Tauler, R. (2018). Investigation of the photodegradation profile of tamoxifen using spectroscopic and chromatographic analysis and multivariate curve resolution. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 174, 128–141.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.01.011>
- **ARTICLE II:** Marín-García, M.; De Luca, M.; Ragno, G.; Tauler, R. (2022). Coupling of spectrometric, chromatographic, and chemometric analysis in the investigation of the photodegradation of sulfamethoxazole. *Talanta*, 239, 122953.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122953>
- **ARTICLE III:** Marín-García, M.; Tauler, R. (2020). Chemometrics characterization of The Llobregat river dissolved organic matter. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 201, 104018.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104018>



# CAPÍTOL 2

## INTRODUCCIÓ

---





## 2.1. LA PROBLEMÀTICA DE LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL

Es calcula que al llarg del segle XX es van arribar a sintetitzar al voltant de 10 milions de compostos químics a tot el món. D'entre aquestes substàncies químiques sintètiques, més de 30 mil es produïen a gran escala en tenir un ampli ús comercial, suscitant que la seva producció i el seu ús estiguessin en constant augment a les societats modernes degut als diferents canvis demogràfics, socials i econòmics ocorreguts al llarg d'aquesta època industrial (Howard & Muir, 2010). A més a més, també es té constància de que es sintetitzaven entre mil i dos mil substàncies noves cada any, habitualment sense un control estricte dels seus efectes en els organismes vius. Durant molt de temps, les polítiques ambientals no van ser considerades entre els assumptes prioritaris a discutir globalment a les cimeres d'organismes internacionals. Va ser així com, al llarg del segle XX, la societat va ser testimoni d'una gran quantitat de desastres ecològics, com ara la contaminació de la Badia de Minamata (Japó), el gran *smog* londinenc, les fuites de substàncies químiques de Seveso (Itàlia) o de Bophal (Índia), i l'accident de Txernòbil (actual Ucraïna), entre d'altres.

El ràpid desenvolupament aconseguit per la nostra societat, especialment en els darrers 50 anys, ha donat lloc a un increment constant de la demanda de béns de consum i d'exigències d'avanç tecnològic. A part del desenvolupament industrial, s'està donant un creixement exponencial de la població mundial (9.000 milions previstos per l'Organització de les Nacions Unides per al 2050) (United Nations, 2004) que incrementa, d'una banda, les necessitats energètiques i de transport, augmentant així el consum de combustibles fòssils, i de l'altra, exigeix l'alimentació d'una població en constant creixement, la qual cosa requereix el perfeccionament de l'agricultura obligant als professionals del sector a utilitzar tècniques que proporcionin una gran producció. Tanmateix, aquest desenvolupament humà porta com a conseqüència una incessant activitat industrial que genera gran quantitat de residus, molts dels quals són abocats al medi ambient després d'un tractament insuficient dels mateixos. S'introdueixen, per tant, una gran quantitat de substàncies químiques a la natura de les quals, per a la gran majoria, el comportament i destí a l'entorn natural i els seus possibles efectes sobre els organismes vius són, avui en dia, encara desconeguts (Doménech, 2000).

De fet, per trobar les primeres referències al concepte de la contaminació ambiental ens hem de situar al setembre de 1962 quan Rachel Carson, una cèlebre biòloga marina i ecòloga nord-americana, va publicar el llibre *Silent Spring (La primavera silenciosa)* on advertia dels efectes perjudicials dels pesticides en el medi ambient, especialment en els ocells, i en culpava a la indústria química de l'època (Carson, 2016). Amb aquesta i altres afirmacions del seu llibre, Carson donava la veu d'alarma denunciant que el desenvolupament industrial i l'augment poblacional feien, i per desgràcia encara fan, augmentar esfereïdorament la contaminació que afecta el nostre planeta. Gràcies a la publicació d'aquest llibre i fruit del sorgiment de l'incipient moviment ecologista en aquella època, durant els anys setanta van redactar-se les primeres regulacions sobre la producció i l'ús de certs compostos químics nocius.

Concretament, el 1972 l'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units (en anglès, *Environmental Protection Agency*, EPA) va prohibir el diclorodifeniltricloroetà (DDT) (USEPA, 1975) convertint-se en el punt de partida de la legislació sobre contaminació per compostos químics. Durant el mes de juny d'aquell mateix any, es va dur a terme la primera gran conferència convocada per l'Organització de les Nacions Unides (ONU) sobre qüestions ambientals internacionals. Aquesta "*Conferència de Nacions Unides sobre l'Ambient Humà*", també coneguda com a "*Cimera de la Terra d'Estocolm*", va ser la primera conferència a tractar el tema ambiental de manera àmplia i global, marcant un punt d'inflexió en el desenvolupament de la política internacional els anys següents. Posteriorment, van ser legislatos altres compostos i, a mesura que es prenia consciència de la situació de contaminació global, van anar tenint lloc diversos convenis sobre contaminació global, com per exemple el *Conveni de Rotterdam* (1998), relatiu al comerç internacional de determinats productes químics perillosos (Rotterdam Convention, 2019), o el *Conveni d'Estocolm* (2001) en el que es regulen dotze compostos anomenats popularment la "dotzena bruta" (Stockholm Convention, 2019).

Des d'aquell moment, la preocupació pública pel que fa a la cura del medi ambient ha anat augmentant. Conseqüentment, l'organització periòdica de noves cimeres i conferències ha permès introduir el concepte de desenvolupament sostenible i evidenciar la seva estreta relació amb la preservació dels recursos naturals, propiciant així el desenvolupament d'una nova consciència ambiental. Tot i aquesta nova percepció del problema de la contaminació i la legislació implícita creada, alguns dels

compostos inicialment prohibits, com el DDT, es continuen emprant en diverses zones del món, sobretot en països en vies de desenvolupament (Stockholm Convention, 2019). En l'actualitat, inclús, aquest mateix contaminant es genera encara com a subproducte de la fabricació d'altres pesticides organoclorats (Sparling, 2016).

Així doncs, actualment encara es pateixen les conseqüències de la contaminació històrica dels ecosistemes i, fins i tot, la gestió mediambiental contemporània es fa cada vegada més complicada en haver de pal·liar amb l'aparició de nous compostos susceptibles de contaminar el medi, que en alguns casos, poden ser abocats a la natura sense conèixer quins són els seus efectes en els organismes. A més, molts s'utilitzen en la indústria o en l'agricultura fins que es regulen, moment en el que es substitueixen per d'altres de nova creació. Aquests nous compostos, dels quals es té relativament poca informació, formen part del que es coneix com a contaminants emergents.

## 2.2. ELS CONTAMINATS EMERGENTS

Durant dècades, la comunitat científica ha centrat els seus esforços en l'estudi dels contaminants químics la presència dels quals en el medi ambient ha estat o està regulada a les diferents legislacions; contaminants majoritàriament apolars, tòxics, persistents i bioacumulables, com ara els hidrocarburs aromàtics policíclics (en anglès, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, PAHs), els bifenils policlorats (*Polychlorinated Biphenyls*, PCBs) o les dioxines. En els darrers anys, però, el desenvolupament de nous i més sensibles mètodes d'anàlisi ha permès alertar de la presència d'altres contaminants, potencialment perillosos, anomenats globalment com a emergents. Els contaminants emergents, l'estudi dels quals es troba entre les línies prioritàries de recerca dels principals organismes dedicats a la protecció de la salut pública i mediambiental, com ara l'Organització Mundial de la Salut (OMS), l'Agència de Protecció Ambiental d'Estats Units (EPA), o la pròpia Comissió Europea (CE), es defineixen com a contaminants prèviament desconeguts o no reconeguts com a tals la presència dels quals en el medi ambient no és necessàriament nova, però si la preocupació per les possibles conseqüències de la mateixa, que fins ara ha estat en gran part inadvertida en termes de distribució i/o concentració. Són compostos orgànics de diferent origen i naturalesa química dels quals se sap relativament poc o gens sobre la seva presència i impacte en els diferents

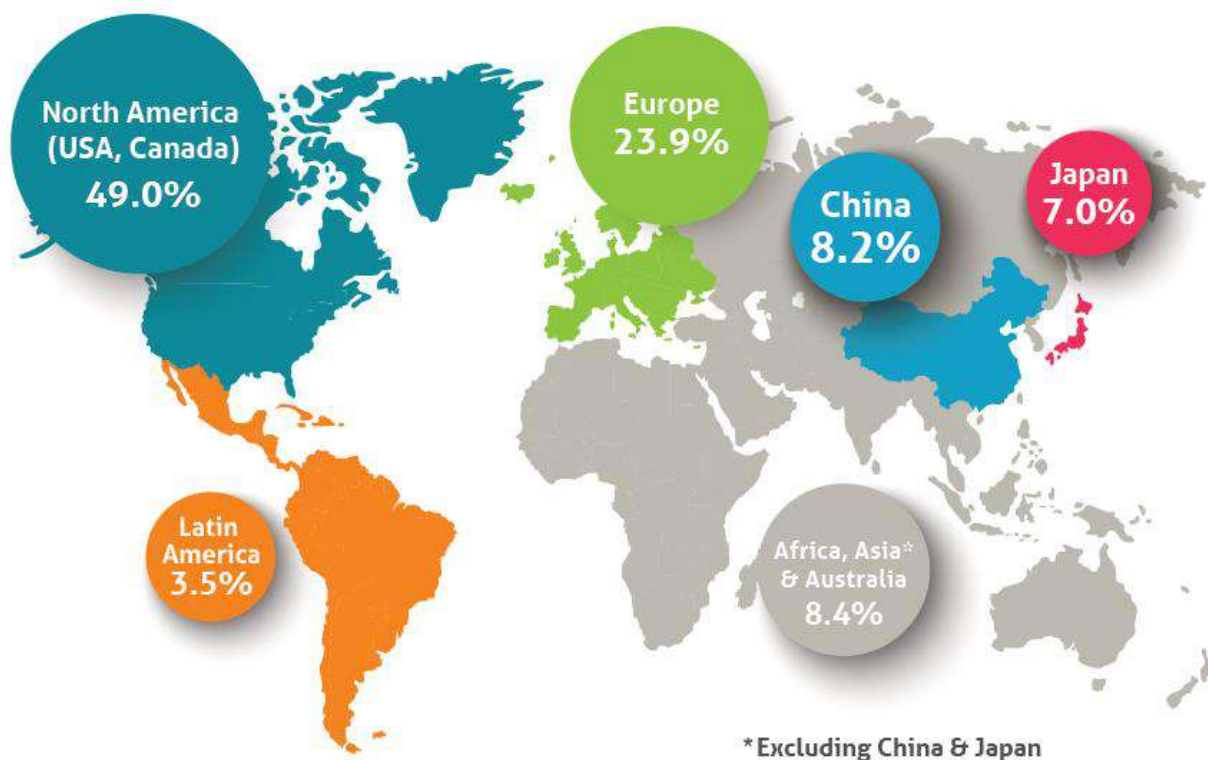
compartiments ambientals i en l'ésser humà, raó per la qual (i alhora conseqüència) de que no hagin estat degudament regulats. Tanmateix, la disponibilitat de mètodes per a la seva anàlisi és també nul·la o limitada. Aquest terme, doncs, abasta una àmplia varietat de productes d'ús diari amb aplicacions industrials i domèstiques. Entre aquests compostos trobem: els retardants de flama bromats; els cloroalcans; els pesticides polars; els compostos perfluorats; els plastificants; els fàrmacs, les drogues d'abús i els seus metabòlits; els productes d'higiene personal (en anglès, *Personal Care Products*, PCPs) com desodorants, xampús, pastes dentífriques, fragàncies i cosmètics; els additius industrials; els tensioactius; els esteroides, les hormones i altres compostos disruptius endocrins; els nanomaterials; els organofosforats ignífugs; i també els subproductes dels articles desinfectants. Aquests contaminants es caracteritzen per presentar una alta taxa de transformació i remoció, però alhora, hi ha una reincorporació contínua als diferents compartiments ambientals a causa de l'activitat humana diària; per tant, no necessiten estar constantment en el medi ambient per causar efectes negatius sobre el mateix (Petrović, Gonzalez, et al., 2003; Roig Bondia, 2013). Gràcies als nous mètodes d'anàlisi, s'ha pogut determinar amb més exactitud la seva presència i la seva bioacumulació ambiental en múltiples fonts d'aigua arreu del món (Díaz-Cruz & Barceló, 2015). Tanmateix, ens centrarem a parlar dels fàrmacs, el principal fil conductor de la present tesis.

### 2.2.1. ELS FÀRMACS COM A CONTAMINANTS EMERGENTS

D'acord amb la definició de l'OMS, un fàrmac o principi actiu (en anglès *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) és una substància química emprada, degut a les seves propietats medicinals, en la producció de medicaments destinats a proporcionar certa activitat farmacològica o a tenir efecte directe en el diagnòstic, curació, mitigació, tractament o prevenció de malalties, o per tenir efecte directe en restaurar, corregir o modificar les funcions fisiològiques dels éssers humans i els animals (WHO, 2011). Així doncs, és important remarcar que els productes farmacèutics són indispensables pel manteniment de la salut pública i la qualitat de vida de la societat actual, i és per aquest motiu que anualment es consumeixen una gran quantitat d'ells arreu del món. De fet, milers de tones de substàncies farmacològicament actives s'utilitzen anualment per tractar malalties de tipologies molt diverses, alleujar-ne el dolor o

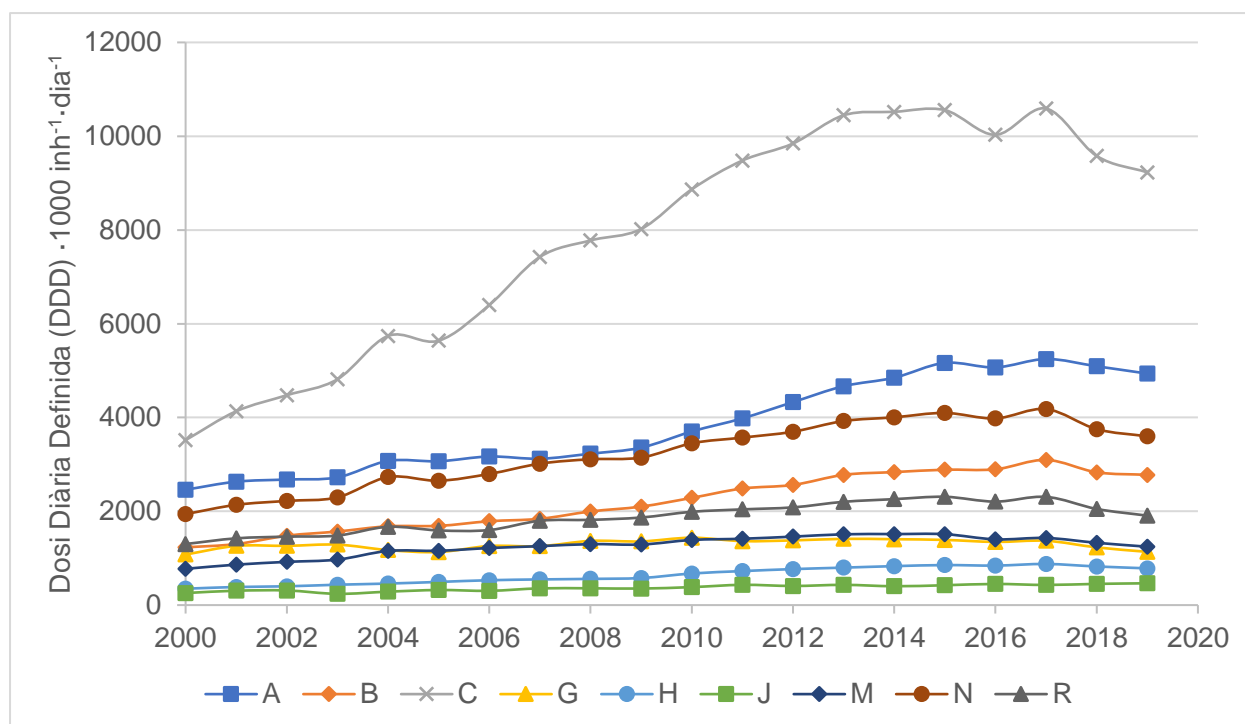
suavitzar-ne els processos febrils derivats. A més, aquestes substàncies també són àmpliament emprades per controlar la natalitat o per afrontar l'estrès de la vida moderna. Tanmateix, la cria d'animals (ramaderia, avicultura, piscicultura) també porta associada un gran consum de fàrmacs: antibiòtics, additius alimentaris, hormones i parasiticides són administrats al bestiar, les aus i els peixos de piscifactoria. Finalment, la demanda creixent de productes amb l'etiqueta de beneficiosos per a la salut ha disparat recentment el consum de suplementes dietètics amb formulacions que sovint contenen hormones i altre espècies que presenten una acció antimicrobiana, antisèptica o neuroquímica.

En conseqüència, actualment es calcula que, a tot el món, es consumeixen més de 100.000 tones/any de fàrmacs, en forma de més de 4.000 productes farmacèutics diferents (Howard & Muir, 2011; Touraud & Roig, 2008). El 2015, per exemple, la indústria farmacèutica va generar aproximadament un bilió d'ingressos (en US\$) a tot el món i es calcula que aquest valor ha anat augmentant els darrers anys (EFPIA, 2016). Segons l'últim informe de la Federació Europea d'Indústries i Associacions Farmacèutiques publicat el 2021 (en anglès, *European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*, EFPIA), els majors mercats farmacèutics es localitzen a Amèrica del Nord, on es consumeixen el 49% dels fàrmacs produïts a tot el món, i a la Unió Europea (UE), que en consumeix el 24% del mercat global, tal com mostra la **Figura 1**. A Europa, s'estima un consum per habitant variable d'entre 50-150 g/persona/any (Jones, Voulvoulis, et al., 2001). Als Estats Units, segons dades de l'Administració d'Aliments i Fàrmacs (en anglès, *Food and Drugs Agency*, FDA), hi ha més de 10.000 prescripcions i productes farmacèutics sense recepta amb més de 1.300 principis actius únics registrats i aprovats per al seu ús al país (Žonja, 2017). Pel que fa a la UE, actualment hi ha autoritzades unes 3.000 substàncies farmacèutiques actives, amb una gran variabilitat entre els estats membres pel que fa a la seva producció i administració d'un any a un altre (Howard & Muir, 2011; Rodríguez, 2012). A més, factors com la millora contínua de la qualitat de vida i l'ús de fàrmacs genèrics suggereixen que el consum de productes farmacèutics és probable que augmenti dràsticament en els propers anys (Rodríguez, 2012).



**Figura 1.** Distribució del mercat farmacèutic mundial. Percentatge de vendes efectuades el 2020.  
Font: IQVIA (MIDAS), abril 2021 (EFPIA 2021).

De fet, segons dades de l'Organització per a la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic (OCDE), el nombre de nous productes farmacèutics anuals i el volum de medicaments consumits a Europa gairebé s'han duplicat en l'última dècada (OECD, 2021). Aquest augment, com es pot observar a la **Figura 2**, va ser impulsat per un major ús d'antimicrobians així com de medicaments farmacèutics relacionats amb l'envelliment i les malalties cròniques (antihipertensius, fàrmacs hipocolesterolèmics, antidiabètics i antidepressius), afeccions molt més presents els darrers anys (OECD, 2021). Els productes farmacèutics cardiovasculars i els antineoplàstics van mostrar l'augment més elevat durant aquest període, una tendència que es preveu similar en el consum global de productes farmacèutics l'any 2050, seguint les projeccions demogràfiques a tota Europa (Van Der Aa, Kommer, et al., 2011).



**Figura 2.** Consum total de productes farmacèutics (Dosi Diària Definida (DDD)·1000 inh<sup>-1</sup>·dia<sup>-1</sup>) de 9 grups anatòmics diferents (A - Aparell digestiu i metabolisme, B - Sang i òrgans hematològics, C - Sistema cardiovascular, G - Sistema genito-urinari i hormones sexuals, H - Preparats hormonal sistèmics, excepte les hormones sexuals i les insulines, J - Antiinfecciosos per a ús sistèmic, M - Sistema musculoesquelètic, N - Sistema nerviós i R - Sistema respiratori) en 22 països de l'OCDE (Àustria, Bèlgica, República Txeca, Dinamarca, Estònia, Finlàndia, Alemanya, Grècia, Hongria, Islàndia, Itàlia, Letònia, Lituània, Luxemburg, Països Baixos, Noruega, Portugal, República Eslovaca, Eslovènia, Espanya, Suècia i Regne Unit) del 2000 al 2019 (OCDE Health Statistics, 2022).

Tanmateix, les primeres evidències de la presència de fàrmacs al medi ambient daten de 1976, quan es va informar de la detecció de l'àcid clofibrí (el metabòlit bioactiu d'una sèrie de fàrmacs que redueixen els triglicèrids sèrics) a concentracions d'entre 0,8 i 2 µg L<sup>-1</sup> en un dipòsit d'aigua subterrània que s'havia recarregat amb aigües residuals tractades (Garrison, Pope, et al., 1976). De fet, aquest regulador lipídic va ser trobat de nou l'any següent juntament amb d'altres productes farmacèutics com l'aspirina, la cafeïna i la nicotina en un estudi punter a l'època sobre contaminació d'una planta de tractament d'aigües residuals de Kansas City (Estats Units), tot documentant-ne la seva presència tant a les aigües residuals d'entrada com als efluents de sortida de l'estació depuradora (Hignite & Azarnoff, 1977). Tot i això, en aquell moment no es va donar gaire importància a aquest fet i se'n van obviar els resultats.



El destí, però, va fer que 15 anys després, quan científics alemanys buscaven herbicides a l'aigua de la regió de Berlin el 1992, tornessin a topiar-se amb l'àcid clofíbric (Halling-Sørensen, Nors Nielsen, et al., 1998). Aquell mateix any, diversos estudis realitzats per investigadors d'Alemanya, Dinamarca i Suècia van trobar de nou la presència d'aquest fàrmac a rius, llacs i zones costaneres del Mar del Nord (Peñate, Javier, et al., 2009). A partir d'aquests resultats, investigadors nord-americans van començar a prendre consciència a la qüestió de trobar-se els fàrmacs al medi ambient i a adoptar mesures al respecte (Raloff, 1998). No obstant això, l'àcid clofíbric ha continuat essent detectat molt freqüentment en efluents d'aigües residuals, aigües subterrànies i aigües superficials arreu del món (Boyd, Palmeri, et al., 2004; Buser, Müller, et al., 1998; Stan & Heberer, 1997; Stumpf, Ternes, et al., 1999), demostrant el fet que certs fàrmacs presenten persistència al medi ambient (en el cas de l'àcid clofíbric, estimada en 21 anys (Buser, Müller, et al., 1998)) i que l'ús terapèutic és la font principal d'aquest fàrmacs per arribar als efluents d'aigües residuals i d'allà al conjunt del medi aquàtic (Skoumal Canals, 2009; Stan, Heberer, et al., 1994).

De la mateixa manera, al 1981 es va documentar també la presència de fàrmacs en concentracions superiors a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  a Anglaterra (Ribera Fuentes, 2010) i uns anys més tard, al 1985, s'identificaven l'ibuprofè i el naproxèn (dos antiinflamatoris) en mostres d'aigües residuals al Canadà (Servos, Smith, et al., 2007). Addicionalment, també es detectaven diversos antibiòtics al medi aquàtic (Skoumal Canals, 2009). Un dels primers casos de contaminació d'aigües subterrànies del que es té constància, és el d'un pou a Florida (Estats Units) contaminat amb pentobarbital, un sedant emprat en operacions quirúrgiques, el 1993. En aquest cas, l'aqüífer del que s'abastia el pou es trobava situat molt a prop de l'abocador d'una base militar on s'hi incloïen deixalles del seu hospital (Eckel, Ross, et al., 1993).

Si bé és cert que la presència d'aquest grup de compostos al medi ambient ja s'havia mencionat a la literatura científica en un primer moment (Halling-Sørensen, Nors Nielsen, et al., 1998; Hignite & Azarnoff, 1977; M. L. Richardson & Bowron, 1985), la importància d'aquest fet va passar inicialment desapercibuda, possiblement perquè la regulació internacional de fàrmacs estava dirigida per agències sanitàries que habitualment tenien un grau d'experiència limitat en matèria ambiental; atès que tradicionalment els fàrmacs no eren vistos com a contaminants ambientals potencials un cop excretats pel consumidor sinó que destacaven per les seves propietats

sanadores. No obstant això, la quantitat de fàrmacs presents en el medi ambient i, més concretament, en el medi aquàtic va anar creixent exponencialment amb el pas del temps, arribant a totes les regions del planeta degut a la dispersió de la contaminació per tots els compartiments ambientals. En els darrers anys, doncs, s'ha començat a prendre consciència de que aquests canvis afecten a la salut dels ecosistemes i a la nostra pròpia, de manera que s'han començat a aplicar mesures de control d'aquests contaminants.

En el següent apartat, s'intentarà resumir la legislació aprovada per diferents estaments en matèria de qualitat d'aigües, així com les referents als productes farmacèutics.

### **2.3. LEGISLACIÓ SOBRE CONTAMINACIÓ AMBIENTAL I DEL MEDI AQUÀTIC. REGULACIÓ SOBRE PRODUCTES FARMACÈUTICS EN EL MEDI AMBIENT.**

En el marc de la protecció del medi aquàtic, existeix legislació a nivell europeu que regula els diferents aspectes de la seva preservació, com es veurà a continuació, així com també diversos convenis i protocols que promouen accions per a la millora del medi ambient, com és el cas del *Conveni de Rotterdam* o el *Conveni d'Estocolm*, mencionats prèviament. Tot i que aquests protocols no són vinculants, han influït notablement en la creació de la legislació en matèria de protecció mediambiental actual (veure **Figura 3**).

El *Conveni de Rotterdam* (firmat el 1998, en vigor a partir del 2004), per exemple, proposa promoure la responsabilitat compartida en el comerç internacional de certs productes químics perillosos per a protegir la salut humana i el medi ambient i contribuir a una utilització ambientalment racional dels compostos químics. Actualment, aquest conveni s'aplica a 52 productes químics (35 pesticides, 16 productes industrials i 1 compost químic enumerat en ambdues categories). L'aplicació del *Conveni de Rotterdam* dins la Unió Europea es regeix pel Reglament (UE) núm. 649/2012 del Parlament Europeu i del Consell, de 4 de juliol de 2012, relatiu a l'exportació i importació de productes químics perillosos (European Union, 2017), que substitueix el Reglament (CE) núm. 689/2008 vigent anteriorment, que establia les mesures necessàries per a l'aplicació a la UE del Conveni de Rotterdam (European Union, 2008b). Aquest Reglament també aplica un requisit del *Conveni*

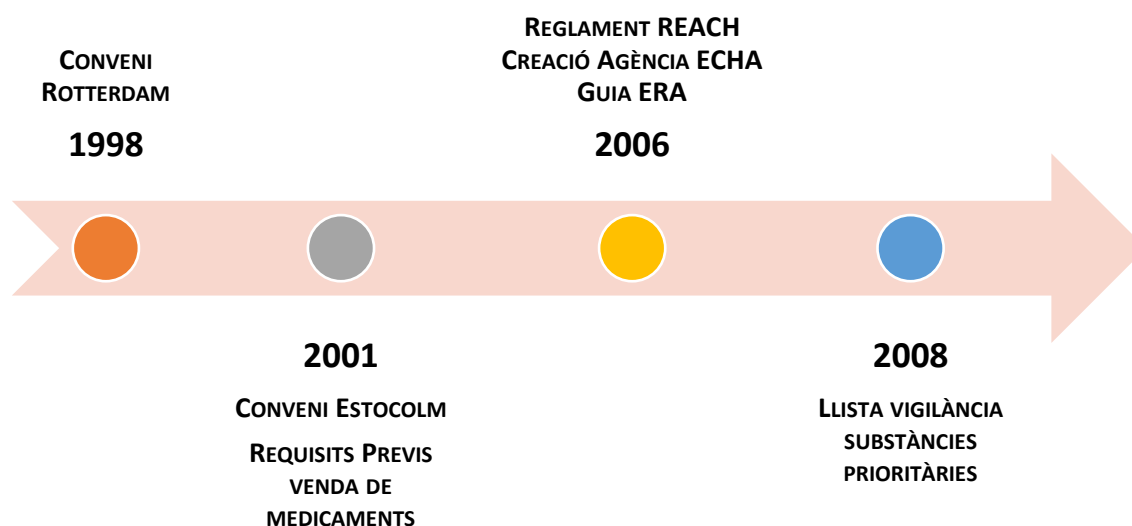
d'Estocolm sobre els contaminants orgànics persistents (en anglès, *Persistent Organic Pollutants*, POPs), ja que prohibeix l'exportació dels productes químics assenyalats com a tals al Conveni, excepte en el cas d'alguna de les excepcions específiques contemplades en el mateix.

D'altra banda, el *Conveni d'Estocolm* (firmat el 2001, en vigor a partir del 2004), plasmat en la Decisió 2006/507/CE del Consell Europeu (European Council, 2006a), té com a objectiu protegir la salut humana i el medi ambient de substàncies químiques tòxiques que són resistents a la biodegradació, que s'acumulen en els organismes vius, es transporten a llargues distàncies, contaminen l'ambient i danyen la salut; una definició bastant exhaustiva del que avui dia coneixem com a contaminants orgànics persistents (POPs). Aquest protocol estableix la prohibició i/o adopció de les mesures necessàries per a eliminar la producció, l'ús i la importació/exportació del que inicialment es va anomenar la "dotzena bruta", un grup de substàncies considerades POPs que incloïa diferents plaguicides, químics industrials, dioxines i furans. A aquests dotze tòxics, se n'hi van afegir nou l'any 2010 i nou més fins al 2019, essent actualment un total de 30 les substàncies legislades. El DDT, inclòs a la llista dels POPs, és una de les excepcions del Conveni, ja que encara s'utilitza de manera restrictiva com a pesticida en la lluita contra els vectors de determinades malalties (com la malària) en països en vies de desenvolupament i també, de retruc, es forma com a producte intermediari en la producció del pesticida dicofol (Turgut, Gokbulut, et al., 2009). Respecte els contaminants produïts de forma no intencionada, com són les dioxines, els furans, l'hexaclorobenzè i els bifenils policlorats (PCBs), el Conveni estableix mesures per reduir les emissions totals d'aquests contaminants amb l'objectiu d'aconseguir una reducció progressiva i, quan sigui viable, eliminar-los definitivament (Navarro-Ortega, 2009).

Mes tard, per tal de millorar el coneixement sobre els productes químics existents i els de nova creació que es produïen en el si de la UE, l'any 2006 es va aprovar el Reglament CE núm. 1907/2006 del Parlament Europeu i del Consell, de 18 de desembre, referent al sistema REACH (de l'anglès, *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) (European Council, 2006b). Aquesta normativa el que pretén és registrar, avaluar i autoritzar els compostos químics que puguin produir potencialment efectes nocius al medi ambient i, indirectament, a l'home. Per tal de controlar el compliment d'aquesta nova normativa, el Reglament

també impulsava la creació de l'Agència Europea de Productes Químics (*European Chemicals Agency*, ECHA), en funcionament des del juny de 2007, i que s'encarrega de gestiona els aspectes tècnics, científics i administratius del moviment dels productes químics a la UE.

Com es pot observar, les Normes internacionals i les Directives europees s'han caracteritzat sempre per la seva complexitat, degut especialment a les excepcions, correccions, annexos i interconnexions entre unes i altres. A més a més, abans d'entrar en vigor, les diverses Directives han de ser transposades a cadascun dels països membres, on sovint l'aprovació es fa amb el text íntegre proposat per la UE però afegint pròrrogues per adaptar la nova llei al marc econòmic i legal nacional en vigor, com va succeir a Espanya.



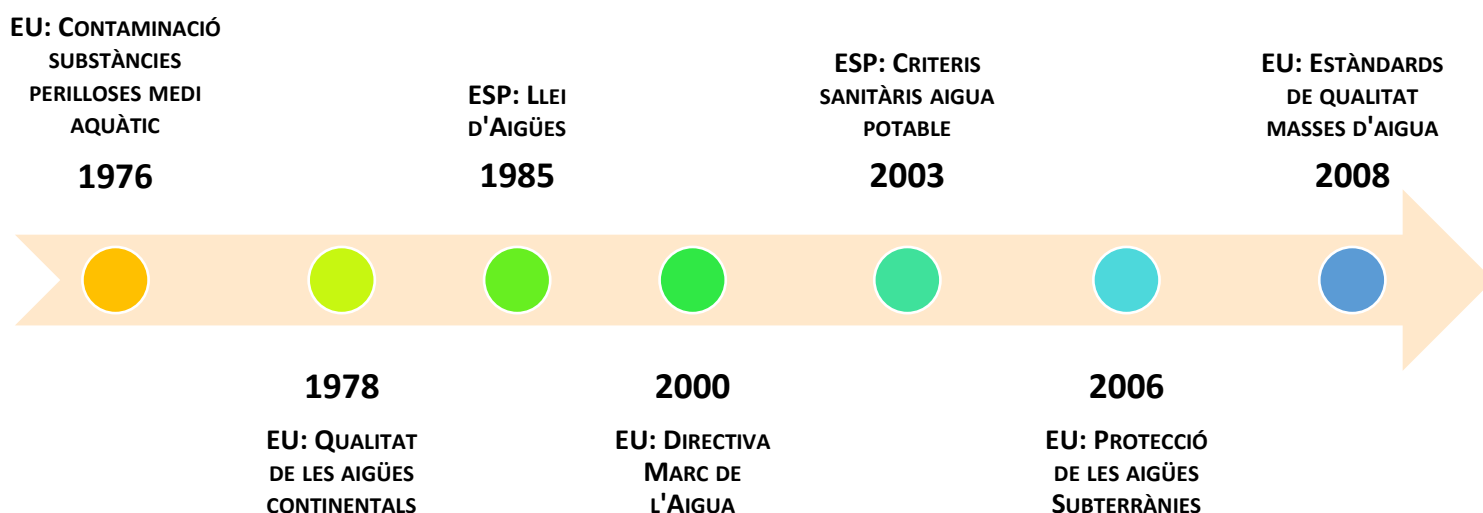
**Figura 3.** Cronograma de la legislació sobre contaminants i fàrmacs en el medi ambient.

En referència al medi aquàtic (veure cronograma a la **Figura 4**), històricament sempre s'ha considerat l'aigua com un recurs natural que s'ha de preservar d'una mala utilització o privatització per part de col·lectius o d'individuals, i ja l'any 1879 s'establia a Espanya la primera Llei d'Aigües, derogada posteriorment per l'entrada en vigor de la Llei 25/1985, de 2 d'agost (BOE núm. 189, de 8 d'agost de 1985) (BOE, 1985), on es posava de manifest que *"l'aigua és un recurs natural escàs, indispensable per a la vida i per a l'exercici de la immensa majoria de les activitats econòmiques; és irremplaçable, no ampliable per la mera voluntat de l'home, irregular en la forma de presentar-se en el temps i en l'espai, fàcilment vulnerable i susceptible d'usos*

*successius*.”. Per tant, es tracta d'un recurs que ha d'estar disponible no només en la quantitat necessària, sinó també amb la qualitat precisa, en funció de les directrius de la planificació econòmica, d'acord amb les previsions de l'ordenació territorial i com la pròpia dinàmica social demanda (Barceló & López, 2008). Des de la publicació de la Llei d'Aigües de 1985 i, sobretot, des de la incorporació d'Espanya a la Unió Europea, han estat moltes les mesures legislatives que, amb un rang normatiu diferent, s'han anat adoptant progressivament amb la finalitat de protegir els recursos hídrics existents i d'harmonitzar la nostra legislació amb l'europea; ja que fins aleshores, la normativa vigent en matèria d'aigües es trobava dispersa en una àmplia varietat d'eines legislatives de diferents nivells de competència –europeu (directives), nacional (real decrets, ordres, etc.) o autonòmic (lleis, decrets legislatius)–, àmbits d'aplicació (aigües de consum humà, aigües subterrànies, aigües destinades a la producció d'aigua potable, etc.), i aspectes a regular (paràmetres de qualitat, freqüències de mostreig i anàlisi, etc.) (Barceló & López, 2008).

Tradicionalment, la legislació de la UE en matèria de qualitat d'aigües ha estat definida principalment per dues importants Directives: la Directiva 76/464/CEE del Consell, de 4 de maig de 1976 (European Council, 1976), relativa a la contaminació causada per determinades substàncies perilloses abocades al medi aquàtic de les aigües comunitàries i la Directiva 78/659/CEE del Consell, de 18 de juliol de 1978 (European Council, 1978), relativa a la qualitat de les aigües continentals que requereixen protecció o millora per a ser aptes per la vida dels peixos. Ambdues Directives, però, van quedar derogades en entrar en vigor la Directiva 2000/60/CE, del Parlament Europeu i del Consell, de 23 d'octubre de 2000 (European Council, 2000), més coneguda com a Directiva Marc de l'Aigua (DMA), per la qual s'estableix un marc comunitari d'actuació per a la protecció de les aigües superficials continentals, de transició, costaneres i subterrànies, per prevenir-ne o reduir-ne la contaminació, promoure'n l'ús sostenible, protegir el medi ambient, millorar l'estat dels ecosistemes aquàtics i atenuar els efectes de les inundacions i les sequeres. La DMA, que considera que: *“l'aigua no és un bé comercial com els altres, sinó un patrimoni que cal protegir, defensar i tractar com a tal”*, es caracteritza per presentar una visió global i un marc d'acció local, on s'especifiquen les mesures a prendre per aconseguir la protecció integrada de l'aigua i la qualitat química i ecològica d'aquesta, mitjançant la reducció progressiva de la contaminació existent i, en el cas de les anomenades

substàncies perilloses prioritàries, mitjançant el cessament o la progressiva eliminació d'abocaments, emissions i pèrdues d'aquests compostos. Les substàncies que aquesta Directiva (i les posteriors que la modifiquen) estableix com d'interès prioritari a l'aigua (33 en total) es troben recollides en una llista dinàmica (Decisió Núm. 2455/2001/EC) que es revisada cada quatre anys (Barceló & López, 2008).



**Figura 4.** Cronograma de part de la legislació sobre contaminants en el medi aquàtic.

A banda del control dels compostos inclosos en aquesta llista, d'acord amb la DMA, els aspectes biològics i hidromorfològics prenen rellevància en la diagnosi integrada de la qualitat de l'aigua. Com a complement a aquesta Directiva, doncs, posteriorment es van adoptar la Directiva 2006/118/CE del Parlament Europeu i del Consell, de 12 de desembre de 2006 (European Union, 2006), relativa a la protecció de les aigües subterrànies contra la contaminació i el deteriorament, i la Directiva 2008/105/CE, de 16 de desembre de 2008 (European Union, 2008a), relativa a les normes de qualitat ambiental en l'àmbit de la política d'aigües, on es modificava la DMA i en què s'indiquen els estàndards de qualitat de les diferents masses d'aigua i es defineixen concentracions màximes admissibles i mitjanes anuals per a les substàncies considerades com a prioritàries i altres contaminants en aigües superficials i biota. Tanmateix, a Espanya es va adoptar el Reial Decret 14/2003, de 7 de febrer (BOE, 2003), on s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà, i amb el qual quedava incorporada a l'ordenament jurídic espanyol la Directiva comunitària 98/83/CE, referent a aquesta mateixa qüestió (European Council, 1998),

recentment refosa com a Directiva (UE) 2020/2184 del Parlament Europeu i del Consell, de 16 de desembre de 2020 (European Union, 2020).

D'altra banda, el novembre del 2001 es publicà la Directiva 2001/83/CE del Parlament Europeu i del Consell (European Union, 2001), que estableix els requisits que ha de complir un medicament per poder ésser comercialitzat en qualsevol estat membre de la Unió Europea. Un dels requisits descrits en aquesta Directiva és el que es detalla a l'article 8 (3g), en el que es fa explícita referència a que la sol·licitud d'aprovació del medicament ha de venir acompanyada d'un estudi del risc potencial pel medi ambient, també anomenada avaluació de risc ambiental (en anglès, *Environmental Risk Assessment*, ERA). Tot i això, fins al 2005 el procés d'autorització per la comercialització de fàrmacs no incloïa cap avaluació de l'impacte ambiental (Aceña i Sánchez, 2017).

Per tal de desenvolupar una metodologia que permeti l'avaluació del risc ambiental, l'Agència Europea de Medicaments (en anglès, *European Medicines Agency*, EMA) designà un comitè, el Comitè per a Productes Medicinals d'Ús Humà (en anglès, *Committee for Medicinal Products for Human Use*, CHMP). Aquest comitè és l'encarregat d'avaluar si un medicament compleix els requisits científics exigits per aquesta Directiva per tal de poder acceptar-ne la comercialització a la Unió Europea. Al juny del 2006, el CHMP publicà una guia per a l'avaluació del risc ambiental que contempla els requisits que han de complir tots els nous fàrmacs que es produeixen a partir del 2001 (EMA, 2006). En aquesta guia, s'explica la metodologia que cal seguir per a la realització d'un anàlisi que permeti caracteritzar el risc d'una substància per al medi ambient. Aquest ERA es descriu com un procés que consta de dues fases: l'estimació de l'exposició d'un fàrmac al medi ambient (Fase I), mitjançant el càlcul de les concentracions ambientals previstes (en anglès *Predicted Environmental Concentrations*, PECs) de la substància farmacèutica, i l'anàlisi del destí i avaluació dels seus possibles efectes sobre el medi ambient (Fase II), que s'obté comparant els PECs i les concentracions previstes sense efecte (*Predicted No Effect Concentrations*, PNECs). Aquest darrer paràmetre, es calcula aplicant un factor d'avaluació (*Assessment Factor*, AF) a la concentració més baixa sense efectes observats (*No-Observed-Effect-Concentration*, NOEC), que s'obté com a resultat de les proves de toxicitat a llarg termini rellevants realitzades (EMA, 2006).

Així, d'acord amb la DMA i la Directiva 2008/105/CE, mencionades anteriorment, s'estableix la "*llista de vigilància*" de substàncies prioritàries que requereixen un seguiment dirigit a tota la UE, que a partir de 2015 va incloure diversos fàrmacs i hormones en la mateixa. Aquesta llista dóna suport al procés de prioritització en futures revisions de la Directiva 2008/105/CE (Gimeno Melià, 2019). A més, el protocol estableix estàndards de qualitat ambiental (en anglès *Environmental Quality Standards*, EQS) per a aquestes substàncies prioritàries en les aigües superficials (rius, llacs, de transició i costaneres) i en defineix les concentracions mitjanes anuals (*Annual Average Concentrations*, AA-EQS), que atorguen una protecció contra l'exposició prolongada, i les concentracions màximes acceptables (*Maximum Acceptable Concentrations*, MAC-EQS), que confereixen una protecció contra concentracions elevades de les substàncies a curt termini.

Si bé el PNEC previst a l'ERA dels fàrmacs és només una part d'una avaluació de riscos, l'EQS d'aquest protocol és un llindar global que protegeix tots els receptors i rutes dins de l'aigua. Tanmateix, els procediments per estimar els AA-EQS (rellevants per als productes farmacèutics) i els PNEC a les aigües superficials (descrits a la guia REACH; (ECHA, 2012)) són els mateixos (s'empren les mateixes dades d'ecotoxicitat i AF per ambdós càlculs), de manera que tots dos valors solen coincidir normalment (European Commission, 2018). No obstant això, cal remarcar que l'establiment d'EQS per a substàncies prioritàries resulta d'un procés científic, basat en estudis ecotoxicològics, i d'un procés polític, és a dir, a la UE les modificacions a la Directiva 2008/105/CE es negocien al Consell Europeu i al Parlament Europeu per part dels Estats membres (Gimeno Melià, 2019). Així, els països europeus haurien d'aplicar mesures amb l'objectiu d'aconseguir un bon estat químic de l'aigua i, per tant, que es compleixin els EQS per a totes les substàncies prioritàries en el conjunt de les seves masses d'aigua.

Tot i això, com s'ha mencionat, fins al 2005 el procés d'autorització per la comercialització de fàrmacs no incloïa cap avaluació de riscos mediambientals. Actualment, aquests processos estan subjectes a alguns marcs normatius per la producció i comercialització de productes químics a Europa que comencen a incloure una avaluació de la seva possible persistència, bioacumulació i toxicitat. Anys després de sonar les alarmes sobre la presència de traces de fàrmacs no només al medi aquàtic, sinó fins i tot a l'aigua destinada al consum humà, l'abocament d'aquest tipus



de substàncies al medi ambient es troba actualment regulat. No obstant això, avui dia encara no existeixen regulacions o controls estrictes sobre els efectes dels productes farmacèutics al medi ambient i, en conseqüència, multitud d'investigacions científiques i projectes d'investigació han sorgit els darrers anys centrats en determinar la presència i les possibles conseqüències d'aquests compostos sobre els diferents ecosistemes.

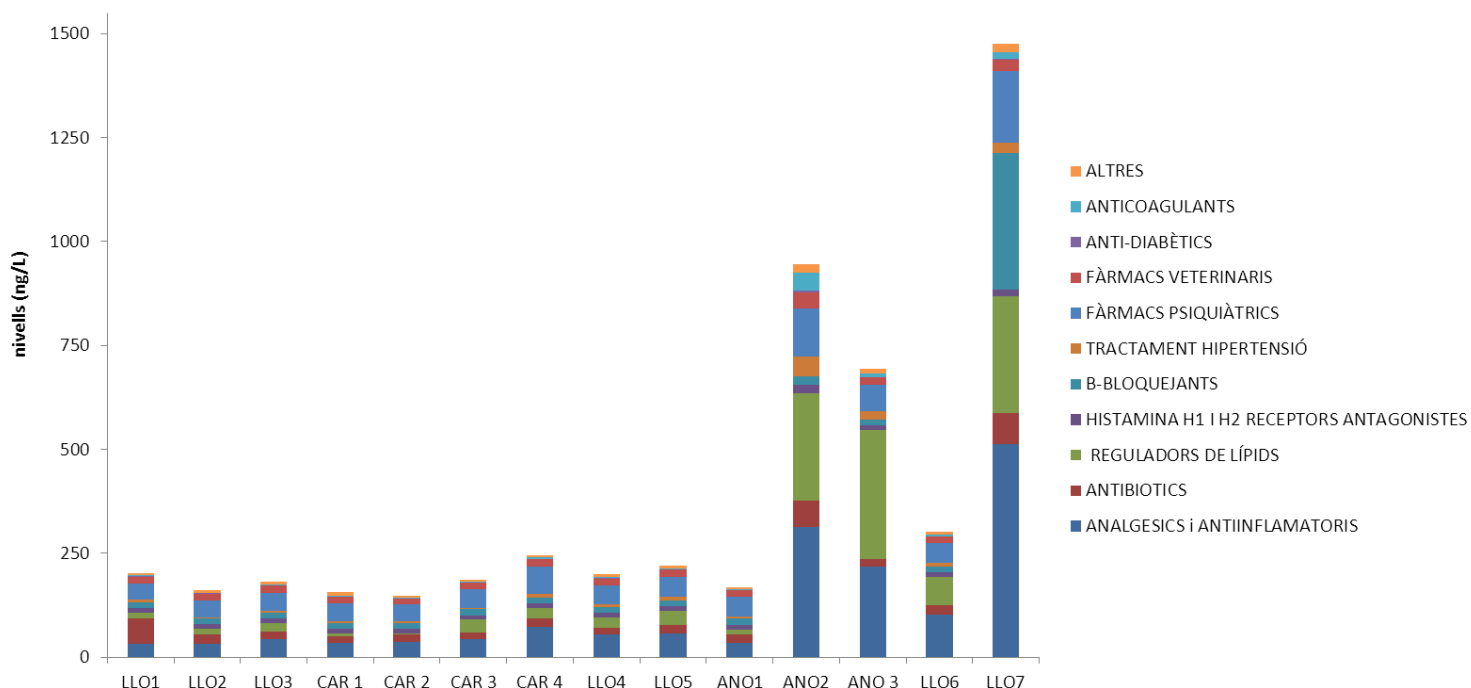
### **2.4. ELS FÀRMACS A LES AIGÜES RESIDUALS I AL MEDI AMBIENT. APARICIÓ, MOBILITAT I PROBLEMÀTICA.**

Els productes farmacèutics són àmpliament utilitzats a tot el món per prevenir o combatre malalties. Amb volums de producció a l'alça i un consum cada dia més elevat, sumant-hi el fet que l'abocament d'aquests compostos hagi estat poc regulat i objecte d'escasses restriccions fins fa pocs anys, s'ha contribuït considerablement a la seva àmplia difusió al medi ambient, especialment en el medi aquàtic. Aquesta elevada presència fa que aquests compostos puguin suposar un perill d'exposició crònica als éssers vius del medi aquàtic (Skoumal Canals, 2009).

Majoritàriament, els productes farmacèutics es consumeixen als hospitals o es compren a les farmàcies (amb o sense recepta mèdica) per a un consum domiciliari. Així doncs, quan el medicament ha complert la seva funció terapèutica, aquestes substàncies poden ser directament excretades sense canvis aparents (és a dir, com a substàncies actives) o bé metabolitzades pels enzims de l'organisme i eliminades a través de la femta fecal o mitjançant l'orina en major o menor quantitat (Daughton & Ternes, 1999; Ternes, 1998). Un cop eliminades del cos, aquestes substàncies van a parar a les canonades i d'allà a les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR) abans de ser retornades, malauradament, al medi ambient. També es poden abocar a les clavegueres per una eliminació inadequada a través de lavabos i piques. A més a més, si els fàrmacs s'administren per via tòpica, part del compost original també s'hi pot abocar després de la dutxa o juntament amb el drenatge de la rentadora (Bound & Voulvoulis, 2005; Osorio, Imbert-Bouchard, et al., 2014). Com s'espera una eliminació insignificant de la majoria dels productes farmacèutics al llarg de les canonades del clavegueram (Jelić, Rodríguez-Mozaz, et al., 2015), es habitual que aquests compostos arribin als efluent d'entrada de les depuradores en concentracions que varien des de pocs  $\text{ng L}^{-1}$  fins a centenars de  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Daughton &

Ternes, 1999). D'entre els molts tipus de fàrmacs trobats, en destaquen els analgèsics, els antiepilèptics, els antimicrobians, antidepressius, els beta-bloquejants, els reguladors lipídics en sang, els mitjans de contrast i els contraceptius orals (Bottoni, Caroli, et al., 2010; Lapworth, Baran, et al., 2012). De fet, aquestes diferents classes de fàrmacs que es detecten en l'entorn aquàtic inclouen evidentment les diferents famílies del mercat i es relacionen directament amb el seu consum. La **Figura 5** mostra, per exemple, els nivells detectats per les diferents tipologies de fàrmacs en aigua superficial del riu Llobregat durant un estudi realitzat l'any 2016 en aquest riu (Osorio, Larrañaga, et al., 2016).

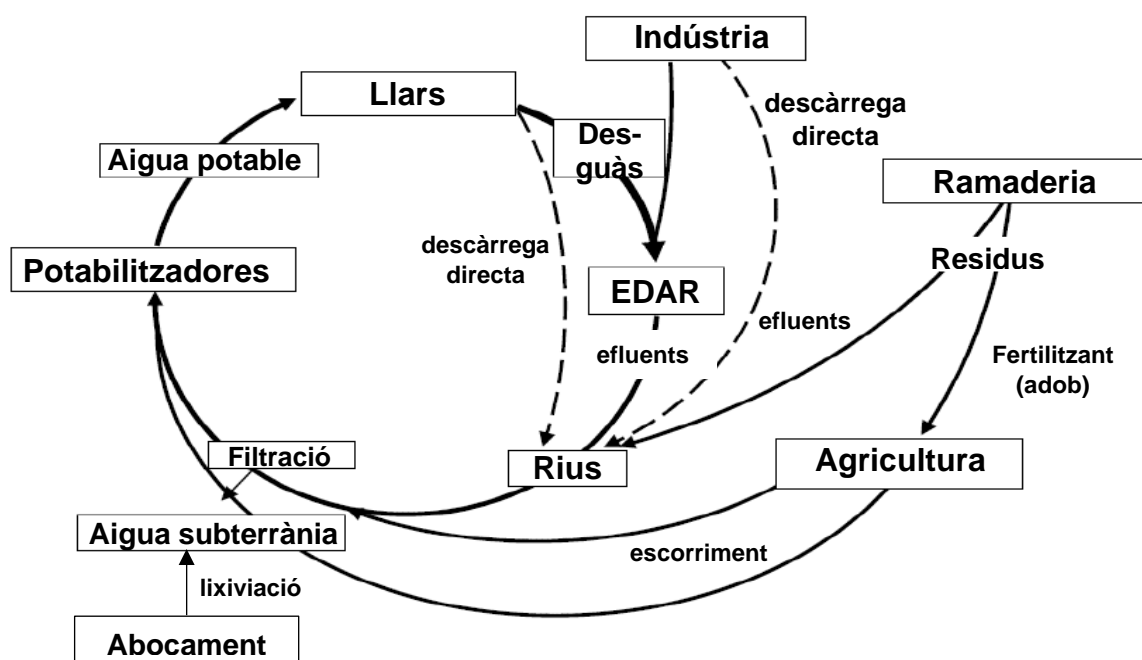
És, de fet, en aquest punt on comença la problemàtica ambiental dels fàrmacs, ja que si bé una part d'ells són degradats, molts d'aquests compostos sobreviuen sovint als tractaments aplicats a les EDAR i aconsegueixen dispersar-se inalterats amb facilitat pel medi aquàtic, on són potencialment perillosos (Radjenović, Petrović, et al., 2009; Santos, Aparicio, et al., 2007; Vieno, Tuhkanen, et al., 2007). A vegades, fins i tot, els propis efluents residuals ingressen als cursos d'aigua fluvials sense tenir cap tractament previ.



**Figura 5.** Nivells de concentració de diferents classes de fàrmacs al riu Llobregat l'any 2016. Reproduït de (Aceña i Sánchez, 2017).

En conseqüència, l'increment d'aquests productes farmacèutics en els diferents cossos d'aigua ha augmentat els darrers anys, un fet que es considerat un risc mediambiental greu, ja que gran part d'aquestes substàncies són solubles en aigua i poden ser presents en qualsevol etapa del Cicle de l'Aigua (Peñate, Javier, et al., 2009). Una altra conseqüència d'aquesta problemàtica és que els fàrmacs poden arribar a assolir les aigües subterrànies i contaminar els aqüífers o bé quedar retinguts a terra i acumular-se als fangs (Bergheim, Gieré, et al., 2012). A més, l'aigua de rius i torrents és un vehicle de transport dels fàrmacs, de tal manera que, si no es depura, aquests van a parar en últim terme al mar, que té una certa capacitat autodepuradora, però si es sobrepassa es poden originar problemes greus a l'ecosistema (Doménech, 2000). Per tant, la preocupació sobre aquesta tipologia de contaminants és alarmant, ja que la seva activitat biològica intrínseca pot ocasionar efectes adversos al conjunt dels sistemes aquàtics i, de retruc, sobre la salut humana (Yan & Song, 2014).

La **Figura 6** mostra, doncs, el periple que pot seguir un fàrmac des de que es produeix fins que entra en contacte amb el medi ambient.



**Figura 6.** Difusió d'un fàrmac dins del Cicle de l'Aigua. Figura adaptada de (Barceló & López, 2008).

Segons la literatura (Skoumal Canals, 2009), després de la seva administració, els Productes Farmacèutics i d'Higiene Personal (en anglès, *Pharmaceuticals and Personal Care Products*, PPCP) i els seus metabòlits, a part d'assolir les aigües fluvials a través de les EDAR, també poden arribar al medi ambient mitjançant altres vies d'entrada, com per exemple: els efluent dels punts de fabricació i dels hospitals, com a resultat d'operacions d'alimentació animal a l'engròs (macrogranjes), per eliminació directa dels mateixos fàrmacs o per aplicació terrestre de biosòlids (Daughton & Ternes, 1999). Si bé, les principals vies per les quals els productes farmacèutics s'introdueixen al medi aquàtic són:

- a) L'abocament directe als cursos fluvials o bé a través d'aigües sortints de les EDAR, que desemboquen a les aigües superficials.
- b) Les aigües d'escorriment (*runoff waters*), que arrosseguen els fàrmacs dels sòls contaminats i els transporten als cursos fluvials o llacs propers causant la contaminació de les aigües superficials (Lapworth, Baran, et al., 2012).
- c) La contaminació d'aigües subterrànies per filtració de PPCPs tant des de sòls contaminats com des d'aigües superficials contaminades.
- d) L'administració de fàrmacs a peixos criats en piscifactories situades en rius i mars.
- e) L'aigua de la pluja o la humitat ambiental acumulada, que pot dissoldre els PPCPs dels sòls contaminats i provocar-ne la filtració fins a les aigües subterrànies dels aqüífers.

La forma més directa de contaminació d'aigües amb productes farmacèutics és l'abocament d'aigua residual tractada (Daughton & Ternes, 1999). Tot i que les EDAR eliminen molts tipus d'espècies de contaminants durant el procés de depuració, les eficiències d'eliminació per a molts fàrmacs varien sovint de planta a planta i molts d'ells s'introdueixen contínuament al medi aquàtic a través dels efluent provinents d'aquestes plantes, on molts cops no són totalment eliminats (Heberer, 2002a). De fet, la presència d'aquests compostos origina complicacions importants a les EDAR. Els fàrmacs que passen a la planta sense ser correctament depurats influeixen en el procés d'oxidació i degradació de la matèria orgànica present a l'aigua, afectant negativament al funcionament normal de la pròpia planta (Osorio Osorio, 2018).

En tot cas, la fracció no eliminada s'introdueix al medi aquàtic a través de les aigües de sortida de les depuradores. En alguns casos, es dona fins i tot l'abocament directe dels PPCPs, com és el cas de llars domèstiques de municipis que no tracten les seves aigües residuals. Aquest rebuig inadequat de productes farmacèutics caducats a nivell domèstic també contribueix en gran mesura a la presència de fàrmacs a les aigües residuals (Kuspis & Krenzelok, 1996). Els residus de les factories farmacèutiques també poden representar fonts puntuals de contaminació local importants. Els fàrmacs arriben a les aigües residuals principalment a través de deixalles de procedència humana que contenen els fàrmacs no metabolitzats i els metabòlits excretats, i també productes de neteja o higiene personal rebutjats (Radjenović, Petrović, et al., 2009).

Una altra font molt important de la contaminació de les aigües amb PPCPs prové també dels sòls contaminats. Els sòls de les terres destinades a activitats ramaderes i de cria intensiva d'aviram pateixen una contaminació amb els residus biològics d'aquests animal, els quals han estat tractats amb hormones i altres medicaments que excreten parcialment metabolitzats (Shore, Shemesh, et al., 1988; Warman & Thomas, 1981). Aquestes hormones, que s'utilitzen com a promotors del creixement de les aus, arriben als sòls a través dels excrements dels animals. D'altra banda, es solen detectar antibiòtics en residus de granges ramaderes (Meyer, Ferrell, et al., 2004). La contaminació de sòls amb fàrmacs també és causada per la implantació d'abocadors. Diversos analgèsics han estat detectats en sòls i aigües subterrànies als camps utilitzats com a abocadors de deixalles sòlides de les ciutats (Ahel & Jeličić, 2001). L'estructura polar de molts productes farmacèutics evita que s'adsorbeixin de manera significativa al subsol i en facilita el transport, afavorint que es vagin filtrant als aqüífers tant des de les aigües superficials com des dels sòls contaminats (Stan & Heberer, 1997).

Finalment, l'aqüicultura incontrolada i/o il·legal és una altra de les causes principals de la presència de PPCPs al medi ambient. S'ha documentat que del total dels fàrmacs utilitzats en medicina veterinària que s'administren als peixos de les piscifactories, en contacte directe amb el mar o rius, entre un 70 – 80% es pot introduir al medi ambient (Jacobsen & Berglind, 1988; Rigos, Nengas, et al., 2004). En sediments subjacents a algunes piscifactories, s'ha arribat a trobar concentracions acumulades d'antibiòtics d'entre 0,1 – 4,9 mg per Kg de matèria seca (Ahel & Jeličić, 2001). Com que els productes farmacèutics poden presentar temps de semi-vida

elevats, s'acumulen i assoleixen valors de concentració als quals poden ser biològicament actius (Halling-Sørensen, Nors Nielsen, et al., 1998), amb el perill per la natura que aquest fet comporta.

En conseqüència, per tal de conèixer el comportament d'un fàrmac un cop ha entrat en el medi hídric, és necessari conèixer les seves propietats fisicoquímiques ja que, d'una banda, pot tendir a volatilitzar-se si la seva pressió de vapor és alta, mentre que si és una substància polar romandrà a la fase aquosa. La majoria dels fàrmacs i els seus metabòlits són molt solubles en aigua i, per tant, un cop excretats pel cos, aniran a parar a la xarxa d'aigües residuals on seran canalitzats, majoritàriament, cap a les EDAR (Ribera Fuentes, 2010). D'altra banda, si es tracta d'un compost lipofílic tendirà a associar-se amb les partícules en suspensió o la matèria orgànica i d'aquesta manera passarà als sediments o s'acumularà en la biota. Per tant, els fàrmacs menys solubles, en comptes de sortir de les EDAR a través de les aigües residuals tractades, ho faran través dels fangs produïts al llarg del procés. En aquest cas, els fangs podran anar als abocadors on romandran retinguts, o bé, podran ser aplicats als camps de conreu com a fertilitzants, amb la qual cosa aquests compostos entraran també al medi ambient (Skoumal Canals, 2009). En comparació amb els nivells d'altres POPs en sòls o en sediments (que poden arribar a rondar els  $\text{mg L}^{-1}$ ), les concentracions de compostos farmacèutics al medi ambient són molt més baixes i es solen trobar entre  $\text{ng L}^{-1}$  i  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Heberer, 2002a). En aigües residuals no tractades o en efluent tractats només biològicament, els productes farmacèutics es troben sovint en concentracions de  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Deo, 2014; Kolpin, Furlong, et al., 2002). Tanmateix, els darrers anys, s'ha detectat també la seva presència tant en rius i llacs com en mars i oceans a les zones costaneres en concentracions de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Jorgensen & Halling-Sorensen, 2000; Weigel, Berger, et al., 2004).

Aquest comportament, doncs, determina el destí dels fàrmacs a una escala més àmplia. Aquells amb una elevada solubilitat en aigua es distribueixen ràpidament gràcies al que es coneix com a Cicle de l'Aigua, arribant a llocs i compartiments aliens als focus de contaminació per escorrentia o filtració (Heberer, 2002b). Mentre que aquells amb més afinitat pels sediments es poden acumular i fer que els sediments actuïn com a embornals dels contaminants, d'on es poden alliberar quan les condicions són favorables; de forma que els sediments poden actuar com a font pròpia de contaminació (Skoumal Canals, 2009). En el moment en que entren en joc els

éssers vius presents al medi, es poden donar processos de biodegradació. Segons el tipus de compost del que es tracta, també es poden arribar a bioacumular. Es dona bioacumulació si l'organisme en qüestió no metabolitza els fàrmacs contaminants, i així, poden passar a través de la cadena tròfica i arribar fins i tot a l'home (Du, Haddad, et al., 2014). Els processos que patiran els fàrmacs en els diferents compartiments ambientals dependran fonamentalment de la seva naturalesa química, de les característiques fisicoquímiques del medi reactiu i de les condicions de reacció (humitat, temperatura, pH, etc.) (Domènech, 1999).

Així doncs, la presència de fàrmacs en els efluents líquids és un problema mediambiental greu que cal resoldre. En primer lloc, perquè no es té l'ecotoxicologia d'aquests compostos. Conseqüentment, no hi ha prou informació documentada de tots aquests fàrmacs i, per tant, se'n desconeixen encara els efectes adversos de molts d'ells (Osorio Osorio, 2018). Aquesta escassetat de documentació que fins fa relativament poc hi havia sobre la presència de fàrmacs al medi ambient ha estat motivada, en part, per la falta de mitjans analítics que detectessin i quantifiquessin les baixíssimes concentracions en què aquestes espècies es troben al medi aquàtic; ja que molt sovint les tècniques analítiques disponibles en aquell moment no presentaven límits de detecció prou baixos per certificar-ne la seva presència.

En segon lloc, molts dels fàrmacs han estat dissenyats expressament per tal de no ser degradats fàcilment, mirant d'evitar així que siguin alterats pel propi cos abans de poder donar el seu efecte terapèutic (Ribera Fuentes, 2010); un fet que n'augmenta la persistència al medi ambient i fa més probables els seus efectes tòxics. De fet, molts productes farmacèutics han estat dissenyats per tenir una acció biològica, els efectes de la qual sobre moltes espècies aquàtiques encara es desconeixen (Dietrich, Webb, et al., 2002). Tanmateix, molts dels fàrmacs acostumen a presentar propietats fisicoquímiques similars a les dels compostos típicament nocius, com són un caràcter lipofílic que els permet travessar membranes biològiques, i una certa resistència a una degradació ràpida, la qual cosa augmenta les seves possibilitats d'introduir-se als organismes vius que es troben al seu entorn. Aquestes propietats i la vinculació de diverses patologies a la presència de productes farmacèutics, han posat en dubte la innocuïtat de les exposicions cròniques a aquest tipus de compostos, fins i tot encara que es tracti de quantitats subterapèutiques (Skoumal Canals, 2009).

En tercer lloc, la gran diversitat de fàrmacs amb estructures i propietats físiques i químiques molt diferents dificulta el disseny de noves EDAR, que utilitzen tècniques avançades de tractament (Fent, Weston, et al., 2006), capaces d'eliminar tota aquesta diversitat de productes. Aquest fet, provoca una limitació en l'ús (recreatiu, industrial, agropecuari) que actualment se'n pugui fer de l'aigua tractada, degut a l'eliminació merament parcial que hi ha d'alguns d'aquests productes farmacèutics. Així mateix, els avenços en el camp de la salut i la major accessibilitat als medicaments per part de la població, fan que la fabricació i el consum de fàrmacs creixi any rere any de forma significativa, afectant novament les EDAR.

En quart lloc, degut a la introducció contínua de fàrmacs al medi, en alguns casos en grans quantitats, alguns d'ells comencen a ser considerats com a persistents (pseudo-persistents), cosa que fa que augmenti la probabilitat que organismes vius puguin manifestar efectes tòxics després de períodes llargs d'exposició, fins i tot a baixes concentracions de l'ordre de  $\text{ng L}^{-1}$  (Petrović, Gonzalez, et al., 2003). Tanmateix, roman incert el fet de si les baixíssimes concentracions dels diversos fàrmacs i dels seus metabòlits derivats que persisteixen a les aigües podran alterar l'ordre ecològic del medi o no. El fet de trobar-se en unes concentracions tan baixes fa pràcticament inexistent la possibilitat d'intoxicacions agudes, fàcilment detectables i atribuïbles a les substàncies de l'entorn, i encamina les conseqüències a possibles canvis subtils i difícils de distingir de les evolucions naturals.

Finalment, cal considerar els efectes sinèrgics o de toxicitat antagònica deguts a la presència de mescles de fàrmacs, que poden fer respectivament que la toxicitat que tindria cadascun d'ells per separat augmenti en estar amb contacte amb altres o que, contràriament, la seva interacció tingui un efecte inhibidor en la seva acció i redueix el seu caràcter contaminant (Fent, Weston, et al., 2006). Actualment, es coneix molt poc encara sobre la possibilitat d'efectes interactius entre diversos fàrmacs. De la mateixa manera que els fàrmacs poden causar efectes secundaris no desitjats en l'organisme diana, també poden presentar nombrosos efectes en organismes no diana als quals aquest fàrmac no va dirigit. Sovint poden ser efectes no esperats, ja que aquests organismes poden presentar receptors que els humans o animals de ramaderia no presenten. Ben mirat, el mecanisme d'acció dels fàrmacs en els humans, tot i que és sempre investigat, no es coneix mai en la seva totalitat i molt sovint és obscur. Molt menys encara es coneixen les vies metabòliques que poden



seguir aquests fàrmacs dins d'organismes aquàtics no diana. La major preocupació, doncs, no és una intoxicació aguda a les espècies aquàtiques o de l'espècie humana, sinó una acumulació gradual i progressiva d'aquestes substàncies a l'organisme dels consumidors d'aigua, que a llarg termini ocasioni canvis importants indistingibles d'efectes purament naturals (Bottoni, Caroli, et al., 2010).

En resum, doncs, podem dir que existeix una entrada de fàrmacs al medi ambient deguda majoritàriament al consum humà i com a resultat d'un procediment d'eliminació incomplet a través de les EDAR. Per tant, un cop assolit l'estat estacionari d'aquests compostos, ens trobem amb la presència de quantitats residuals de fàrmacs als diferents compartiments ambientals i, per consegüent, enfront un més que probable risc ambiental. Mentre que, per exemple, els fluxos de pesticides en aigües són més esporàdics i presenten una major heterogeneïtat espacial, concentrant-se majoritàriament vora les zones de cultiu, els productes farmacèutics es troben homogèniament distribuïts, ja que s'introdueixen constantment al medi vora les zones habitades o visitades per humans. D'aquesta manera, l'exposició als fàrmacs del medi té un caràcter crònic d'efectes encara no coneguts.

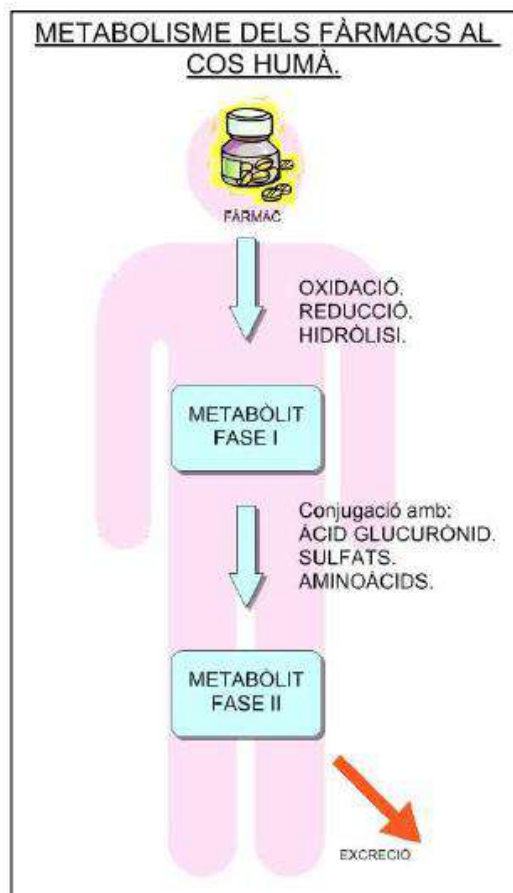
### **2.5. ELIMINACIÓ/TRANSFORMACIÓ DELS FÀRMACS AL MEDI AQUÀTIC**

Durant les darreres dècades, els procediments d'eliminació de la contaminació aquàtica s'han centrat en els tractaments destinats a eliminar pesticides cancerígens o de caràcter agudament tòxic i intermedis industrials que són persistents en el medi ambient. Tanmateix, aquest grup de compostos representa només una part d'un espectre molt més ampli d'espècies potencialment nocives. Els fàrmacs i els Principis Actius dels Productes d'Higiene Personal (PPCPs) han rebut comparativament una atenció menor tenint en compte que es tracten de contaminants potencials biològicament actius. Així doncs, quan s'intenta eliminar aquest tipus de contaminants de les aigües mitjançant tractaments de depuració, en funció de la substància i del tractament realitzat, pot succeir que:

- a) la substància sigui mineralitzada eficaçment a CO<sub>2</sub> i sals minerals,
- b) el caràcter lipofílic de la substància no en permeti la seva degradació i la substància quedi retinguda al fang o fase estacionària, o

- c) la substància sigui metabolitzada cap a una forma més hidròfila que la substància mare, però encara sigui persistent. Aquesta nova forma polar, pot sobreviure doncs, a la planta de tractament d'aigües i acabar a l'ecosistema aquàtic a través dels efluentes de sortida de la depuradora i, un cop allà, afectar els organismes vius. Això darrer, és el que succeeix amb bona part dels fàrmacs que arriben a les EDAR.

Tot i que hi ha una major preocupació pública i científica reconeguda pel que fa a la presència i exposició crònica als residus de fàrmacs en el medi ambient, s'ha prestat poca atenció a l'avaluació de la seva transformació. Els productes farmacèutics, com d'altres substàncies, també tenen el potencial de transformar-se mitjançant diversos processos i produir nombrosos Productes de Transformació (TPs), els quals poden arribar a ser més mòbils, polars i tòxics que el compost farmacèutic original. En el cas dels compostos bioactius, a més, el seu efecte pot ser retingut perquè la part farmacèuticament activa de la molècula pot romandre sense modificar-se (Navarro-Ortega, 2009).



**Figura 7.** Metabolisme dels fàrmacs al cos humà. Reproduïda de (Ribera i Fuentes, 2010).

La transformació dels productes farmacèutics en la majoria dels casos s'inicia en el cos humà, on es metabolitzen al fetge per mitjà dels enzims en la fase I o en la fase II del metabolisme (Daughton & Ternes, 1999) (veure [Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.](#)). En aquesta primera fase metabòlica, el compost de partida és oxidat, reduït o hidrolitzat, donant lloc a un altre compost més reactiu. En la segona fase, on s'aconsegueix fer la molècula més hidrofílica, aquest compost resultant és acoblat a un conjugat mitjançant la conjugació covalent (glucuronització), donant lloc a un compost que presenta menys reactivitat, però també una major

solubilitat (Gibson & Skett, 2001). Aquests metabòlits, que solen ser més polars que els respectius compostos originals, poden ser excretats del cos a través de l'orina o de les femtes amb més facilitat. Tot i la possible reducció de toxicitat de moltes de les formes metabolitzades excretades, alguns bacteris poden reconvertir novament els productes conjugats en el fàrmac inicial mitjançant processos d'hidròlisi, alliberant de nou la forma lliure del fàrmac que és biològicament més activa (Halling-Sørensen, Nors Nielsen, et al., 1998; Ternes, 1998). L'abast del metabolisme, a més, difereix entre els diferents productes farmacèutics. En alguns casos, els metabòlits poden constituir una gran part de la massa total del fàrmac administrat (Skoumal Canals, 2009). D'altra banda, altres productes farmacèutics són menys propensos a l'eliminació metabòlica i normalment s'excreten sense canvis (Kasprzyk-Hordern, Dinsdale, et al., 2008; Upton, Buskin, et al., 1980). Fa uns anys, es va suggerir un nou enfocament en el disseny de productes farmacèutics, on es té en compte la degradabilitat ambiental d'un compost en comparació amb la seva activitat farmacològica per tal d'assegurar-ne una millor atenuació ambiental (Rastogi, Leder, et al., 2015).

Un cop els fàrmacs han arribat als cursos fluvials, la seva concentració també pot disminuir de forma natural o artificial, essent aquesta darrera la forma a tenir en compte en considerar la reutilització de l'aigua superficial com a aigua potable. Les concentracions de fàrmacs al riu poden atenuar-se de manera natural per diferents processos biològics, físics i/o químics.

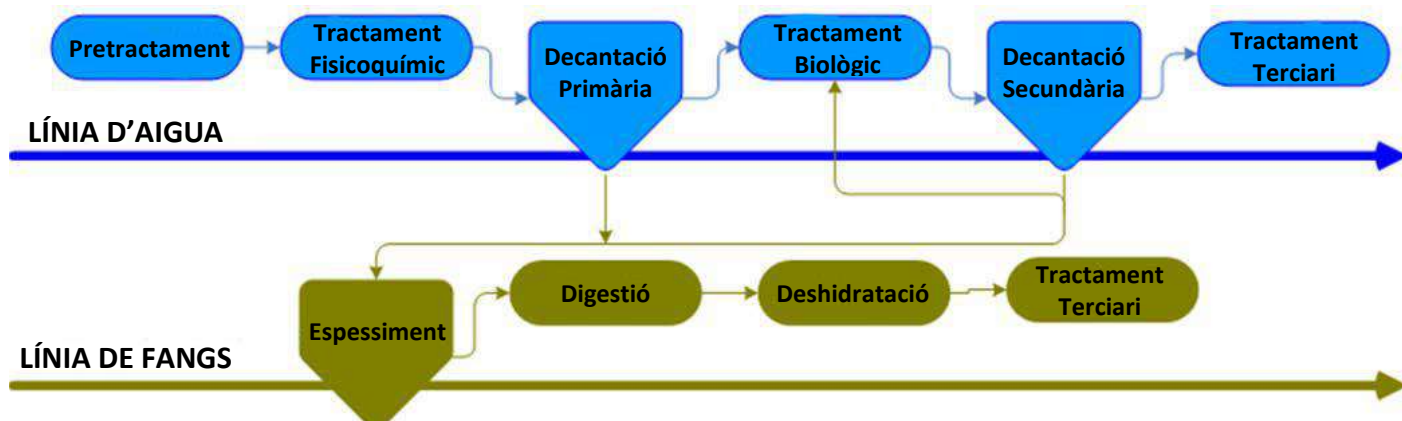
D'una banda, hi ha processos físics de dispersió i dilució els quals no alteren químicament els fàrmacs, però si les seves concentracions, que poden ser d'un ordre de magnitud inferior a les concentracions que tenen en els efluent de les depuradores (Aceña i Sánchez, 2017). Aquests processos de dilució es produeixen principalment en zones amb grans rius, els quals poden diluir la concentració dels fàrmacs. N'és un clar exemple el riu Ebre, el més cabalós de l'estat espanyol. En un estudi realitzat en aquest riu, així com en els seus efluent, es van detectar concentracions totals de fàrmacs màximes de 333 ng L<sup>-1</sup> al propi riu i de 890 ng L<sup>-1</sup> als efluent, demostrant que l'efecte de la dilució acostuma a ser menor en els efluent que als rius cabalosos (Silva, Jelic, et al., 2011).

Un altre procés d'atenuació natural és la volatilització, que tot i ser un procés important en l'eliminació de compostos orgànics d'un riu, per als compostos farmacèutics és tracta d'un procés bastant residual, ja que aquests compostos presenten habitualment una baixa pressió de vapor, una polaritat elevada i pesos moleculars més alts que els de les molècules volàtils (Jorgensen & Halling-Sorensen, 2000). Malgrat que en el material particulat de l'aire es podrien detectar fàrmacs, les concentracions esperades són molt baixes i degudes, principalment, a processos de resuspensió de partícules que es troben als sòls i als rius.

A més d'existir partícules sòlides a l'aire, als rius també hi ha dos tipus de material sòlid susceptibles d'interaccionar amb els fàrmacs: el material particulat en suspensió i els sediments, on podrien tenir lloc processos d'adsorció dels fàrmacs. Els sòlids en suspensió transporten els fàrmacs pel riu, mentre que els sediments són fonts de contaminació i acumulació més estàtiques (Silva, Jelic, et al., 2011). L'altre procés important d'atenuació natural dels fàrmacs als rius és el de la seva biodegradació; la qual, mitjançant processos catabòlics de microorganismes, algues, llevats i fongs, poden descompondre parcialment o completament els compostos orgànics i alguns productes farmacèutics (Bottoni, Caroli, et al., 2010).

D'altra banda, a les EDAR, els fàrmacs i metabòlits presents a les aigües residuals són sotmesos també a diferents processos físics, biològics i/o químics, que es combinen per tal d'eliminar aquestes substàncies amb la finalitat que es pugui assolir la qualitat desitjada de l'aigua depurada (Ramalho, 1996). Generalment, les EDAR (veure la **Figura 8**) comprenen diferents etapes: una primera fase de *pretractament* físic, en què es retiren els sòlids més gruixuts a través de reixetes o tamisos de diferents mides, seguida d'una etapa posterior en que l'aigua passa a un *tractament primari* on, a través de processos fisicoquímics de coagulació i/o floculació, es separa la matèria que està en suspensió. Després de la decantació, se sotmet l'aigua a un *tractament secundari* o biològic mitjançant microorganismes que poden ser aerobis o anaerobis. Finalment, si es requereix una major qualitat de l'efluent de sortida final, aquest es pot sotmetre a un *tractament terciari*, de tipus fisicoquímico, biològic o químic avançat. Els tractaments avançats poden emprar-se també com a etapa prèvia al tractament biològic, ja que d'aquesta manera es poden generar compostos més biodegradables. Durant aquests tractaments, alguns d'aquests compostos poden ser correctament eliminats; mentre que alguns d'altres es mantenen inalterats o

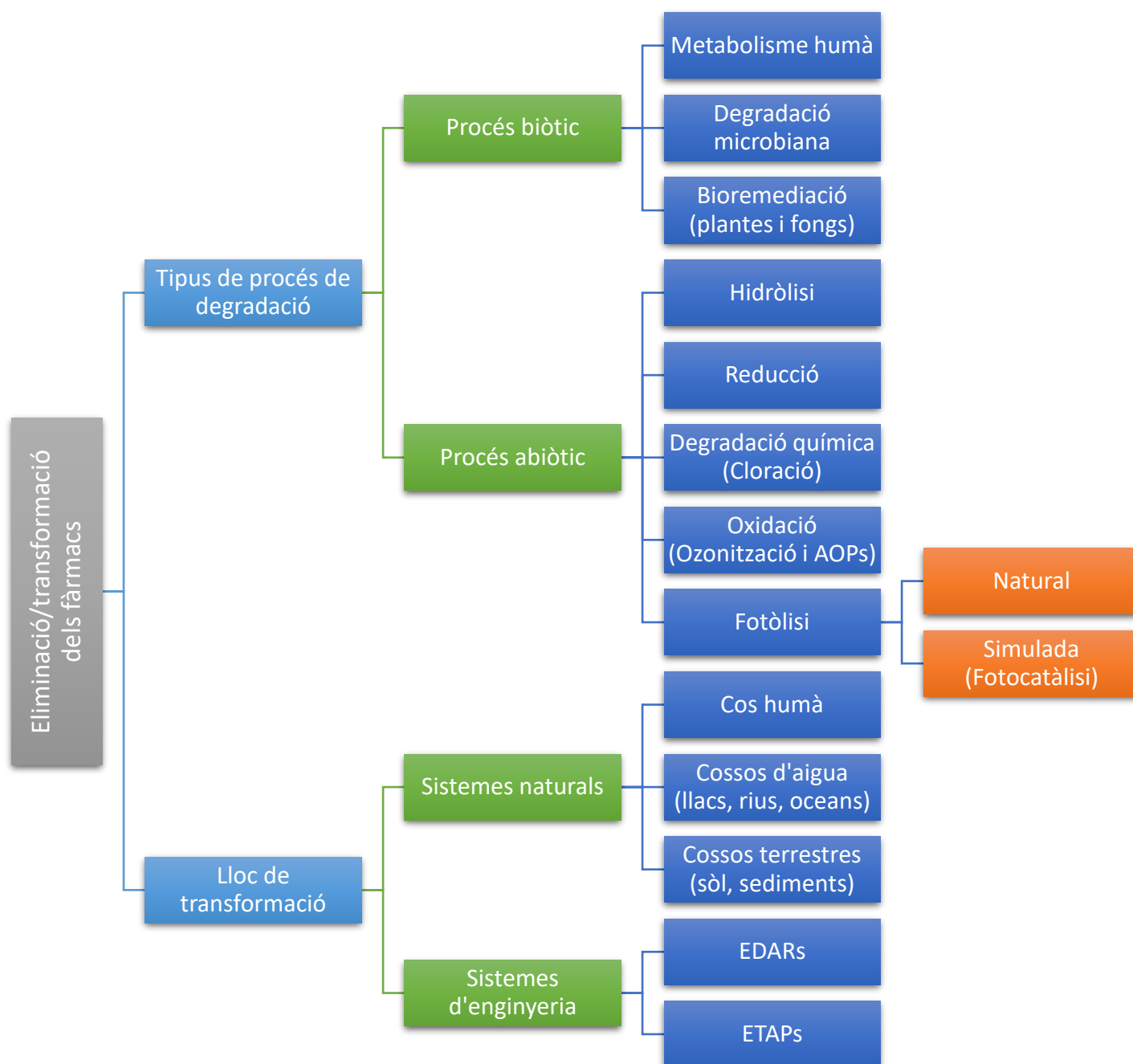
produïxen productes de transformació que, com s'ha esmentat abans, en alguns casos poden ser més perillosos que el propi compost.



*Figura 8. Esquema de les etapes d'una EDAR convencional. Figura adaptada de (Espejo, 2016).*

En el cas d'aigües residuals d'origen industrial, en què l'efluent pot tenir una contaminació molt més gran que la que pot ser tractada en una EDAR, o bé, poden contenir contaminants refractaris als tractaments convencionals, cal la implantació de processos de depuració específics, dissenyats segons les característiques de l'aigua residual a tractar abans de que aquesta sigui descarregada a l'EDAR, cercant sempre el mètode més efectiu de depuració i cost econòmic. Els processos per tractar les aigües residuals industrials es poden classificar en processos no destructius, o de separació, i processos destructius (incineració, oxidació química, reducció catalítica, degradació biològica, entre d'altres).

Així, el terme productes de transformació (TPs) s'aplica en general als compostos relacionats estructuralment amb els fàrmacs originals, però que han estat modificats; és a dir, que han patit canvis (transformacions) químics en algun tipus de procés natural o d'enginyeria humana (Žonja, 2017). Per als productes farmacèutics, doncs, podem classificar la presència i modificació d'aquests TPs en el sistema aquàtic tenint en compte: i) el tipus de transformació o ii) el lloc on s'ha produït aquesta transformació, com es mostra resumit en l'esquema de la **Figura 9**.



**Figura 9.** Representació esquemàtica dels possibles tipus i llocs de transformació dels fàrmacs.

Pel que fa al tipus de procés de transformació, normalment es divideixen en dos subgrups: a) *processos biòtics* i b) *processos abiòtics*. Les transformacions biòtiques solen estar relacionades amb les reaccions del metabolisme humà i de la degradació microbiana. D'altra banda, les reaccions abiòtiques poden anar des de la hidròlisi, la reducció, la degradació química (com la cloració) fins a l'oxidació (com l'ozonització i els processos avançats d'oxidació) i la fotòlisi (natural o simulada, on trobem també la fotocatàlisi). A part dels diferents tipus de transformació, podem classificar aquestes

modificacions segons el lloc on un compost pot patir-les. En general, es podrien classificar en a) *sistemes naturals* i/o b) *sistemes d'enginyeria*. Els sistemes naturals comprenen, per exemple, el cos humà, els cossos d'aigua (llacs, rius, oceans) o els cossos terrestres (sòl, sediments). Contràriament als sistemes naturals, els sistemes d'enginyeria són sistemes antropogènics on un determinat tractament pot provocar transformacions. Els sistemes més coneguts inclouen les plantes de tractament d'aigües residuals (EDAR) i les instal·lacions potabilitzadores d'aigua (ETAP), com per exemple les instal·lacions de producció d'aigua de l'aixeta. Tots aquests possibles tipus i llocs de transformació donen lloc a mescles complexes de compostos pares (fàrmacs) i dels seus TPs que estan presents en el medi aquàtic. La major part d'aquestes modificacions, però, encara estan suficientment poc caracteritzades; tanmateix, en els darrers anys, s'ha fet un gran esforç per a la seva caracterització i identificació més detallada.

Les seccions següents tractaran els processos biòtics i abiòtics més importants que poden transformar els compostos farmacèutics del medi, començant per les transformacions microbianes a les EDAR. Per a cadascun dels processos de degradació es farà una breu descripció i es posarà especial èmfasi en el procés de fototransformació sota la llum solar natural en aigües superficials, ja que aquest és el tractament principalment estudiat en la present tesi.

### 2.5.1. PROCESSOS BIÒTICS

- *Metabolisme humà*

Com s'ha mencionat anteriorment, molts productes farmacèutics es transformen fins i tot abans de ser abocats a les aigües residuals a través del metabolisme humà. Així doncs, dins el cos humà, els fàrmacs pateixen reaccions catalitzades per enzims per tal d'evitar la possible intoxicació de l'organisme. Per evitar aquesta possible intoxicació, es recórrer normalment, com hem vist, a canviar les propietats fisicoquímiques del fàrmac fent-los més hidròfils. D'aquesta manera, es formen metabòlits farmacològicament inactius que són més fàcilment excretats del nostre organisme.

- *Degradació microbiana (biodegradació)*

La degradació microbiana és, probablement, el procés de transformació més important per a compostos orgànics com els productes farmacèutics a les EDAR. En general, aquestes transformacions utilitzen reaccions químiques catalitzades pel creixement o repòs de cèl·lules microbianes o enzims específics, aïllats de certs microorganismes, i que s'activen químicament durant el seu metabolisme. De fet, la transformació dels productes farmacèutics per mitjà de la biodegradació no es limita només a les reaccions químiques que transcorren durant el tractament de les aigües residuals, ja que aquesta degradació es pot produir al sistema de clavegueram fins i tot abans que els fàrmacs arribin a les EDAR. Com s'ha comentat abans, els compostos farmacèutics es poden atenuar de manera natural per diversos processos abiòtics i biòtics com ara: i) dilució en aigua superficial, ii) adsorció sobre les partícules en suspensió o partició al sediment, iii) fotodegradació sota la llum solar natural, iv) bioacumulació a la biota i v) biodegradació per microorganismes a la interfície aigua/sediment o al sediment del llit del riu. Allà, el grau de biotransformació per atenuació natural dependrà de la concentració i tipus de microorganismes presents i de les propietats fisicoquímiques dels productes farmacèutics (Fent, Weston, et al., 2006; Radke & Maier, 2014). Tanmateix, s'espera que la transformació principal, tant per qualitat com per quantitat, es produeixi en els reactors biològics de les EDAR, plens de fangs actius. Per a alguns productes farmacèutics però, atès que són metabòlicament estables i s'excreten intactes, això es pot traduir eventualment en que mostrin també estabilitat cap a la degradació microbiana al medi ambient (Jones, Voulvoulis, et al., 2002).

Així doncs, a les EDAR trobem els anomenats tractaments biològics, que són aquells en què s'utilitzen microorganismes vius, com els bacteris, els quals poden produir l'oxidació-reducció dels contaminants a través del seu metabolisme. Aquest tipus de tractament es caracteritza per la seva gran versatilitat en poder tractar diferents tipus d'aigües segons la seva contaminació, ja que es poden fer servir diferents tipus de cultius microbians en cada cas. Així mateix, el baix cost d'aquesta aplicació la fa molt atractiva. En funció de l'espècie receptora d'electrons, es poden distingir la *respiració aeròbia*, en la què els organismes utilitzen l'oxigen per transformar la matèria orgànica en biomassa i CO<sub>2</sub> (metabolisme anabòlic); la *digestió anaeròbia*, en la què en absència d'oxigen la matèria orgànica es degrada a CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O (metabolisme



catabòlic); i la *fermentació*, quan es tracta d'un compost orgànic (Chan, Chong, et al., 2009). En línies generals, els processos anaeròbics solen utilitzar-se per al tractament d'aigües residuals industrials, amb una alta càrrega contaminant, mentre que els tractaments aerobis s'apliquen en aigües amb menor càrrega de contaminants, com les presents normalment a les EDAR (Alexander, 1999; Kagle, Porter, et al., 2009). Generalment en aquestes plantes, a causa del seu menor cost i del seu major rendiment per depurar la matèria orgànica, es solen emprar com a tractament secundari processos biològics aerobis mitjançant fangs actius o filtres biològics percoladors, els quals poden convertir ràpidament diversos compostos orgànics en biomassa i posteriorment, per mitjà d'aclaridors, separar aquesta de l'aigua. No obstant això, per a substàncies refractàries a concentracions elevades, resulten processos lents de degradació de les mateixes.

La biodegradació, doncs, es pot produir a la zona aeròbica i anaeròbica del reactor de fangs activats, o anaeròbiament més tard durant la digestió d'aquests. Tot i que alguns productes farmacèutics es degraden durant la digestió anaeròbica dels fangs, la biodegradació en condicions aeròbiques es considera el principal procés d'eliminació (Fent, Weston, et al., 2006). A causa de la baixa concentració dels productes farmacèutics per donar suport al creixement substancial de la biomassa, és més probable que la seva transformació es produeixi mitjançant un metabolisme catabòlic durant la degradació activa del substrat present a les aigües residuals (Taewoo, Willie, et al., 2007).

Els mètodes principals d'eliminació de compostos orgànics mitjançant fangs activats poden ser per una banda processos abiòtics, com l'adsorció a la superfície del fang actiu, la isomerització/epimerització o la degradació hidrolítica; o processos biòtics, com són els de transformació o degradació dels compostos i/o mitjançant volatilització per arrossegament a través de l'aire bombollejat (Radjenović, Petrović, et al., 2009). No s'espera però, que la volatilització elimini la majoria dels productes farmacèutics, ja que aquests normalment presenten una baixa volatilitat.

En diversos estudis s'ha comprovat que els compostos farmacèutics es poden absorbir a l'estructura lipídica dels bacteris que conformen el fang, a través d'interaccions hidrofòbiques dels grups alifàtics i aromàtics (Espejo, 2016). També es pot aconseguir l'adsorció dels compostos orgànics carregats positivament (com poden

ser els grups amino) a la part exterior cel·lular dels bacteris carregats negativament, mitjançant interaccions electrostàtiques entre grups funcionals. Una altra forma d'interaccionar aquests compostos en els tractaments biològics pot ser mitjançant unions químiques amb àcids nucleics i proteïnes dels bacteris (Meakins, Bubb, et al., 1994). A més del que s'ha comentat, en el procés d'adsorció poden intervenir altres mecanismes de reacció com ara les interaccions entre enllaços d'hidrogen, de bescanvi iònic o mitjançant la formació de complexos metàl·lics a la superfície de l'adsorbat (Tolls, 2001).

La digestió anaeròbica de fangs, en canvi, permet només la degradació d'alguns d'aquests fàrmacs. Però, per a la majoria dels compostos farmacèutics com els antibiòtics, només les tecnologies avançades com l'ozonització post tractament biològic o la nanofiltració acompanyada de tractament amb carboni actiu porten a una eliminació eficient (Skoumal Canals, 2009). D'altra banda, la irrigació i el pas a través de sòl (*soil passage*), com ara els filtres de sorra, permeten també l'eliminació de la majoria dels fàrmacs (més del 80%) tant per adsorció com per degradació (Ternes, Joss, et al., 2005). Durant aquest procés, però, s'ha d'evitar la seva infiltració a través de les aigües residuals a les aigües subterrànies, per tal d'evitar-ne la seva contaminació. És per això que, normalment, s'implementen tractaments avançats on es combinen els reactors de biomembrana (en anglès, *Membrane Biological Reactors*, MBRs) amb diversos processos químics i fisicoquímics: addició de carboni activat en pols, nanofiltració, osmosi inversa, ozonització i ozonització/UV (Baumgarten, Schröder, et al., 2007). Els processos de potabilització d'aigua, per la seva banda, també requereixen la implementació de tecnologies semblants (Reyes, Geronimo, et al., 2021).

Els mètodes biològics convencionals de tractament d'aigües residuals, doncs, no eliminen de manera satisfactòria molts dels productes farmacèutics que s'hi troben i, en conseqüència, aquests arriben a les aigües superficials a través de les aigües sortints de les depuradores. La biotransformació d'un fàrmac està estructuralment relacionada i depèn dels fragments funcionals disponibles a la molècula i els enzims presents (Žonja, 2017). Per això, molt sovint els compostos farmacèutics són parcialment o fins i tot totalment no biodegradables i/o difícils d'eliminar mitjançant els tractaments habituals emprats, ja que normalment presenten estructures polars que els permeten passar a través d'aquestes barreres (Joss, Zabczynski, et al., 2006;

Kagle, Porter, et al., 2009). Tot i que les plantes modernes de tractament d'aigües residuals poden portar a terme amb eficàcia l'eliminació de carboni i nitrogen, així com el control de la contaminació microbiana, no han estat dissenyades específicament per eliminar traces de fàrmacs i, per tant, aquests es distribueixen finalment pels diferents compartiments ambientals (Deblonde, Cossu-Leguille, et al., 2011).

És per això que avui dia es busquen tecnologies més eficients no sols per al tractament d'aigües residuals (a les EDAR), sinó també per a l'aigua de consum (a les ETAP). En els darrers anys, s'han estudiat sistemes de membrana ja siguin biològics (MBRs) o no biològics (osmosi inversa, ultrafiltració i nanofiltració) i processos d'oxidació avançada (en anglès, *Advanced Oxidation Processes*, AOPs) amb aquesta finalitat. Aquests sistemes són considerats com els més apropiats per eliminar concentracions traça de contaminants emergents (Roig Bondia, 2013). Els reactors biològics de membrana (MBRs) són considerats com una millora al tractament microbiològic d'aigües residuals, però degut a qüestions econòmiques, la seva aplicació en plantes de tractament d'aigües industrials o municipals és limitada. Aquests sistemes presenten considerables avantatges als tractaments biològics convencionals pel fet que es genera una baixa càrrega de fang en termes de Demanda Biològica d'Oxigen (DBO), cosa que fa que els bacteris es vegin obligats a mineralitzar els compostos orgànics de poca biodegradabilitat i, a més, el llarg temps de retenció del fang (10-15 dies) dona als bacteris temps suficient per adaptar-se al tractament de substàncies resistents (Côté, Buisson, et al., 1997). Tot i això, se solen combinar amb altres mètodes (Yoon, Westerhoff, et al., 2006).

### 2.5.2. PROCESSOS ABIÒTICS

Diferents tractaments fisicoquímics com la coagulació, la flotació i la cloració s'han utilitzat com a tractament primari a les EDAR per tal d'eliminar contaminants emergents en aigües residuals. En un estudi realitzat a nivell de laboratori utilitzant diversos d'aquests tractaments (coagulació/flotació, suavització amb calç, ozonització, cloració i adsorció amb Carbó Actiu Granular (CAG)), per exemple, es va analitzar l'eliminació de 30 compostos farmacèutics diferents i, tot i que no es va obtenir una eliminació significativa (< 20%) amb els processos de coagulació/flotació ni suavització amb calç, si es va assolir un bon resultat amb el carbó actiu i l'oxidació per ozó i la cloració (>90%) (Filali-Meknassi, Tyagi, et al., 2004; Westerhoff, Yoon, et

al., 2005). Aquests resultats concorden amb d'altres estudis realitzats anteriorment (Petrović, Gonzalez, et al., 2003; Vieno, Tuhkanen, et al., 2006). A continuació, es descriuen els principals processos abiòtics emprats en el tractament de les aigües residuals:

- *Hidròlisi química*

La hidròlisi química és una de les principals reaccions que poden transformar els contaminants orgànics en el medi aquàtic, ja que l'aigua és un reactiu omnipresent en el medi que pot iniciar reaccions consecutives (Žonja, 2017). Encara que la hidròlisi es produeix en funció del pH i la temperatura, altres substàncies presents a l'entorn natural com la Matèria Orgànica Dissolta (en anglès, *Dissolved Organic Matter*, DOM) o els metalls poden influir en la hidròlisi de contaminants orgànics en els sistemes aquosos (Noblet, Smith, et al., 1996; Suffet & MacCarthy, 1999). Les estructures moleculars de molts productes farmacèutics contenen grups funcionals hidrolitzables com èsters, amida, imida i halògens que estan implicats en la degradació hidrolítica (H. Zhang, Xie, et al., 2015). Aquests grups hidrolitzables són especialment freqüents en moltes classes d'antibiòtics i fàrmacs citostàtics. Les directrius de proves de laboratori més completes i estandarditzades per a la transformació hidrolítica abiòtica de substàncies químiques en un sistema aquàtic a un pH determinat van ser publicades per l'OCDE, on suggereixen realitzar experiments amb valors de pH que normalment es troben al medi ambient (pH 4-9), un rang de temperatures de 10 a 70 °C i sense presència d'oxigen o llum (OECD-Test-Nº111, 2004). Diversos estudis han centrat la seva atenció en la detecció de TPs hidrolítics al medi ambient (Hirte, Seiwert, et al., 2016; Pérez-Parada, Agüera, et al., 2011).

- *Degradació química: cloració*

La cloració és un procés de desinfecció aplicat en processos de tractament d'aigua en EDARs, instal·lacions d'aigua potable o en efluent hospitalaris que utilitzen clor, cloramines o diòxid de clor com a desinfectant. Tot i que generalment es considera un procés impulsat per l'enginyeria de la desinfecció de l'aigua, l'ús elevat de productes químics basats en clor com l'hipoclorit de sodi (lleixiu líquid; NaOCl) als hospitals pot provocar també la formació de TPs de cloració als efluent sense cap tractament predissenyat. Els desinfectants amb clor de les aigües residuals reaccionen amb la matèria orgànica present i poden formar compostos organoclorats,

i tot i que poden ser absorbits pel carbó actiu de les plantes de tractament, es consideren tòxics per als organismes aquàtics i són persistents en el medi ambient (Emmanuel, Keck, et al., 2004). A causa del seu cost relativament baix, el clor està àmpliament estès i és l'oxidant químic més utilitzat històricament per a la desinfecció de l'aigua potable. En les ETAP, s'utilitza tant en el pretractament inicial, emprat per iniciar la desinfecció, com en el post-tractament que es fa per tal de limitar el creixement d'organismes heteròtrofs als sistemes de distribució (Deborde & von Gunten, 2008). Els TPs que es formen en el procés de desinfecció s'han estudiat intensament des del descobriment que poden ser fins i tot més tòxics que els seus compostos pare (Bedner & MacCrehan, 2006) o poden formar subproductes de desinfecció (en anglès, *Disinfection By-Products*, DBPs) altament tòxics (S. D. Richardson, Plewa, et al., 2007). Molts DBPs es formaran com a resultat de la interacció del clor amb la Matèria Orgànica Natural/Dissolta (N/DOM). Tanmateix, es poden generar fàcilment a partir d'altres microcontaminants com ara els productes farmacèutics, ja que molts d'ells tenen un anell aromàtic activat que pot reaccionar fàcilment amb oxidants com el clor (Postigo & Richardson, 2014).

Com a alternatives a la cloració, la cloramina i el diòxid de clor també s'utilitzen per a la desinfecció de residus. La *cloraminació* es va seleccionar com a alternativa a la cloració per tal de reduir la formació de trihalometans (THM) i àcids haloacètics (*Haloacetic Acid*, HAA), però el seu ús està directament relacionat amb la formació de nitrozamines (Krasner, Mitch, et al., 2013), com la N-nitrosodimetilamina (NDMA), que també són cancerígenes. Tot i que, com en el cas de la cloració, aquests compostos es poden generar a partir de precursors naturals de matèria orgànica, diversos estudis han demostrat que els productes farmacèutics que tenen grups dimetilamina poden formar la N-nitrosodimetilamina sota cloraminació (Postigo & Richardson, 2014; S. D. Richardson, Plewa, et al., 2007; S. D. Richardson & Ternes, 2014). Al contrari de la cloració i la cloraminació, el diòxid de clor tendeix a formar pocs DBPs halogenats. Com a resultat, quan els productes farmacèutics estan exposats al diòxid de clor, la majoria dels TPs es formen per oxidació i no per halogenació (Postigo & Richardson, 2014).

- *Tractament químic. Processos d'oxidació avançada (AOPs)*

En moltes EDAR, degut a que les característiques de l'efluent secundari no presenten la qualitat exigida, ja sigui per tenir un grau de contaminació major al requerit per abocar al riu, o bé, perquè es desitja un major grau de depuració, cal aplicar un tractament terciari que, en la majoria dels cassos, es tracta d'un procés avançat d'oxidació (AOP). Aquests processos químics són mètodes d'oxidació basats principalment en la formació de radicals hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) en fase aquosa que intervenen en la degradació dels contaminants ja sigui per transformació o mineralització. Aquests processos han guanyat popularitat en les últimes dues dècades ja que són capaços de degradar compostos més recalcitrants que superen els tractaments convencionals com la biodegradació en fangs activats a les EDAR. El terme AOP inclou una gran diversitat de processos tecnològics que es poden aplicar per tal d'oxidar els contaminants, com ara la fotòlisi, l'ozonització, l'electròlisi, la catàlisi heterogènia o homogènia basada en l'ultraviolat (UV), l'UV proper (VUV) o la llum visible, l'ús del reactiu de Fenton (solució de peròxid d'hidrogen amb ions ferrosos com a catalitzador), els ultrasons (US) o l'oxidació d'aire humit (*Wet Air Oxidation*, WAO). El procés finalment emprat dependrà de l'objectiu del tractament i de les característiques intrínseques de l'aigua d'origen (Klavarioti, Mantzavinos, et al., 2009). Així mateix, els AOP es poden aplicar en combinació amb d'altres processos com la combinació d'ozó ( $\text{O}_3$ ) i peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  $\text{O}_3$  i UV, UV i  $\text{H}_2\text{O}_2$  o la combinació de tots tres. Altres processos acoblats inclouen l'òxid de titani ( $\text{TiO}_2$ ) en combinació amb UV i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ultrasons en combinació amb el reactiu Fenton, Photo-Fenton, l'electròlisi amb Fenton o la WAO amb  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fatta-Kassinos, Hapeshi, et al., 2010). Aquests processos d'oxidació s'han estudiat àmpliament i, en general, han demostrat ser efectius en l'eliminació de productes farmacèutics (Klavarioti, Mantzavinos, et al., 2009). En funció de la presència o absència de radiació, els AOP es poden classificar en processos fotoquímics o no fotoquímics (veure **Figura 10**). A més, aquests tractaments es poden combinar entre ells per assolir una major velocitat de reacció i millors rendiments quant a depuració.

Els processos avançats d'oxidació es postulen com a una bona opció per al tractament de contaminants emergents i, de fet, es troben entre les tecnologies amb més futur en el camp de l'eliminació de productes farmacèutics de les aigües residuals (García Gómez, Gortáres Moroyoqui, et al., 2011). Però, aquestes tecnologies

presenten un desavantatge important, ja que tenen un alt cost comparat amb els processos biològics tradicionals. Tanmateix, l'ús d'un AOP determinat, utilitzant-lo com a pretractament o post-tractament, pot millorar la biodegradabilitat posterior d'aigües residuals o pot aconseguir una gairebé completa eliminació dels fàrmacs, respectivament. S'han realitzat diverses investigacions que contempnen la combinació de processos d'oxidació amb processos biològics, ressaltant-ne el gran potencial davant el problema del tractament d'aigües contaminades difícils o impossibles de depurar mitjançant processos convencionals fisicoquímics/biològics. Tot això amb l'objectiu final de reutilitzar aquesta aigua i contribuir a la millora del medi ambient (Gogate & Pandit, 2004; Mantzavinos & Psillakis, 2004).

L'ozonització és un dels AOP de més àmplia difusió. S'aplica al tractament d'efluents contaminats i en redueix les concentracions de fàrmacs de manera eficaç (Esplugas, Bila, et al., 2007; Ternes, Stüber, et al., 2003), amb l'excepció dels medis que contenen iode, ja que són resistents a aquest tractament (Seitz, Jiang, et al., 2008). Moltes espècies contaminants es poden eliminar de les EDAR afegint el tractament per ozó als efluents sortints del tractament per carboni actiu i del biològic (Skoumal Canals, 2009). Els processos d'oxidació avançada basats en l'ozonització combinen sovint la força oxidant de l'ozó amb la de la radiació ultraviolada (tractaments  $O_3/UV$ ) (Rosenfeldt, Linden, et al., 2006), i també en presència de peròxid d'hidrogen (tractaments  $O_3/H_2O_2$ ) (Ferron, Brackin, et al., 2012). Altres processos d'oxidació avançada força utilitzats substitueixen l'ozó pel peròxid d'hidrogen com a agent oxidant i generador de radicals hidroxil (tractaments  $H_2O_2/UV$ ) (Rosenfeldt, Linden, et al., 2006). L'ozó també es pot aplicar combinat amb altres tractaments, com per exemple la irradiació UV en presència de diòxid de titani ( $UV/TiO_2$ ). La combinació d'aquests dos tractaments d'oxidació avançada presenta un efecte sinèrgic que es tradueix en una oxidació més eficient (TANIZAKI, HASHIMOTO, et al., 2005; Thiruvengkatachari, Kwon, et al., 2005).

L'ozonització i els altres AOP són, doncs, tractaments ja reconeguts per a ser aplicats en processos per degradar productes contaminants en plantes potabilitzadores d'aigua. Tanmateix, com amb d'altres mètodes d'eliminació, la desaparició del compost original no implica una mineralització eficient del fàrmac i s'ha de prestar especial atenció a la formació dels seus productes de transformació o TPs. Com que els AOP, normalment, es basen en la formació de radicals implicats en reaccions no

específiques, això pot provocar vies de reacció complexes i un nombre elevat de TPs. Però, si més no, en el cas dels productes farmacèutics, les vies de reacció resultants haurien de conduir a la pèrdua de l'activitat farmacològica, a causa de l'augment del nombre de grups funcionals hidroxil (-OH) i, per tant, de la polaritat de la molècula. Això, però, s'ha de comprovar analitzant l'activitat dels TPs formats (Ternes, Stüber, et al., 2003), ja que en alguns casos, fins i tot després de la degradació, els TPs de nova formació podrien contenir farmacòfors funcionals amb efectes superiors sobre els sistemes biològics del medi (Zhu, Zonja, et al., 2015). Els AOPs, tot i que siguin respectuosos amb el medi ambient, encara són cars, ja que per a la mineralització completa de compostos orgànics com els productes farmacèutics a les aigües residuals es necessiten recursos energètics i econòmics elevats. L'inconvenient que presenten aquests processos és l'alt cost que comporta fer servir algun d'aquests reactius oxidants així com l'elevat consum energètic provinent principalment de l'ús de làmpades. Per aquest motiu, la fotocatalisi solar (Klavarioti, Mantzavinos, et al., 2009) està prenent més rellevància com a AOP sostenible ja que s'estalvia en el cost energètic de les làmpades en usar el Sol com a recurs natural de font de radiació. Destaca també com a procés d'eliminació sostenible l'ús d'aquest mètode oxidatiu com a pretractament seguit d'algun procés de biodegradació (Jelić, Petrović, et al., 2012; Osorio Torrens, 2015).



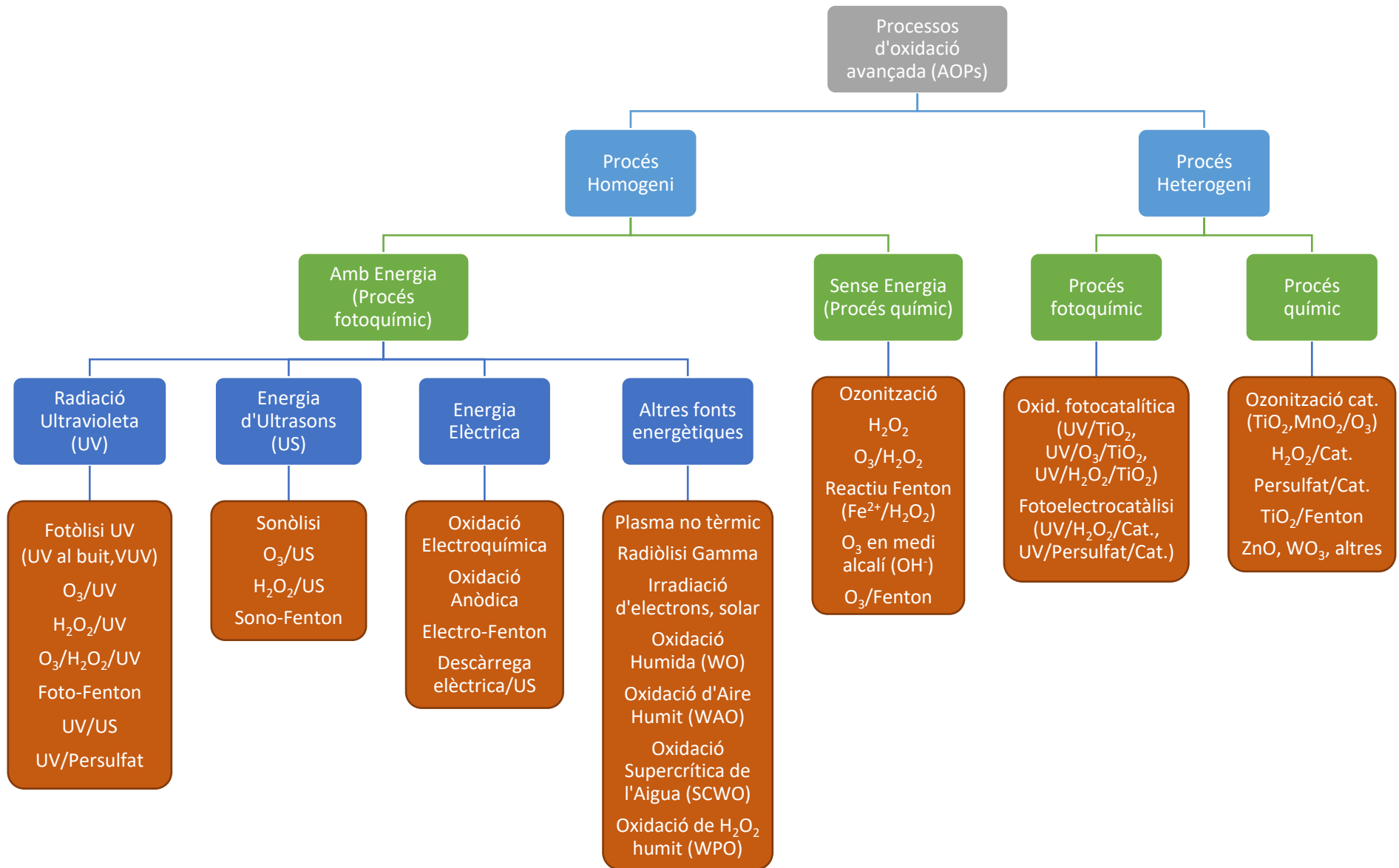


Figura 10. Classificació dels Processos d'Oxidació Avançada (AOPs).

### 2.5.3. PROCESSOS ALTERNATIUS

- *Bioremediació*

Des de fa alguns anys, algunes investigacions científiques s'han enfocat a buscar alternatives que accelerin l'eliminació d'aquests contaminants del medi ambient. Un dels processos que s'ha estudiat amb més èmfasi és la *bioremediació*, que és una tecnologia que utilitza elements biològics per eliminar contaminants mitjançant les habilitats catalítiques dels organismes (Lobos, 2020). Els principals microorganismes utilitzats són els bacteris que, com s'ha vist, són capaços d'eliminar algunes substàncies, però també s'han desenvolupat estudis amb altres tipus d'organismes com algues, llevats i fongs, que són capaços de metabolitzar els compostos tòxics transformant-los en molècules innòcues més petites o que siguin menys tòxiques per als ecosistemes en l'ambient (Garbisu, Amézaga, et al., 2003). Alguns exemples de microorganismes que es poden esmentar com a bioremediadors són fongs com *Coriolus versicolor* i *Hypholoma fasciculare* i bacteris del gènere *Lactobacillus*, que són capaços de disminuir el grau de toxicitat de compostos organofosforats utilitzats àmpliament en l'agricultura com a pesticides (Hernández-Ruiz, Álvarez-Orozco, et al., 2017). Dins dels fongs trobem també l'espècie *Ganoderma lucidum*, que pertany a un grup de fongs (fongs de podriment blanc o fongs lignolítics) àmpliament estudiat per les seves capacitats de degradació de contaminants. Alguns estudis han demostrat que aquests fongs són capaços de remoure diverses espècies de fàrmacs de les aigües residuals (Ferrando-Climent, Cruz-Morató, et al., 2015; Rodríguez, 2012; Vasiliadou, Sánchez-Vázquez, et al., 2016).

- *Zones humides i aiguamolls artificials*

Un altre tractament alternatiu a què poden ser sotmesos els contaminants emergents, inclosos els fàrmacs presents a l'aigua, són els tractaments de descontaminació d'aigües observats en zones humides (*wetland treatments*) com a conseqüència de la seva activitat biològica. Utilitzant aquests procediments, s'han obtingut bons resultats per a l'eliminació de nitrats (Bezbaruah & Zhang, 2003) i la desinfecció de subproductes (Rostad, Martin, et al., 2000) i pesticides (Schulz & Peall, 2001). A Alemanya, per exemple, estudis de filtració a les riberes de riu documenten l'eliminació parcial de fàrmacs presents en aigües fluvials (Verstraeten, Heberer, et al., 2003). S'han documentat altres casos al riu Santa Ana (Califòrnia) (B. Gross,

Montgomery-Brown, et al., 2004) i a zones humides de Sud-àfrica (Schulz & Peall, 2001), mostrant el tractament de zones humides com un mètode natural i eficaç d'eliminar també compostos farmacèutics.

Per tal de simular el comportament d'aquests indrets, recentment s'ha incrementat l'ús dels anomenats aiguamolls artificials, que es poden definir com a sistemes biològics confinats mitjançant algun tipus d'impermeabilització similars als mecanismes propis de les zones humides naturals per a la depuració de les aigües. En aquests indrets, es combinen processos físics, químics i biològics que ocorren en interactuar les aigües amb el sòl, les plantes, els microorganismes i l'atmosfera, donant lloc a l'aparició de processos de sedimentació, filtració, adsorció, degradació biològica, fotosíntesi, fotooxidació i presa de nutrients per part de la vegetació present, i que en conjunt contribueixen a l'acció depuradora del sistema (Ávila & García, 2015). Per tant, en aquests indrets s'apliquen un seguit de tractaments gràcies a la vegetació, la fracció lliure d'aigua i el tipus de flux, entre altres, que permeten la degradació dels contaminants per efecte de la radiació solar, i per la formació de la biopel·lícula (biofilm) que es forma al llit del riu i a les roques. Aquests tractaments contribueixen significativament a la destrucció dels compostos orgànics, juntament amb l'elevat temps de retenció hidràulic característic d'aquests sistemes, els fa especialment idonis quan es disposa d'extensions de terreny apropiades per a la seva construcció (Roig Bondia, 2013).

En resum, i segons es sintetitza en estudis previs (Projecte POSEIDON 2001-2004 de la Unió Europea) (Ternes, Joss, et al., 2005), es pot constatar que per a l'eliminació de productes farmacèutics:

- La degradació biològica i l'adsorció són els principals mecanismes d'eliminació de fàrmacs durant el tractament d'aigües residuals a nivell municipal.
- L'ozonització d'efluents prèviament ja tractats redueix considerablement el contingut de compostos.
- Alguns fàrmacs són degradats de manera significativa durant la digestió anaeròbica de fangs.
- L'eliminació per adsorció en sòlids en suspensió és un mecanisme important per a compostos hidròfobs o carregats positivament.

- Els mètodes de *stripping* (corrent de vapor) no són efectius per a l'eliminació de fàrmacs a les plantes de tractament d'aigües actuals.
- Durant els tractaments d'irrigació i de pas a través de sòls, la major part dels fàrmacs (més d'un 80%) són adsorbits o degradats. Tanmateix, la irrigació pot ocasionar la contaminació d'aigües subterrànies amb alguns d'aquests contaminants.
- L'ozonització i d'altres mètodes d'oxidació avançada (AOPs) són capaços de reduir substancialment la contaminació d'aigües subterrànies abans del procés d'irrigació d'aigües residuals tractades.
- Tret de poques excepcions, la coagulació i la floculació resulten inadequades per eliminar fàrmacs.
- L'ozonització és un mètode de tractament molt efectiu per oxidar compostos farmacèutics. Actualment no hi ha documentació que indiqui la formació de productes d'oxidació tòxics.
- La desinfecció amb clor i diòxid de clor no comporta l'oxidació/eliminació general dels fàrmacs. Només alguns d'ells pateixen transformacions.
- El carboni actiu és un procés potent per a l'eliminació de fàrmacs. Només un reduït nombre d'ells mostren afinitats insuficients per adsorbir-se al carboni actiu.
- La nanofiltració i la ultrafiltració amb l'ús de carboni activat en pols són processos eficaços per eliminar compostos farmacèutics.

### 2.6. PROCESSOS DE TRANSFORMACIÓ: FOTODEGRADACIÓ

Com s'ha comentat anteriorment, un gran nombre de compostos presents al medi ambient es poden transformar en altres productes per l'acció de radiació de diferents longituds d'ona. Aquest fenomen, que es coneix com a fotòlisi o fotodegradació, pot donar-se de manera natural (per mitjà de la llum solar) o artificial (emprant làmpades), segons quina sigui la font emissora de radiació. La fotodegradació d'un contaminant en el medi ambient pot tenir lloc en l'atmosfera, en la superfície del sòl i en l'aigua. La fotodegradació, segons la definició de la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (en anglès, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC), és la transformació fotoquímica d'una molècula en fragments de menor massa molecular, produïts en general durant un procés d'oxidació (Verhoeven, 1996). En un sentit més ampli del terme, parlar de fotodegradació es referir-se a tota transformació d'un compost original en productes més o menys pesats mitjançant diferents tipus de reaccions induïdes per l'exposició a una font de radiació. Aquest procés químic, és el procés de transformació abiòtica més important del medi natural, sobretot a les aigües superficials. En els sistemes aquàtics als quals hi arriba força irradiació lumínica, aquest procés pot ser més rellevant que els processos biòtics, sobretot pels contaminants que han persistit als tractaments biològics de les EDAR.

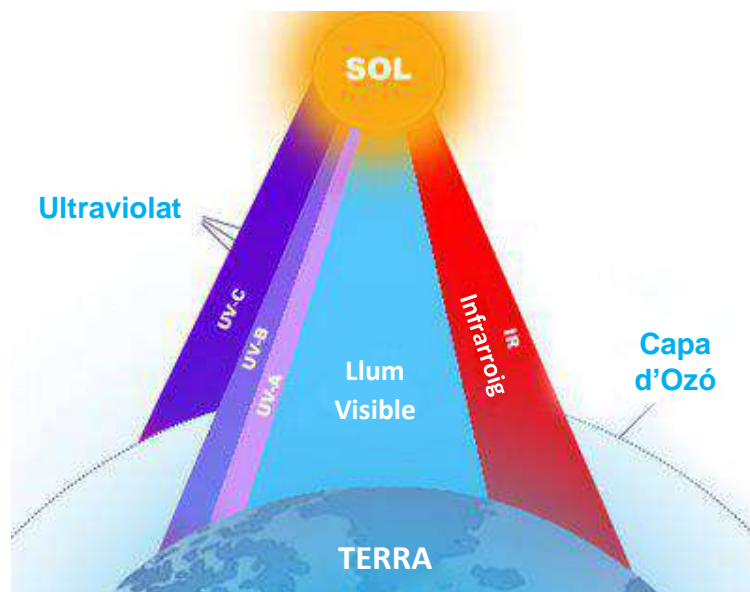
Les transformacions fotoquímiques, per tant, són reaccions químiques causades per l'absorció de la llum. El Sol és la font de radiació natural més important que existeix, ja que emet un espectre electromagnètic que cobreix l'interval de longituds d'ona entre 290 i 3000 nm. La radiació electromagnètica emesa pel Sol que arriba a la superfície terrestre engloba diferents fraccions de radiació lumínica, entre les que trobem la radiació ultraviolada (UV), la llum visible (Vis) i la radiació infraroja (IR), com es mostra a la **Figura 11**. En la **Taula 1** s'observen els diferents intervals de longituds d'ona d'aquestes regions de l'espectre de la radiació solar. La distribució de la intensitat de radiació solar entre aquestes fraccions és del 10% de radiació ultraviolada, prop del 50% de radiació visible i el 40% de radiació infraroja (Dąbrowska, Kot-Wasik, et al., 2004).

**Taula 1.** Regions de l'espectre de la radiació solar.

Regió	Long. d'ona ( $\lambda$ ) nm
Infraroig (IR)	> 700
Visible (Vis)	400 – 700
Ultraviolat A (UV-A)	315 – 400
Ultraviolat B (UV-B)	280 – 315
Ultraviolat C (UV-C)	200 – 280

La regió ultraviolada de l'espectre electromagnètic és la font d'energia principal per a les reaccions fotoquímiques. Aquesta radiació, al seu temps, es subdivideix en tres regions de radiació diferents que poden ser delimitades, com es mostra també a la **Taula 1**, segons les seves longituds d'ona d'emissió en funció dels efectes que produeixen: l'UV-C (200-280 nm), una radiació molt energètica i molt perjudicial; l'UV-B (280-315 nm), una mica menys energètica però igualment perillosa i l'UV-A (315-400 nm), menys energètica però capaç de penetrar a la pell. Actualment, la radiació UV-C és absorbida totalment per l'ozó existent a l'estratosfera, així com la major part de la fracció UV-B. Només una petita part de la fracció de l'UV-B arriba a la troposfera i a la superfície terrestre, juntament amb la radiació UV-A, la llum visible i la infraroja. Aquestes radiacions, un cop assoleixen les capes baixes de la troposfera, poden ser dispersades, reflectides o absorbides pels núvols, la pols, la contaminació atmosfèrica o la pròpia Terra, atenuant la seva incidència a la superfície terrestre. La radiació interessant perquè es produeixi la fotodegradació dels fàrmacs o d'altres compostos presents a les aigües naturals és la radiació UV. De la mateixa manera, un dels factors que condicionen aquest procés de degradació és la intensitat de la radiació de la llum solar que, al seu torn, depèn de l'època de l'any, l'hora del dia, la latitud, l'altura sobre el nivell del mar, la presència de núvols, la mida del forat de la capa d'ozó, etc.

Quant a les fonts artificials que simulen la llum solar, emprades a escala de laboratori, hi ha diverses làmpades farcides de gasos que emeten a diferents longituds d'ona de l'espectre lumínic, tant fixes (monocromàtiques) com en un interval de longituds concret (policromàtiques), segons els gasos i els additius que continguin al seu interior (làmpada de xenó, de vapor de mercuri, de deuteri, etc.). La font de radiació emprada en aquesta Tesi consisteix en una cambra de reacció amb una làmpada policromàtica que simula la llum solar, les característiques de la qual es descriuen més avall a la secció 3.2.1 de la Tesi.



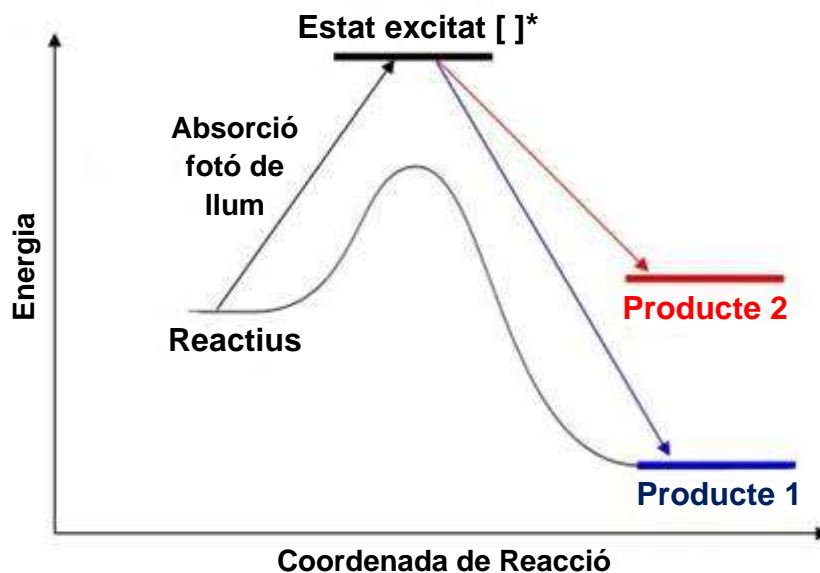
**Figura 11.** Fraccions d'emissió de la radiació solar. Figura adaptada de (Espejo, 2016).

La fotodegradació solar, doncs, és un procés que utilitza i avalua el potencial de la llum solar per degradar i transformar microcontaminants emergents com, per exemple, els productes farmacèutics en l'aigua superficial. A les aigües naturals il·luminades pel sol, la degradació fotoquímica es pot produir per dos principals processos, ja sigui de manera i) *directa* o ii) *indirecta*. La fotodegradació o fotòlisi directa d'un compost succeeix quan aquest compost en concret absorbeix energia en forma de radiació de la font emissora i les seves molècules assoleixen estats excitats per un període de temps suficient perquè es produeixi una reacció química, complint-se així el principi de la primera llei de la fotoquímica (Avery & Shaw, 2009). Aquesta unitat d'energia absorbida ( $E$ ) rep el nom de quàntum de llum (o fotó) i es troba caracteritzada per una determinada freqüència energètica ( $\nu$ ), segons l'equació:

$$E = h\nu, \quad (1)$$

on  $h$  és la constant de Planck. Una molècula que es troba en el seu estat fonamental (no excitada) pot absorbir un quàntum de llum de forma que es produeix una transició electrònica i la molècula passa a un estat de major energia (estat excitat, \*), com es mostra a la **Figura 12**. Una molècula excitada és molt més reactiva i, en conseqüència, les reaccions posteriors a l'absorció del fotó de llum per part d'aquesta substància (excitació) venen determinades per la manera en què aquesta molècula perdrà l'excés d'energia. Si l'energia de la llum UV absorbida, per exemple, és més gran que l'energia d'enllaç de la molècula, l'enllaç químic de la substància es pot

trencar i, aquest fet, pot comportar la formació de radicals més reactius. L'estructura molecular determinarà si aquesta substància és capaç d'absorbir un tipus de radiació o un altre i incrementar la seva energia de manera que passi a un estat excitat que en comportarà potser el trencament de l'enllaç, i per tant, la degradació.



**Figura 12.** Esquema d'una reacció fotoquímica.

Cal tenir en compte, doncs, que durant la desactivació de l'estat excitat de la molècula, un gran nombre de processos estan en competència directa amb la formació de productes fotoquímics (Avery & Shaw, 2009). Així, que es produeixi finalment o no aquest procés fotoquímic vindrà condicionat tant per la velocitat d'absorció de la radiació que presenti la substància en qüestió com pel rendiment quàntic ( $\phi$ ) de la reacció esmentada, essent aquest últim paràmetre la relació existent entre el nombre de molècules que reaccionen i el nombre de fotons absorbits per unitat de temps.

El rendiment quàntic, per tant, dona una idea sobre l'eficàcia de la fotodegradació directa, d'acord amb l'Equació (2):

$$\phi_k = \frac{k_\lambda}{2,303E_\lambda \varepsilon_\lambda} \quad (2)$$

En aquesta expressió,  $k_\lambda$  es la constant cinètica de degradació a una determinada  $\lambda$ ;  $E_\lambda$  és l'energia emesa per la font de radiació;  $\varepsilon_\lambda$  és el coeficient d'absorció del compost a la  $\lambda$  considerada i  $\phi_k$  és el rendiment quàntic en aquesta  $\lambda$  (Kari, Huger, et al., 1995).



D'altra banda, aquesta reacció també dependrà de l'estabilitat i la simplicitat dels productes de reacció formats. Durant la fotòlisi, una molècula absorbeix un quàntum de llum i es dissocia donant lloc a dues o més substàncies més simples. Els fragments produïts en aquest procés són, sovint, àtoms o radicals lliures; per això, aquesta reacció es dona normalment en un mecanisme en cadena.

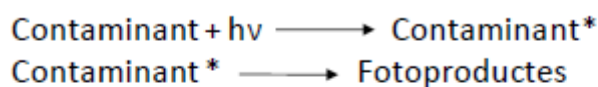
Així doncs, durant la fotòlisi directa, una molècula absorbeix la llum (de la radiació solar o d'una font artificial), es torna inestable i posteriorment es degrada o es transforma degut a la ruptura d'un o més dels enllaços que la conformen. Per tant, per poder absorbir la llum, és necessari que l'espectre d'absorció electrònica d'un compost se superposi amb les longituds d'ona d'irradiació rebudes de la llum del sol o de la font de radiació. La possibilitat de fotodegradació d'un compost orgànic en el medi ambient o en laboratori, doncs, depèn d'aquest grau de solapament. Tanmateix, fins i tot amb aquesta superposició, si una molècula es sotmetrà a fotòlisi o no depèn de la seva estructura i de les característiques moleculars fotosensibles (Albini & Fasani, 2004; Yan & Song, 2014). Les substàncies que es troben presents en el medi natural es podran degradar per incidència de la radiació solar sempre que absorbeixin radiació dins el rang de longituds d'ona de l'espectre solar i, a més, presentin un bon rendiment quàntic de fotodegradació. No obstant, hi ha altres condicionants, deguts majoritàriament a factors ambientals, que poden afectar al procés de fotodegradació; com pot ser la presència d'altres substàncies que absorbeixin la radiació i puguin o no transmetre-la, o bé, que aquestes substàncies generin un altre tipus d'espècies reactives, com poden ser els radicals lliures (Žonja, 2017). La radiació UV, doncs, indueix la dissociació de compostos presents en el medi amb oxigen i la formació de radicals altament reactius que són capaços de degradar els contaminants orgànics. Aquest fenomen es coneix com a fotòlisi indirecta.

En les reaccions fotoquímiques indirectes, un compost es transforma com a resultat de la generació induïda pel sol d'intermediaris reactius a partir d'espècies naturalment presents al medi aquàtic, com són la matèria orgànica dissolta (DOM), especialment els àcids húmics i fúlvics, els nitrats ( $\text{NO}_3^-$ ) o els nitrits ( $\text{NO}_2^-$ ). Aquestes espècies també s'anomenen sensibilitzadors o iniciadors de radicals (S, veure **Figura 13**). L'absorció de la radiació solar per part d'aquests components naturals, que són agents oxidants, genera espècies reactives i oxidatives com els radicals hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) (Zepp, Schlotzhauer, et al., 1985), l'oxigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ) (Zepp & Cline, 1977), l'ozó ( $\text{O}_3$ )

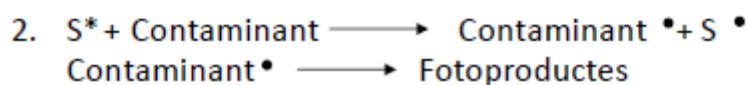
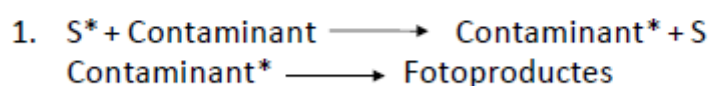
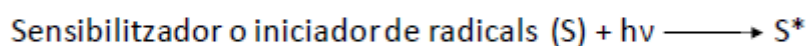
(Hutzinger, 1980), els radicals alquil peroxi ( $\bullet\text{OOR}$ ) (Larson, Smykowski, et al., 1981), el radical carbonat ( $\bullet\text{CO}_3^-$ ) o els electrons solvatats ( $e_{\text{aq}}^-$ ) (Žonja, 2017), que es generen per la ionització d'una molècula d'aigua (Andreozzi, Marotta, et al., 2003; Boreen, Arnold, et al., 2003; Fatta-Kassinos, Vasquez, et al., 2011; Lam & Mabury, 2005; A. Y. C. Lin & Reinhard, 2005). A més, les espècies que absorbeixen la llum poden absorbir energia en un estat excitat i transferir-la a una espècie orgànica propera en un estat fonamental i invocar així una reacció mitjançant fotosensibilització (Zepp, Baughman, et al., 1981).

D'entre les espècies reactives esmentades, el radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) és el més reactiu per la seva naturalesa no selectiva i altament electròfila (Lam, Young, et al., 2005). A més, el grau de fotodegradació de l'aigua superficial depèn, en la majoria de casos, de molts factors com la profunditat de la columna d'aigua, la turbulència de l'aigua, el pH, la temperatura, la latitud, la salinitat i, per descomptat, l'estació de l'any i les hores de llum solar directa (Žonja, 2017).

#### **Fotodegradació directa**



#### **Fotodegradació indirecta**



**Figura 13.** Mecanismes de reacció de la fotodegradació directa i indirecta.

La prevalença d'un procés (directe o indirecte) sobre l'altre dependrà de l'espectre d'absorció de les substàncies químiques i del rendiment quàntic de la seva fotòlisi (Doll & Frimmel, 2003). En el medi ambient (i en certs casos en el laboratori), aquests dos mecanismes de fotodegradació es produeixen simultàniament. Tanmateix, cal esmentar que la fotòlisi amb radiació UV presenta uns rendiments baixos quant a la degradació de compostos orgànics dissolts en aigua. No obstant això, per al cas de contaminants amb un alt coeficient d'extinció molar i un elevat rendiment quàntic, pot

resultar interessant aquest tractament (Boreen, Arnold, et al., 2003). A més, la presència de microorganismes, algues o substàncies húmiques en l'aigua acceleren les reaccions fotoquímiques perquè són entitats capaces d'absorbir la llum del sol (Zepp & Schlotzhauer, 1983).

En aigües naturalment il·luminades pel sol, la fotodegradació es considera el principal procés de transformació abiòtica que pot atenuar de manera natural la concentració de productes farmacèutics que, a causa del seu disseny, poden resistir altres processos abiòtics importants com la hidròlisi (Boreen, Arnold, et al., 2004; Doll & Frimmel, 2003; Fatta-Kassinos, Vasquez, et al., 2011; Lam & Mabury, 2005; Nikolaou, Meric, et al., 2007). Malgrat el fet que molts fàrmacs no presenten una resistència especial a la degradació, la seva contínua introducció a les aigües residuals, i el seu pas posterior al medi aquàtic, fa que puguin presentar persistència a les zones on són abocats, ja que aquest flux continu d'entrada al medi en compensa la seva degradació (Daughton & Ternes, 1999).

### **2.6.1. FOTODEGRADACIÓ SOLAR DE PRODUCTES FARMACÈUTICS I VIES DE REACCIÓ**

En les últimes dècades s'ha estudiat la fotodegradació solar de moltes classes i compostos farmacèutics (Andreozzi, Marotta, et al., 2003; Bergheim, Gieré, et al., 2012; Lam, Young, et al., 2005; Lam & Mabury, 2005; Pérez-Parada, Agüera, et al., 2011; Yan & Song, 2014). Molts productes farmacèutics tenen anells aromàtics, heteroàtoms i altres grups funcionals en la seva estructura que poden absorbir la radiació solar o bé reaccionar amb els compostos sensibilitzadors generats per la irradiació solar de l'aigua superficial (Boreen, Arnold, et al., 2003). Fa uns anys, aquests darrers investigadors citats, es van adonar que molts productes farmacèutics contenen fragments estructurals similars als que formaven els pesticides, com els grups fenol (-OPh), nitro (-NO<sub>2</sub>) i nafoxil (-ONaph), que anteriorment ja s'havia descobert que patien fotodegradació.

Inicialment, es va prestar especial atenció a les substàncies que es detectava que passaven els tractaments convencionals (primaris i/o secundaris) de les plantes d'aigües residuals i arribaven fins als rius, o bé, en aquells compostos les concentracions trobades en aigües superficials dels quals eren elevades. Més tard, aquesta tipologia d'estudis es va anar implantant cada cop més en compostos

considerats persistents i/o que es detectava que podien tenir algun tipus d'efecte tòxic per als organismes vius, éssers humans inclosos.

En general, el mètode d'elecció utilitzat per a la fotodegradació de productes farmacèutics és la degradació amb un simulador de llum solar en comptes de l'exposició dels fàrmacs a la llum solar natural, amb la voluntat d'accelerar les reaccions fotoquímiques que es produeixen. Tanmateix, s'ha trobat que sovint s'utilitzen ambdós mètodes i, en alguns casos, una comparació entre els dos tipus d'experiments es discuteix a la bibliografia (Gonçalves, Pérez, et al., 2011; Tong, Eichhorn, et al., 2011).

Com s'ha esmentat anteriorment, els productes farmacèutics són un gran grup heterogeni estructuralment. Per tant, seria poc probable que es pogués proposar un únic mecanisme de reacció per a tots ells o fins i tot en un grup farmacològic (antibiòtics, antihipertensius, etc.) concret. Per tant, les vies de fotodegradació s'han de determinar de manera individual (o dins d'un grup de compostos relacionats estructuralment, com per exemple, els antibiòtics de sulfonamida). Tanmateix, com que les principals espècies reactives en la fotòlisi (in)directa són els radicals hidroxil, molts productes farmacèutics formaran productes de transformació (TPs) hidroxilats (Gonçalves, Pérez, et al., 2011; Gros, Williams, et al., 2015; Lam & Mabury, 2005). La hidroxilació es pot produir a l'anell benzè o a la cadena alquílica, dues de les estructures més comunes dels productes farmacèutics. No obstant, la fotodegradació també pot formar òxids d'heteroàtoms, com els òxids-N (Aceña, Pérez, et al., 2014; Eichhorn, Pérez, et al., 2012) o l'òxid-S (Gros, Williams, et al., 2015), com es veurà en el cas del sulfametoxazol (Trovó, Nogueira, Agüera, Fernandez-Alba, et al., 2009; Trovó, Nogueira, Agüera, Sirtori, et al., 2009), un dels compostos farmacèutics estudiats en aquesta tesis.

Deponent dels grups funcionals o fragments del fàrmac, també s'han detectat reaccions específiques d'un compost. Per a les molècules que contenen halògens, per exemple, la deshalogenació (*halogenació reductora*) es produeix, amb o sense hidroxilació, a la posició des de la qual es perd l'halogen (*deshalogenació oxidativa*) (Agüera, Perez Estrada, et al., 2005; Doll & Frimmel, 2003). A més, la descarboxilació o desalquilació és una via habitual de reacció. La N-desalquilació o la O-desalquilació es veuen sovint en la formació dels productes de fototransformació dels compostos

farmacèutics (Lam, Young, et al., 2005; Sturini, Speltini, et al., 2012; Tong, Eichhorn, et al., 2011). No obstant això, fragments específics de fàrmacs produiran vies de reacció específiques i, per tant, TPs també específics. Alguns exemples són l'epoxidació en el cas de la carbamazepina (Lam, Young, et al., 2005), la formació de benzofenones i altres derivats en el cas del diazepam (West & Rowland, 2012) i la isomerització i ciclització del tamoxifè (DellaGreca, Ilesce, et al., 2007), un altre dels compostos estudiat en la present tesis.

Sovint, la fotodegradació d'un compost farmacèutic es pot descriure mitjançant una equació cinètica de primer ordre (Dabrowska, Kot-Wasik, et al., 2005). Les cinètiques de degradació de primer ordre s'expressen de la següent manera:

$$\frac{dC}{dt} = -kC, \quad (3)$$

on  $C$  és la concentració del compost degradat en el temps i  $k$  és la constant de velocitat aparent de la fotodegradació (1r ordre). Aquesta expressió també es pot escriure tenint en compte els diferents valors de la concentració del compost parental en funció del temps de degradació:

$$\ln C(t) = \ln C_0 - kt, \quad (4)$$

on  $C_0$ , en aquest cas, fa referència a la concentració inicial del compost ( $t=0$  min).

A l'hora de comparar cinètiques de fotodegradació, també s'utilitza el temps de vida mitjana o semivida ( $t_{1/2}$ ), que és un paràmetre més intuïtiu. Aquest es defineix com el temps que triga la concentració inicial d'una molècula a reduir-se a la meitat del seu valor. Al medi aquàtic, la fotòlisi no sempre degrada completament els fàrmacs i en moltes ocasions l'efecte de la llum produeix reaccions complexes. Si bé aquesta és una forma senzilla de descriure la degradació d'un compost, cal dir que moltes vegades els compostos es poden degradar també mitjançant esquemes de reacció que inclouen reaccions paral·leles, de segon ordre o superiors i, per tant, aquesta expressió és una simplificació del mecanisme real de degradació. Així doncs, cal limitar-ne l'ús a estudis en què el coneixement del ritme de desaparició del compost parental sigui l'únic objectiu.

## 2.6.2. MÈTODES DE DETECCIÓ DELS ESTUDIS DE FOTODEGRADACIÓ DE FÀRMACS EN EL MEDI AQUÀTIC

Com s'ha comentat anteriorment, la presència de residus farmacèutics al medi ambient pot representar una amenaça potencial pels ecosistemes i fins i tot pels humans. Un cop al medi aquàtic, els fàrmacs poden ser transportats i distribuïts en les diferents aigües superficials i subterrànies. A més del transport, aquests compostos estan subjectes a la degradació per dues vies, els processos biòtics i els abiòtics. Aquestes reaccions causen transformacions en l'estructura del compost, formant compostos estables de propietats i toxicitat desconegudes. Sovint, doncs, el resultat d'aquests processos de modificació són la formació de productes de transformació (TPs), que poden ser més mòbils i polars que el compost original i, per tant, també poden exercir efectes adversos en els organismes aquàtics. A més, en el cas dels compostos bioactius, el seu efecte farmacològic pot ser retingut quan la part activa de la molècula roman intacte després de la seva transformació; com per exemple l'activitat antibiòtica, com s'ha demostrat per alguns casos (Halling-Sørensen, Sengeløv, et al., 2002; Sunderland, Tobin, et al., 1999). Per tant, l'elucidació de les diferents vies de degradació dels fàrmacs i la identificació dels TPs és de crucial importància per avaluar el destí i el risc global d'aquests contaminants emergents al medi aquàtic

Al llarg del Capítol 2, i més concretament a les seccions 2.5 i 2.6, s'han descrit les diferents transformacions que poden patir els fàrmacs un cop arriben al medi aquàtic, i principalment a les aigües superficials, fixant com a principals processos la fotodegradació i la biodegradació. Malgrat això, a la literatura científica es disposa encara de poca informació relacionada amb els possibles efectes tòxics de gran part dels TPs formats com a resultat d'aquests processos. A més, en la majoria d'estudis que hi ha, s'avalua la toxicitat de mescles que contenen els fàrmacs d'origen junt amb els seus TPs i, per a una avaluació concloent de la seva toxicitat, seria essencial poder identificar, separar i aïllar cada TP de la mostra estudiada.

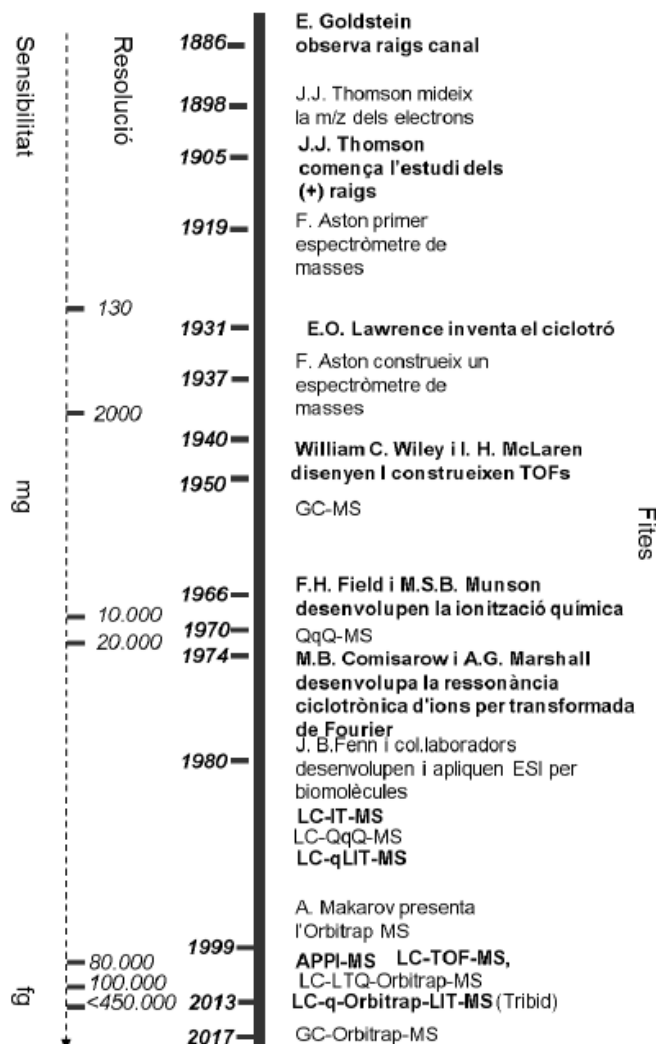
Els dos fàrmacs seleccionats, descrits al Capítol 3 i objectiu d'estudi de la present memòria, tamoxifè i sulfametoxazol, són susceptibles a la fototransformació ja que les seves estructures contenen grups cromòfors que absorbeixen la llum a longituds d'ona en la regió de l'UV-Vis de l'espectre solar. Per tant, com s'ha descrit amb anterioritat,

la fotodegradació d'aquests compostos es susceptible de generar productes de transformació amb una toxicitat superior a la dels compostos parentals (Boreen, Arnold, et al., 2003). Això, explica la importància de conèixer el comportament fotoquímic d'aquests compostos.

Per tal d'avaluar aquests processos de transformació, habitualment s'estudien primer a escala laboratori i després al medi natural, degut a la complexitat del propi medi i als diferents factors que poden afectar al destí dels fàrmacs en el mateix (Mas Garcia, 2012). Així doncs, solucions aquoses fortificades amb els fàrmacs estudiats són irradiades, generalment mitjançant un simulador de llum solar, per tal de formar, detectar i identificar els seus TPs més importants. Aquest procediment, descrit en el pròxim capítol, ha estat un dels objectius principals d'aquesta tesi.

Avui en dia, tot i que la identificació estructural de TPs és actualment un dels procediments més utilitzats pels investigadors per avaluar el destí dels fàrmacs al medi ambient, aquesta tasca és encara complexa i requereix l'aplicació de tècniques instrumentals sofisticades com ara la ressonància magnètica nuclear (RMN), la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC-MS) o la cromatografia líquida acoblada també a masses (LC-MS). A la majoria d'estudis centrats en la determinació de fàrmacs en diferents matrius ambientals, els anàlisi es realitzen principalment per LC-MS (Petrović & Barceló, 2007). Això es degut a que, gràcies als avenços i desenvolupaments tecnològics en el camp de la LC-MS des de la seva creació, especialment durant les últimes dècades (veure cronologia en la **Figura 14**), s'ha ampliat la popularitat d'aquesta tècnica fins a convertir-la en una de les preferides per a la identificació estructural de metabòlits i TPs de productes farmacèutics a causa de la naturalesa habitualment polar d'aquests compostos (Zonja, Aceña, et al., 2014). L'anàlisi amb GC-MS, en canvi, és molt menys popular, ja que amb aquesta tècnica els compostos polars solen ser derivatitzats en la posició del seu grup funcional per tal de reduir la polaritat i augmentar l'estabilitat tèrmica i la volatilitat (Žonja, 2017). Malgrat que aquesta tècnica ofereix una major resolució i una informació estructural més àmplia en comparació amb la LC-MS (Selim, Shawky, et al., 2016), la impossibilitat de realitzar l'anàlisi directa de les mostres polars i evitar d'aquesta manera les pèrdues derivades del procés de derivatització, propicien que la GC-MS no sigui una bona alternativa per a la determinació d'aquest tipus de compostos.

D'altra banda, la RMN té un paper important per a la caracterització estructural dels TPs, ja que permet la determinació inequívoca de l'estructura i l'estereoquímica d'aquests compostos, generant una ressonància única de diversos grups funcionals a partir dels dos nuclis més utilitzats: l'isòtop més receptiu a l'abundància natural ( $^1\text{H}$ )



**Figura 14.** Història de la espectrometria de masses. Figura reproduïda de (Aceña i Sánchez, 2017).

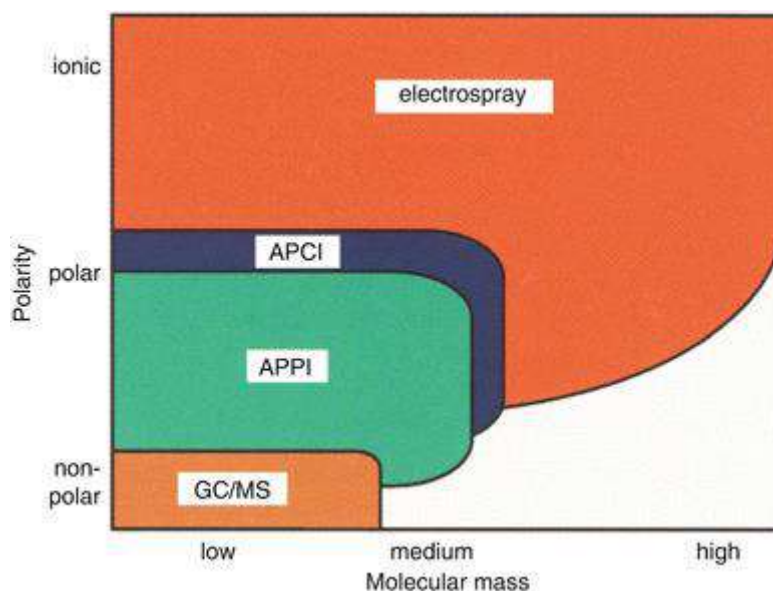
((H)ESI) la font de ionització més emprada a causa de la seva gran versatilitat per a una àmplia gamma de compostos polars i un ampli rang de masses (gran interval de relacions massa/càrrega,  $m/z$ ) (J. H. Gross, 2017). Addicionalment, també s'utilitzen altres fonts de ionització com la fotoionització a pressió atmosfèrica (en anglès, *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI) o la ionització química a pressió atmosfèrica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) per a compostos no polars i/o mitjanament polars, respectivament (veure **Figura 15**). En conseqüència,

i  $^{13}\text{C}$ . Tanmateix, la RMN no té la capacitat de separar compostos com la cromatografia líquida (LC), requereix molt de temps i precisa d'una elevada quantitat de la mostra degut a la sensibilitat limitada d'aquesta tècnica (Žonja, 2017). Per aquest motiu, molts cops no resulta viable l'ús d'aquesta tècnica en presentar manca de sensibilitat a les concentracions baixes en que es troben normalment els TPs a les mostres ambientals.

La cromatografia líquida (o cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)), en canvi, resulta una tècnica instrumental més adient en aquests casos. Aquesta, s'acobla normalment a un espectròmetre de masses que utilitza diferents fonts de ionització i analitzadors, essent la ionització (escalfada) d'electrosprai



l'aplicació de la tècnica de HPLC-MS en estudis de determinació de fàrmacs en el medi aquàtic i dels seus TPs ha augmentat considerablement en disposar d'un ampli rang de polaritats diferents (que permetrà determinar un gran nombre de fàrmacs amb polaritats diferents) gràcies a les distintes fonts de ionització disponibles.



**Figura 15.** Tipus de fonts de ionització disponibles segons rang de masses i polaritat. Comparació amb GC-MS. Figura reproduïda de (J. H. Gross, 2017).

En les dues últimes dècades, s'han emprat diversos analitzadors de baixa resolució (*Low Resolution*, LR) amb la LC, però només alguns d'ells ofereixen la sensibilitat i la selectivitat requerida per a la quantificació fiable de petits compostos polars en diferents tipus de mostres. La LC acoblada amb un espectròmetre de quadrupol individual (Q), per exemple, ofereix una bona sensibilitat, però quan s'investiguen matrius molt complexes, com les aigües residuals, la selectivitat és insuficient i sovint perjudica la identificació inequívoca dels diferents analits. L'espectrometria de masses en tàndem (MS/MS), desenvolupada el 1970 (Yost & Enke, 1978), ofereix un rendiment superior en termes de sensibilitat i selectivitat en comparació amb els instruments d'un simple quadrupol i també la capacitat d'aïllar, en una primera etapa, l'ió molecular del compost d'interès. La LC-MS/MS utilitza els espectròmetres de triple quadrupol (QqQ) o els espectròmetres de quadrupol amb trampa lineal d'ions (QqLIT). A causa de la seva elevada sensibilitat i selectivitat, els analitzadors de QqQ esdevenen l'eina principal per a l'anàlisi de traces en tot tipus de matrius. I de fet, han estat fins ara els espectròmetres de masses més utilitzats als laboratoris per a la quantificació d'un gran nombre de compostos orgànics (Petrović & Barceló, 2007).

Aquests instruments ofereixen aquesta gran sensibilitat i selectivitat mitjançant adquisicions en el mode de monitorització selectiva d'ions (en anglès, *Selected Reaction Monitoring*, SRM), que consisteix en monitoritzar transicions del compost precursor al ió fragment. A la literatura s'han reportat centenars de determinacions de nombroses classes de contaminants emergents utilitzant instruments de QqQ (Gago-Ferrero, Díaz-Cruz, et al., 2013; Gros, Petrović, et al., 2006; Ortelli, Edder, et al., 2004; Petrović, Hernando, et al., 2005; Picó, Blasco, et al., 2004). No obstant això, una de les limitacions principals del mode de SRM és la incapacitat per detectar o avaluar els compostos no inclosos inicialment a la llista de transicions, encara que la seva abundància a la mostra sigui molt alta. A més, el requisit d'almenys dues transicions SRM per compost restringeix el nombre d'analits a determinar en una sola injecció, degut a que l'increment de temps que se'n deriva en compromet la sensibilitat. Un problema afegit és el fet que alguns compostos de baix pes molecular només proporcionen una transició amb suficient intensitat de senyal per a la detecció sensible i altres components de la matriu poden tenir les mateixes transicions que l'analit d'interès.

Molts dels inconvenients esmentats es poden evitar mitjançant l'ús d'espectròmetres de masses d'alta resolució (*High Resolution*, HR). Recentment, doncs, i a causa de les actuals millores en l'anàlisi instrumental, l'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS) acoblada a LC s'ha convertit en l'eina imprescindible vàlida tant per a l'anàlisi qualitatiu com quantitatiu de les diferents mostres ambientals (Xian, Hendrickson, et al., 2012). Les plataformes principals, doncs, que ara s'utilitzen per a l'elucidació estructural dels TPs farmacèutics en els estudis basats en l'HRMS són: la trampa d'ions quadrupol (IT-MS), on trobem el quadrupol amb trampa d'ions lineal (QqLIT)-MS; el temps de vol (ToF), amb el quadrupol amb temps de vol (QToF)-MS; l'Orbitrap-MS (amb o sense quadrupol o LIT) i l'espectròmetre de ressonància ciclòrica d'ions per transformada de Fourier (FT-ICR)-MS (Rodríguez-Aller, Gurny, et al., 2013). Cadascun d'aquests instruments es caracteritza per la resolució que es pot obtenir (poder de resolució), la precisió de la massa que ofereixen, el rang de masses disponible, la sensibilitat, la selectivitat, el rang lineal/dinàmic, els modes i la velocitat d'adquisició, la mida i el preu, i el seu ús dependrà de la finalitat desitjada de l'anàlisi.

Els instruments d'alta resolució ofereixen la ruta més senzilla cap a la caracterització fiable dels TPs perquè la determinació de fórmules elementals es basa en la mesura de masses exactes amb precisions millors (inferiors) que 1-2 ppm en l'error de massa relativa, unes precisions que aquests aparells són capaços d'oferir. Aquest fet, ha provocat que la HRMS hagi cobrat força en el camp de l'anàlisi ambiental, propiciant el desenvolupament de noves estratègies per la identificació de TPs i/o metabòlits en mostres ambientals (Hernández, Sancho, et al., 2012; Hopfgartner, Tonoli, et al., 2012; Krauss, Singer, et al., 2010). A la literatura revisada s'han reportat aplicacions d'aquestes estratègies, demostrant el potencial que a fet tant atractiva aquesta tècnica per a la determinació de contaminants emergents i fàrmacs (Chiaia-Hernandez, Schymanski, et al., 2014; Díaz, Ibáñez, et al., 2012; Hug, Ulrich, et al., 2014).

D'altra banda, els mètodes alternatius que utilitzen tècniques de detecció espectrofotomètrica (UV) o d'espectroscòpia de fluorescència també poden ajudar a identificar els TPs, però no són tan informatius com altres tècniques d'identificació com MS o RMN. Tanmateix, es poden utilitzar instruments amb detecció de matriu de díodes (DAD) o fluorescència (FLD) juntament amb la detecció de MS. Aquestes metodologies de detecció, es consideren tècniques complementàries al MS que aporten més informació respecte els diferents TPs i metabòlits formats durant el procés de degradació (Žonja, 2017). Principalment, en els estudis de degradació de fàrmacs realitzats a escala de laboratori, els quals acostumen a desenvolupar-se en un entorn lliure de matriu de mostra, la LC es pot acoblar amb els detectors d'UV i/o de fluorescència i es poden utilitzar majoritàriament com a eina per aïllar els TPs generats durant els processos de degradació, a causa de la naturalesa no destructiva d'aquests detectors.

En un cas ideal, un TP detectat en el procés de degradació estaria disponible com a estàndard autèntic que es pogués utilitzar per corroborar la seva estructura. En alguns casos, és possible trobar estàndards comercials dels metabòlits humans dels productes farmacèutics, però amb prou feines estan disponibles per als TPs ambientals. A causa d'algunes similituds entre el metabolisme humà i la degradació microbiana, els dos processos poden produir el mateix metabòlit/TP, fent que l'estàndard comercialitzat estigui disponible també per als TP ambientals. Tanmateix, aquesta superposició no és gaire habitual, ja que a causa dels diferents sistemes enzimàtics implicats, les transformacions que es produeixen a les aigües residuals i

ambientals no són generalment comparables a les dels mamífers (Kosjek, Heath, et al., 2007). És per això que, actualment, molts estudis de degradació ambiental centren la seva atenció en la síntesi química dels estàndards (tot i que aquesta tasca pot ser complexa, llarga i costosa) o en l'aïllament de l'estàndard format de la mescla transformada. Això, no només ofereix la possibilitat d'executar experiments de RMN per a una caracterització estructural addicional, sinó que també ofereix l'avantatge de tenir l'estàndard autèntic que es pot utilitzar per al desenvolupament del seu mètode de detecció i, en última instància, servir per quantificar els TPs en mostres reals.

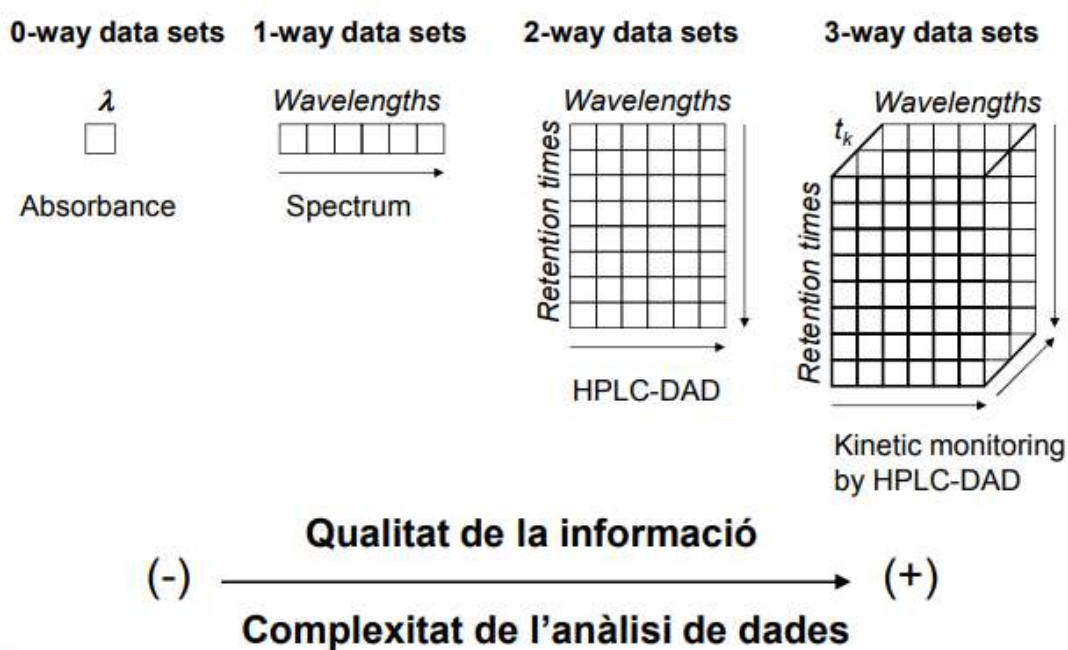
En la present memòria, s'ha estudiat el procés de fotodegradació de dos compostos farmacèutics mitjançant les tècniques de detecció espectrofotomètrica i d'espectrometria de masses anteriorment mencionades, aplicant també de manera innovadora mètodes quimiomètrics per a elucidar la cinètica de fotodegradació d'aquests compostos. Addicionalment, per a un dels fàrmacs, el procés de degradació va ser també monitoritzat emprant tècniques de detecció fluorimètrica per tal d'obtenir informació complementària del procés estudiat. D'aquesta manera, s'han establert les cinètiques de fotodegradació d'ambdós fàrmacs i s'han detectat o identificat (mitjançant HPLC-MS) un gran nombre de fotoproductes, el que ha possibilitat plantejar algunes hipòtesis dels mecanismes de fotodegradació per a la formació d'alguns dels compostos, com es veurà en la secció de resultats (Capítol 5).

### **2.6.3. EL PAPER DE LA QUIMIOMETRIA EN ELS ESTUDIS DELS PROCESSOS DE FOTODEGRADACIÓ**

Els mètodes espectroscòpics són, en general, senzills, altament sensibles i molt adequats per a l'estudi de reaccions químiques en solució, com ara els processos cinètics de fotodegradació. Quan els components implicats en la reacció química en qüestió tenen respostes espectrals diferents, la seva concentració pot ser controlada directament per mitjà d'aquestes tècniques. Tanmateix, en molts casos, les respostes espectrals de dos i, de vegades, fins i tot més components, es superposen considerablement. Quan això succeeix, l'anàlisi directe de les seves concentracions ja no és tant senzilla. L'enfocament comú utilitzat en aquests casos per pal·liar la falta de selectivitat del sistema consisteix, doncs, en mesurar el procés en un punt únic a una longitud d'ona concreta (dades univariants), on un component domina la resposta espectral i les contribucions dels altres components són negligibles. En canvi, l'ús de

mètodes quimiomètrics permet analitzar tot el rang espectral mesurat, utilitzant així tota la informació recollida en realitzar les diferents mesures espectrals. Aquest enfocament analític és superior a qualsevol mesura d'un sol punt, ja que centenars de punts de dades per espectre es poden tractar simultàniament (dades multivariants) (Lavine, 2000).

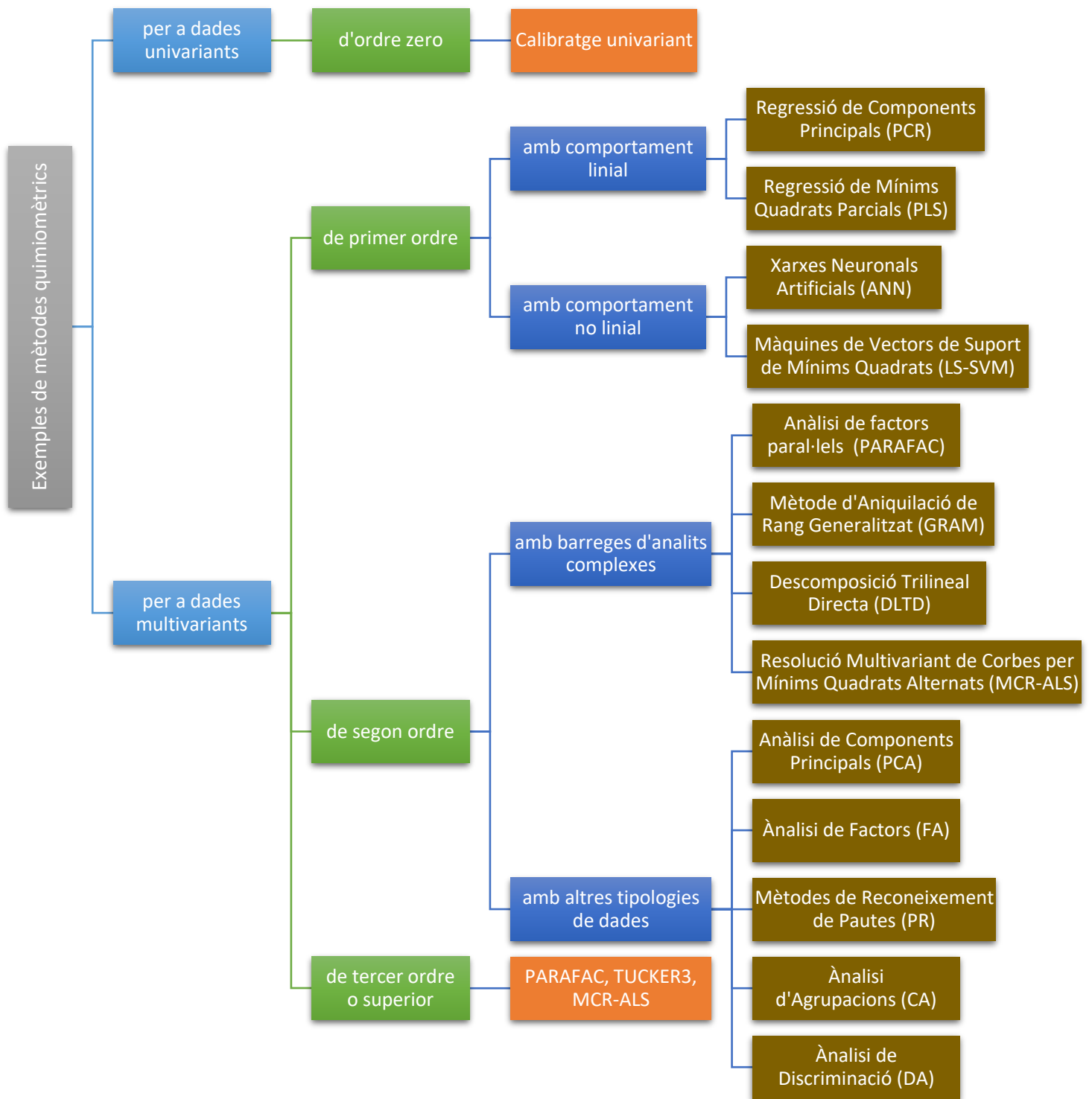
La quimiometria és, doncs, la disciplina científica que utilitza les matemàtiques, l'estadística i la lògica formal per dissenyar i seleccionar procediments experimentals òptims, i per obtenir la màxima informació i coneixement químic a partir de l'anàlisi de dades químiques (Massart, Vandeginste, et al., 1997). En els darrers anys, les noves tècniques analítiques, cada vegada més sensibles i sofisticades, han proporcionat una enorme quantitat de dades de diferents tipus (cinètiques, farmacèutiques, proteòmiques, metabolòmiques, etc.), de manera que s'han necessitat mètodes més complexos per resoldre la informació continguda en els estudis realitzats. Així, tot i que les metodologies estadístiques (com l'ajust univariant de corbes o el control estadístic) s'han estat utilitzat en química analítica des de fa temps, la quimiometria ha passat a ésser una eina molt important en els últims anys en permetre'ns processar i interpretar tot aquest volum d'informació química de forma multivariant (Hanrahan, 2008). Aquestes dades, segons la seva complexitat i mida, es poden classificar en diferents ordres de magnitud, com es mostra a la **Figura 16**.



**Figura 16.** Alguns exemples de tipologia de dades segons la seva complexitat.

Així, les dades són d'ordre zero (en anglès, *0-way data*), si com a resultat d'una mesura sobre una mostra concreta es té un valor escalar (es produeix una resposta individual per mostra). Aquest tipus de dades també rep el nom de dades univariants. Les dades d'ordres superiors a zero, en canvi, es consideren dades multivariants. Per tant, si com a resultat de la mesura sobre una mostra s'obté un vector (per exemple, un espectre), les dades són de primer ordre (*1-way data*). Són dades de segon ordre (*2-way data*) si, en canvi, com a resultat de la mesura s'obté una taula o matriu de dades (per exemple, utilitzant un instrument analític que registra espectres d'excitació-emissió o acoblant dos instruments de primer ordre, com LC-DAD o CG-MS). Finalment, es consideren dades de tercer ordre (*3-way data*), si com a resultat d'una mesura sobre una mostra s'obté un conjunt de taules o matrius de dades, o el que és el mateix, un cub de dades. N'és un exemple d'aquest darrer tipus de dades el seguiment de reaccions o processos amb respostes de segon ordre, com per exemple, el seguiment cinètic per LC-DAD, les dades ambientals (localitzacions geogràfiques, compartiments de l'ecosistema, concentració de contaminants) o les dades hiperespectrals. Depenent de les dades que tinguem en cada cas particular, es poden utilitzar uns mètodes quimiomètrics o uns altres (Escandar, Olivieri, et al., 2007), els quals es troben resumits en el següent gràfic (veure **Figura 17**).

Així, com es mostra a la **Figura 17**, per dades d'ordre zero s'utilitza habitualment un ajust de regressió lineal per mínims quadrats, que es coneix com a calibratge univariant, i que requereix selectivitat total per part de l'analit d'interès (Danzon & Currie, 1998). Per dades de primer ordre, en canvi, en que s'ha de compensar la falta de selectivitat amb algoritmes matemàtics eficients per extraure el senyal que faci possible predir la concentració d'un constituent en presència d'altres senyals interferents, s'han desenvolupat mètodes com la Regressió Multivariant de Components Principals (*Principal Component Regression*, PCR) o la Regressió de Mínims Quadrats Parcial (*Partial Least Squares*, PLS) (Geladi & Kowalski, 1986) per a dades amb un comportament lineal. Quan les dades es comporten de manera no lineal respecte de la concentració de l'analit, es poden utilitzar llavors altres mètodes com les Xarxes Neuronals Artificials (*Artificial Neural Network*, ANN) (Marini, 2020) o les Màquines de Vectors de Suport de Mínims Quadrats (*Least-Squares Support Vector Machine*, LS-SVM) (Suykens, 2020).



**Figura 17.** Exemples de mètodes quimiomètrics en funció de la tipologia de dades a analitzar.

Per dades de segon ordre i superiors, hi han altres mètodes més sofisticats com l'Anàlisi de Factors Paral·lels (*Parallel Factor Analysis*, PARAFAC) (Bro, 1997), el Mètode d'Aniquilació de Rang Generalitzat (*Generalized Rank Annihilation Method*, GRAM) (Sánchez & Kowalski, 1986), la Descomposició Trilineal Directa (*Direct Trilinear Decomposition*, DTLTD) (Sanchez & Kowalski, 1990) o la Resolució

Multivariant de Corbes per Mínim Quadrats Alternats (*Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*, MCR-ALS) (Tauler, 1995), que són especialment rellevants per l'anàlisi de barreges d'analits complexes.

Altres mètodes molt utilitzats per analitzar dades amb estructures de segon ordre són l'Anàlisi de Components Principals (*Principal Component Analysis*, PCA) (Jolliffe, 2002) o, en general, els que es deriven de la família de mètodes anomenats d'Anàlisi de Factors (*Factor Analysis*, FA) (Hopke, 2009), els mètodes de Reconeixement de Pautes (*Pattern Recognition*, PR) (Hopke, 2020) o els mètodes d'Anàlisi d'Grupacions (*Cluster Analysis*, CA) (Bratchell, 1989) o de Discriminació (*Discriminant Analysis*, DA) (Lavine & Rayens, 2009), entre d'altres. Per dades d'ordres superiors, normalment s'utilitzen també els mètodes de PARAFAC, TUCKER3 (Tucker, 1966) o MCR-ALS.

Tots aquests mètodes tenen aplicacions molt diverses, un fet que a propiciat que en les dues últimes dècades, l'ús dels mètodes quimiomètrics s'hagi popularitzat per a l'estudi de diferents tipus de processos químics i problemes analítics, en especial el MCR-ALS (Alier, Felipe-Sotelo, et al., 2009; Amigo, Cruz, et al., 2008; M. C. Antunes, J. Simão, et al., 2002; Azzouz & Tauler, 2008; De Juan, Tauler, et al., 2004; De Juan & Tauler, 2003; Gorrochategui, Jaumot, et al., 2016; Mas, Tauler, et al., 2011; Pérez-Cova, Tauler, et al., 2020; Perez-Lopez, Ginebreda, et al., 2021).

Els sistemes analítics i les mostres naturals solen estar lluny de ser simples i sovint estan compostes per molts constituents químics que s'han d'analitzar simultàniament. En altres casos, per exemple, alguns analits interessants s'han d'analitzar en presència de moltes altres interferències químiques. Per tant, es necessita una instrumentació més complexa per fer front a aquests sistemes, així com, es requereixen eines d'anàlisi de dades més sofisticades per manejar i interpretar la informació continguda en les dades generades per aquests instruments (de Juan & Tauler, 2006). En particular, l'estudi de la degradació i transformació de compostos farmacèutics implica l'anàlisi de sistemes multicomponents que involucren múltiples equilibris i processos químics cinètics, els quals també s'haurien d'investigar combinant diversos mètodes analítics i quimiomètrics (De Luca, Ioele, et al., 2012, 2020; Gómez-Canela, Bolívar-Subirats, et al., 2017; Jayaraman, Mas, et al., 2012).



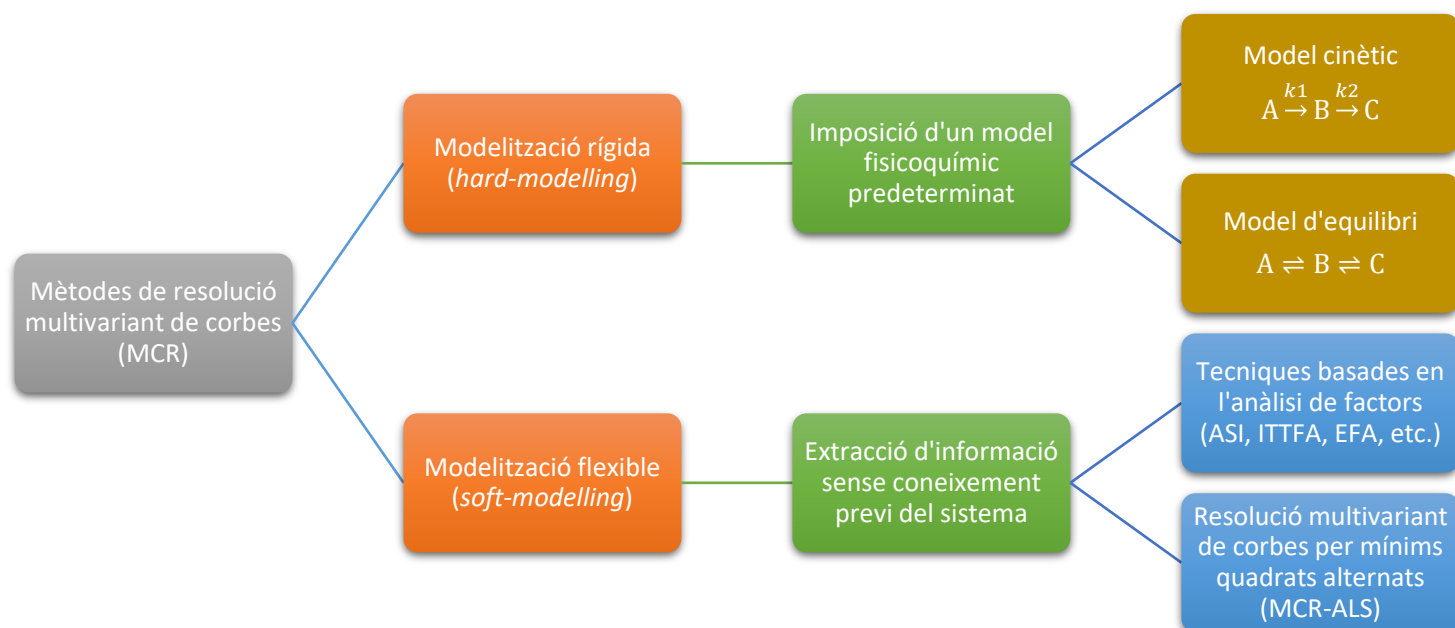
Com hem vist en aquest capítol, els mètodes espectrofotomètrics i espectromètrics de masses són útils per controlar i estudiar les reaccions químiques dels compostos orgànics en solució, com ara els processos de fotodegradació i valoració àcid-base. Així, a partir de la combinació d'aquestes tècniques experimentals i de l'anàlisi de les dades obtingudes amb mètodes quimiomètrics, és possible investigar acuradament els processos de degradació dels fàrmacs i identificar els diferents productes de transformació formats. En aquest cas, els mètodes quimiomètrics emprats estan majoritàriament enfocats en extreure els espectres purs (identificatius) dels components implicats en el procés químic investigat i els seus corresponents perfils de concentració. Tradicionalment, ens referim a aquest tipus de mètodes com a deconvolució de corbes espectrals (en cas d'anàlisi d'un únic espectre) o com a mètodes de resolució de corbes multivariants (en cas de l'anàlisi simultània de múltiples espectres).

Aquestes tècniques quimiomètriques, tanmateix, es poden classificar en dos grups: i) mètodes de modelització rígida (en anglès *hard-modelling*) (Maeder, McCann, et al., 2020) i ii) mètodes de modelització flexible (*soft-modelling*) (de Juan, Casassas, et al., 2000) (veure **Figura 18**).

Tradicionalment, s'han utilitzat els mètodes de modelització rígida, també anomenats mètodes basats en models deterministes, per analitzar les mesures donades a partir d'un model fisicoquímic predeterminat. El model pot ser una funció matemàtica simple o un sistema químic complex que s'ajusta a un conjunt de dades per tal de definir els perfils de concentració de les espècies intervinents en el procés estudiat. Per tant, cal conèixer prèviament el model adequat a ajustar, basat normalment en les lleis fisicoquímiques fonamentals, com ara el mecanisme de reacció química en cinètica o el model d'equilibri correcte en un experiment de valoració àcid-base. Malauradament, sovint això no és el cas a la pràctica i, per tant, no hi ha eines generals aplicables disponibles per orientar cap a la recerca del millor model que descriu correctament el procés químic investigat a part del propi ajust assolit en l'explicació de les dades experimentals en aplicar els diferents models quimiomètrics.

D'altra banda, els mètodes de modelització flexible extreuen directament els perfils de concentració i els espectres amb un mínim d'informació a priori sobre la naturalesa de les espècies formades i les seves característiques. Per tant, no fan servir cap

model químic explícit de descripció global de les dades en el càlcul dels perfils de concentració del procés estudiat, sinó propietats genèriques dels perfils de concentració i de les respostes químiques (espectres) per a definir la forma de les contribucions de cada component en el procés analitzat. Alguns exemples d'aquest tipus de mètodes són les tècniques basades en l'Anàlisi de Factors com l'Aïllament Espectral Automatitzat (*Automated Spectral Isolation*, ASI) (C.-H. Lin & Liu, 1978), l'Anàlisi Iterativa de Transformació de Factors Objectiu (*target*) (*Iterative Target Transformation Factor Analysis*, ITTFA) (Gemperline, 1986), l'Anàlisi de Factors Emergents (*Evolving Factor Analysis*, EFA) (Maeder, 1987), l'Anàlisi Iterativa Conjunta de Factors Clau (*Iterative Key Set Factor Analysis*, IKSFA) (Schostack & Malinowski, 1989), l'Anàlisi de Factors per Finestres (*Windows Factor Analysis*, WFA) (Malinowski, 1992) i l'anteriorment mencionat de Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (MCR-ALS) (Tauler, 1995). Aquest darrer mètode, ha estat l'emprat en la present Tesi i es troba descrit amb detall al Capítol 4.



**Figura 18.** Metodologies per enfocar l'anàlisi per MCR.

### 2.7. CARACTERITZACIÓ DE LA MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA PRESENT A LES AIGÜES SUPERFICIALS

Com s'ha mencionat a l'inici d'aquest Capítol, l'aigua és un recurs essencial per al desenvolupament de la vida del nostre planeta i, per tant, requereix de les millors condicions de qualitat per al seu consum. Molt sovint, com hem vist, la seva disponibilitat i viabilitat naturals es veuen afectades per l'impacte ambiental de les activitats humanes. De fet, les activitats antropogèniques que generen més contaminants són, la indústria química, la petrolera i l'electrònica, el tractament de residus, la generació d'electricitat, el transport, la mineria, la metal·lúrgia, l'agricultura i la ramaderia i els residus generats per la població en les seves activitats domèstiques, com ara els detergents i els productes de neteja, i els productes farmacèutics consumits per el manteniment de la salut; altrament, però, també hi ha algunes fonts naturals com els incendis forestals o les erupcions volcàniques que generen així mateix contaminants químics a l'aigua. Tanmateix, l'aigua de consum és un bé que comença a ser escàs, degut a l'augment creixent de la població mundial i a la relativament poca disponibilitat d'aquest preuat element. Ben mirat, la situació és inclús més problemàtica si es té en compte que una bona proporció d'aquestes aigües superficials està contaminada per l'abocament indiscriminat de residus generats per l'activitat de l'home en centres urbans i industrials.

Per aquest motiu, les plantes de tractament d'aigües residuals (en anglès, *Wastewater Treatment Plants*, WWTP), també anomenades comunament depuradores, són molt útils per eliminar les substàncies nocives transportades per l'aigua que poden provocar efectes no desitjats per a la salut i el medi ambient. Entre aquestes substàncies, trobem infinitat de compostos orgànics i inorgànics on destaquen els adobs i els pesticides, els residus d'origen industrial que contenen metalls pesants, els productes de neteja personal i de la llar, les substàncies fecals i els fàrmacs.

Així doncs, la matèria orgànica dissolta en l'aigua (en anglès, *Dissolved Organic Matter*, DOM), present tant a les aigües superficials com a les subterrànies, té un efecte significatiu en els processos bioquímics dels sistemes aquàtics (per exemple, en l'atenuació de la llum, la disponibilitat de nutrients, el transport de contaminants i metalls, entre d'altres). Per tant, aquesta matèria orgànica actua moltes vegades com a indicador de qualitat del nivell de salubritat de l'aigua. Addicionalment, moltes altres

espècies animals, plantes i algues també es modifiquen segons la qualitat del aigua, de manera que també s'utilitzen com a indicadors de la contaminació del aigua.

La demanda biològica d'oxigen, també anomenada demanda bioquímica d'oxigen (DBO), és un paràmetre que mesura la quantitat de matèria susceptible de ser consumida o oxidada per mitjans biològics que conté una mostra líquida. Normalment es mesura transcorreguts 5 dies ( $DBO_5$ ) i s'expressa en  $mg\ O_2\ L^{-1}$ . Aquest indicador, a més, també serveix per a mesurar la contaminació de l'aigua. Valors per sobre de  $30\ mg\ O_2\ L^{-1}$  poden ser indicatius de contaminació en aigües continentals, encara que les aigües residuals poden arribar a una DBO de milers de  $mg\ O_2\ L^{-1}$ . Si no hi ha oxigen, els bacteris no poden descompondre la matèria orgànica present en l'aigua i, per tant, augmenta la seva contaminació. Per tant, a l'hora d'optimitzar els processos de depuració d'aigües tant en l'aigua potable (ETAP) com en les estacions de tractament d'aigües residuals (EDAR), és molt important conèixer la concentració i les característiques de la DOM present en aquest tipus d'aigües i aplicar els procediments de tractament adequats per remoure-la correctament (Vera, Cruz, et al., 2017).

Tanmateix, en les reaccions fotoquímiques indirectes descrites anteriorment, la matèria orgànica dissolta i, més concretament, els àcids húmics i fúlvics, juguen un paper molt important com a intermedis reactius. En aquests casos, com s'ha vist, la degradació dels compostos orgànics succeeix com a resultat de la generació induïda per la llum solar d'intermediaris reactius a partir d'aquestes i altres espècies naturalment presents al medi aquàtic. D'aquesta manera, doncs, a causa de la seva funció d'atenuació de la llum (*quenching* de llum), la DOM pot afectar a les reaccions fotoquímiques directes anàlogues als processos químics estudiats en aquesta tesi. Si bé, les solucions dels fàrmacs emprades com a mostra a escala de laboratori han estat utilitzades sense la presència de cap matriu ambiental, en futurs estudis del grup d'investigació on s'ha realitzat aquesta Tesi, es preveu emprar solucions aquoses que simulin les condicions reals de mostra presents en el medi ambient i, per tant, que aquestes contingui DOM per induir certa activitat bioquímica en les mostres emprades. Per aquest motiu, és també important conèixer el comportament y destí de la DOM present en el medi aquàtic, en especial, en la conca del riu Llobregat, un dels principals recursos d'aigua per a l'Àrea Metropolitana de Barcelona (AMB).

### 2.7.1. MÈTODES DE DETECCIÓ DE LA DOM

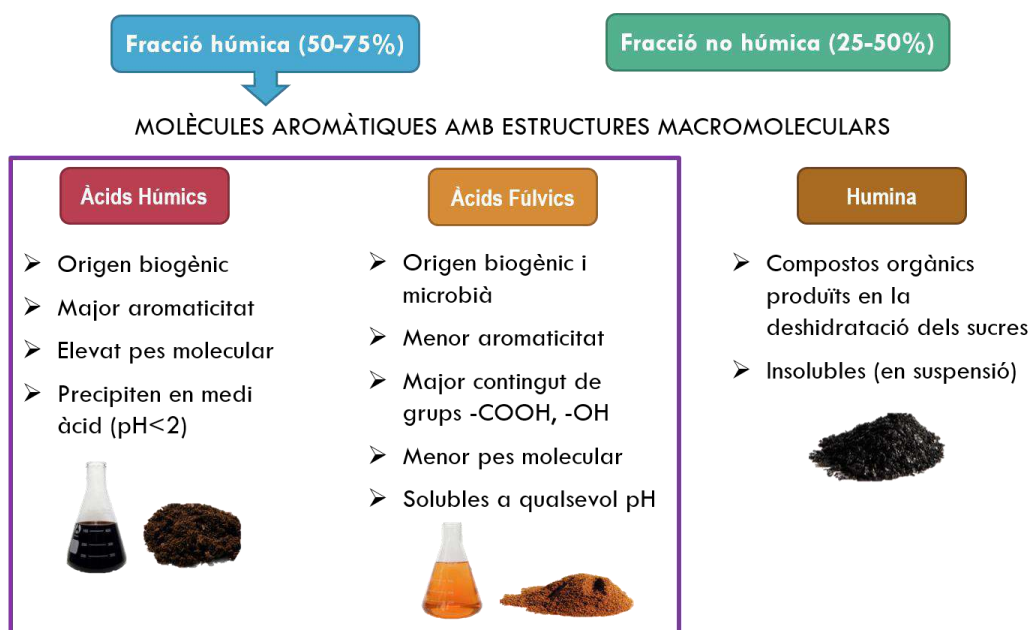
La matèria orgànica dissolta es pot analitzar i caracteritzar mitjançant diferents espectroscòpies, com l'absorbància UV-Visible i les matrius de fluorescència d'excitació-emissió (EEM), també anomenada fluorescència multidimensional. Les tècniques de fluorescència són més sensibles que l'espectroscòpia d'absorció molecular i tant els espectres d'excitació com els d'emissió mostren més detalls i proporcionen informació més selectiva sobre la naturalesa de la DOM que els espectres d'absorbància (P. G. Coble, 2007). S'ha demostrat que la recopilació de dades de fluorescència multidimensionals d'excitació-emissió proporciona un benefici enorme sobre la recollida d'espectres individuals (P. G. Coble, 2007; P. G. Coble, Spencer, et al., 2014).

L'espectroscòpia EEM implica, doncs, la recollida de múltiples espectres d'emissió en un rang de longituds d'ona d'excitació diferents. L'ús d'aquesta tècnica permet la discriminació de diferents tipus de matèria orgànica dissolta de color (en anglès, *Coloured Dissolved Organic Matter*, CDOM) a partir dels fluoròfors (grups funcionals amb capacitat d'emetre fluorescència) de la mostra analitzada i de les seves concentracions relatives (Kowalczyk, Stoń-Egiert, et al., 2005). De fet la CDOM, formada per una barreja complexa i heterogènia de centenars de molècules individuals de compostos orgànics, i que moltes vegades rep el nom de matèria orgànica dissolta cromofòrica o acolorida (que absorbeix radiació UV i Visible), és el component òpticament mesurable de la matèria orgànica dissolta en l'aigua.

En termes generals, la DOM es considera que té dues fraccions principals (com es mostra a la **Figura 19**): una fracció húmica i una altra de no húmica (McDonald, Bishop, et al., 2004). La fracció húmica inclou tot un conjunt de molècules altament aromàtiques que formen estructures macromoleculares i que poden incloure un ampli rang de mides moleculars. La majoria d'aquestes molècules, però, romanen químicament indefinides. A causa d'aquesta complexitat, en lloc d'un compost pur se les considera com una substància, i per això en conjunt s'anomenen substàncies húmiques. Aquestes substàncies tenen un origen biogènic, i deriven de materials vegetals com ara la cel·lulosa o la lignina. Les substàncies húmiques representen la fracció majoritària de les molècules de la DOM, ja que poden representar entre el 50 i el 75% de la seva composició (Hudson, Baker, et al., 2007).

D'altra banda, la fracció no húmica inclou biomolècules senzilles i químicament ben definides com ara lípids, aminoàcids i proteïnes, glúcids i àcids nucleics, entre d'altres. Aquesta fracció és considerada com la més làbil, és a dir, que és ràpidament utilitzada per la biota que viu a l'aigua. El seu origen rau majoritàriament en secrecions cel·lulars per part d'algues i bacteris (Findlay & Sinsabaugh, 2003).

### Composició DOM



**Figura 19.** Composició de la matèria orgànica dissolta (DOM).

A causa d'aquesta gran complexitat química, i del fet que potencialment la diversitat d'estructures químiques que poden prendre les substàncies húmiques és infinita, és inviàble definir la composició exacta de totes les molècules que componen la DOM. Per això, a l'hora de caracteritzar la matèria orgànica dissolta, s'utilitzen tècniques que estudien característiques específiques d'aquestes substàncies, com ara: la distribució de mides moleculars, les propietats òptiques, la composició elemental o la seva biodisponibilitat (veure **Figura 20**).

En relació a l'anàlisi de la distribució de mides moleculars, consisteix a mesurar quin ventall de mides moleculars existeix en una mostra determinada de DOM. Per fer-ho, existeixen dues metodologies principals: l'anàlisi de categories discretes de mides moleculars, i la separació cromatogràfica al llarg d'un continu de mides moleculars, també anomenada cromatografia d'exclusió molecular o per grandària (en anglès, *Size-Exclusion Chromatography*, SEC). La primera d'elles, s'aconsegueix en un procés anomenat ultrafiltració, en la qual la mostra es filtra successivament per filtres

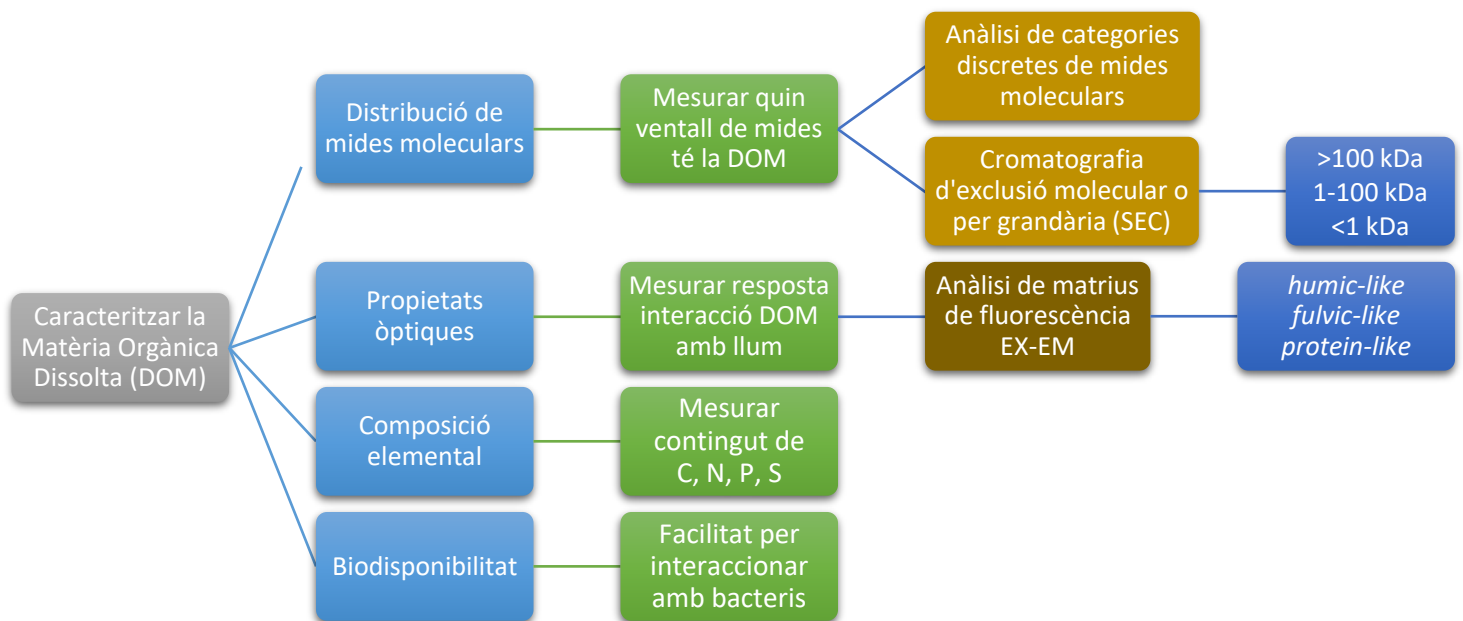
amb diàmetre de porus cada vegada més petits. Segons aquesta metodologia, la DOM es divideix convencionalment en les categories d'alt pes molecular (>100 kDa), pes molecular mitjà (1 – 100 kDa) i baix pes molecular (<1 kDa), encara que aquestes categories poden ser molt variables entre els diferents estudis (McDonald, Bishop, et al., 2004). En el cas de la cromatografia, la finalitat i el mecanisme són els mateixos que el procés d'ultrafiltració, i es separen les partícules de la mostra dins la columna cromatogràfica en funció de la seva mida. D'aquesta manera, l'any 2015 Amon i Benner van proposar un model, anomenat "*contínuum de mida-reactivitat*", que relaciona la mida molecular de la DOM amb la seva bioreactivitat (Amon & Benner, 1996; Benner & Amon, 2015). Segons aquest model, les molècules de major mida molecular són més làbils, ja que correspondrien a molècules de més recent formació. En canvi, les molècules més petites serien el resultat de la degradació de les molècules més grans, i formarien part d'un residu recalcitrant.

Pel que fa a l'anàlisi de les propietats òptiques, es basa en el fet que una gran part de les molècules que componen la DOM tenen la capacitat intrínseca d'interaccionar amb la llum. Específicament, els anells aromàtics presents en les substàncies húmiques i en alguns aminoàcids (com el triptòfan, la tirosina i la fenilalanina) contenen electrons que, quan són exposats a la llum, absorbeixen fotons d'energia i la reemetten en forma de radiació a una longitud d'ona inferior (fluorescència). Aquesta longitud d'ona a la qual una substància absorbeix i emet la llum és específica per cada compost. Per això, diversos components de la DOM poden ser identificats mitjançant l'anàlisi de la intensitat màxima de fluorescència a la qual absorbeixen i emeten llum. Aquesta anàlisi es fa mitjançant la mesura de matrius de fluorescència d'excitació-emissió (Hudson, Baker, et al., 2007).

El resultat d'aquesta anàlisi és un mapa òptic en el qual diferents components apareixen en forma de pic. Cal tenir en compte, però, que cada pic obtingut no correspon a un únic compost pur, sinó a un conjunt de compostos (famílies) que comparteixen unes propietats òptiques molt semblants. Així, al llarg dels anys, s'han identificat fins a vuit tipus diferents de bandes de fluorescència a les aigües naturals (P. G. Coble, Del Castillo, et al., 1998). Aquestes bandes inclouen bandes de fluorescència de tipus húmic, fúlvic, proteínic i pigmentari (P. G. Coble, 1996, 2007; P. G. Coble, Spencer, et al., 2014), cadascuna d'elles descrita amb un parell de longituds d'ona màxima d'excitació/emissió característic. Els materials de tipus húmic

terrestres, per exemple, mostren màxims d'excitació i emissió a longituds d'ona més llargues que els marins, tal com es pot preveure a partir de la seva naturalesa química més aromàtica i dels seus pesos moleculars més elevats (P. G. Coble, 2007). Com que a cada estudi de detecció de DOM realitzat es poden obtenir bandes de fluorescència diferents, és a dir, que presentin màxims d'excitació/emissió lleugerament diferents als descrits anteriorment a la literatura a causa de l'heterogeneïtat de les substàncies húmiques, cada component trobat sovint s'etiqueta com a "semblant a l'húmic", "semblant a proteïnes", etc., en referència a la tipologia de DOM que més s'assembla al component detectat en cada cas (és a dir, que presenta unes longituds d'ona màximes d'EX/EM més semblants a les detectades).

L'espectroscòpia EEM és, doncs, una potent eina espectral multidimensional capaç de detectar la DOM present en les aigües natural, no obstant això, la dificultat afegida en la identificació de bandes i la seva posterior quantificació provoquen que aquesta metodologia analítica sigui, per si sola, més aviat difícil d'aplicar (P. G. Coble, 2007).



**Figura 20.** Tècniques emprades per caracteritzar la Matèria Orgànica Dissolta (DOM) present al medi natural.



### 2.7.2. EL PAPER DE LA QUIMIOMETRIA EN ELS ESTUDIS DE CARACTERITZACIÓ DE LA DOM

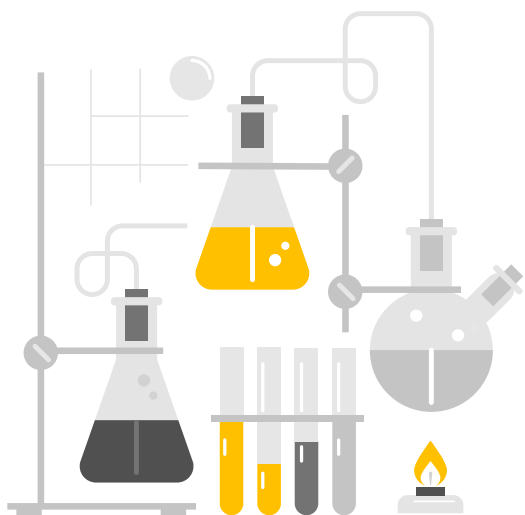
Al llarg dels anys, s'han proposat diferents tècniques quimiomètriques d'anàlisi de dades multivariants per extreure informació sobre la CDOM d'aigua marina i fluvial de les seves dades espectrofluorimètriques 2D i 3D (Bieroza, Baker, et al., 2011; Machado & Esteves da Silva, 1993; Persson & Wedborg, 2001; X. Zhang, Marcé, et al., 2014). Per exemple, l'anàlisi de components principals (PCA) (Jolliffe, 2002) i la regressió parcial de mínims quadrats (PLS) (Geladi & Kowalski, 1986) s'han utilitzat per distingir entre diferents masses d'aigua del mar Bàltic (Persson & Wedborg, 2001). Un enfocament més potent que aprofita l'estructura de dades interna en tres direccions/modes/vies (en anglès, *three-way*) de les mesures d'EEM de múltiples mostres és l'anàlisi de factors paral·lels (PARAFAC) (Bro, 1997), que es basa en el compliment estricte d'un model trilineal, com es veurà més endavant, i té la capacitat de resoldre les matrius d'EEM en grups fluorescents individuals (fluoròfors) i proporciona estimacions de les concentracions relatives de cada component del sistema (Murphy, Stedmon, et al., 2013; Stedmon & Bro, 2008). Aquest mètode quimiomètric, per tant, és àmpliament emprat avui dia (Murphy, Bro, et al., 2014; Stedmon, Markager, et al., 2003; Yamashita, Jaffé, et al., 2008) en aquests tipus d'anàlisi de matèria orgànica en aigües superficials.

No obstant això, recentment també s'ha proposat l'aplicació del mètode de Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (MCR-ALS) (Tauler, 1995) com a tècnica de processament de dades per a l'anàlisi de conjunts de dades experimentals multidireccionals obtingudes a partir d'anàlisi d'EEM de mostres amb DOM (M. C. G. Antunes, Pereira, et al., 2007; M. C. G. Antunes & Esteves da Silva, 2005; Esteves da Silva, Tavares, et al., 2006; X. Zhang, Marcé, et al., 2014). De fet, com que les dades de fluorescència EEM adquirides poden mostrar algunes distorsions del model trilineal pur a causa de l'efecte de filtre intern (en anglès, *inner filter effect*, IFE) (Kumar Panigrahi & Kumar Mishra, 2019), i també degut a l'elevat soroll experimental i alt grau de colinealitat espectral entre components, el compliment d'un model multilineal estricte no s'assoleix sempre (M. C. G. Antunes & Esteves da Silva, 2005). En aquests casos, el mètode MCR-ALS disposa d'un cert avantatge respecte el PARAFAC en ser capaç de modelar aquestes dades que no són

estrictament trilineals conjuntament amb aquelles que si ho són, fent que sigui possible aplicar component a component i matriu per matriu la restricció del model trilineal quan escaigui. Així doncs, el MCR-ALS funciona de manera similar al PARAFAC (de Juan, Rutan, et al., 1998; de Juan & Tauler, 2001) i, quan s'aplica amb la restricció de trilinealitat, és possible obtenir resultats similars d'ambdues tècniques (Alier, Felipe, et al., 2011; García-Reiriz, 2014; X. Zhang, Marcé, et al., 2014).

Adicionalment en aquesta Tesi, doncs, s'ha emprat el mètode MCR-ALS per a processar les dades obtingudes en l'estudi de la caracterització de la matèria orgànica dissolta (DOM) en l'aigua del riu Llobregat al llarg de 3 campanyes de mostreig d'aigua diferents.





---

# CAPÍTOL 3

## PART EXPERIMENTAL

---



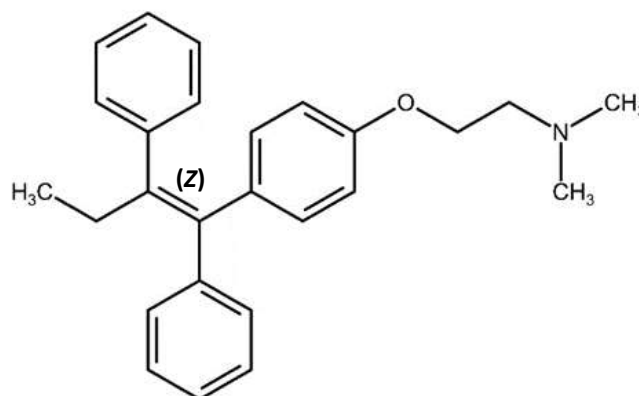
En aquest capítol es descriu de forma general la metodologia experimental utilitzada en cada un dels estudis realitzats. En virtut de la diferent tipologia dels mateixos, s'ha optat per dividir el capítol en 2 grans blocs. El primer bloc, on es detallarà el procediment experimental seguit en els processos de fotodegradació de fàrmacs i, més concretament, en tot allò relacionat amb la degradació del tamoxifè (TAM) i el sulfametoxazol (SMX); i el bloc restant, on s'esmentarà la metodologia emprada en relació amb l'estudi de la caracterització de la matèria orgànica dissolta (DOM) del riu Llobregat.

## BLOC 1: ESTUDI DELS PROCESSOS DE FOTODEGRADACIÓ DE FÀRMACS

### 3.1. FÀRMACS ESTUDIATS

#### ➤ *Tamoxifè (TAM)*

El tamoxifè (abreujat com a TMX o TAM) és el nom utilitzat habitualment per a referir-se a la (*Z*)-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)fenoxi]-*N,N*-dimetiletilamina (veure **Figura 21**), un fàrmac antiestrogen no esteroide que s'ha utilitzat com a teràpia complementària per tractar amb èxit el càncer de mama en humans durant molts anys (Jordan, 1992). S'utilitza durant un període de cinc anys després de la finalització de la cirurgia i el tractament de quimioteràpia i s'ha demostrat en diversos estudis que redueix significativament la probabilitat de recurrència del creixement del tumor (Clemons, Danson, et al., 2002; Jordan, 2006). Tot i que els efectes adversos de vegades són greus, els beneficis del fàrmac superen els seus inconvenients, millorant la qualitat de vida i la supervivència dels pacients (Šalamoun, Macka, et al., 1990).



**Figura 21.** Estructura del (*Z*)-tamoxifè.

El compost original es sintetitza com una barreja dels isòmers (*E*) i (*Z*), tot i que l'isòmer (*E*) no té ús clínic i només la forma isomèrica (*Z*) actua com a antagonista d'estrògens (Pandey, Wakharkar, et al., 2005; Robertson & Katzenellenbogen, 1982). Algunes de les propietats fisicoquímiques més rellevants del TAM per a aquest estudi de fotodegradació es resumeixen a la taula que es mostra a continuació (**Taula 2**).

**Taula 2.** Propietats fisicoquímiques del tamoxifè.

Propietats	Valor
Formula molecular	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> NO
Pes molecular ( <i>M<sub>w</sub></i> ) <sup>1</sup>	371,52 g/mol
Constant d'acidesa ( <i>pK<sub>a</sub></i> ) <sup>2</sup>	8,87
Coeficient partició octanol-aigua ( <i>log K<sub>ow</sub></i> ) <sup>2</sup>	7,88
Solubilitat en aigua <sup>1,a</sup>	1,02·10 <sup>-3</sup> mg/mL
Solubilitat en metanol <sup>3,a</sup>	94,6 mg/mL
Vida mitjana ( <i>t<sub>1/2</sub></i> ) <sup>1</sup>	5-7 dies
Mètode d'excreció <sup>1</sup>	Orina (9-13%) femta (26-65%)

(a) Mesurat a temperatura ambient (25 °C).

<sup>1</sup>(Gómez-Canela, Ventura, et al., 2014), <sup>2</sup>(J. Zhang, Chang, et al., 2013), <sup>3</sup>(Araya, Tomita, et al., 2005).

El tamoxifè ha estat considerat un dels fàrmacs citostàtics més estudiats a Espanya (Gómez-Canela, Ventura, et al., 2014) i en els darrers anys s'ha constatat la seva presència en el medi aquàtic (Besse, Latour, et al., 2012; Negreira, de Alda, et al., 2014; J. Zhang, Chang, et al., 2013). Malgrat la seva baixa solubilitat en aigua (<1 mg L<sup>-1</sup>) (Gómez-Canela, Cortés-Francisco, et al., 2013), l'aparició d'aquest fàrmac en matrius ambientals ha augmentat considerablement en els últims anys (Besse, Latour, et al., 2012; J. Zhang, Chang, et al., 2013). Així, diversos estudis han demostrat l'aparició d'aquest compost en efluent hospitalaris, aigües residuals (d'entrada i sortida) i aigües superficials en diferents rangs de concentracions (51 – 200 ng L<sup>-1</sup>) a gairebé totes les mostres analitzades (Ashton, Hilton, et al., 2004; Besse, Latour, et al., 2012; Ferrando-Climent, Cruz-Morató, et al., 2015; Ferrando-Climent, Gonzalez-Olmos, et al., 2017; Ferrando-Climent, Rodríguez-Mozaz, et al., 2014; Roberts & Thomas, 2006). El TAM s'allibera al clavegueram a través de les aigües residuals hospitalàries i domèstiques i, com que no s'elimina totalment de les EDAR durant els

tractaments biològics convencionals, s'aboca amb posterioritat a les aigües receptores naturals (Ferrando-Climent, Rodríguez-Mozaz, et al., 2014; Kovalova, 2009).

La presència d'aquest fàrmac en el medi aquàtic és preocupant degut a la seva toxicitat coneguda, els efectes de la alteració endocrina que pot causar en els organismes presents al medi i el seu potencial de bioacumulació (Jean, Perrodin, et al., 2012). L'alt coeficient de partició octanol/aigua del fàrmac ( $\log K_{ow}$  7,88) indica una major afinitat d'absorció en teixits grassos, sòls i sediments. Aquest comportament, pot provocar bioacumulació i fer augmentar la toxicitat d'aquest fàrmac en els diferents compartiments ambientals (Negreira, de Alda, et al., 2014; J. Zhang, Chang, et al., 2013). La seva baixa mobilitat afavoreix, doncs, la toxicitat d'aquest tipus de substàncies. A més, estudis recents han revelat que les barreges de tamoxifè amb altres fàrmacs anticancerígens en mostres reals tenen una toxicitat més elevada que el fàrmac individual (Mater, Geret, et al., 2014). Per tots aquests motius, el TAM representa un bon candidat per estudiar la seva fotodegradació.

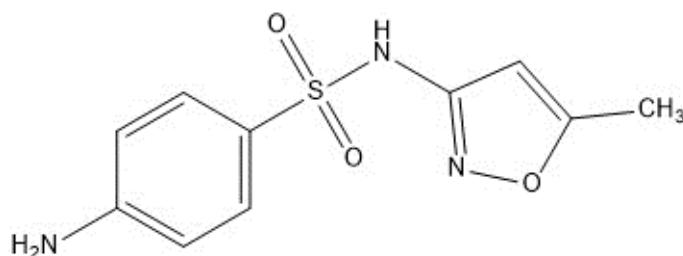
Tot i que la fotosensibilitat del TAM és ben coneguda (Z. Chen, Park, et al., 2008; Kojima, Onoue, et al., 2007; Li, Nanaboina, et al., 2016), fins ara pocs articles descriuen el seu perfil de fotodegradació en detall (DellaGreca, Iesce, et al., 2007; Negreira, Regueiro, et al., 2015; Šalamoun, Macka, et al., 1990). Recentment, es va publicar un estudi d'eliminació del TAM mitjançant diferents processos d'oxidació avançada (AOPs) com a mètode de degradació (Ferrando-Climent, Gonzalez-Olmos, et al., 2017).

#### ➤ *Sulfametoxazol (SMX)*

El sulfametoxazol (abreujat SMX o SMZ) és el nom comunament utilitzat per a la 4-amino-N-(5-metil-1,2-oxazol-3-il)benzensulfonamida (veure **Figura 22**). Aquest compost és un antibiòtic que forma part del grup de les sulfonamides, un grup d'agents antimicrobians sintètics que contenen un grup sulfonamida, un derivat de la sulfanilamida, el primer agent quimioterapèutic eficaç utilitzat àmpliament per al tractament d'infeccions bacterianes en humans (Vijaya Chamundeeswari, James Jebaseelan Samuel, et al., 2014). Actualment, es prescriu per tractar infeccions del tracte urinari, infeccions de l'oïda, conjuntivitis, bronquitis, sinusitis i toxoplasmosi (Gong & Chu, 2015). A més, s'utilitza en l'aqüicultura i la ramaderia (Trovó, Nogueira,



Agüera, Sirtori, et al., 2009). El SMX també s'utilitza en medicina veterinària com a additiu alimentari per promoure el creixement i l'augment de pes dels animals, així com per al tractament de malalties o com a medicina preventiva (Xu, Mao, et al., 2011). Per aquest motiu, en alguns estudis, es detecta com a residu a la carn de porc (Shao, Dong, et al., 2005) o al sòl de granja (Drillia, Dokianakis, et al., 2005). Algunes de les propietats fisicoquímiques més rellevants del SMX per a aquest estudi de fotodegradació es resumeixen a la **Taula 3**.



**Figura 22.** Estructura del sulfametoxazol.

El sulfametoxazol és hidrosoluble i un compost quelant feble que uneix la matèria orgànica al sòl mitjançant un mecanisme d'unió i intercanvi catiónic (Xu, Mao, et al., 2011). En conseqüència, pot migrar dels cossos humans i animals i entrar al medi aquàtic sense impediments (Kemper, 2008). A més, aquest fàrmac és prou estable a la natura per mantenir una activitat biològica significativa. Addicionalment, alguns dels seus metabòlits excretats poden fins i tot transformar-se de nou al fàrmac actiu original (Bonvin, Omlin, et al., 2013). A causa de la seva baixa biodegradabilitat, el SMX pot persistir al medi ambient durant molt de temps. S'ha demostrat que, fins i tot a concentracions baixes, la seva presència pot suposar un risc ambiental sever en alterar l'estructura de la comunitat microbiana, que pot provocar una inducció completa de la resistència antibacteriana o provocar resistència creuada en bacteris patògens (Kemper, 2008; Su, Deng, et al., 2016). A més, el SMX pot afectar l'ecosistema aquàtic inhibint l'activitat vital dels seus organismes (Gmurek, Horn, et al., 2015).

**Taula 3.** Propietats fisicoquímiques del sulfametoxazol.

Propietats	Valor
Formula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
Pes molecular ( <i>M<sub>w</sub></i> ) <sup>1</sup>	253,28 g/mol
Constants d'acidesa ( <i>pK<sub>a</sub></i> ) <sup>1</sup>	0,25 // 1,97 // 6,16
Coefficient partició octanol-aigua ( <i>log K<sub>ow</sub></i> ) <sup>2</sup>	0,89
Solubilitat en aigua <sup>2,a</sup>	<1 mg/mL
Solubilitat en metanol <sup>2,a</sup>	20 mg/mL
Vida mitjana ( <i>t<sub>1/2</sub></i> ) <sup>3</sup>	10 hores
Mètode d'excreció <sup>3</sup>	Orina i femta (15-25%)

(a) Mesurat a temperatura ambient (25 °C).

<sup>1</sup>(Şanlı, Şanlı, et al., 2010), <sup>2</sup>(PubChem, 2021), <sup>3</sup>(Radke, Lauwigi, et al., 2009)

El SMX s'ha identificat, juntament amb altres productes farmacèutics, en molts efluents de depuradores municipals de diversos països d'Europa, inclosa Espanya (Gros, Rodríguez-Mozaz, et al., 2013). De fet, dins dels fàrmacs amb més detecció al món, el SMX es troba en tercera posició, juntament amb l'ibuprofè, els quals han estat detectats a 47 països del món (Weber, Carius, et al., 2014). Les concentracions trobades oscil·laven entre 0,01 i 2 µg L<sup>-1</sup> (Trovó, Nogueira, Agüera, Sirtori, et al., 2009). També s'ha detectat en aigües superficials i subterrànies a nivells de concentració de fins a 500 ng L<sup>-1</sup>, en afluents d'EDAR a 440 ng L<sup>-1</sup> i uns 90 ng L<sup>-1</sup> en els seus efluents (Voigt, Bartels, et al., 2017). En general, quan aquest fàrmac s'absorbeix al cos, es produeixen algunes reaccions de biotransformació i el SMX es metabolitza en compostos més polars, la qual cosa demostra que la major part d'aquesta substància es descomposa amb certa rapidesa. Tanmateix, una quantitat significativa del fàrmac original, al voltant del 15-25%, no es metabolitza, i el compost original abandonarà l'organisme a través de l'orina o s'excretarà a les femtes (Radke, Lauwigi, et al., 2009; Xu, Mao, et al., 2011). Addicionalment, el SMX també s'excreta a través de la llet humana (Committee on Drugs, 1994; Libecco & Powell, 2004). Al llarg dels anys, diferents estudis de biodegradació (Drillia, Dokianakis, et al., 2005; Pérez, Eichhorn, et al., 2005; Su, Deng, et al., 2016; Xu, Mao, et al., 2011), toxicitat i fotodegradació (Bonvin, Omlin, et al., 2013; Gmurek, Horn, et al., 2015; Gong & Chu,

2015; Lam & Mabury, 2005; Trovó, Nogueira, Agüera, Sirtori, et al., 2009) han estat realitzats.

### 3.2. TÈCNiques DE FOTODEGRADACIÓ APLICADES

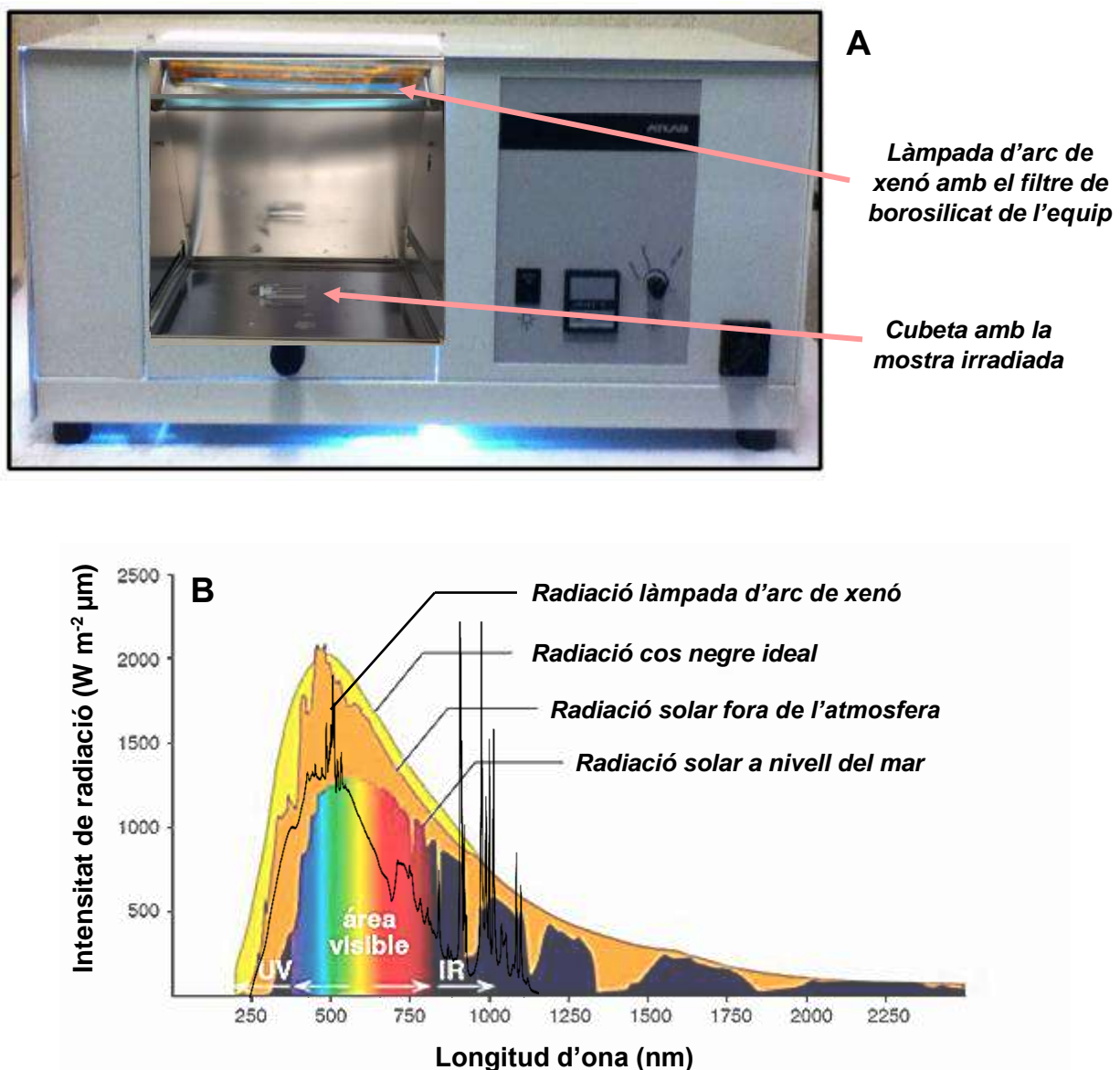
Els experiments de fotodegradació dels fàrmacs estudiats en aquesta tesi es basen en el seguiment cinètic de l'evolució d'aquests compostos quan son sotmesos a una font de radiació controlada a escala de laboratori. Aquest seguiment, es realitza mitjançant l'ús de tècniques instrumentals com l'espectroscòpia d'absorció molecular i la cromatografia líquida. Emprar aquestes dues tècniques té per finalitat esbrinar els mecanismes i la identitat dels compostos formats durant els processos de fotodegradació. Per tal d'assolir aquesta fita, les dades obtingudes en aplicar aquestes tècniques instrumentals han estat tractades amb mètodes quimiomètrics.

A continuació, es presenta la font de radiació emprada i es fa una descripció dels seguiments cinètics realitzats (espectroscòpic i cromatogràfic). Els mètodes quimiomètrics aplicats per a l'anàlisi d'aquestes mesures es descriuen en detall en el Capítol 4 de la Tesi.

#### 3.2.1. FONT DE RADIACIÓ EMPRADA

Les fotodegradacions han estat induïdes mitjançant un simulador de llum solar SUNTEST® CPS d'Atlas Material Testing Solutions, que es troba equipat amb una làmpada d'arc de xenó de 1500 W (veure **Figura 23A**). La intensitat d'irradiància seleccionada va ser de 400 i 765 W m<sup>-2</sup>, en el cas del TAM, i de 600 W m<sup>-2</sup> per al fàrmac SMX, que es corresponen amb dosis per hora de llum de 1440, 2754 i 2160 kJ m<sup>-2</sup>, respectivament. També es va treballar a intensitats menors però simplement disminuïa la velocitat del procés. L'espectre de llum obtingut amb aquesta làmpada és molt similar al de la llum solar (veure **Figura 23B**). L'equip disposa d'un ventilador que ajuda a equilibrar l'augment de temperatura que provoca la làmpada i la manté propera als 35 °C. A més, l'instrument conté un filtre de borosilicat que permet emetre a un radiació constant per sobre de 280 nm (en el rang 300 – 800 nm, evitant l'UV-C), i les seves parets interiors són làmines metàl·liques brillants que enfoquen la radiació cap al recipient que conté la mostra. Aquestes característiques estan conformes amb les normes dictades per la Conferència Internacional d'Harmonització (en anglès, *International Conference on Harmonization*, ICH), en concret, la directriu ICH Q1B

referent a les proves de fotoestabilitat de noves substàncies actives i medicaments (EMA, 1998). En aquest cas, les mostres es van exposar a la llum en cubetes de quars perfectament tapades de 5 mL de capacitat, per evitar qualsevol evaporació del dissolvent (veure **Figura 23A**). Per a tenir una visió global de les longituds d'ona a les que emet la font de radiació emprada, en la **Figura 23B** es mostra l'espectre d'emissió solar i també, superposat en blau, el d'emissió de la làmpada d'arc de xenó que incorpora l'equip simulador de llum solar. Com es pot observar, en la zona de l'UV-Vis, aquests espectres són molt semblants.

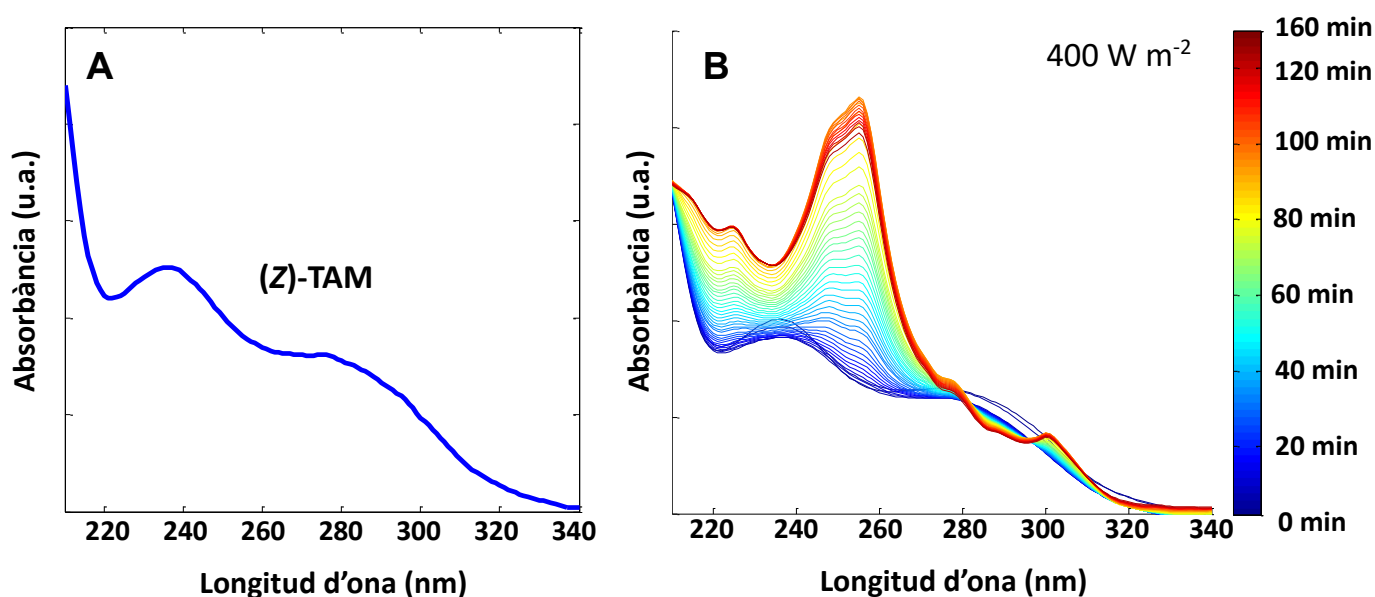


**Figura 23.** (A) Simulador de llum solar SUNTEST®. En el seu interior hi ha les cubetes de quars emprades per exposar les mostres a la llum. (B) Espectres d'emissió solar i de la làmpada d'arc de xenó del simulador emprat. Figura adaptada de (García Gómez, 2017).

### 3.2.2. SEGUIMENT CINÈTIC DE LA FOTODEGRADACIÓ MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA D'ABSORCIÓ MOLECULAR

L'objectiu d'aquest experiment és seguir cinèticament la fotodegradació mitjançant l'adquisició d'una sèrie d'espectres UV-Visibles a diferents temps de procés. Per tal de realitzar l'experiment, les cubetes de quars perfectament tapades exposades a la llum són retirades del simulador solar cada cert temps del procés i mesurades amb l'espectrofotòmetre. Un cop mesurades, les cubetes tornen a ser inserides dins el simulador solar i es prossegueix amb el procés de fotodegradació.

Ambdós fàrmacs estudiats en aquesta tesi presenten un espectre d'absorció en l'interval de longituds d'ona 200 – 400 nm i, per tant, són susceptibles de patir fotodegradació sota la font de radiació descrita. A mode d'exemple, la **Figura 24A** mostra l'espectre d'absorció UV-Visible del TAM. Per efecte de la llum UV, com es mostra també en la **Figura 24B**, s'observen canvis espectrals en la solució del fàrmac al llarg del temps, la qual cosa indica que el TAM s'està degradant i dona lloc a la formació d'altres productes de transformació.



**Figura 24.** (A) Espectre UV-Visible del (Z)-tamoxifè ((Z)-TAM). (B) Sèrie d'espectres corresponents al seguiment d'un procés de fotodegradació del (Z)-TAM sota l'acció de la llum UV.

L'espectroscòpia d'absorció molecular en la zona espectral de l'UV-Visible és una eina molt bona per a l'estudi de cinètiques de degradació. Però, tot i que aquesta tècnica no proporciona informació estructural suficient per a la identificació dels productes de degradació, és molt útil per a obtenir informació sobre el mecanisme i la

cinètica del procés, ja que es poden adquirir molts espectres de forma ràpida i simultània i es pot tenir una descripció global molt acurada de l'evolució del senyal (composició de la mostra estudiada) en funció del temps transcorregut del procés.

Per tal d'extreure aquesta informació, les dades s'han d'exportar a l'entorn computacional MATLAB® (The MathWorks Inc., 2020b) per a poder ser tractades amb els mètodes quimiomètrics anteriorment mencionats. Amb aquesta finalitat, s'utilitza la macro *Export* (un petit programa amb comandes pròpies del programari software UV-Vis ChemStation, amb el que es maneja l'espectrofotòmetre), que crea arxius en format ASCII (.csv) per a cada un dels espectres UV-Vis mesurats. A continuació, aquests arxius es converteixen en arxius llegibles en MATLAB® mitjançant una rutina creada en el nostre grup d'investigació. Aquesta rutina permet englobar el conjunt d'espectres en un únic arxiu en format ASCII (.txt) que, posteriorment, es converteix a format Excel (.xls) per a facilitar una importació directa a l'entorn MATLAB®.

### **3.2.3. SEGUIMENT CINÈTIC MITJANÇANT CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC-DAD-MS)**

El seguiment cinètic per cromatografia es basa en la injecció d'una sèrie d'alíquotes de la solució sotmesa a fotodegradació recollides a diferents temps de procés. Aquest tipus d'experiment s'ha realitzat per a confirmar o ampliar la informació obtinguda amb el seguiment cinètic mitjançant espectroscòpia d'absorció molecular i amb la intenció de caracteritzar i identificar els possibles productes formats durant el procés de fotodegradació estudiat.

Els temps de procés escollits en què s'han recollit les alíquotes s'han decidit en funció dels resultats obtinguts amb els experiments de seguiment cinètic per absorció molecular. Segons aquest resultat, es possible diferenciar varies fases en el procés de degradació amb velocitats de reacció diferenciades, que han suggerit els temps de procés als quals és més informatiu prendre les alíquotes que seran injectades posteriorment en el cromatògraf.

La cromatografia de líquids acoblada a un detector de díodes en sèrie i un espectròmetre de masses (HPLC-DAD-MS) s'ha escollit com a tècnica instrumental per a l'anàlisi dels fàrmacs i dels seus productes de degradació. L'ús d'aquesta tècnica es deu a les diferents propietats fisicoquímiques que presenten els compostos

estudiats. A continuació, es fa una breu descripció de la determinació dels fàrmacs en estudi i dels seus productes de degradació mitjançant aquesta tècnica.

L'espectròmetre de masses emprat en aquesta tesi, de la marca comercial Waters®, està format per una font de ionització d'electrospray (ESI) i un analitzador de triple quadrupol (QqQ), que ens han permès obtenir informació relativa al pes molecular dels compostos analitzats i també proporcionar informació estructural dels mateixos, respectivament. En la present tesi, s'ha optat per utilitzar l'espectròmetre de masses en mode de seguiment complet d'escaneig (*full scan monitoring*). Aquest mètode d'anàlisi proporciona una imatge qualitativa de la composició de la mostra, ja que implica escanejar l'interval de masses (prèviament definit) començant per la massa més petita d'ions fragments fins a la massa més alta esperada per a aquests fragments. Aquest tipus d'exploració d'una sola etapa, on el QqQ funciona com un quadrupol individual, proporciona un espectre de masses complet de cada analit. Amb aquest mètode, però, en cas que de definir un rang de masses elevat, la sensibilitat de l'espectròmetre disminuirà, ja que es realitzen menys exploracions per unitat de temps. De tota manera, amb l'evolució actual dels instruments, es poden aconseguir també mesures cada cop amb major sensibilitat també en aquest mode d'escaneig de rang complet. Tot i que el mode d'escaneig seleccionat pot resultar no idoni quan s'investiguen matrius molt complexes com les aigües residuals, on sovint la falta de selectivitat perjudica la identificació inequívoca dels diferents analits, en el cas de les solucions aquoses fortificades amb els fàrmacs estudiats (que no contenen cap matriu de mostra) emprades en la tesi es possible obtenir la informació desitjada.

Per al seguiment cromatogràfic de la fotodegradació dels productes farmacèutics seleccionats, doncs, es va emprar un cromatògraf de líquids amb detecció doble DAD-MS. Aquesta doble detecció (DAD-MS) es realitza amb la finalitat d'aconseguir millores en la diferenciació i caracterització dels productes de transformació formats durant el procés de degradació, ja que ambdós detectors aporten informació complementària l'un de l'altre. La HPLC-DAD-MS és una molt bona tècnica instrumental per al seguiment dels processos de degradació. A més, com es veurà en el següent capítol, és una eina més adequada que el seguiment directe per absorció molecular UV en el cas de sistemes complexos (amb un gran nombre de productes de degradació o amb productes de degradació amb espectres UV similars o evolucions cinètiques molt semblants). Les dades HPLC-DAD donaran una idea sobre

l'evolució cinètica dels productes de degradació, mentre que les dades HPLC-MS donarà els espectres de MS que ens ajudaran a la caracterització i identificació d'aquests productes.

Per a la separació cromatogràfica dels fotoproductes generats en els diversos experiments, es van provar diverses fases binàries d'aigua/metanol i aigua/acetonitril per a l'elució cromatogràfica de cada fàrmac, però finalment es va optar per utilitzar una fase binària d'aigua/metanol per ambdós compostos; no obstant, en diferents proporcions per a cadascun d'ells. En el cas del TAM, la fase mòbil es compon d'un 70% de metanol i un 30% d'aigua. Mentre que pel que fa al SMX, les proporcions són a la inversa: 80% d'aigua i 20% de metanol, acidificades però amb 0,1% d'àcid fòrmic. En ambdós casos, la separació cromatogràfica es va realitzar en condicions isocràtiques (sense variar la proporció de la fase mòbil durant tota l'elució cromatogràfica). Es va triar aquesta fase mòbil perquè la força eluotrópica generada en les dues columnes cromatogràfiques de fase reversa emprades ( $C_{18}$  i  $C_8$ , respectivament) permetia separar els diferents analits en major o menor mesura.

Per al seguiment cromatogràfic s'extreuen, aproximadament, una desena d'alíquotes de la solució de degradació. Cadascuna d'aquestes mostres proporciona un cromatograma HPLC-DAD-MS. Tal com s'ha comentat anteriorment, aquestes dades no proporcionen una informació cinètica tan detallada com els experiments de seguiment clàssic per espectroscòpia d'absorció molecular, però són més indicades per a la identificació dels possibles compostos de degradació.

Per tal de traspasar les dades generades per l'instrument i poder-les processar amb mètodes quimiomètrics, s'ha utilitzat el programa *DataBridge*, incorporat dins del software MassLynx subministrat amb els equips cromatogràfics de Waters®, com l'emprat en aquesta tesi. Aquest programa converteix les dades HPLC-DAD-MS (.raw) en arxius en format computable (.cdf) (de l'anglès, Common Data Format, CDF) (Space Physics Data Facility (SPDF), n.d.). Més tard, aquests arxius són importats a l'entorn computacional MATLAB®, per exemple a través de la funció *netcdfreadr* de la PLS\_Toolbox (Eigenvector Research Inc., 2020), que permet llegir, analitzar i aplicar diversos preprocessaments a les dades obtingudes (per exemple, l'escalat de Poisson (Keenan & Kotula, 2004; Lee, Gilmore, et al., 2008) i la suavització de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964), com es descriu amb més detall al Capítol 4). A partir de



l'aplicació d'aquesta eina s'obtenen dues matrius de dades per cada cromatograma, una corresponent a les dades de HPLC-DAD i l'altra corresponent a les dades de HPLC-MS, respectivament. En cas de realitzar l'espectrometria de masses emprant ambdues polaritats (positiva i negativa), per exemple, s'obtindria una matriu de dades per a cadascuna d'elles.

Finalment, el mètode MCR-ALS (en la seva versió GUI 2.0) (Jaumot, de Juan, et al., 2015) es va implementar a l'entorn de càlcul i visualització de MATLAB®. Totes les anàlisis quimiomètriques es van realitzar en aquest entorn informàtic.

El procediment experimental emprat en els estudis de fotodegradació dels fàrmacs seleccionats en aquesta tesi es troben descrits amb més detall a l'**ARTICLE I** "*Investigation of the photodegradation profile of tamoxifen using spectroscopic and chromatographic analysis and multivariate curve resolution*" i a l'**ARTICLE II** "*Coupling of spectrometric, chromatographic, and chemometric analysis in the investigation of the photodegradation of sulfamethoxazole*", referents al procés de degradació del TAM i el SMX, respectivament.

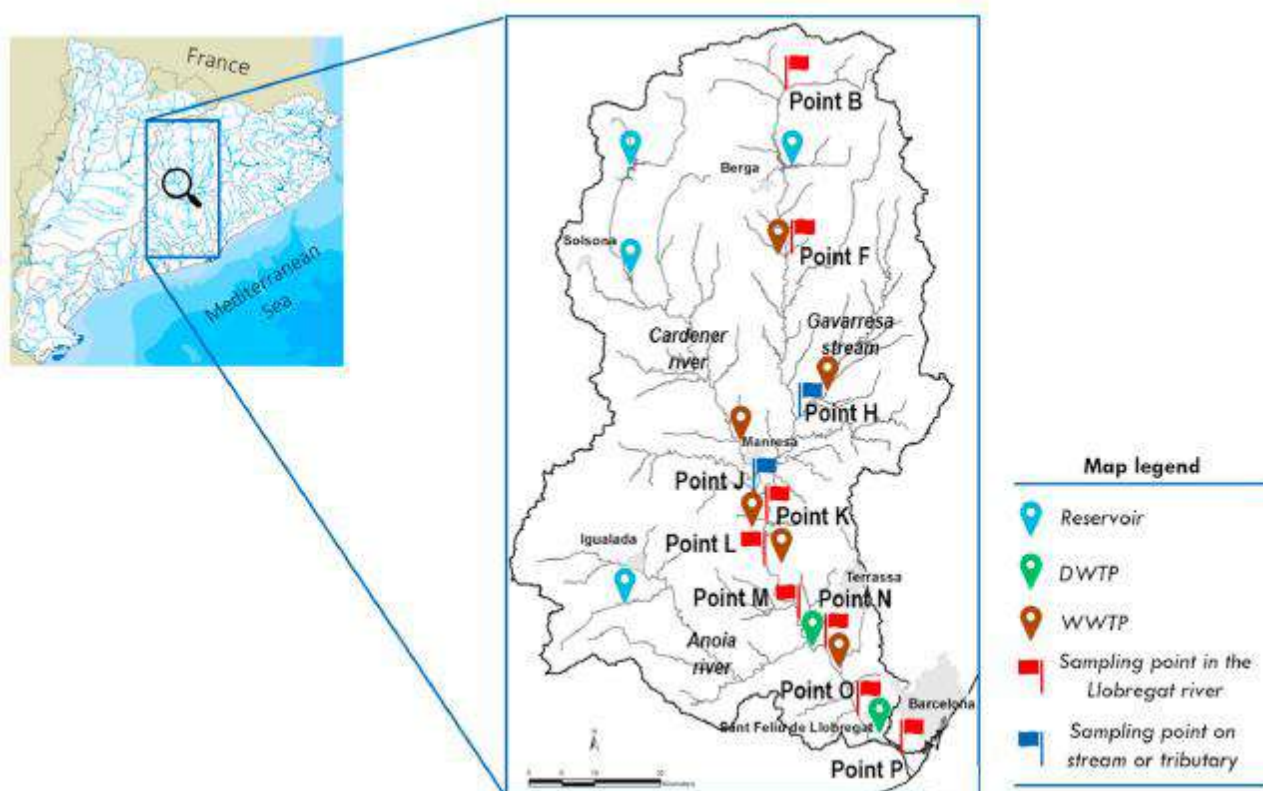
## BLOC 2: CARACTERITZACIÓ DE LA MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA DEL RIU LLOBREGAT

### 3.3. DESCRIPCIÓ DE LA CONCA HIDROGRÀFICA DEL LLOBREGAT I DELS PUNTS DE MOSTRA

El riu Llobregat és un dels principals recursos hídrics per a l'Àrea Metropolitana de Barcelona (AMB), a la qual subministra al voltant del 40% de la demanda total d'aigua (Martín-Alonso, Devesa, et al., 2007). Tres preses (marques cian, veure **Figura 25**) situades a la part alta del riu i diversos afluent més petits contribueixen al cabal principal de la conca del riu Llobregat, entre els que destaquen el riu Cardener, el riu Anoia i la riera Gavarresa. A la part alta i mitjana de la conca del riu Llobregat, la composició mineral de l'aigua es veu fortament afectada per les roques sedimentàries, donant lloc a un nivell de mineralització molt elevat (Marcé, Honey-Rosés, et al., 2012). El fort creixement de la industrialització al llarg de la conca, les limitacions financeres i tecnològiques i, en alguns casos, l'escàs compliment de les lleis públiques, han provocat la contaminació de les aigües del riu Llobregat en varies ocasions al llarg dels anys (Marcé, Honey-Rosés, et al., 2012; Platikanov, Baquero, et al., 2019). Sovint, la qualitat de l'aigua del riu es veu afectada per abocaments accidentals d'aigües residuals, vessaments d'indústries i contaminació derivada de l'agricultura. No obstant, la font principal de contaminació prové essencialment de l'escorrentia urbana i industrial (Sabater, Ginebreda, et al., 2012). A més, la qualitat de l'aigua del riu Llobregat es veu fortament afectada per la indústria minera de potassa (situada a la part mitjana del riu) que pot afectar la salinitat de la conca durant els episodis de pluja (Ginebreda, Barata, et al., 2012). Per agreujar la situació, les condicions climàtiques mediterrànies tampoc són favorables des del punt de vista de la gestió d'EDARs i ETAPs al riu (Martín-Alonso, 2006). Les escasses nevades i els llargs períodes secs provoquen sequeres llargues i severes; les pluges fluixes de primavera/estiu provoquen inundacions també amb un greu impacte en la qualitat de l'aigua (Ginebreda, Barata, et al., 2012) i, per tant, en la DOM present al riu Llobregat.

Les mostres d'aigua estudiades van ser recollides per l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA) durant les respectives campanyes de seguiment (octubre de 2017, octubre de 2018 i maig de 2019) a 10 estacions de mostreig diferents de la xarxa principal del riu

Llobregat. La **Figura 25** mostra la localització dels diferents llocs/punts de mostreig utilitzats (marques blaves i vermelles) juntament amb els embassaments (marques cian) i les principals ETAPs i EDARs (marques verdes i marrons, respectivament) presents a la conca del riu Llobregat.



**Figura 25.** Mapa de la conca del riu Llobregat que mostra la ubicació dels llocs de mostreig (marques blaves i vermelles) juntament amb els embassaments (marques cian) i les principals estacions d'aigua potable (ETAP) i plantes depuradores d'aigües residuals (EDAR) (marques verdes i marrons, respectivament) de la conca fluvial. Figura reproduïda de l'ARTICLE III.

La primera estació de mostreig es troba situada a una distància en línia recta de 8 km aigües avall de la font natural del riu Llobregat (**Punt B**; 42° 14' 10" N, 1° 53' 41" E). El segon punt de mostreig (**Punt F**; 41° 55' 26" N, 1° 53' 8" E), es va col·locar uns 20 km aigües avall després de l'embassament principal de la conca, el pantà de la Baells, que pot emmagatzemar fins a 109 m<sup>3</sup> d'aigua. A continuació, hi ha les dues úniques estacions de mostreig que no estaven situades al sistema principal del riu Llobregat, sinó que es van situar a la confluència de dos dels seus principals afluents, la riera Gavarresa (**Punt H**; 41° 48' 46" N, 1° 57' 16" E), una riera amb petits regadius al seu voltant i que té un cabal de marcat component estacional, i el riu Cardener (**Punt J**; 41° 40' 59" N, 1° 50' 52" E), respectivament. Aquest darrer punt es troba 4 km després de l'EDAR de Manresa, la principal ciutat del Bages, a la comarca central de

Catalunya. Més avall es van situar les altres estacions de mostreig del curs mitjà del riu: el **Punt K** (41° 39' 21" N, 1° 51' 38" E), el **Punt L** (41° 33' 45" N, 1° 52' 50" E) i el **Punt M** (41° 30' 12" N, 1° 55' 13" E). El Punt M està situat a 1 km de distància en línia recta aigües avall de l'EDAR d'Abrera, una de les viles amb més de 10.000 habitants que formen part de la comarca del Baix Llobregat. Finalment, al curs final del riu és on es van situar les tres últimes estacions: el **Punt N** (41° 28' 28" N, 1° 57' 59" E), que es troba 3 km aigües avall del principal afluent del riu, el riu Anoia; el **Punt O** (41° 21' 12" N, 2° 02' 51" E), que està situat en una zona molt industrial i densament poblada a pocs metres aigües amunt de l'EDAR de Sant Joan d'Espí; i finalment el **Punt P** (41° 19' 44" N, 2° 06' 47" E), situat 5 km aigües amunt de l'estuari de la desembocadura, molt a prop de l'aeroport de Barcelona.

### 3.4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A continuació es descriu la metodologia experimental seguida per a l'anàlisi de la CDOM de les mostres d'aigua recol·lectades per mitjà de mesures espectroscòpiques d'absorbància molecular i de fluorescència multidimensional (mesures d'excitació-emissió).

#### 3.4.1. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES D'AIGUA

Totes les mostres d'aigua de la mateixa campanya de mostreig es van recollir el mateix dia i es van emmagatzemar en pots (envasos d'emmagatzematge) de polietilè d'alta densitat (en anglès, *high density polyethylene*, HDPE) a baixa temperatura (3 – 5 °C) fins a la seva anàlisi. Com que les mostres de DOM es poden descompondre fàcilment amb el temps, només van passar uns quants dies (menys de 2 setmanes en tots els casos) entre el procediment de mostreig i l'anàlisi espectroscòpica corresponent. Per verificar si les mostres de DOM s'havien degradat/descompost durant l'emmagatzematge, es va analitzar una mostra control d'aigua al cap d'uns mesos (5 – 6 mesos), obtenint intensitats d'absorbància i fluorescència similars a les mesurades anteriorment. Totes les mostres d'aigua, prèviament a ser analitzades, es van filtrar mitjançant un filtre de politetrafluoroetilè (PTFE) de 0,5 µm i es van estabilitzar a temperatura ambient (20 °C). També es va utilitzar aigua Milli-Q ultrapura (amb menys de 8 ppb de carboni orgànic total (en anglès, *Total Organic Carbon*, TOC)) com a blancs de mostra.

### 3.4.2. INSTRUMENTACIÓ I SOFTWARE

D'una banda, els espectres UV-Vis es van registrar mitjançant un espectrofotòmetre d'absorció molecular UV-Visible HP-Agilent 8453 equipat amb un detector de matriu de díodes (DAD). De l'altra, els espectres de fluorescència multidimensional (matriu d'excitació-emissió, EEM) es van enregistrar mitjançant un espectrofotòmetre de fluorescència Cary Eclipse, també de la casa comercial Agilent Technologies, amb tubs fotomultiplicadors d'alta sensibilitat (PMT) com a detector. Els programaris d'ambdós equips, UV Spectrophotometer ChemStation B.02.01 i Cary WinFLR v1.2, respectivament, es van utilitzar per al control, l'adquisició i el preprocessament inicial de les dades. Totes les dades generades van ser exportar directament a fitxers .csv i, posteriorment, importades a l'entorn de treball de MATLAB®. El mètode MCR-ALS (versió GUI 2.0) (Jaumot, de Juan, et al., 2015) es va implementar a l'entorn de càlcul i visualització de MATLAB® (The MathWorks Inc., 2020b). Totes les anàlisis quimiomètriques es van realitzar en aquest entorn informàtic. També es va aplicar un algoritme de correcció de la dispersió de la llum (en anglès, *scattering correction*) (Zepp, Sheldon, et al., 2004) a totes les mostres de fluorescència enregistrades.

Una descripció més minuciosa de com s'han realitzat les mesures experimentals de les mostres d'aigua es troba detallada a l'**ARTICLE III**. "*Chemometrics characterization of The Llobregat river dissolved organic matter*".



---

# CAPÍTOL 4

## ANÀLISI DE LES DADES

---

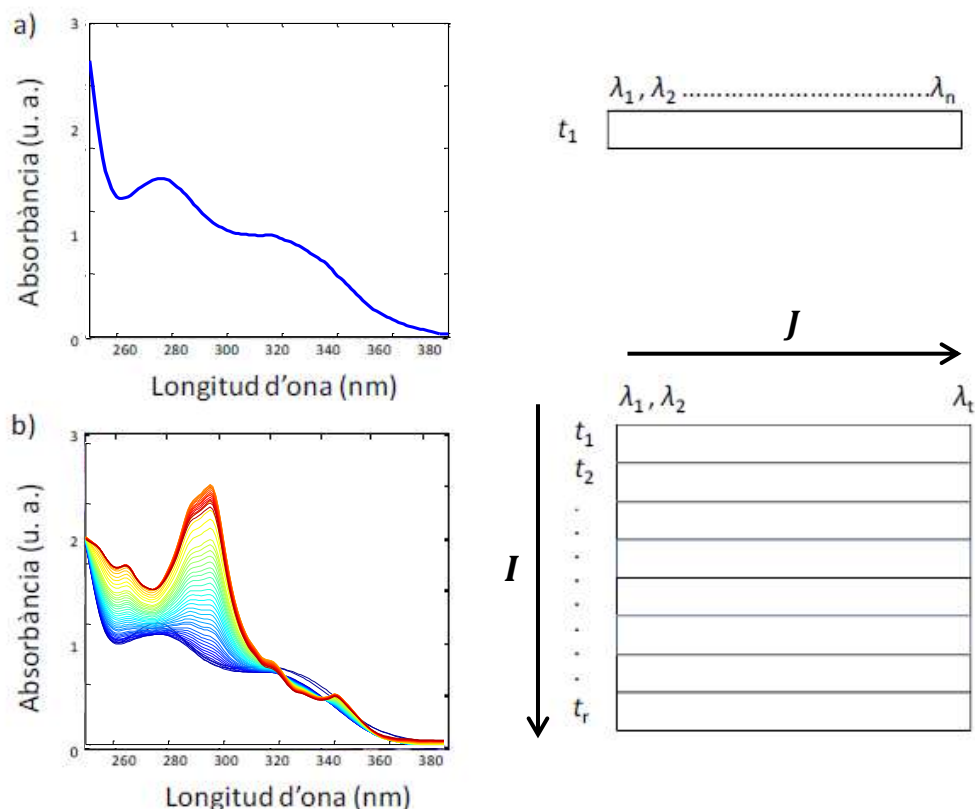


El conjunt de dades obtingudes en els diferents estudis realitzats han estat analitzades amb mètodes quimiomètrics; més concretament, amb el mètode de Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (en anglès, *Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares*, MCR-ALS) (Tauler, 1995). Per tant, les dades recollides en els processos de fotodegradació dels dos fàrmacs estudiats, tamoxifè i sulfametoxazol, així com aquelles mesurades en la caracterització de la Matèria Orgànica Dissolta (DOM) de l'aigua del riu Llobregat, han estat processades mitjançant aquest mètode quimiomètric. L'objectiu de l'aplicació d'aquest mètode analític és extraure la màxima informació rellevant possible que es troba en les dades analítiques recollides i obtenir així una millor interpretació química dels processos de degradació i de les fraccions de la DOM presents al riu, respectivament.

#### 4.1. ESTRUCTURA DE LES DADES EN ELS PROCESSOS QUÍMICS ESTUDIATS

Les tècniques espectroscòpiques i cromatogràfiques emprades en aquesta tesi ens proporcionen respostes multivariants. Això vol dir que els espectres i cromatogrames que s'obtenen d'aquestes tècniques, respectivament, estan formats per un conjunt de valors numèrics que contenen la informació química sobre la mostra estudiada. Així doncs, en el cas d'un espectre, trobem un conjunt d'absorbàncies o d'intensitats (abundàncies) a diferents longituds d'ona o a diferents valors de relacions massa/càrrega ( $m/z$ ), respectivament. D'altra banda, en el cas d'un cromatograma, trobem l'evolució d'una absorbància o d'un valor  $m/z$  concret a diferents temps de retenció. La informació d'un sol espectre o cromatograma es pot representar en forma de vector (dades d'ordre 1) (veure **Figura 26a**), en canvi, la informació proporcionada per un conjunt d'espectres recollits durant un procés o la d'un conjunt de cromatogrames en què el detector recull un espectre complet a cada temps de retenció, només es pot representar en forma de taula o matriu de dades (**D**) (dades d'ordre 2) (veure **Figura 26b**). D'altra banda, les mesures de fluorescència multidimensional impliquen la recollida de múltiples espectres d'emissió en un rang de longituds d'ona d'excitació diferents. Així doncs, aquestes mesures espectrals donen com a resultat dades d'ordre 2 estructurades en les anomenades matrius d'excitació-emissió (en anglès, *Excitation-Emission Matrix*, EEM).



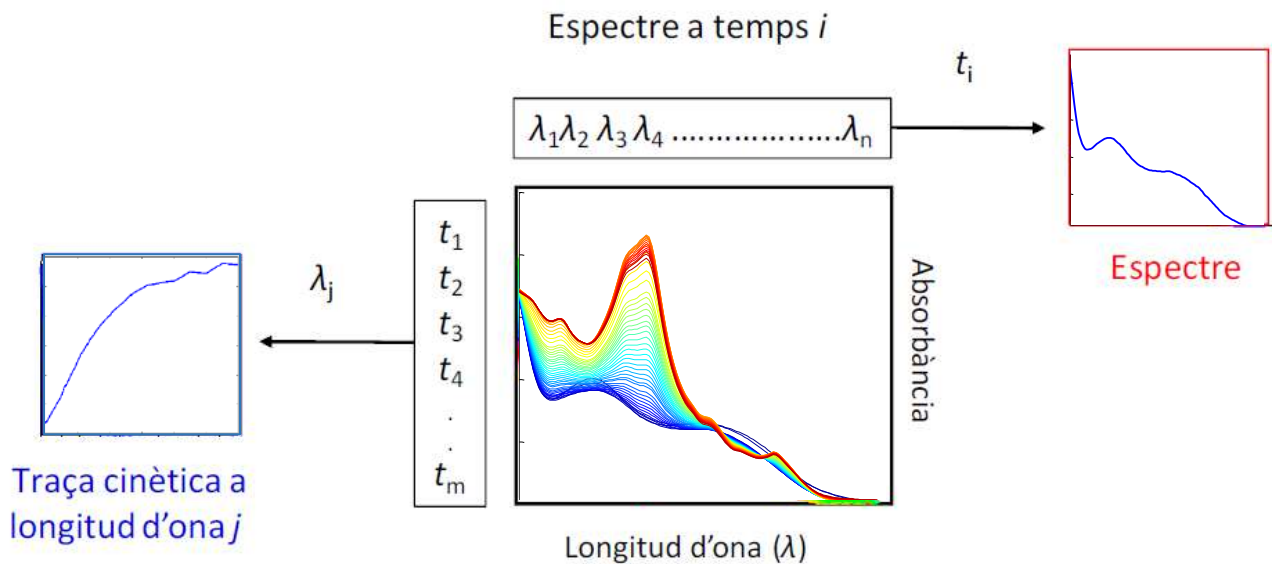


**Figura 26.** (a) Espectre i la seva representació en forma de vector. (b) Conjunt d'espectres recollits durant un procés i la seva representació en forma de matriu de dades senzilla (**D**). Figura adaptada de (Mas García, 2012).

➤ *Matriu de dades senzilla (D)*

Com s'ha mencionat anteriorment, anomenem matriu **D** a la taula de dades que descriu individualment el conjunt d'observacions obtingudes en cadascun dels experiments de laboratori realitzats en aquesta tesi. En aquest cas, i degut a les tècniques analítiques emprades, aquestes observacions s'obtidrien mitjançant una sèrie d'espectres o d'un seguit de cromatogrames. Aquesta matriu **D** té dimensions  $I \times J$ , on generalment  $I$  són els diferents objectes o observacions, que trobem disposats a les files, i  $J$  fa referència a les diferents variables analitzades, situades a les columnes. Si traslladem aquesta estructura de dades a un dels experiments realitzats per a que sigui més fàcil d'entendre, com per exemple, al seguiment cinètic de la fotodegradació mitjançant l'espectrofotometria UV-Visible, en la matriu formada pel conjunt d'espectres UV recollits a diferents temps de procés (com la que es mostra en la **Figura 26b**),  $I$  correspon al nombre de temps de procés i  $J$  al nombre de longituds d'ona presents a cada espectre mesurat. Per tant, cada fila d'aquesta matriu

conté l'espectre UV-Vis enregistrat a un determinat temps de procés  $i$  i cada columna una traça cinètica, és a dir, l'evolució de l'absorbància en funció del temps de procés a una determinada longitud d'ona  $j$  (veure **Figura 27**). En aquest cas, la matriu **D** conté tota la informació relativa al procés en estudi.



**Figura 27.** Representació gràfica de l'ordenació de les dades experimentals en el cas del seguiment cinètic per espectroscòpia d'absorció molecular d'un procés de degradació. Les files representen els espectres UV-Vis enregistrats durant el procés i les columnes representen la variació del senyal en funció del temps a les diferents longituds d'ona mesurades. Figura adaptada de (Mas García, 2012).

Tanmateix, l'estructura de dades anteriorment descrita es correspon amb la casuística d'arranjament de matrius més senzilla, on només disposem d'una única taula de dades. Moltes vegades, però, el seguiment d'un procés químic proporciona diverses matrius de dades. En el seguiment cromatogràfic d'un procés de fotodegradació, per exemple, s'obtenen tantes matrius de dades (amb els seus corresponents cromatogrames i espectres acoblats) com temps de procés estudiats, és a dir, com alíquotes de solució injectades i analitzades. La recopilació de totes aquestes matrius de dades, que ens proporcionen informació global del procés químic estudiat, es pot ordenar de diferents maneres, donant lloc a estructures multi-experiment o multi-tècnica (*multiset structures*) en què les dades s'ordenen i encadenen en matrius augmentades (**D<sub>aug</sub>**). Una matriu augmentada **D<sub>aug</sub>** està formada per diverses matrius més senzilles i pot prendre estructures diferents segons la direcció (o direccions) en que s'hagi realitzat l'augmentació.

### ➤ *Matriu augmentada en la direcció de les files ( $D_{raug}$ )*

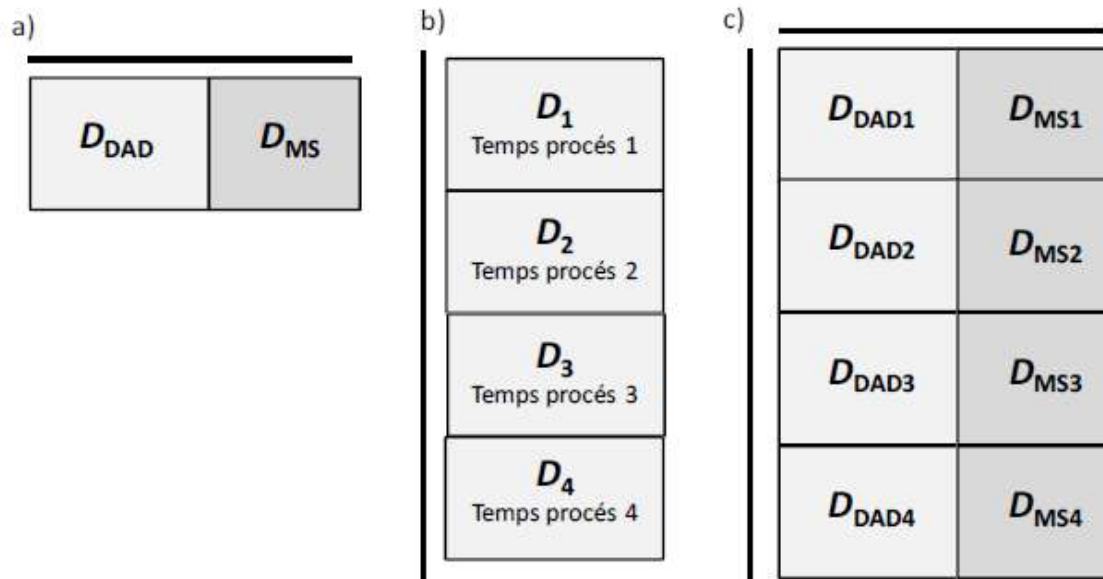
En aquesta opció d'arranjament, les diferents matrius individuals tenen el mateix nombre de files, amb un mateix significat químic totes elles (per exemple, els mateixos temps d'elució), mentre que poden tenir diferent nombre de columnes i, a més, de significació diversa. Un exemple d'aquest tipus d'augmentació seria la d'un cromatograma amb detecció simultània DAD i MS, on cadascun dels sistemes de detecció produeix una matriu de dades (HPLC-DAD o HPLC-MS), i les columnes de cadascuna d'elles tenen significats diferents (longituds d'ona i valors de relació massa/càrrega, respectivament). Aquestes matrius, doncs, es poden acoblar aprofitant la direcció comuna de les files, col·locant una matriu al costat de l'altra (veure **Figura 28a**).

### ➤ *Matriu augmentada en la direcció de les columnes ( $D_{caug}$ )*

Per a utilitzar aquesta disposició de matrius, tots els experiments han d'haver estat analitzats, per exemple, amb la mateixa tècnica instrumental espectroscòpica. Per tant, és necessari que les diferents matrius acoblades tinguin el mateix nombre de columnes i que aquestes tinguin un mateix significat químic. En canvi, el nombre de files i la seva significació química poden diferir entre les matrius acoblades. Seguint amb els exemples cromatogràfics, aquesta disposició de matrius és l'escollida en el cas de voler tractar les dades de l'experiment de seguiment cromatogràfic d'un procés, en què tots els cromatogrames obtinguts amb un mateix sistema de detecció a diferents temps de procés s'analitzen conjuntament; tot i que l'interval de temps d'elució i el patró d'elució dels analits en el conjunt de cromatogrames sigui diferent. En aquest cas, les matrius s'acoblen aprofitant la direcció comuna de les columnes, posant una matriu sota de l'altra (veure **Figura 28b**).

➤ *Matriu augmentada en la direcció de les files i les columnes ( $D_{rcaug}$ )*

En aquest cas, les matrius s'acoblen entre elles aprofitant la direcció comuna de les files i la direcció comuna de les columnes entre els experiments. Un exemple d'aquest tipus de disposició correspondria a la que s'obté en voler tractar simultàniament el conjunt de cromatogrames de l'experiment cromatogràfic de seguiment d'un procés emprant ambdós sistemes de detecció (DAD i MS) alhora (veure **Figura 28c**).



**Figura 28.** Estructures de matrius augmentades en els processos químics. (a) Matriu augmentada en la direcció de les files, (b) Matriu augmentada en la direcció de les columnes i (c) Matriu augmentada en la direcció de les files i de les columnes. Les línies horitzontals i verticals representen la direcció (o direccions) de l'augmentació. Figura reproduïda de (Mas Garcia, 2012).

Al Capítol 5 de resultats, i per tal d'abreujar aquesta secció, es descriuen amb més detall l'estructura de les matrius augmentades arranades corresponents als diferents tipus de dades obtingudes en els estudis realitzats sobre, respectivament, la fotodegradació de fàrmacs i la caracterització de la DOM del riu Llobregat.

### 4.2. TRACTAMENT PRELIMINAR DE LES DADES

Una vegada coneixem l'estructura de les dades i abans de procedir a la seva anàlisi quimiomètrica, és convenient fer certs tractaments previs a les dades en brut per tal d'obtenir senyals de millor qualitat i d'una grandària adequada per a la seva manipulació. El nivell de soroll relativament alt (majoritàriament en la HPLC-MS) i les irregularitats en la forma de la línia de base en cromatografia i, de vegades, també en la direcció espectral, són problemes típics que deterioren els senyals originals de les dades experimentals. A més de millorar la qualitat de la informació continguda en la mesura, el tractament previ de les dades també resulta necessari, sovint, per a reduir-ne la seva mida i facilitar-ne la manipulació i, d'aquesta manera, minvar el seu temps d'anàlisi. A continuació, es descriuen els tractaments previs que s'han realitzat a les dades obtingudes en la present memòria.

#### 4.2.1. COMPRESSIÓ I SINCRONITZACIÓ DE LES DADES

Per tal de reduir la mida de les matrius procedents de les tècniques cromatogràfiques, se selecciona l'interval espectral i de relacions massa/càrrega ( $m/z$ ) d'interès. En el cas dels experiments amb detecció DAD, s'eliminen aquelles longituds d'ona on absorbeixen principalment els solvents i les solucions reguladores (generalment 190-205 nm) i les longituds d'ona més altes (a partir de 400 nm) on els compostos d'interès ja no absorbeixen. El mateix procediment s'aplica a les matrius de dades procedents del seguiment cinètic de la fotodegradació mitjançant l'espectroscòpia d'absorció molecular. D'aquesta manera, es disposa del mateix rang de longitud d'ones en els dos conjunts de dades i, si escau, es pot realitzar la seva anàlisi simultània, com es veurà posteriorment.

En el cas de les dades de HPLC-MS, les dades també s'escapcen abans de procedir-ne a l'anàlisi, seleccionant l'interval de relacions massa/càrrega ( $m/z$ ) d'interès. En tractar-se, en aquest cas, de dades de masses de baixa resolució (LR-MS) no va ser necessària cap compressió addicional. Generalment, sinó, en dades de masses d'alta resolució, com que el nombre de canals dels espectres de masses és força gran i molts d'ells no aporten informació, les dades es comprimeixen en la direcció espectral abans de procedir-ne a l'anàlisi. Un dels procediments més senzills i sovint utilitzat per a aquest propòsit és el *binning*, que consisteix en sumar lectures d'un interval de canals espectrals veïns per a formar una sola mesura (compressió espectral).

Existeixen, però, altres mètodes que, a més de comprimir la matriu, filtren part del possible soroll (sense informació química) present a les dades experimentals, com són les transformades d'ones (de l'anglès *wavelet transform*) (Walczak, 2000) o, més recentment, les regions d'interès (*regions of interest*, ROIs) (Gorrochategui, Jaumot, et al., 2019).

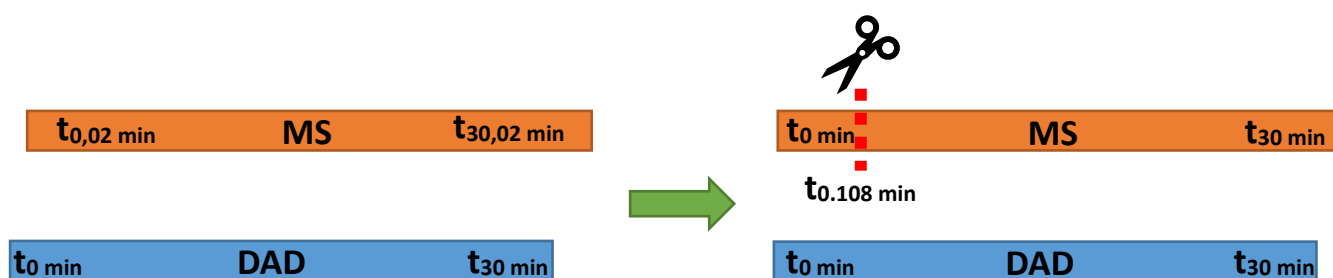
De la mateixa manera, per a totes les injeccions cromatogràfiques, ja sigui amb detecció DAD o MS, es van processar i analitzar, sempre que va ser possible, la mateixa finestra de temps d'elució. Per tant, es van descartar les zones on no es va detectar l'elució de cap espècie química d'interès, i només s'observava la presència del front d'elució i senyals de molt baixa intensitat principalment associades al dissolvent emprat (MeOH) i al fons instrumental (*background*) i el soroll (*noise*). En aquest cas, les contribucions del soroll es van eliminar en part aplicant el filtre de suavització de dades de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964). Tanmateix, cal tenir present que en cas de coeluir en una mateixa zona les espècies d'interès i les contribucions del solvent i el *background*, l'aplicació dels tractaments proposats per tal d'eliminar aquestes contribucions del senyal enregistrat es torna més laboriosa. Addicionalment, els valors d'absorbància d'intensitat negativa es van eliminar del conjunt de dades del detector DAD. Com a resultat, les dades cromatogràfiques finals tenen una millor qualitat de relació senyal-soroll.

D'altra banda, a causa de la diferent freqüència dels dos detectors cromatogràfics (DAD i MS) en l'adquisició d'espectres, també es va necessitar un altre pretractament de dades per trobar la correspondència en el temps dels perfils d'elució en ambdós detectors, permetent, d'aquesta manera, la seva posterior anàlisi quimiomètrica simultània (fusió de dades). Com que la velocitat d'adquisició d'espectres UV del sistema HPLC-DAD (20 punts  $s^{-1}$ ) era més ràpida que l'adquisició d'espectres de masses del sistema de detecció de l'espectròmetre (4,76 punts  $s^{-1}$ ), es va adquirir un nombre més gran d'espectres UV que MS per unitat de temps. Per tant, les dades cromatogràfiques originals procedents del sistema HPLC-DAD eren, aproximadament, unes 10 vegades més grans en la direcció temporal (temps d'elució, files) que les dades originades en l'espectròmetre de masses. Per fer coincidir els dos sistemes de detecció, es va utilitzar una estratègia d'interpolació lineal (i suavització) per sincronitzar els senyals del detector DAD i el de MS a la mateixa freqüència temporal. Per a aquest propòsit, es va utilitzar la funció d'interpolació de dades *Interp1*

que forma part del llenguatge computacional propi del programari MATLAB® (MathWorks, 2020).

A més, com que els dos sistemes de detecció es troben en tàndem, és a dir, un darrere l'altre, es produeix també un breu retard en l'enregistrament del senyal màxim en els cromatogrames a causa del tub de transferència entre ambdós detectors: en aquest cas, el DAD (situat primer) i, al darrere, el MS. Es va estimar que aquest retard de temps era, per al cabal de fase mòbil aplicat, d'aproximadament 0,109 min (uns 6,5 s). Aquest valor, per tant, no sempre es fixe i pot variar en funció del cabal de fase mòbil emprat i de la llargària del tub de connexió entre els dos detectors.

Aquest fet, doncs, requereix el desplaçament de l'eix de temps de les dades enregistrades del MS a l'escala de temps adquirida anteriorment per part del detector DAD (veure **Figura 29**). Això, s'aconsegueix tallant la part inicial de tots els cromatogrames de MS en la direcció del temps d'elució (files) aproximadament uns  $4,76 \text{ punts s}^{-1} \times 6,5 \text{ s} = 31$  temps d'elució. Per tant, això vol dir que al començament de l'anàlisi cromatogràfica, en cada injecció d'alíquota, s'analitza material eluït durant 31 temps d'elució que només es percebent pel detector de MS i no pas pel detector DAD. Aquest material, es correspon amb fase mòbil que queda retinguda el tub de transferència entre ambdós detectors. Tanmateix, com s'ha mencionat anteriorment, durant aquesta finestra de temps inicial no s'observa l'elució de cap dels analits de la mostra, amb la qual cosa aquest interval d'elució pot ser descartat sense problemes.



**Figura 29.** Visualització esquemàtica de la correcció de sincronització de les dades cromatogràfiques (LC-DAD-MS).

#### 4.2.2. CORRECCIONS DE LA LÍNIA BASE

En el cas de les valoracions àcid-base i del conjunt de dades del seguiment cinètic del procés de fotodegradació, ambdós experiments controlats pel mateix espectrofotòmetre UV-Visible, es va aplicar una correcció de la línia de base sobre la direcció espectral (és a dir, les columnes), seleccionant posteriorment els canals de longitud d'ona desitjats. Aquesta correcció de la línia de base es va realitzar de manera individual restant el valor mínim de l'espectre mesurat a tots els altres valors de l'espectre. D'aquesta manera, tots els valors dels espectres són positius i el valor mínim de cadascun d'ells és igual a zero.

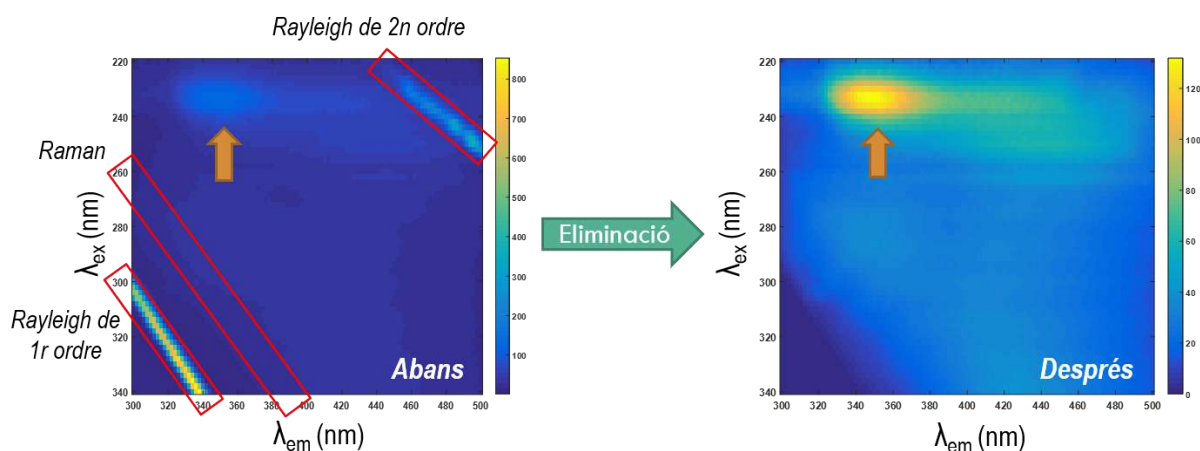
En el cas de les dades cromatogràfiques, es va utilitzar l'algoritme de mínim quadrats asimètrics (de l'anglès *Asymmetric Least-Squares*, AsLS) (Eilers & Boelens, 2005) per a corregir els possibles canvis en la línia de base dels cromatogrames. Aquest mètode és especialment adequat per a corregir les línies de base d'aquells conjunts de dades en què el senyal significatiu (pics cromatogràfics) és molt més estret que la contribució ampla de la línia de base, com succeeix normalment en les dades cromatogràfiques (Eilers, 2004).

#### 4.2.3. CORRECCIÓ DEL SCATTERING DE FLUORESCÈNCIA

La dispersió de la llum, més coneguda en anglès com *scattering*, es va considerar i corregir abans de l'anàlisi quimiomètrica de les dades a causa dels seus efectes no lineals indesitjables. Dos tipus de dispersió de la llum poden interferir potencialment amb les mesures de fluorescència: la dispersió Rayleigh (de 1r i 2n ordre) i la Raman. Per tal d'eliminar aquestes interferències de dispersió, es va utilitzar el mètode i l'algoritme descrit a (Zepp, Sheldon, et al., 2004). Aquest algorisme elimina els pics de dispersió directament de la matriu de dades de fluorescència d'excitació-emissió (EEM) i omple les regions eliminades mitjançant una interpolació polinomial dels punts de dades circumdants. Com a resultat, les contribucions de dispersió es van eliminar pràcticament en la seva totalitat i es van recuperar les matrius de dades EEM amb una bona qualitat del senyal mesurat, com es pot veure a la **Figura 30**. Com que no es va observar una alta densitat òptica ni terbolesa a les mostres d'aigua recollides del riu Llobregat, que van ser prèviament filtrades tal com s'ha esmentat en la secció



3.4.1, no va ser necessària en aquest cas una correcció addicional de l'efecte de filtre intern (IFE) (Kumar Panigrahi & Kumar Mishra, 2019).



**Figura 30.** Exemple de correcció de la dispersió de llum de la fluorescència. Els pics de la dispersió de Rayleigh i Raman es van eliminar mitjançant el mètode descrit a (Zepp, Sheldon, et al., 2004) per millorar la qualitat de les dades espectrals EEM mesurades. Figura adaptada del Material Suplementari de l'ARTICLE III.

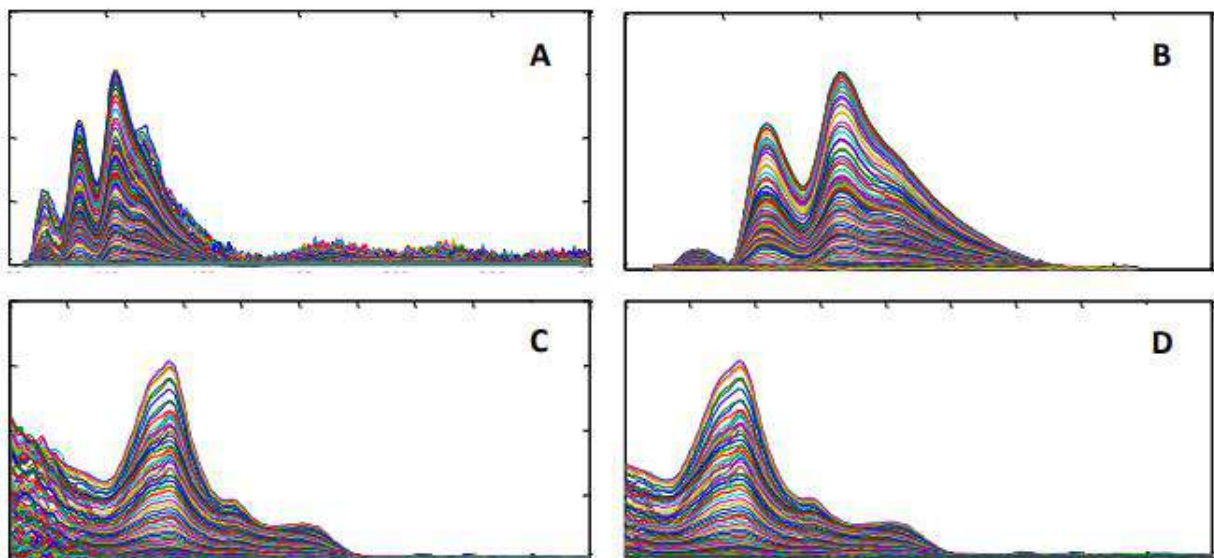
#### 4.2.4. ESCALAT DE LES DADES

En molts casos, l'objectiu de l'escalat de les dades és ajustar la magnitud de cada variable de manera que la seva contribució a la variància total i el seu nivell de soroll sigui similar per totes les variables. En els casos en què el soroll és aproximadament proporcional a l'arrel quadrada del senyal en cada variable, es pot utilitzar l'escalat de Poisson (Keenan & Kotula, 2004; Lee, Gilmore, et al., 2008). Aquest mètode, escala cada variable per l'arrel quadrada de la mitjana de la variable. Si la font de soroll predominant és veritablement proporcional a l'arrel quadrada del senyal, aquest mecanisme corregeix de manera efectiva totes les variables al mateix nivell de soroll. En aquesta tesi, el procediment d'escalat de Poisson es va aplicar al conjunt de dades procedents de l'espectròmetre de masses mitjançant la funció *poissonscale* de la PLS\_Toolbox (Eigenvector Research Inc., 2014), l'eina que va ser emprada també per importar les dades cromatogràfiques al programari MATLAB®.

Finalment, per poder analitzar simultàniament el conjunt de matrius de dades obtingudes per les diferents tècniques analítiques emprades en aquesta tesi (espectrofotometria UV-Visible, LC-DAD i LC-MS), va ser necessari un procediment de *normalització per blocs* de dades. Com que les intensitats dels senyals d'absorbància i d'abundància de masses dels diferents detectors difereixen

considerablement entre elles (2 ordres de magnitud), les matrius de dades de la mateixa plataforma analítica es van escalar (dividir) pel primer valor singular (SVD) (Golub & Van Loan, 2013) del conjunt de dades considerat. Així doncs, es va escalar simultàniament tot el bloc de dades format pel conjunt de matrius obtingudes a partir de la valoració àcid-base i del seguiment cinètic del procés de fotodegradació, ambdós experiments controlats pel mateix espectrofotòmetre UV-Visible. D'altra banda, es van escalar de manera combinada el bloc de dades format pel conjunt d'injeccions cromatogràfiques analitzades per LC-DAD per separat, i el bloc de dades format pel conjunt de dades proporcionat pel detector MS acoblat.

Com a resultat de tots aquests tractaments preliminars, s'obtenen matrius de dades amb una millor qualitat de senyal. La **Figura 31** mostra un exemple d'aquest preprocessat de dades per a l'elució cromatogràfica d'un determinat temps de reacció del procés de fotodegradació del fàrmac tamoxifè.



**Figura 31.** Exemple de preprocessament d'una matriu de dades en la direcció cromatogràfica (temps d'elució) (**A** i **B**) i l'espectral (**C** i **D**) abans i després de la seva aplicació, respectivament.

### 4.3. MÈTODES QUIMIOMÈTRICS D'ANÀLISI MULTIVARIANT

Depenent de l'estructura que presenten les dades analitzades, es poden aplicar diferents tipus de models i mètodes quimiomètrics. Els processos cinètics monitoritzats espectroscòpicament, com poden ser els processos de degradació, s'han analitzat tradicionalment mitjançant enfocaments de modelització rígida (en anglès, *hard-modelling*), on s'ajusten els paràmetres d'un model per a un procés fisicoquímic determinat; en aquest cas, un model cinètic, com s'ha vist anteriorment (De Juan, Maeder, et al., 2000). Els paràmetres del model, doncs, inclouen les constants de velocitat ( $k$ ) i l'absortivitat molar ( $\epsilon$ ) de les espècies reactives a totes les longituds d'ona mesurades. Aquest enfocament clàssic té un bon rendiment si el conjunt de models cinètics proposats és l'adequat i si tota la variació relacionada amb la resposta espectromètrica mesurada està vinculada als components implicats en el procés. En cas contrari, però, el model proposat no s'ajusta a les dades químiques a descriure i l'especiació i els paràmetres extrets del model són erronis. En canvi, els enfocaments de modelització flexibles (en anglès, *soft-modelling*), com ara la resolució multivariant de corbes (*Multivariate Curve Resolution*, MCR), pretenen descriure els processos sense utilitzar explícitament el model químic subjacent vinculat a ells (De Juan, Jaumot, et al., 2014). Aquesta metodologia evita els errors provocats per l'ús d'un model cinètic incorrecte i permet la presència de components químics desconeguts, responsables de part de la resposta experimental mesurada, però que no participen directament en el procés estudiat.

Així, per a dades organitzades en dues direccions (*2-way data*), com per exemple les taules de dades obtingudes com a resposta instrumental de les tècniques espectroscòpiques utilitzades en aquesta tesi, es poden aplicar mètodes basats en models de descomposició bilineal de dades (estratègia emprada també en el mètode MCR) que es poden descriure mitjançant l'Equació (5).

$$\mathbf{d}_{i,j} = \sum_{nc=1}^{NC} \mathbf{c}_{i,nc} \mathbf{s}_{nc,j} + \mathbf{e}_{i,j} \quad (5)$$

En aquesta equació,  $\mathbf{d}_{i,j}$  fa referència al valor experimental mesurat per la mostra  $i$  del paràmetre o variable  $j$ . En aquesta descomposició bilineal,  $\mathbf{c}_{i,nc}$  i  $\mathbf{s}_{nc,j}$  són els factors de la descomposició (anomenats generalment *scores* i *loadings*,

respectivament) corresponents a la mostra  $i$ , variable  $j$ , pel component  $nc$ . El nombre total de components de la descomposició descrits en aquest cas és  $NC$  i  $\mathbf{e}_{i,j}$  és la contribució no explicada després de considerar aquests  $NC$  components, per a la mostra  $i$  del paràmetre o variable  $j$ .

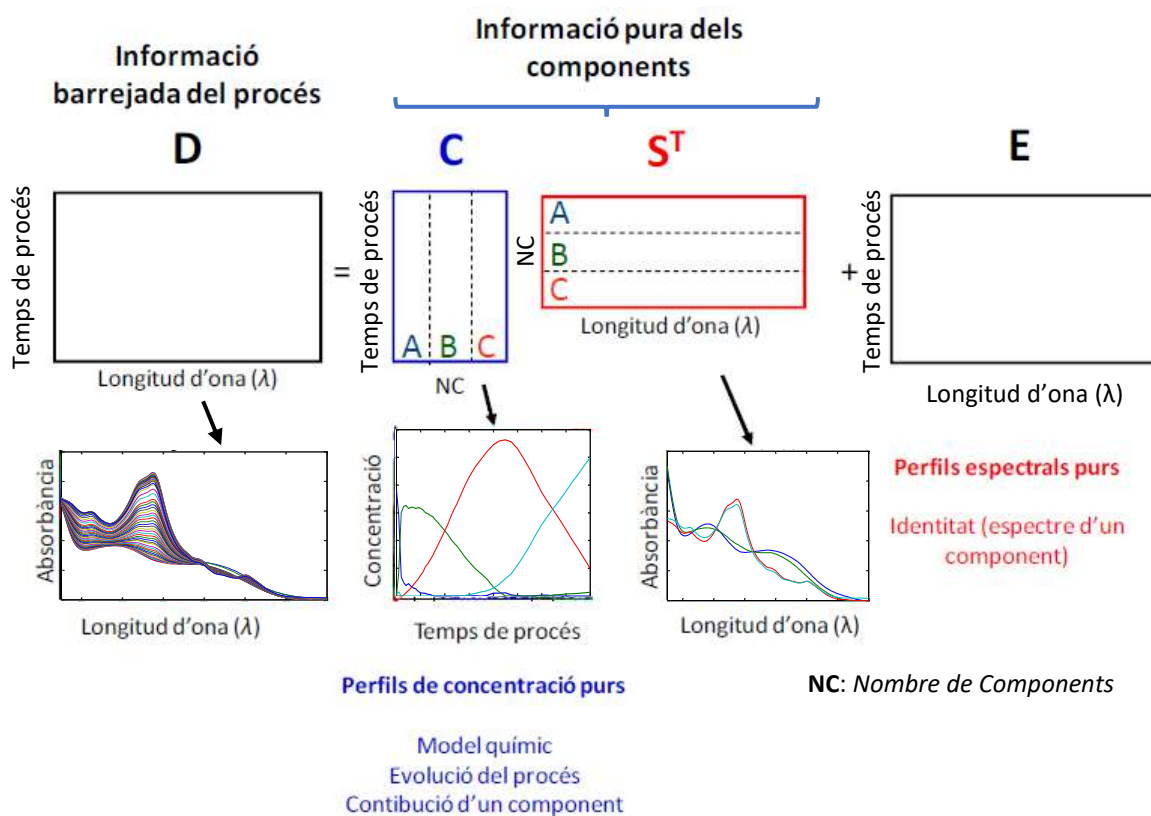
En forma matricial, aquests mètodes segueixen un model de tipus bilineal comparable a la generalització matricial (és a dir, per a múltiples mostres i varies longituds d'ona) de la llei de Beer-Lambert emprada en espectrofotometria (De Juan, Jaumot, et al., 2014):

$$\mathbf{D}_{(I \times J)} = \mathbf{C}_{(I \times NC)} \mathbf{S}_{(NC \times J)}^T + \mathbf{E}_{(I \times J)} \quad (6)$$

On  $\mathbf{D}_{(I \times J)}$  és la taula o matriu de dades experimentals que conté totes les mesures realitzades per les  $i = 1, \dots, I$  mostres (files de la matriu  $\mathbf{D}$ ) en les  $j = 1, \dots, J$  variables analitzades (columnes de la matriu  $\mathbf{D}$ ); és a dir, la matriu que conté els espectres del procés estudiat. En aquest cas, com a resultat de la descomposició bilineal d'aquesta matriu  $\mathbf{D}$ , s'obtenen dues matrius factorials: la matriu  $\mathbf{C}_{(I \times NC)}$ , que conté els perfils de concentració (en les  $I$  mostres mesurades) de les diferents espècies ( $nc = 1, \dots, NC$  components) que participen en el procés, i la matriu  $\mathbf{S}_{(NC \times J)}^T$ , que és la matriu d'espectres purs (amb  $J$  variables analitzades) associats a cadascun dels  $NC$  components presents en el procés estudiat. Finalment, hi ha la matriu  $\mathbf{E}_{(I \times J)}$ , de la mateixa mida de  $\mathbf{D}$ , que rep el nom de matriu de residuals. Aquesta matriu inclou la variació no explicada pel model bilineal expressat en l'Equació (6),  $\mathbf{C}\mathbf{S}^T$ . En cas que el sistema estigui ben descrit per aquest model bilineal, la matriu  $\mathbf{E}$  ha d'ésser d'una magnitud similar a l'error experimental associat a les condicions particulars de mesura de la tècnica instrumental emprada. Alguns dels mètodes que utilitzen aquest model bilineal de descomposició d'una matriu de dades són el mètode d'Anàlisi de Components Principals (PCA) (Jolliffe, 2002) i el mètode de Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (MCR-ALS) (Tauler, 1995).

La representació gràfica de l'Equació (6) es mostra a la **Figura 32**, prenent com a exemple el seguiment cinètic de la fotodegradació per absorció molecular. La matriu  $\mathbf{D}$ , en aquest cas, conté la informació del procés cinètic (un conjunt d'espectres enregistrats a diferents temps de procés) i es pot descriure mitjançant les

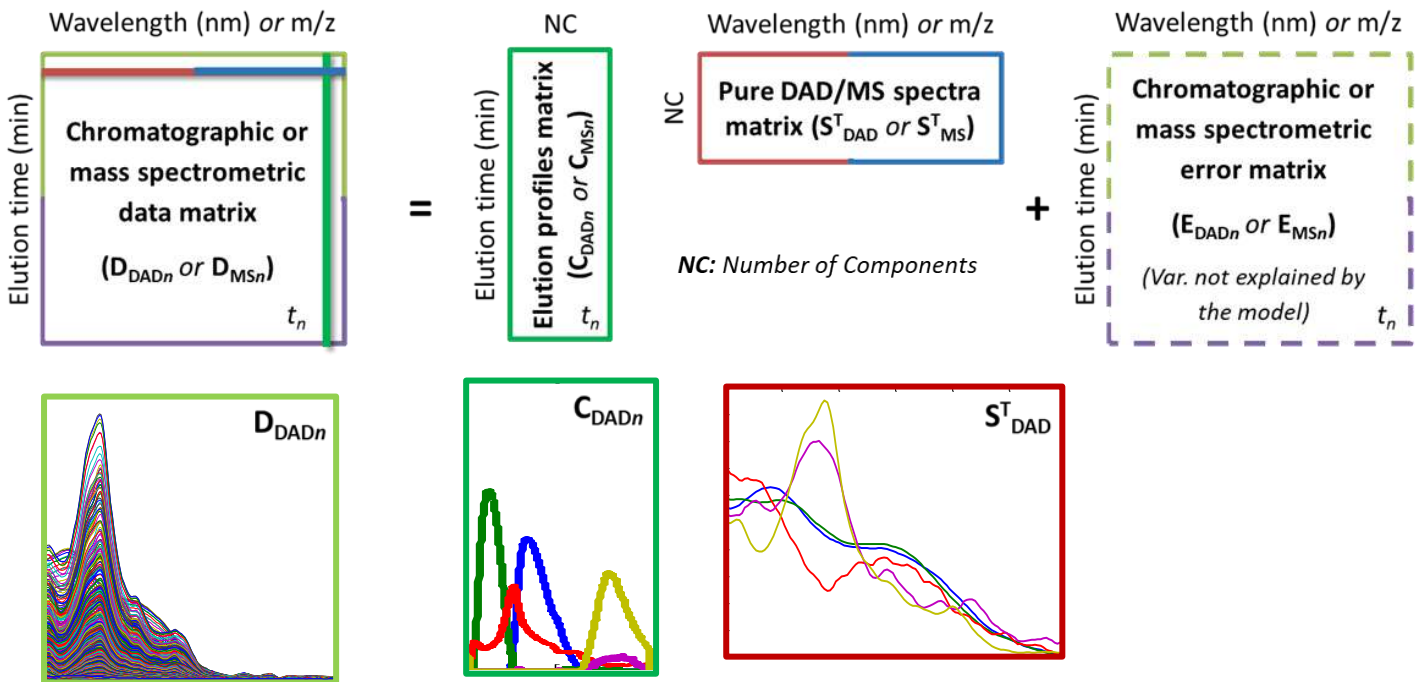
contribucions pures (perfils de concentració,  $C$ , i espectrals,  $S^T$ ) de les espècies presents en el procés de degradació, sempre que aquestes presentin una resposta instrumental amb la tècnica emprada.



**Figura 32.** Representació en forma matricial de les dades experimentals corresponents al seguiment cinètic per absorció molecular. Figura adaptada de (Mas Garcia, 2012).

El principal objectiu, doncs, dels mètodes d'anàlisi multivariant de processos basats en un model bilineal (com l'emprat en el MCR) és el càlcul de les matrius  $C$  i  $S^T$  a partir de l'anàlisi de la matriu experimental  $D$ . És a dir, resoldre la informació que conté aquesta matriu com a suma de les contribucions de cadascun dels components químics que participen en el procés estudiat. Aquestes contribucions, representades a través dels perfils de concentració ( $C$ ) i dels espectres purs ( $S^T$ ), proporcionen informació sobre l'evolució de la concentració dels components implicats en el procés i sobre la seva identitat, respectivament.

Com es pot veure, per tal d'il·lustrar l'organització de les dades experimentals i el significat del model bilineal mostrat anteriorment en l'Equació (6), s'ha pres com a referència l'experiment de seguiment cinètic per espectroscòpia d'absorció molecular. No obstant això, les explicacions donades són aplicables també a les dades cromatogràfiques mesurades. En aquest cas, però, es necessari canviar el significat de les files ( $i$ ) per temps d'elució i el de les columnes ( $j$ ) per longituds d'ona (en cas d'emprar la detecció per DAD) o relacions  $m/z$  (en utilitzar la detecció que ofereix la MS), com es mostra a la **Figura 33**. De la mateixa manera, aquest model bilineal també pot aplicar-se a les dades fluorimètriques d'excitació-emissió recollides. En aquest cas, les files estaran constituïdes per les longituds d'ona d'excitació i les columnes seran les respectives longituds d'ona d'emissió. Addicionalment, aquest model pot estendre's a l'anàlisi simultani de múltiples matrius de dades (matrius augmentades,  $\mathbf{D}_{aug}$ ), com s'explicarà de manera detallada en el capítol de resultats (Capítol 5) per a les casuístiques concretes d'arranjament del conjunt de dades obtingudes en els experiments de fotodegradació dels fàrmacs estudiats.



$$\text{Bilinear Model: } \mathbf{D}_{DADn} = \mathbf{C}_{DADn} \mathbf{S}_{DAD}^T + \mathbf{E}_{DADn} \text{ or } \mathbf{D}_{MSn} = \mathbf{C}_{MSn} \mathbf{S}_{MS}^T + \mathbf{E}_{MSn}$$

**Figura 33.** Representació en forma matricial de les dades experimentals corresponents al seguiment per cromatografia líquida amb detecció per díodes en sèrie (DAD).

Un cop descrits els pretractaments de les dades que s'han dut a terme per tal de millorar la qualitat de les mesures que es volen analitzar, i havent definit també

prèviament l'organització, l'estructura i el comportament de les dades experimentals, a continuació s'explicaran el procediment emprat per a l'obtenció de les matrius  $\mathbf{S}^T$  i  $\mathbf{C}$  del model bilineal a partir de la matriu senzilla  $\mathbf{D}$  o l'augmentada  $\mathbf{D}_{\text{aug}}$ .

### 4.3.1. MÈTODE DE RESOLUCIÓ MULTIVARIANT DE CORBES (MCR)

El mètode de resolució multivariant de corbes (en anglès *Multivariate Curve Resolution*, MCR) descriu una família de procediments quimiomètrics de modelització flexible utilitzats amb la finalitat d'identificar i resoldre les contribucions existents en un conjunt de dades (de Juan & Tauler, 2006). Al llarg dels anys, l'ús dels mètodes MCR s'ha estès a diversos àmbits de la química, com per exemple, la voltamperometria (Esteban, Ariño, et al., 2000), l'espectroscòpia d'infraroig (Ruckebusch, Duponchel, et al., 2003), la cromatografia unidimensional (Gargallo, Tauler, et al., 1996) i bidimensional (Mogollon, Ribeiro, et al., 2013; Pérez-Cova, Tauler, et al., 2020), la ressonància magnètica nuclear (Jaumot, Marchán, et al., 2004; Puig-Castellví, Alfonso, et al., 2016), l'anàlisi d'imatges hiperespectrals (Bedia, Tauler, et al., 2017; Piqueras, Duponchel, et al., 2011), la química ambiental (Platikanov, Baquero, et al., 2019; Terrado, Barceló, et al., 2009), i els estudis de fotodegradació (De Luca, Ioele, et al., 2020; Mas Garcia, 2012). A més, els mètodes MCR han demostrat ser adequats per a la investigació simultània de la informació analítica procedent de diferents experiments i/o mètodes analítics (de Juan & Tauler, 2021). Així doncs, el mètode MCR permet resoldre problemes relacionats amb la identificació i determinació analítica de compostos d'interès en presència d'interferències desconegudes, a partir de l'anomenada petjada dactilar (*fingerprint*) dels constituents d'una mostra complexa (De Juan, Jaumot, et al., 2014).

El MCR es basa en una descomposició bilineal equivalent a la del mètode PCA (Jolliffe, 2002). El PCA, tanmateix, en aquesta descomposició utilitza restriccions d'ortogonalitat, de màxima variància explicada i de normalització dels *loadings* per a obtenir com a resultat solucions úniques. Aquestes solucions però, no són directament interpretables des d'un punt de vista fisicoquímic, ja que els perfils (vectors) que s'obtenen pels *scores* i *loadings* per a cada component són en realitat una combinació lineal dels perfils (espectrals, instrumentals, de concentració, elució, etc.) dels components que causen realment la variància observada (Alier Pedemonte, 2014). En el mètode MCR, en canvi, la finalitat de la descomposició bilineal és recuperar

aquests perfils causants de la variància observada (matrius  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{S}^T$ ) i poder realitzar la corresponent interpretació dels resultats directament. MCR utilitza, per tant, restriccions més naturals que el PCA que equivalen a propietats generals dels perfils de concentració o de resposta instrumental del sistema químic estudiat, com per exemple la no-negativitat, la unimodalitat o la selectivitat dels perfils espectrals i de concentració. No obstant, el preu a pagar per aquesta aplicació de restriccions més naturals i per l'obtenció de solucions més interpretables (amb significat químic) esdevé en que les solucions resultants no són úniques i existeix una certa ambigüitat associada a elles (Tauler, Smilde, et al., 1995) (veure secció 4.3.2).

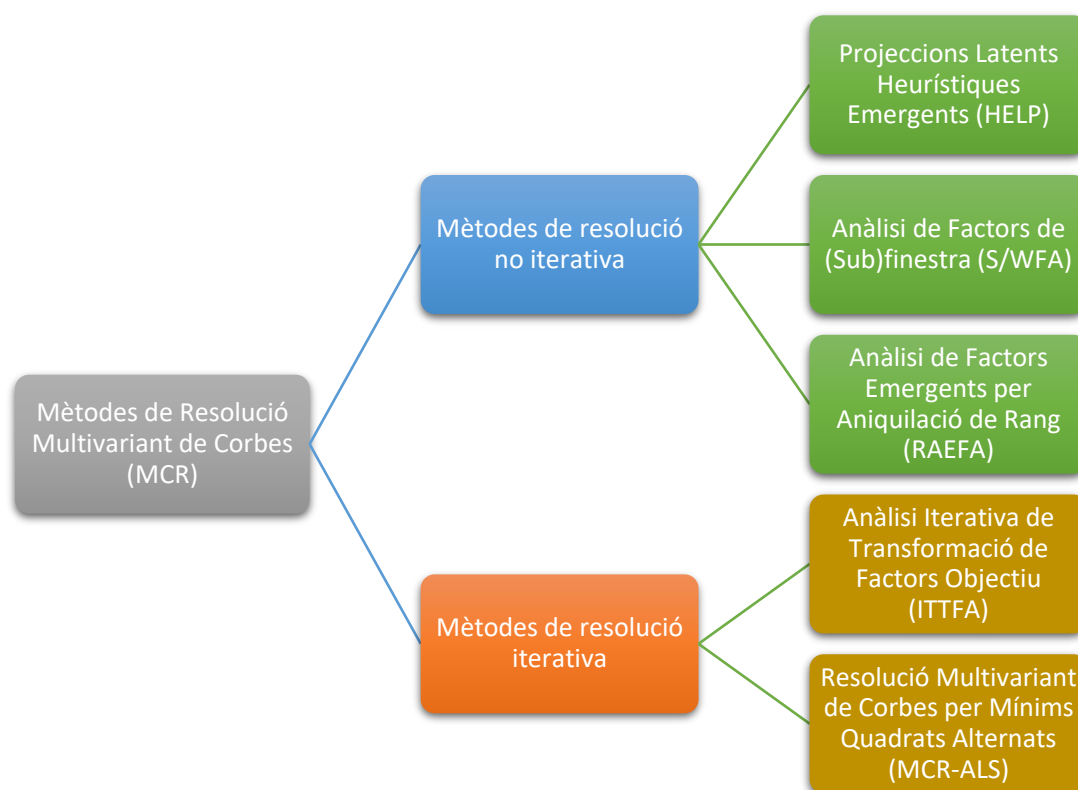
Així doncs, es diu que hi ha ambigüitat en la solució quan parelles diferents de matrius  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{S}^T$  poden reproduir la matriu de dades original  $\mathbf{D}$ , amb un mateix ajust òptim i tot respectant les mateixes restriccions utilitzades en l'anàlisi. Aquestes ambigüitats, considerades el principal inconvenient dels mètodes de modelització flexible, com es veurà més endavant, són especialment crítiques per als sistemes de reaccions cinètiques, i no tant perjudicials en el cas dels sistemes cromatogràfics, especialment quan s'utilitza la detecció per espectrometria de masses, altament selectiva.

Des de l'inici dels mètodes MCR, hi ha hagut diversos algorismes destinats a proporcionar les solucions del model bilineal de contribucions pures. La distinció principal entre aquests mètodes es fonamenta en si la resolució del mètode es pot fer de manera iterativa o no iterativa (de Juan, Rutan, et al., 2019; Z. Zhang, Ma, et al., 2020) (veure **Figura 34**). La majoria de mètodes no iteratius, com ara les Projeccions Latents Heurístiques Emergents (*Heuristic Evolving Latent Projections*, HELP) (Kvalheim & Liang, 1992), l'Anàlisi de Factors per Finestra (*Window Factor Analysis*, WFA) (Malinowski, 1992), l'Anàlisi de Factors per Subfinestra (*Subwindow Factor Analysis*, SFA) (Manne, Shen, et al., 1999) o l'Anàlisi de Factors Emergents per Aniquilació de Rang (*Rank Annihilation Evolving Factor Analysis RAEFA*) (Gampp, Maeder, et al., 1987), que utilitzen les idees de selectivitat i aniquilació de rang, van néixer quan el MCR es va circumscriure a l'anàlisi de matrius de dades simples similars a un procés. En aquests casos, l'estructura seqüencial dels perfils de concentració va ser emprada convenientment per definir les finestres d'existència dels diferents components. Aleshores, aquestes finestres amb diferents condicions de solapament de components (en termes d'identitat i rang de components) es combinen adequadament i s'obtenen els perfils de concentració o els espectres mitjançant un



sol pas de mínims quadrats (De Juan, Jaumot, et al., 2014). Aquests algorismes són avui dia menys utilitzats perquè establir les finestres de concentració en sistemes amb gran nombre de components i un ordre no seqüencial o amb una direcció de concentració no estructurada dificulta l'aplicació d'aquests mètodes. A més, no es van ampliar i adaptar per tractar estructures de dades multi-conjunt (dades augmentades), una necessitat força habitual en l'anàlisi de dades avui en dia.

Els mètodes iteratius, en canvi, funcionen optimitzant un conjunt d'estimacions inicials (suposicions) dels perfils de concentració o dels espectres, que són posteriorment modificades de manera iterativa sota l'acció de diferents restriccions (en anglès, *constraints*) fins que s'assoleix un criteri de convergència determinat (de Juan, Rutan, et al., 2019). Aquestes restriccions, forcen les matrius de factors  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{S}^T$  a obeir unes propietats químiques o matemàtiques prèviament definides. Entre els mètodes iteratius més coneguts, destaquen els procediments iteratius de resolució per mínims quadrats com l'Anàlisi Iterativa de Transformació de Factors Objectiu (*Iterative Target Transformation Factor Analysis*, ITTFA) (Gemperline, 1986) i la Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (*Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*, MCR-ALS) (Tauler, 1995). Per un costat, el mètode ITTFA treballa optimitzant únicament la direcció del perfil de concentració sota un seguit de restriccions i recuperant la matriu d'espectres del model bilineal per mínims quadrats. El mètode MCR-ALS, en canvi, realitza una optimització alternada tant dels perfils de concentració com dels espectres purs (matrius  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{S}^T$ , respectivament) en cada cicle iteratiu per resoldre el model bilineal per mínims quadrats. Aquest mètode, tal com indica el seu nom, utilitza una implementació específica de mínims quadrats alternats (en anglès, *Alternating Least-Squares*, ALS) que és la que s'ha emprat en aquesta Tesi.



**Figura 34.** Classificació segons el tipus de resolució (iterativa o no iterativa) dels mètodes de Resolució Multivariant de Corbes (MCR).

Els mètodes iteratius, doncs, solen ser l'opció de resolució multivariant preferida avui en dia, perquè no cal tenir una direcció de concentració estructurada per a que puguin aplicar-se i, a més, permeten introduir fàcilment la informació química i/o matemàtica coneguda prèviament en el procés d'optimització per tal d'assegurar l'obtenció de solucions més interpretables i pròximes a les reals (de Juan, Rutan, et al., 2019). Addicionalment, els algorismes com el MCR-ALS s'han adaptat per treballar amb estructures multi-conjunt i han permès la introducció de moltes restriccions diferents relacionades amb la informació química (Tauler, Maeder, et al., 2020), amb les propietats matemàtiques (condicions de rang o estructura del model) (Alier, Felipe-Sotelo, et al., 2009; Malik & Tauler, 2013) o a tasques d'anàlisi de dades normalment associades amb altres tipus d'algorismes (per exemple, la modelització rígida (de Juan, Maeder, et al., 2001) o el calibratge (M. C. Antunes, J. Simão, et al., 2002; Bayat, Marín-García, et al., 2020)).

A continuació, es descriu amb detall la implementació de l'algoritme del mètode MCR-ALS per a la resolució multivariant de dades químiques.

#### 4.3.1.1. MÈTODE DE RESOLUCIÓ MULTIVARIANT DE CORBES PER MÍNIMS QUADRATS ALTERNATS (MCR-ALS)

El mètode de MCR-ALS descomposa la matriu de dades  $\mathbf{D}$  mitjançant un algorisme de mínims quadrats alternats (en anglès, *Alternating Least-Squares*, ALS) que minimitza la següent equació per a les matrius  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{S}^T$  sota l'aplicació de les restriccions adients:

$$\min_{\mathbf{C}, \mathbf{S}^T, \text{restriccions}} \|\widehat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}} - \widehat{\mathbf{C}}\widehat{\mathbf{S}}^T\| \quad (7)$$

on  $\widehat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}$  és la matriu de dades reproduïda (filtrada o projectada) per PCA utilitzant el nombre preseleccionat de components  $NC$  i  $\widehat{\mathbf{C}}$  i  $\widehat{\mathbf{S}}^T$  són, respectivament, les estimacions actuals de les matrius factor amb els perfils de concentracions i els espectres obtingudes durant l'optimització per ALS i resoltes sota un conjunt de restriccions fins que s'assoleixen els criteris de convergència establerts. L'èxit de l'aplicació del mètode MCR-ALS, doncs, es troba precisament en la selecció i aplicació adequada d'aquestes restriccions.

Aquest mètode iteratiu, representat gràficament en la **Figura 35**, consta dels passos següents:

- Estimació inicial del nombre de components del sistema (contribucions, espècies químiques),  $NC$ , necessàries per explicar la variància experimental de la matriu de dades originals  $\mathbf{D}$ .
- Càlcul de  $\widehat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}$  per a aquest nombre de components seleccionat mitjançant l'anàlisi de components principals (PCA) o per descomposició de valors singulars (SVD) (Golub & Van Loan, 2013; Jolliffe, 2002).
- Estimació inicial de la concentració ( $\mathbf{C}_{\text{initial}}$ ) o dels espectres ( $\mathbf{S}_{\text{initial}}^T$ ) d'aquests components utilitzant diferents metodologies (en aquest cas, variables o mostres més pures) (Windig & Guilment, 1991).
- Selecció de les restriccions adequades per la tipologia de dades analitzades.

- e) Càlcul i optimització iterativa d'aquestes matrius de factors,  $\hat{\mathbf{C}}$  i  $\hat{\mathbf{S}}^T$ , mitjançant la regressió per ALS sota les restriccions seleccionades prèviament i fins que s'aconsegueixi la convergència (veure el diagrama de la **Figura 35**).
- f) Finalment, avaluació de l'ajust del model (*lof*) i de la variància explicada de les dades ( $R^2$ ) i revisió dels perfils de concentració finalment resolts (en  $\hat{\mathbf{C}}_{\text{opt}}$ ) i els espectres associats (en  $\hat{\mathbf{S}}_{\text{opt}}^T$ ).

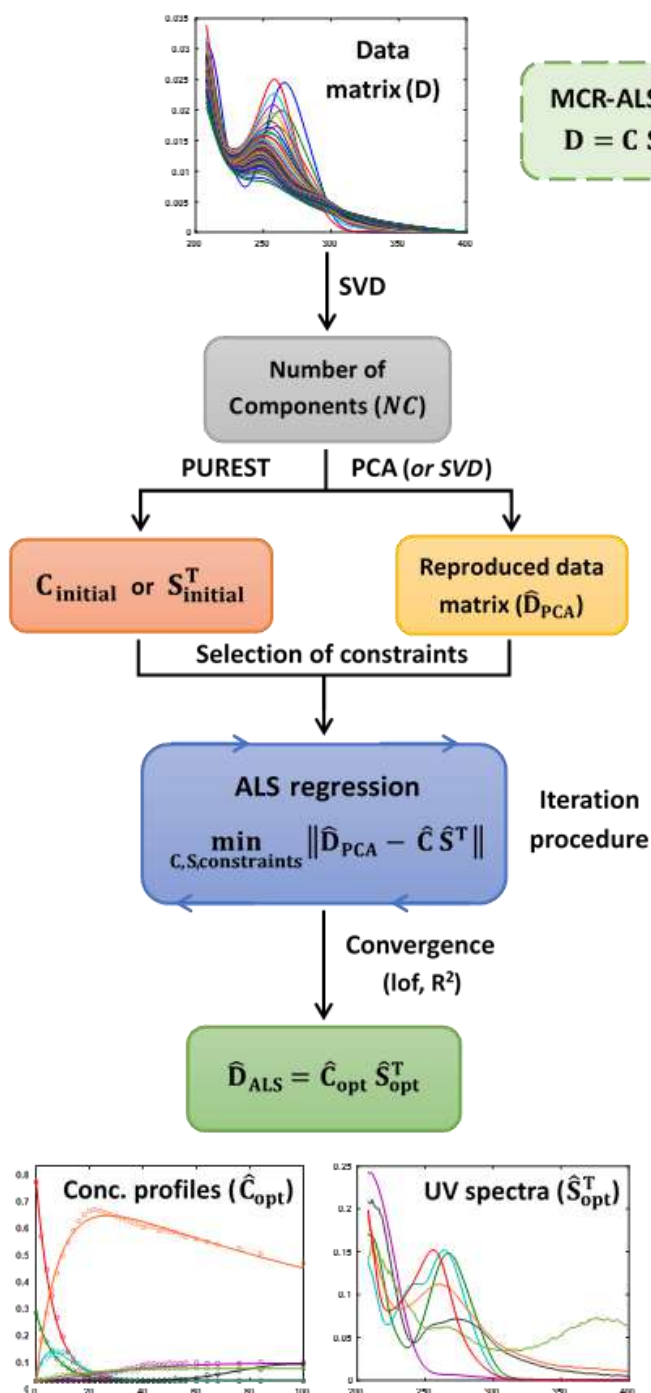
A continuació, es fa una descripció detallada d'aquestes etapes. A la **Figura 35** es mostra de forma resumida l'aplicació del mètode de MCR-ALS per a una matriu de dades experimental  $\mathbf{D}$  que correspon al seguiment d'un procés de fotodegradació per espectroscòpia d'absorció molecular, més concretament, a la degradació del fàrmac sulfametoxazol (SMX). Un esquema general del procés es mostra també a la **Figura 36**.

### ➤ **Determinació del nombre de components químics del sistema**

En tots els mètodes de MCR, un primer pas és proposar el nombre de contribucions independents necessari per a descriure la variació observada en la matriu de dades experimentals  $\mathbf{D}$ . Per al tipus de dades tractades en la present memòria, aquest nombre sol estar associat freqüentment al nombre d'espècies químiques presents en el procés de fotodegradació. D'aquesta manera per exemple, el nombre de components necessaris per resoldre el sistema pot ser escollit a partir dels resultats de l'anàlisi de la mateixa matriu de dades mitjançant PCA o SVD, o mitjançant el coneixement previ disponible sobre el sistema estudiat. En qualsevol cas, aquesta estimació inicial ens permetrà indicar el nombre de contribucions possibles que integren el sistema en una primera aproximació.

Per a realitzar l'anàlisi per components principals, s'utilitza l'algoritme de descomposició en valors singulars (de l'anglès, *Singular Value Decomposition*, SVD) (Golub & Van Loan, 2013). Aquest algoritme ens permet seleccionar el nombre de valors singulars que són més grans que els relacionats amb el soroll i que descriuen la major part de la variància de les dades originals, és a dir, que estan relacionats amb causes químiques de variació experimental. La distinció entre uns i altres, o millor dit, entre els components amb significat químic i els components corresponents a soroll experimental, sol ser senzilla degut a les diferències de magnitud entre ambdós valors

singulars, essent aquestes majors per als valors singulars relacionats amb causes químiques de variació experimental. En alguns casos, però, aquesta diferenciació pot resultar difícil, sobretot si existeixen contribucions sistemàtiques a l'error experimental o dependències lineals entre els perfils (en  $C$  o  $S^T$ ) dels diferents components.



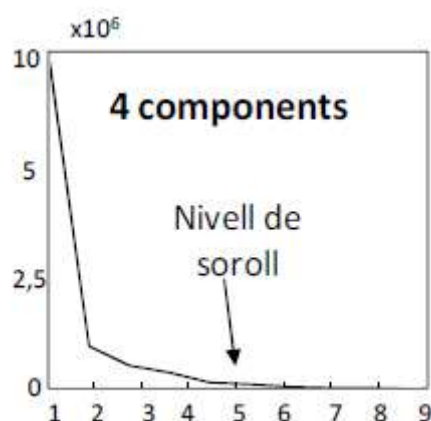
**Figura 35.** Diagrama de flux del procediment que segueix l'algorisme del mètode de Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (MCR-ALS). Figura reproduïda de l'ARTICLE II.



Figura 36. Esquema general del mètode MCR-ALS.

D'altra banda, aquest nombre de components també s'utilitza per avaluar la matriu de dades reproduïda per PCA (o SVD),  $\hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}$ . Així doncs, la selecció final d'aquestes aportacions químiques independents tindrà també en compte els resultats finals aconseguits, comprovant si els perfils finalment resolts en les matrius  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{S}^T$  proporcionen la informació química buscada del sistema. Això, és especialment important per a les contribucions menors, que poden tenir senyals petits i contribuir feblement a la variància global de les dades (a prop de la contribució que fa el soroll), però que poden ser especialment rellevants per a l'estudi en qüestió, com succeeix en l'**ARTICLE II**.

Per tant, una manera fàcil i intuïtiva per a tenir una primera aproximació del nombre de components necessaris per a explicar la variació química de la matriu  $\mathbf{D}$  és mitjançant la representació gràfica dels valors singulars (veure **Figura 37**). No obstant això, en alguns casos, el nombre de components determinat per SVD té un valor merament orientatiu. En conseqüència, és comú realitzar l'anàlisi per MCR-ALS de les dades utilitzant diferents nombres de components al voltant dels inicialment proposats (per sobre o per sota segons el cas) i, posteriorment, avaluar la millora o empitjorament de l'ajust de les dades experimentals i com han resultat les solucions obtingudes. La solució final considerada òptima, en aquest cas, serà aquella que proporcioni un millor ajust de les dades i uns perfils de concentració i espectrals resolts químicament més interpretables.



**Figura 37.** Gràfic de descomposició de valors singulars per a una matriu corresponent a un seguiment cinètic de fotodegradació. En aquest cas, el nombre de components (a priori) químicament rellevants (és a dir, amb una variància més elevada que la del soroll) és 4. Figura reproduïda de (Mas Garcia, 2012).

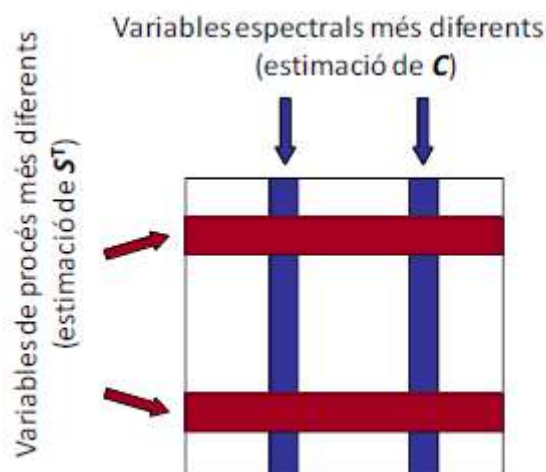
### ➤ **Determinació de les estimacions inicials**

El següent pas de l'algoritme MCR-ALS és proposar una estimació inicial dels perfils d'una de les dues matrius factorials  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{S}^T$  per tal de començar el procés iteratiu d'optimització sota un seguit de restriccions. Existeixen múltiples opcions que permeten generar aquestes estimacions inicials, disminuint d'aquesta manera els temps de càlcul computacionals i minimitzant així els problemes de convergència (de Juan, Rutan, et al., 2019). No obstant, de la mateixa manera que amb la determinació del nombre de components, en la generació d'aquestes estimacions inicials es pot partir de perfils de concentració o d'espectres prèviament coneguts, en el cas de tenir informació química prèvia. En cas contrari, la distinció principal que trobem entre els mètodes que ens permeten generar aquestes estimacions inicials es basa en si han estat dissenyats per generar-les a partir de dades similars a processos o, pel contrari, són mètodes generals que poden funcionar quan no hi ha cap estructura disponible en la direcció de la concentració (veure esquema en la **Figura 36**). Entre els primers, el mètode més conegut és l'Anàlisi de Factors Emergents (*Evolving Factor Analysis*, EFA) (Maeder & de Juan, 2020). Aquest mètode però, no s'ha aplicat en l'anàlisi de dades presentat en aquesta memòria, atès que algunes de les dades analitzades procedents dels processos de fotodegradació realitzats poden, en alguns casos, no complir estrictament la condició de seqüencialitat (hi ha una evolució seqüencial del procés, és a dir, la primera espècie que apareix és la primera en desaparèixer, i el mateix per les altres) requerida per aquest mètode.

D'altra banda, entre la resta de procediments, trobem els anomenats mètodes purs de selecció de variables (Windig, Bogomolov, et al., 2020). Aquesta família de mètodes poden funcionar independentment de la presència o absència en el conjunt de dades d'una direcció de concentració estructurada. Alguns dels procediments més coneguts d'aquest grup són el mètode de detecció de les variables més pures SIMPLISMA (*SIMPL*e to-use *Iterative Self-Modeling Analysis*) (Windig & Guilment, 1991), l'Aproximació per Projeccions Ortogonals (*Orthogonal Projection Approach*, OPA) (Cuesta Sánchez, van den Bogaert, et al., 1996) o l'Anàlisi Conjunt de Factors Clau (*Key Set Factor Analysis*, KSFA) (Malinowski, 1982). Tots ells tenen com a objectiu seleccionar les columnes o files més pures (més selectives) de la matriu  $\mathbf{D}$  (Windig, Gallagher, et al., 2005; Windig & Guilment, 1991), que ens proporcionaran



les estimacions inicials dels espectres o dels perfils de concentració, respectivament, d'acord amb un criteri predeterminat de mesura de la puresa (Mas Garcia, 2012), com es mostra a la **Figura 38**.



**Figura 38.** Representació gràfica de l'obtenció de perfils de concentració ( $C$ ) o espectres ( $S^T$ ) segons el mètode SIMPLISMA. Figura reproduïda de (Mas Garcia, 2012).

El càlcul de les estimacions inicials del MCR-ALS està moltes vegades inspirat en aquest mètode, essent SIMPLISMA el més emprat normalment (de Juan & Tauler, 2006). Tanmateix, és possible que dos components tinguin un espectre idèntic o molt similar i això dificulti al mètode la diferenciació entre ells. Aquest problema acostuma a succeir en sistemes de processos cinètics on dos o més components poden superposar-se, per manca de selectivitat entre ells o similitud dels seus perfils espectrals i/o per la manca d'independència lineal dels corresponents perfils de concentració (Manne, 1995). Tot i això, en la majoria dels casos de la present tesi, el mètode de detecció de variables més pures SIMPLISMA (Windig, Bogomolov, et al., 2020) ha permès obtenir estimacions inicials dels espectres dels compostos presents en el sistema estudiat.

Aquestes estimacions inicials, doncs, es poden obtenir directament a partir de la mateixa matriu de dades  $D$ , seleccionant aquelles de les seves files o columnes que més difereixen entre totes les altres. Més tard, aquests perfils de fila o columna es poden utilitzar com a punt de partida per a l'optimització del mètode per ALS.

### ➤ Selecció de restriccions

Les restriccions són propietats químiques o matemàtiques generals que els perfils de les matrius de factors  $\mathbf{C}$  i/o  $\mathbf{S}^T$  han de complir. Aquestes, s'apliquen durant l'optimització per ALS com a condicions matemàtiques per dotar de significat físic i químic a les solucions obtingudes en els perfils de concentració i en els espectres purs resolts. La utilització adequada de restriccions és una condició imprescindible en tots els procediments de resolució multivariant, ja que permet disminuir l'ambigüitat de les solucions finals obtingudes (De Juan, Jaumot, et al., 2014). Cal remarcar que l'aplicació de les restriccions és sempre opcional i flexible. Per tant, es poden seleccionar restriccions diferents per a cada una de les matrius  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{S}^T$  i, dins de cadascuna d'elles, també es poden restringir de forma diferent els diferents components que hi són presents. Addicionalment, en estructures de dades multi-conjunt (dades augmentades), es poden aplicar indistintament en les diferents submatrius que componen el bloc de dades. A més, moltes de les restriccions, es poden aplicar amb graus diversos de tolerància segons el soroll de les dades o el grau d'acompliment de la condició definida per la restricció. Així doncs, una restricció o condició pot ser imposada de dues maneres: forçant el perfil (espectral, de concentració, etc.) d'un component determinat (o alguns dels seus elements) a ser igual a determinats valors preestablerts (restriccions d'igualtat, *equality constraints*), o bé forçar-lo a ser superior o inferior a ells (restriccions de desigualtat, *inequality constraints*).

La flexibilitat en l'aplicació de les restriccions, doncs, explica la versatilitat dels algorismes MCR, que poden adaptar-se a escenaris molt diversos mitjançant la selecció adequada d'aquestes condicions restrictives. Per fer una selecció adequada de restriccions, hauríem de saber inicialment quin tipus de perfils esperem obtenir en el model de descomposició MCR. Un cop conegut això, es poden aplicar restriccions ajustant la tolerància a l'aplicació segons algunes característiques naturals del conjunt de dades, com ara el nivell de soroll present. En cas de dubte sobre l'aplicació d'una restricció, es poden comparar els models MCR construïts amb i sense introduir aquesta restricció. La introducció d'una determinada restricció no hauria de produir, en cap cas, una disminució significativa de la variància explicada en el conjunt de dades (per tant, ni del seu ajust). Si en canvi, aquesta disminució es produeix, es molt

probable que el conjunt de dades analitzades no compleix aquesta restricció o que aquesta s'hagi aplicat d'una manera inadequada o de forma massa estricta. En el darrer cas, cal veure si ampliant els nivells de tolerància de la restricció es pot evitar el seu incompliment.

Per tant, és important que a l'hora d'aplicar qualsevol restricció, aquesta estigui plenament justificada tant des d'un punt de vista matemàtic com químic, ja que si s'apliquen adequadament, milloren la definició i la interpretabilitat dels perfils obtinguts, però en cas contrari, empitjoren significativament l'ajust del model i proporcionen perfils erronis (De Juan, Jaumot, et al., 2014).

Entre el conjunt de restriccions (veure **Figura 39**), n'hi ha algunes de lligades a propietats naturals intrínseques i d'altres que expressen condicions o models matemàtics, i el seu ús depèn de la naturalesa de les dades i del problema a resoldre (utilitat) (de Juan & Tauler, 2019).

Entre les restriccions naturals trobem:

- **No-negativitat** (NN): És la restricció més general en l'optimització ALS. De manera natural, les concentracions dels components químics han d'ésser sempre valors positius o zero; per tant, s'aplica a tots els perfils de concentració (químicament no té sentit que existeixi una concentració negativa). Pot aplicar-se també a respostes instrumentals que proporcionen sempre valors de senyal positius, com per exemple, l'espectroscòpia d'absorció molecular o l'espectrometria de masses, tècniques emprades en aquesta tesi. La seva implementació pot ser forçosa (reemplaçant els valors negatius per zeros) o emprant algorismes de mínims quadrats no-negatius (*non-negative least-squares*, nnls) o la seva variant més ràpida (*fast non-negative least-squares*, fnnls) (Bro & De Jong, 1997).
- **Unimodalitat** (U): Aquesta restricció s'aplica a perfils que només han de presentar un màxim, una situació força més habitual per als perfils de concentració de processos que no pas per als perfils espectrals associats. En el cas de processos de fotodegradació, l'espècie que es degrada per acció de la llum no té sentit que torni aparèixer si es continua irradiant la mostra. Tanmateix, tampoc té sentit que en perfils d'elució d'espècies pures (pics cromatogràfics), un compost que ja ha eluït torni a aparèixer en temps de

retenció posteriors. La seva implementació es variada i inclou diferents graus de tolerància (Bro & Sidiropoulos, 1998).

- **Sistema tancat** (en anglès, *closure*): S'aplica en aquells sistemes en els quals se sap que la suma de concentracions de totes les espècies detectables assoleix un valor constant particular (compliment del balanç de matèria en química). Aquesta restricció pot ser aplicada de diferents maneres (de Juan, Rutan, et al., 2019). Si durant el procés d'optimització ALS aquesta restricció no es emprada sobre els perfils de concentració, es propicia l'existència d'ambigüitats d'intensitat o escala i, per tant, generalment s'aplica algun altre tipus de normalització, per exemple, s'estableix que els perfils espectrals dels diferents components tinguin una mateixa àrea o intensitat màxima igual a la unitat (veure apartat 4.3.2).
- **Espectres purs/perfils de concentració coneguts**: Aquesta imposició és una mena de restricció d'igualtat, que fa que el perfil de concentració i/o l'espectre d'un component sigui igual al d'un compost conegut, és a dir, que coneguem amb anterioritat el perfil de concentració o l'espectre d'un dels components que formen la mescla analitzada i, per tant, imposen durant la optimització ALS algun dels seus perfils a algun dels components.

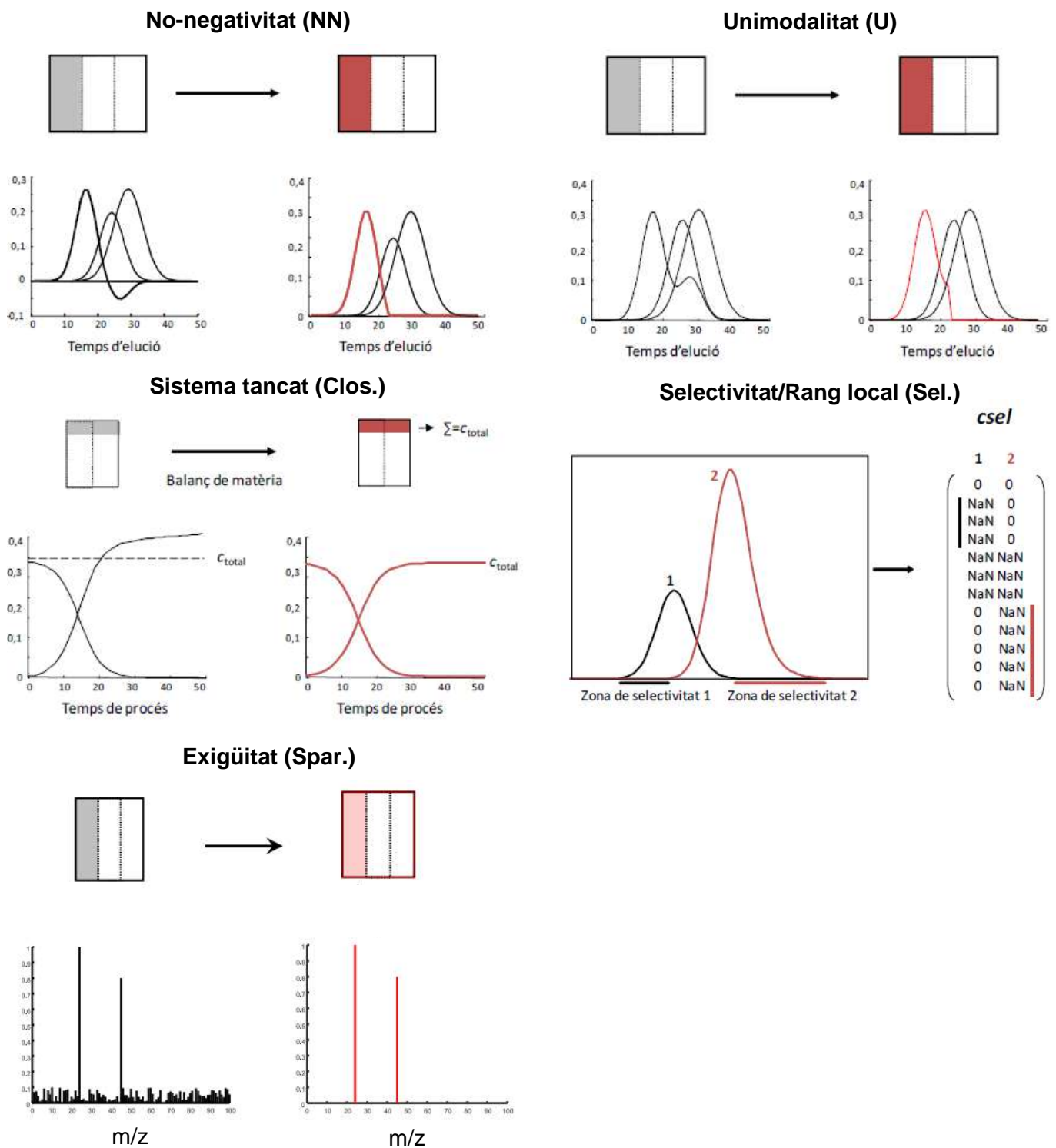
Les restriccions relacionades amb les condicions matemàtiques són:

- **Selectivitat i rang local** (Sel.): Aquesta restricció permet indicar en la matriu de concentracions o espectres si en alguna regió del procés (o de l'elució) o en algun canal spectral només hi ha una espècie (selectivitat) o bé algunes espècies del sistema són absents (rang local). Normalment s'aplica als perfils de concentració, però també es pot aplicar als espectres si aquesta informació es coneguda prèviament. Les regions de concentració zero en els diferents perfils es determinen mitjançant mètodes d'anàlisi de rang local com ara l'EFA (Maeder & de Juan, 2020). Aquesta restricció pot imposar-se forçant a zero la concentració d'una espècie en aquelles zones on se sap que no existeix, o forçant a zero regions espectrals on se sap que aquest component no té cap resposta instrumental. Les condicions de rang local adequades asseguruen, en molts casos, la recuperació dels perfils correctes per MCR (Tauler, Smilde, et al., 1995). En els estudis de fotodegradació, per exemple, es pot aplicar

aquesta restricció a l'inici del procés, on sabem que només tenim el compost original.

- **Correspondència entre espècies en diferents experiments** (Corr.): Aquesta restricció s'aplica en conjunts múltiples d'experiments en matrius de dades augmentades en la direcció de les columnes ( $\mathbf{D}_{\text{caug}}$ ), on la correspondència i presència/absència de components en els diferents experiments analitzats es pot utilitzar com a restricció sobre la matriu de concentracions augmentada  $\mathbf{C}_{\text{caug}}$  (Tauler, Maeder, et al., 2020).
- **Restriccions de model multilinear:** Aquestes són restriccions aplicables a estructures multi-conjunt de dades multidireccionals/multivia (en anglès, *multiway*) i que es pot aplicar opcionalment només a aquelles submatrius augmentades en les que el model multilinear de descomposició es compleix. Tot i que el MCR ofereix per defecte un model bilineal, les condicions de trilinealitat (Tauler, Maeder, et al., 2020; Tauler, Marqués, et al., 1998; Tauler, Smilde, et al., 1995), multilinealitat (Malik & Tauler, 2013; Tauler, 2021) o interacció de factors (com en els models de Tucker) (Alier, Felipe-Sotelo, et al., 2009) es poden implementar individualment per cada component, i també per només algunes de les submatrius simultàniament analitzades. Per tant, es poden configurar models completament bilineals, completament trilineals o híbrids per obtenir-los en els resultats finals del MCR. En el cas de la trilinearitat (**Tril.**), emprada en la present Tesi, aquesta restricció serveix per forçar que els perfils de concentració d'un mateix component en les diferents matrius de dades analitzades simultàniament sobre les que s'aplica la restricció tinguin la mateixa forma durant cada iteració de l'optimització de l'ALS. Per aquest motiu, a vegades aquesta restricció també s'anomena *d'igualtat de forma* en anglès, *equal shape*).
- **Exigüitat:** Força una concentració o un perfil de resposta a ser escàs, és a dir, a mostrar pocs valors no nuls. Aquesta restricció s'aplica a alguns perfils de resposta, com per exemple, en espectrometria de masses (MS) o les senyals de ressonància magnètica nuclear (RMN), i als perfils de concentració, com per exemple, els perfils d'elució en cromatografia o mapes de compostos

menors en imatges hiperespectrals (Cook & Rutan, 2017; Hugelier, Piqueras, et al., 2018).



**Figura 39.** Representació gràfica de l'acció de les restriccions en els perfils MCR. Perfils **negres**, perfils inicials sense restriccions. Perfils **vermells**, perfils restringits. Figura adaptada de (Mas Garcia, 2012; de Juan, Tauler, 2019).

Altrament, existeix un últim grup de restriccions que està vinculat a algunes tasques relacionades amb altres tipus de models que es poden integrar en el procés MCR: la modelització de tipus determinista *hard-modelling* o rígida (De Juan, Maeder, et al., 2000) i la restricció de tipus correlació, pel cas de models de calibratge univariant (M. C. Antunes, J. Simão, et al., 2002; Jaumot, Igne, et al., 2013) i pel cas del calibratge de segon ordre sobre les àrees o intensitats màximes dels perfils de concentració (Bayat, Marín-García, et al., 2020). En aquests dos últims casos, es permet d'aquesta manera la possibilitat d'obtenir directament informació quantitativa sobre els components resolts.

➤ **Optimització iterativa dels perfils de concentració i dels espectres purs**

Finalment, el darrer pas en les etapes del mètode MCR-ALS consisteix a realitzar específicament el procés de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats. Un cop determinats el nombre de components, conegudes les estimacions inicials dels perfils de concentració o dels espectres i havent decidit prèviament quin tipus de restriccions i de quina manera es volen imposar, es realitza l'optimització d'aquests perfils mitjançant l'algoritme de mínims quadrats alternats (ALS) sota la imposició de les restriccions escollides (De Juan, Jaumot, et al., 2014; Tauler, 1995). Com a resultat, s'obtenen perfils de concentració i espectres amb sentit químic que proporcionen informació útil i interpretable sobre el sistema estudiat.

A cada iteració de l'optimització, s'obté una nova estimació de la matriu d'espectres  $\mathbf{S}^T$  i dels perfils de concentració  $\mathbf{C}$ . En el cas més simple, en que no s'apliquen restriccions, les solucions del model bilineal s'obtenen utilitzant les dues equacions següents:

$$\hat{\mathbf{C}} = \hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}(\hat{\mathbf{S}}^T)^+ \quad (8)$$

$$\hat{\mathbf{S}}^T = \hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}(\hat{\mathbf{C}})^+ \quad (9)$$

on  $(\hat{\mathbf{S}}^T)^+$  i  $(\hat{\mathbf{C}})^+$  són les pseudo-inverses de les estimacions de les matrius  $\mathbf{S}^T$  i  $\mathbf{C}$  (Golub & Van Loan, 2013) i  $\hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}$  és la matriu de dades reproduïda (filtrada o projectada) per PCA pel nombre de components considerat. L'Equació (8) parteix d'estimacions inicials de  $\mathbf{S}^T$ . Si el procés iteratiu s'inicia amb estimacions de  $\mathbf{C}$ , l'ordre

de les Equacions (8) i (9) és l'invers. Aquestes estimacions iteratives, normalment però, son sotmeses a restriccions que es poden aplicar de formes diverses. Una forma senzilla d'implementar aquestes restriccions seria la de la seva aplicació 'forçada' sobre l'estimació ja realitzada prèviament en les iteracions anteriors segons les Equacions (8) i (9) prèviament mostrades; o d'altra banda, de manera més òptima, es podrien aplicar aquestes restriccions a partir de l'actualització de les estimacions prèviament obtingudes amb aproximacions més rigoroses de l'algoritme d'optimització de mínims quadrats sota restriccions, com ara la de mínims quadrats no-negatius *npls* o *fnpls* (Bro & De Jong, 1997). En aquest cas, les equacions matemàtiques a resoldre es poden expressar com:

$$\hat{\mathbf{C}} = \mathit{fnpls}(\hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}, \hat{\mathbf{S}}^{\text{T}}) \quad (10)$$

$$\hat{\mathbf{S}}^{\text{T}} = \mathit{fnpls}(\hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}, \hat{\mathbf{C}}) \quad (11)$$

A continuació, es recalcula la matriu de dades reproduïda a partir del producte dels perfils de concentració i dels perfils espectrals resolts. Si la matriu de dades calculada per MCR-ALS ( $\hat{\mathbf{D}}_{\text{ALS}} = \hat{\mathbf{C}}\hat{\mathbf{S}}^{\text{T}}$ ) és suficientment semblant (considerant l'error experimental) a la matriu de dades originals ( $\mathbf{D}$ ) es finalitza el procés iteratiu i s'accepten les matrius  $\hat{\mathbf{C}}$  i  $\hat{\mathbf{S}}^{\text{T}}$  com a solucions finals ( $\hat{\mathbf{C}}_{\text{opt}}$  i  $\hat{\mathbf{S}}_{\text{opt}}^{\text{T}}$ , respectivament). En cas contrari, s'inicia un nou cicle iteratiu.

El procés iteratiu acaba quan es compleix el criteri de convergència que s'ha establert a l'inici de l'optimització o quan s'ha arribat a un nombre preseleccionat d'iteracions. En aquest cas, es defineix la convergència en termes de canvi relatiu de la desviació estàndard dels residuals entre dos cicles consecutius, és a dir, en un valor de llindar que defineix la diferència en la millora de l'ajust entre iteracions consecutives. Generalment, el procediment d'optimització descrit és ràpid i s'assoleix la convergència (sovint definida per un canvi relatiu de menys del 0,1% en l'ajust d'iteracions consecutives) en menys de 50 cicles d'optimització.

Un cop finalitzat el procés d'optimització, els resultats del MCR-ALS són el conjunt de perfils de concentració i d'espectres resolts i els paràmetres de qualitat relacionats amb l'ajust del model. Aquesta qualitat, s'avalua normalment mitjançant dos paràmetres:



- i) La *manca d'ajust de les dades experimentals* a partir de la reproducció del model bilineal (de l'anglès, *% lack of fit, %lof*), que es pot definir a partir de l'equació següent:

$$\% \text{ lof} = \frac{\sqrt{\sum_{j=1}^{IJ} (\mathbf{d}_{ij} - \hat{\mathbf{d}}_{ij})^2}}{\sqrt{\sum_{j=1}^{IJ} \mathbf{d}_{ij}^2}} \times 100 \quad (12)$$

on  $\mathbf{d}_{ij}$  és l'element de la matriu de dades originals  $\mathbf{D}$  de la fila  $i$  i la columna  $j$ , i  $\hat{\mathbf{d}}_{ij}$  és l'element reproduït amb les solucions obtingudes amb el mètode MCR-ALS ( $\hat{\mathbf{C}}\hat{\mathbf{S}}^T$ ) a la mateixa fila  $i$  i columna  $j$ . Idealment, la manca d'ajust ha de tenir un valor similar al soroll de fons o l'error experimental.

- ii) El *percentatge de variància explicada* ( $\mathbf{R}^2$ ), que es calcula d'acord amb l'equació següent:

$$\mathbf{R}^2 = \frac{\sum_{j=1}^{IJ} \mathbf{d}_{ij}^2 - \sum_{j=1}^{IJ} (\mathbf{d}_{ij} - \hat{\mathbf{d}}_{ij})^2}{\sum_{j=1}^{IJ} \mathbf{d}_{ij}^2} \times 100 \quad (13)$$

En resum, per obtenir resultats satisfactoris, és rellevant parar atenció als passos de selecció de les estimacions inicials i de les restriccions. Les estimacions inicials són el punt de partida del procés d'optimització i, per tant, s'ha d'intentar començar amb conjectures assenyades. D'altra banda, les restriccions són les propietats que han de complir els perfils. Per tant, seleccionar les adequades i saber aplicar-les correctament és el punt més crucial per garantir l'obtenció de solucions significatives i fiables, afectades per la menor incertesa possible.

### 4.3.2. INCERTESA EN LES SOLUCIONS MCR

Els perfils de concentració i els espectres purs obtinguts en l'anàlisi individual d'un experiment amb MCR-ALS poden no ser els vertaders a causa de l'existència d'incertesa en la seva resolució (Tauler, Smilde, et al., 1995). La incertesa en MCR, doncs, està relacionada amb el fenomen de l'ambigüïtat i amb la propagació del soroll o error experimental a les solucions. Els fenòmens d'ambigüïtat estan presents sempre que el sistema estudiat no compleix certes condicions de selectivitat i rang local (Tauler, Smilde, et al., 1995). Es diu que hi ha ambigüïtat quan parelles diferents de matrius  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{S}^T$  poden reproduir la matriu de dades original  $\mathbf{D}$ , amb un ajust òptim similar, tot respectant les restriccions utilitzades en l'anàlisi. Es poden observar tres tipus diferents d'ambigüïtat:

- **Ambigüïtat de permutació de components** (*permutation ambiguity*): Aquesta ambigüïtat succeeix perquè no hi ha cap ordre de classificació dels components MCR. Per tant, es poden barrejar en la matriu de concentració i d'espectres (mantenint sempre la correcta correspondència dels components entre elles) i obtenir resultats idèntics (amb un mateix ajust). Aquest tipus d'ambigüïtat no té massa importància i es pot solucionar realitzant simplement una ordenació adequada dels perfils en les estimacions inicials (Abdollahi & Tauler, 2011).
- **Ambigüïtat d'intensitat o d'escala** (*intensity ambiguity*): Aquesta ambigüïtat ocorre quan parelles de perfils que tenen la mateixa forma però diferents escales relatives entre el perfil de concentració i l'espectre associat reproduïen igual de bé el conjunt de dades original (De Juan, Jaumot, et al., 2014). Per tant, es complirà que:

$$\mathbf{D} = \sum_{n=1}^N \mathbf{c}_n \mathbf{s}_n^T \quad (14)$$

$$\mathbf{D} = \sum_{n=1}^N (\mathbf{c}_n k_n) \left( \frac{1}{k_n} \mathbf{s}_n^T \right) \quad (15)$$

on, per qualsevol parella de perfils  $(\mathbf{c}_n \mathbf{s}_n^T)$  existeix un factor desconegut,  $k_n$ , capaç de reescalar els perfils, però mantenint la mateixa forma i qualitat de l'ajust.

És per això que, normalment, els valors de concentració i les intensitats de resposta pura en els perfils  $\mathbf{c}_n$  i  $\mathbf{s}_n^T$  es troben sempre en unitats arbitràries, tret que hi hagi informació de referència sobre les intensitats reals disponible i aquesta sigui utilitzada activament en el procés de resolució. L'ambigüitat d'intensitat, per tant, no és un problema gaire important en l'anàlisi qualitativa o en la identificació, però òbviament és un problema quan es volen recuperar valors de concentració reals. Aquesta ambigüitat se suprimeix amb l'aplicació de la restricció de sistema tancat (emprant valors de concentració de referència) o amb la normalització dels perfils de concentració o dels espectres resolts. Aquesta normalització permet evitar que els valors dels perfils de concentració s'incrementin de manera arbitrària multiplicant-se per un escalar que, al mateix temps, fa decreixer els valors dels perfils espectrals associats a aquests components, de manera que no es canvia el resultat de la seva multiplicació.

Quan es fa la normalització dels espectres resolts, es divideixen tots els valors del perfil d'un component determinat per la seva norma (arrel quadrada de la suma dels quadrats de tots els elements del perfil), forçant per tant que els perfils de tots els components tinguin la mateixa norma igual a la unitat o a un valor constant.

- **Ambigüitat rotacional** (*rotational ambiguity*): Aquesta ambigüitat es considera la font d'incertesa més rellevant associada als perfils resolts. Sorgeix quan conjunts de perfils de concentració i espectres amb diferents formes poden reproduir el conjunt de dades original estudiat amb la mateixa qualitat d'ajust. Matemàticament, es pot expressar de la següent manera:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T \quad (16)$$

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \mathbf{T} \mathbf{T}^{-1} \mathbf{S}^T = (\mathbf{C}\mathbf{T})(\mathbf{T}^{-1}\mathbf{S}^T) = \mathbf{C}_{\text{nou}}\mathbf{S}_{\text{nou}}^T \quad (17)$$

On, per una determinada descomposició de la matriu  $\mathbf{D}$ , sempre existeix un infinit nombre de matrius de transformació  $\mathbf{T}$  invertibles que fan que la solució ( $\mathbf{C}\mathbf{S}^T$ ) no sigui única, ja que permet obtenir perfils diferents que segueixen obeint les restriccions establertes en l'optimització MCR. Aquesta ambigüitat

també se la denomina de '*forma*' perquè en funció de com sigui la matriu  $\mathbf{T}$ , els perfils  $\mathbf{C}$  i  $\mathbf{C}_{\text{nou}}$  i els perfils  $\mathbf{S}^T$  i  $\mathbf{S}_{\text{nou}}^T$  poden tenir formes totalment diferents.

Aquesta ambigüïtat es especialment crítica en sistemes de processos cinètics, on dos o més components poden superposar-se per manca de selectivitat entre ells o similitud dels seus perfils espectrals i/o per la manca d'independència lineal dels corresponents perfils de concentració. En aquests casos, una combinació lineal d'aquests components que compleixin les restriccions del sistema són igualment vàlides i, per tant, no es possible obtenir solucions MCR úniques (Tauler & Maeder, 2020b).

La principal manera de disminuir/suprimir les ambigüïtats en les solucions MCR és mitjançant la introducció de restriccions (Tauler, Maeder, et al., 2020). Algunes d'elles poden garantir la supressió de l'ambigüïtat en els perfils on s'apliquen, com ara la trilinealitat i la modelització rígida (Golshan, Abdollahi, et al., 2012; Tauler, Smilde, et al., 1995). Altres limitacions, com ara el rang local, també poden suprimir l'ambigüïtat, sempre que es compleixin algunes condicions de superposició de components al conjunt de dades (Manne, 1995). Un aspecte rellevant, doncs, per aconseguir disminuir l'ambigüïtat és treballar amb estructures multi-conjunt i multilineals (Tauler, Maeder, et al., 2020; Tauler, Smilde, et al., 1995). En aquest cas, la diversitat dels subconjunts arranats fa que les possibles combinacions de perfils que compleixin les restriccions imposades i que descriguin adequadament la variació en l'estructura de dades augmentada siguin més petites. Per tant, les possibles ambigüïtats rotacionals associades als perfils MCR resolts es poden reduir considerablement i, sovint, eliminar-se quan s'analitzen simultàniament aquestes estructures de dades multi-conjunt (Tauler, Maeder, et al., 2020). El cas extrem és quan s'apliquen restriccions de multilinealitat que comporten l'eliminació de l'ambigüïtat rotacional en les solucions obtingudes, ja que proporcionen una solució única.

### 4.3.3. DEFICIÈNCIA DE RANG I ALTRES LIMITACIONS DELS MODELS MCR

Una altra limitació en l'aplicació del mètode de MCR-ALS per a l'anàlisi de les dades experimentals és el problema de la deficiència de rang. La deficiència de rang es presenta quan el rang total de la matriu de dades (rang matemàtic) és menor que el nombre d'espècies que contribueixen individualment al senyal mesurat (rang químic), és a dir, es detecten menys espècies químiques de les que realment estan presents en el sistema. Aquest problema és conseqüència de la presència de dependències lineals en els perfils de les espècies en una de les direccions (files o columnes). Així, sistemes on els perfils de concentració (o perfils d'espectres) de les espècies presents en la mostra són idèntics o es poden descriure a partir de combinacions lineals d'altres, patiran deficiència de rang (Amrhein, Srinivasan, et al., 1996). Aquest fet, ocorre molt sovint en experiments cinètics seguits per espectroscòpia d'absorció molecular (com és el cas dels estudis de fotodegradació) on, en funció del model cinètic associat a les dades experimentals, varis components es poden descriure amb un mateix perfil de concentració (s'observa la mateixa tendència evolutiva al llarg del procés cinètic).

L'estimació del rang d'una única matriu de dades corresponent a un sistema tancat de reaccions segueix la següent regla (Amrhein, Srinivasan, et al., 1996):

$$\text{Rang (D)} = \min(\text{nombre de reaccions} + 1, \text{nombre d'espècies absorbents}).$$

Esbrinar, doncs, si un sistema presenta deficiència de rang és un problema difícil de resoldre si no es té un cert coneixement previ del sistema que s'està estudiant. Per tal de resoldre aquest problema, l'anàlisi simultània de diversos experiments dissenyats apropiadament podria proposar-se com una possible solució (de Juan & Tauler, 2006; Tauler, 1995). L'objectiu en aquesta estratègia d'augmentar matrius és 'trencar' la dependència lineal que pot existir entre els perfils de les matrius  $\mathbf{C}$  i/o  $\mathbf{S}^T$ . D'aquesta manera, per tal de diferenciar els perfils que es confonen, s'han de concatenar la matriu deficient de rang conjuntament amb les matrius que aportin informació complementària dels perfils de concentració en condicions experimentals diferents, o per exemple, en el cas que la deficiència es produeixi en la direcció espectral, amb matrius procedents d'altres tècniques instrumentals que ens proporcionin diferent resposta per part d'aquests components dubtosos (acoblaments DAD-MS o DAD-FLD, per exemple). L'anàlisi simultània d'aquestes estructures de

dades augmentades (ja sigui mitjançant l'augment de matrius per fila, per columna o, simultàniament, per fila i columna) pot eliminar els problemes associats a la deficiència de rang, permetent l'estimació de el nombre correcte de components i la resolució de tot el sistema. Aquestes i altres estratègies ja s'han proposat i utilitzat en l'estudi de sistemes deficients de rang i s'han descrit en detall en treballs anteriors (Izquierdo-Ridorsa, Saurina, et al., 1997; Saurina, Hernández-Cassou, et al., 1998).

A més de les dificultats esmentades en apartats anteriors, com les ambigüitats, existeixen dues altres limitacions inherents als mètodes MCR que afecten l'anàlisi de processos químics. D'una banda, la no recuperació directa dels paràmetres relacionats amb els models químics (equilibri, cinètic). D'altra banda, el fet que les úniques espècies que poden ser modelades són aquelles que proporcionen senyal. Per a superar algunes d'aquestes limitacions, que afecten en gran mesura al mètode MCR-ALS, però també en general a la resta de mètodes de modelització flexible, es proposen les metodologies híbrides de modelització rígida i flexible.

#### **4.3.4. MÈTODES DE MODELITZACIÓ HÍBRIDA RÍGIDA I FLEXIBLE**

Com s'ha vist anteriorment, en emprar les metodologies de resolució de modelització rígida, on es forcen els perfils de concentració a seguir un model químic predeterminat, aquestes ofereixen uns resultats excel·lents si el model proposat és l'apropiat i si tota la variació instrumental observada està relacionada amb els components químics que formen el sistema. A més, s'obtenen els valors dels paràmetres del procés químic proposat (constants d'acidesa, cinètiques) amb els seus errors associats. Si bé, els resultats empitjoren si sorgeixen variacions incontrolables durant el procés o quan existeixen interferències absorbents que no estan incloses en el model proposat.

D'altra banda, en utilitzar les metodologies de modelització flexible, en particular, el mètode MCR-ALS, no és necessari tenir un coneixement previ tant exhaustiu del sistema, ja que aquest mètode no fa ús de cap model químic explícit en el càlcul matemàtic associat a la resolució. A més, en ser tan flexible, totes les contribucions al senyal poden ser modelades i, per tant, es pot conèixer l'evolució dels perfils dels components involucrats en un procés en presència d'interferents, els quals també són modelats. Contràriament, però, els resultats que s'obtenen amb aquest mètode estan

subjectes a ambigüitats (solucions no úniques) i no s'obtenen els paràmetres del procés estudiat.

Veient els punts forts d'ambdues metodologies, un plantejament innovador a proposar seria el d'incorporar els models químics, que com hem vist son propis de les metodologies de modelització rígida, en l'algorisme de resolució de les metodologies flexibles i, d'aquesta manera, poder aprofitar simultàniament els avantatges d'ambdós tipus de mètodes. Com a resultat d'aquesta combinació, s'han proposat els mètodes de modelització híbrida rígida i flexible (*hard- and soft-modelling*). D'aquesta manera, doncs, es va implementar una variant de l'algorisme MCR-ALS que incorporava restriccions de model rígid. Aquest nom mètode es va anomenar mètode MCR-ALS de modelització híbrida rígida i flexible (de l'anglès *hybrid hard- and soft-modelling MCR-ALS*, HS-MCR) (De Juan, Maeder, et al., 2000).

El funcionament d'aquest mètode és pràcticament idèntic al descrit amb anterioritat per a l'algorisme original de modelització flexible, MCR-ALS. L'única modificació important destacable és l'aplicació de la restricció de model cinètic sobre alguns o tots els perfils de la matriu de concentracions  $\mathbf{C}$  que, en aplicar-se la restricció, força els perfils de concentració seleccionats a adoptar la forma definida pel model químic.

L'ús d'un enfocament mixt (híbrid) que inclou característiques de modelització rígida i flexible té els seus avantatges, superant així algunes de les limitacions que presenten aquestes metodologies quan s'utilitzen individualment. Per tant, introduir el compliment d'un model cinètic com una restricció rígida en un mètode de modelització flexible com MCR-ALS, ajuda a minimitzar l'ambigüitat rotacional associada als perfils de concentració donats pel mètode de resolució (o la supressió total d'aquesta ambigüitat en els perfils de concentració que obeeixen el model cinètic (Golshan, Abdollahi, et al., 2012)) i, a més, proporciona les constants cinètiques de velocitat com a informació addicional de resolució (De Juan, Maeder, et al., 2000).

D'altra banda, la flexibilitat lligada al mètode MCR-ALS permet tractar sistemes on la resposta instrumental mesurada té contribucions addicionals procedents de variacions instrumentals, com per exemple, fortes derives instrumentals, o bé, contribucions que provenen de la presència d'interferències absorbents inertes sense un comportament cinètic, com succeeix comunament en mostres complexes o naturals. En aquests casos, només son obtinguts els perfils de concentració de

compostos vinculats al procés cinètic associats al model de reacció proposat, mentre que els perfils relacionats amb les contribucions "alienes" es poden modelar independentment utilitzant exclusivament les restriccions de modelització flexible (de Juan, Maeder, et al., 2001; De Juan, Maeder, et al., 2000).

La **Taula 4**, reproduïda de (Mas Garcia, 2012), resumeix les principals característiques de les metodologies de modelització rígida, de modelització flexible i de modelització híbrida rígida i flexible:

**Taula 4.** Principals característiques de les diferents metodologies de modelització del MCR-ALS: modelització rígida, flexible i híbrida rígida i flexible.

	Mètode de modelització rígida	Mètode de modelització flexible. MCR-ALS	Mètode de modelització híbrida, rígida i flexible. HS-MCR
Modelització de processos sense mecanisme definit	No	Sí	Sí
Postulació d'un model	Necessari	No necessari	Necessari
Modelització d'interferències	No	Sí	Sí
Modelització d'espècies no absorbents	Sí	No	Sí
Anàlisi simultània ( <i>multiset</i> )	Han de respondre a un mateix model global o a models individuals interconnectats	Sí	Sí
Ambigüitats	Presenten solucions úniques	Poden existir	Solucions úniques als perfils cinètics i possible ambigüitat en la resta
Paràmetres cinètics del procés	S'obtenen amb els seus errors associats	No s'obtenen	S'obtenen amb els seus errors associats







---

# CAPÍTOL 5

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

---



Seguidament, es descriuran i analitzaran els resultats obtinguts en aplicar la metodologia de Resolució de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (MCR-ALS) en cada un dels estudis realitzats. En virtut de la diferent tipologia de les dades tractades, els resultats presentats a continuació han estat diferenciats en 2 grans blocs: el primer bloc, referent als estudis realitzats sobre els processos de degradació dels fàrmacs tamoxifè (TAM) i sulfametoxazol (SMX); i el bloc restant, en relació amb l'estudi de la caracterització de la matèria orgànica dissolta (DOM) del riu Llobregat.

## **BLOC 1: ESTUDI DELS PROCESSOS DE FOTODEGRADACIÓ DE FÀRMACS**

### **5.1. DISPOSICIÓ DE Matrius EN ELS SISTEMES ESTUDIATS**

Les disposicions de matrius individuals i augmentades per els fàrmacs estudiats ha resultat ser molt semblant en emprar en tots dos casos les mateixes tècniques instrumentals de detecció. A continuació, es fa una descripció general dels arranjaments de matrius creats, emfatitzant en detall en cas d'existir alguna particularitat entre ambdós fàrmacs estudiats.

#### **5.1.1. ARRANJAMENTS DE Matrius DE DADES PROCEDENTS D'UNA DETECCIÓ INSTRUMENTAL ÚNICA (UV O MS)**

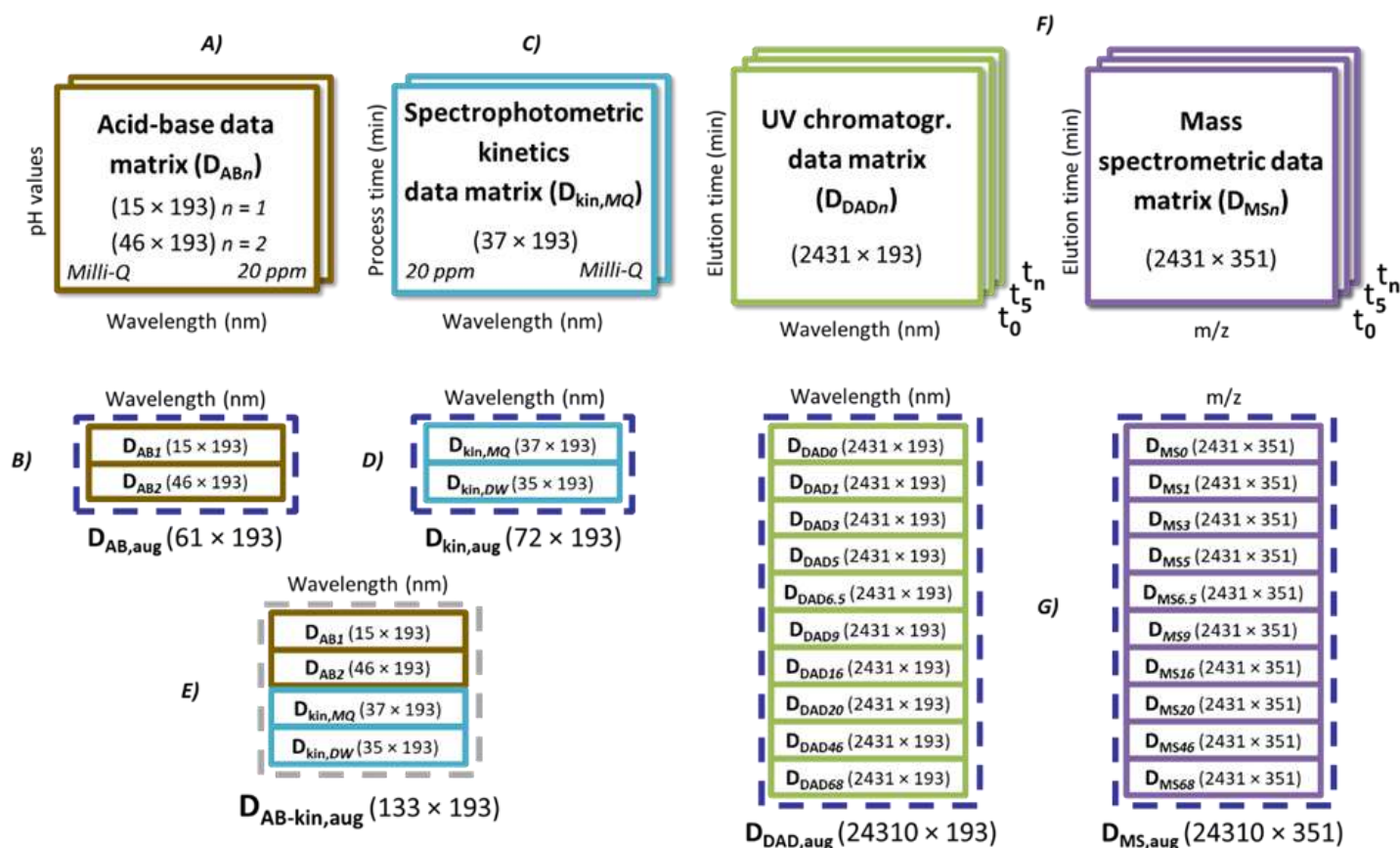
Durant els experiments monitoritzats per espectroscòpia UV-Visible, és a dir, durant el seguiment de la fotodegradació i la valoració àcid-base (en el cas del fàrmac SMX), es van recollir una sèrie d'espectres UV-Vis en funció del temps de reacció (irradiació) o del pH, respectivament. Altrament, per a les anàlisis LC-DAD-MS realitzades, cada injecció cromatogràfica individual va proporcionar una sèrie de perfils d'elució cromatogràfics vinculats als diferents canals espectrals adquirits (longituds d'ona o valors m/z). Utilitzant totes les dades experimentals disponibles, es van dissenyar set arranjaments de dades diferents per investigar en profunditat l'especiació química del procés de fotodegradació dels fàrmacs estudiats. Per entendre millor cadascuna d'aquestes disposicions de les matrius de dades, es comenten amb detall a continuació una per una i es mostren resumides a la **Figura 40** i la **Figura 41**.

En primer lloc, en el cas del fàrmac SMX, les dades recollides durant els experiments de valoració àcid-base es van disposar en una matriu de dades  $\mathbf{D}_{ABn}$ , amb  $n$  igual al nombre seqüencial d'experiments de valoració realitzats, essent en aquest cas només dos, on les files es corresponen amb els espectres UV-Vis adquirits als diferents valors de pH mesurats i les columnes són les traces de pH de les diferents longituds d'ona seleccionades (veure **Figura 40A**). Així, les matrius de dades  $\mathbf{D}_{AB1}$  i  $\mathbf{D}_{AB2}$  fan referència al seguiment espectrofotomètric UV del procés de valoració àcid-base SMX i, per tant, tenen informació sobre l'evolució espectral UV-Vis i sobre els canvis de concentració de les diferents espècies àcid-base implicades en aquest procés (De Luca, Ioele, et al., 2012). De la mateixa manera, es va realitzar un estudi complet de la valoració àcid-base del fàrmac en qüestió mitjançant l'anàlisi simultània de les dues matrius de dades  $\mathbf{D}_{AB1}$  i  $\mathbf{D}_{AB2}$ , que es va aconseguir a través de la construcció de la matriu augmentada en la direcció de les columnes (és a dir, adjuntant una matriu a la part inferior de l'anterior),  $\mathbf{D}_{AB,aug}$  (veure **Figura 40B**). En aquesta nova disposició de dades, les columnes de cadascuna de les dues matrius de dades concatenades verticalment són les mateixes i tenen el mateix significat: 193 longituds d'ona (208-400 nm) (de Juan & Tauler, 2016).

En segon lloc, amb les dades recollides durant el seguiment UV espectrofotomètric del procés de fotodegradació dels compostos farmacèutics es van crear diferents matrius. En el cas del fàrmac TAM, aquestes matrius van rebre el nom de  $\mathbf{D}_{d400sp}$  i  $\mathbf{D}_{d765sp}$  i fan referència a l'anàlisi espectrofotomètrica UV de la fotodegradació del fàrmac en les dues condicions de potència d'irradiació diferents estudiades: 400 i 765  $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ , respectivament. Pel que fa al SMX, l'altre fàrmac estudiat, les matrius de dades es van anomenar  $\mathbf{D}_{kin,MQ}$  i  $\mathbf{D}_{kin,DW}$  i fan referència als espectres UV-Vis obtinguts durant el seguiment del procés de degradació quan s'han emprat solucions de fàrmac amb dos solvents diferents: Milli-Q (subíndex  $MQ$ ) i aigua desionitzada (subíndex  $DW$ ), respectivament (veure **Figura 40C**). En tots dos casos, les files d'aquestes matrius es relacionen amb els espectres UV-Vis adquirits en els diferents temps d'irradiació (reacció) i les columnes són les traces cinètiques a les diferents longituds d'ona seleccionades en l'anàlisi. Aquestes matrius de dades, doncs, tenen la informació relativa a l'evolució espectral UV-Vis i als canvis de concentració de les espècies químiques implicades en els processos de fotodegradació de cada fàrmac.

Adicionalment, es va realitzar un estudi comparatiu de la fotodegradació del SMX utilitzant les dues solucions de dissolvents diferents (SMX-DW i SMX-Milli-Q) mitjançant l'anàlisi simultània de  $\mathbf{D}_{kin,MQ}$  i  $\mathbf{D}_{kin,DW}$ , assolida mitjançant la construcció de la matriu augmentada  $\mathbf{D}_{kin,aug}$  (veure **Figura 40D**). L'anàlisi d'aquesta matriu de dades augmentada permet comparar els processos de degradació en els dos casos i aporta informació interessant sobre la dependència del pH inicial del procés de fotodegradació del SMX, així com sobre la seva cinètica de reacció. En aquesta nova disposició de dades, el mateix espai vectorial de columnes (és a dir, les mateixes 193 longituds d'ona (208-400 nm)) també es comparteix entre les dues matrius de dades augmentades, com succeeix en l'anàlisi simultània de les dues matrius procedents de la valoració àcid-base del fàrmac. De la mateixa manera, un estudi comparatiu de la fotodegradació del TAM a les dues condicions de potència d'irradiació estudiades es va realitzar mitjançant l'anàlisi simultània de les matrius de dades  $\mathbf{D}_{d400sp}$  i  $\mathbf{D}_{d765sp}$ . En aquest cas, la matriu augmentada  $\mathbf{D}_{d400sp,d765sp}$  va ser construïda en la direcció de les columnes. L'anàlisi d'aquesta matriu augmentada permet comparar els dos experiments realitzats i obtenir informació respecte a la cinètica de la reacció.

Per al fàrmac SMX, a més, es va realitzar una disposició addicional d'augmentació de dades, quan es van analitzar simultàniament els conjunts de dades de la valoració àcid-base del fàrmac i dels experiments de fotodegradació espectrofotomètrica UV (veure **Figura 40E**). Amb aquest tipus d'anàlisi simultània, és possible determinar quines espècies àcid-base del SMX estan presents en el temps de reacció inicial ( $t=0$ ) i durant els experiments de fotodegradació quan s'utilitzen les diferents solucions amb diferents solvents. Aquesta anàlisi es va aconseguir mitjançant la creació d'una matriu de dades augmentada en la direcció de les columnes,  $\mathbf{D}_{AB-kin,aug}$ , on les respectives matrius augmentades d'àcid-base i de fotodegradació es concatenaven de nou verticalment una sobre l'altre (De Luca, Ioele, et al., 2012).



**Figura 40.** Estructura de les matrius de dades individuals obtingudes per al fàrmac sulfametoxazol (SMX) en l'anàlisi de: **A)** les titulacions àcid-base espectromètriques UV-Visible  $D_{ABn}$  ( $n=1, 2$ ), **C)** les fotodegradacions cinètiques espectromètriques UV-Visible ( $D_{kin,MQ}$  i  $D_{kin,DW}$ ), i **F)** les injeccions cromatogràfiques LC-DAD ( $D_{DADn}$ ) i LC-MS ( $D_{MSn}$ ) de les alíquotes de mostra del SMX. Matrius de dades augmentades per columnes obtingudes en l'anàlisi simultània de: **B)** les titulacions àcid-base espectromètriques UV-Visible ( $D_{AB,aug}$ ), **D)** les fotodegradacions cinètiques espectromètriques UV-Visible ( $D_{kin,aug}$ ), **E)** les titulacions àcid-base i les fotodegradacions cinètiques espectromètriques UV-Visible ( $D_{AB-kin,aug}$ ) i **G)** les múltiples injeccions cromatogràfiques LC-DAD ( $D_{DAD,aug}$ ) i LC-MS ( $D_{MS,aug}$ ). Figura reproduïda de l'ARTICLE II.

En tercer lloc, s'assoleix una investigació més profunda de les espècies produïdes durant la fotodegradació mitjançant l'anàlisi cromatogràfica de diferents mostres dels fàrmacs estudiats recollides a diversos temps d'irradiació al llarg de tot el procés de degradació. Per tant, es van analitzar mitjançant LC-DAD-MS diferents alíquotes de mostra de la solució del TAM i de la del SMX; en concret, 11 alíquotes en el cas del TAM per a cadascuna de les dues potències d'irradiació estudiades, i únicament 10 d'elles per a la solució preparada amb aigua Milli-Q del SMX. Tanmateix, per a aquest fàrmac, la solució preparada amb aigua destil·lada no va analitzar-se posteriorment per LC-DAD-MS. Aquestes alíquotes van ser seleccionades al llarg dels respectius experiments de fotodegradació. Les anàlisis posteriors, van donar lloc a un conjunt de

matrius de dades per a cada fàrmac i detector cromatogràfic emprat (veure exemple a la **Figura 40F**). Així, el detector PDA (UV-DAD) en el cas del SMX, per exemple, va donar 10 matrius de dades  $\mathbf{D}_{\text{DAD}n}$ , on  $n = 1, \dots, 10$  alíquotes de mostra analitzades; i també per a aquestes mateixes alíquotes avaluades per LC-MS van crear-se 10 matrius de dades  $\mathbf{D}_{\text{MS}n}$ . Les files d'aquestes matrius de dades contenen els espectres (UV-DAD o MS) als diferents temps d'elució. Les columnes d'aquestes matrius tenen, respectivament, els perfils de dades cromatogràfiques registrats als diferents canals espectrals adquirits; que en el cas del SMX, per exemple, van ser de 193 longituds d'ona ( $\mathbf{D}_{\text{DAD}n}$  en el rang 208–400 nm) i 351 valors de m/z ( $\mathbf{D}_{\text{MS}n}$  en el rang 50–400 m/z). En el cas del TAM, aquestes matrius van rebre el nom de  $\mathbf{D}_{400\text{DAD}n}$ ,  $\mathbf{D}_{765\text{DAD}n}$ ,  $\mathbf{D}_{400\text{MS}n}$  i  $\mathbf{D}_{765\text{MS}n}$ , per al detector UV-DAD i MS i les dues potències d'irradiació (400 i 765 W·m<sup>-2</sup>), respectivament.

Finalment, es va aconseguir una anàlisi més detallada del procés de fotodegradació dels fàrmacs estudiats utilitzant la informació completa proporcionada pels dos procediments cromatogràfics emprats, LC-DAD i LC-MS. Aquesta anàlisi es va realitzar mitjançant el tractament simultani del conjunt de matrius  $\mathbf{D}_{\text{DAD}n}$  i  $\mathbf{D}_{\text{MS}n}$  creades per a cada fàrmac, utilitzant primer les dades de cadascun dels dos mètodes de detecció LC per separat i després conjuntament (veure més avall). Aquesta anàlisi es pot aconseguir, tal com es mostra a la **Figura 40G**, mitjançant la construcció de les dues matrius augmentades "llargues" en la direcció de les columnes, formades concatenant verticalment les diferents matrius individuals obtingudes a cada temps de reacció i per a cadascun dels dos sistemes de detecció:  $\mathbf{D}_{\text{DAD, aug}}$  per a la detecció UV-DAD i  $\mathbf{D}_{\text{MS, aug}}$  per a la detecció de MS. Aquest procediment d'augmentació de la matriu és possible perquè totes les alíquotes es van analitzar mitjançant la mateixa tècnica instrumental, ja sigui LC-DAD o LC-MS. D'aquesta manera, per reunir aquestes matrius de dades en una única matriu augmentada en la direcció de les columnes, el nombre i el significat de les columnes de cadascun dels conjunts de dades a concatenar han de ser necessàriament els mateixos. Aquestes dues matrius de dades augmentades contenen, doncs, per a cada estudi realitzat, el conjunt complet de matrius de dades cromatogràfiques obtingudes en les anàlisis de totes les alíquotes de mostra seleccionades als diferents temps de reacció de la fotodegradació. Aquestes matrius, per tant, tenen el seu subespai vectorial de les

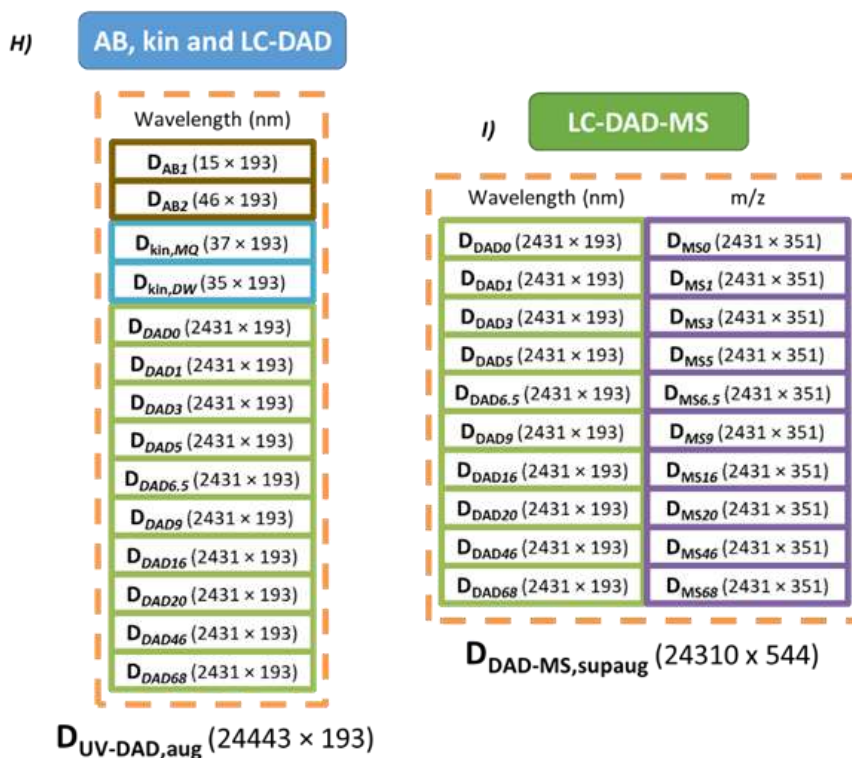


columnes de la matriu en comú: en el cas del SMX (mostrat a la **Figura 40**), les 193 longituds d'ona (208–400 nm) per a les dades LC-DAD o els 351 valors de  $m/z$  (50–400  $m/z$ ) per a les dades LC-MS, respectivament (Mas, Tauler, et al., 2011). En l'estudi del fàrmac TAM, aquestes matrius van rebre altres noms:  $D_{400DAD,aug}$ ,  $D_{765DAD,aug}$ ,  $D_{400MS,aug}$  i  $D_{765MS,aug}$ .

### 5.1.2. CONCATENACIÓ I AUGMENT DE Matrius DE Dades DE DETECCIONS INSTRUMENTALS MÚLTIPLES (UV I MS): FUSIÓ DE Dades COMPLETES DE SEGUIMENT UV, LC-DAD I LC-MS.

Per augmentar el poder de resolució del sistema estudiat, es va realitzar una estratègia de fusió de dades més elaborada que contemplava l'anàlisi simultània dels diferents tipus d'experiments i de les diferents tècniques instrumentals complementàries emprades en l'estudi dels processos de fotodegradació dels fàrmacs seleccionats (en el cas del SMX, per exemple, el seguiment cinètic i de la valoració UV-Visible, l'anàlisi per LC-DAD i l'anàlisi per LC-MS conjuntament).

En el cas particular del sistema de detecció UV-DAD, doncs, és possible una disposició addicional d'augmentació de les matrius de dades tenint en compte que els experiments monitoritzats per espectrofotometria UV-Visible (la valoració àcid-base i la pròpia fotodegradació, en el cas del SMX) i les anàlisis LC-DAD produeixen matrius de dades individuals que tenen en comú el mateix subespai vectorial definit per les columnes de la matriu de dades (longituds d'ona) dels espectres UV-Vis mesurats. Així, les matrius de dades espectrofotomètriques UV-Visible augmentades obtingudes durant l'experiment de valoració àcid-base i les obtingudes en el seguiment inicial de la reacció de fotodegradació,  $D_{AB,aug}$  i  $D_{kin,aug}$ , respectivament, es poden concatenar verticalment amb la matriu de dades LC-DAD augmentada  $D_{DAD,aug}$  per finalment formar la nova matriu de dades augmentades "allargada" en la direcció de les columnes  $D_{UV-DAD,aug}$  (veure **Figura 41H**). En el cas del fàrmac TAM, aquesta matriu va rebre el nom de  $D_{d400sp,400DAD,aug}$  o  $D_{d765sp,765DAD,aug}$ , en funció de la potència d'irradiació emprada en cada estudi de fotodegradació realitzat.



**Figura 41.** Matrius de dades superaumentades obtingudes en l'anàlisi simultània per fusió de dades de: **H)** el conjunt de dades resultant d'agrupar les titulacions àcid-base espectromètriques UV-Visible, les fotodegradacions cinètiques espectromètriques UV-Visible i les múltiples injeccions cromatogràfiques LC-DAD ( $D_{UV-DAD,aug}$ ) i **I)** el conjunt de dades resultant d'acoblar les múltiples injeccions cromatogràfiques LC-DAD i LC-MS ( $D_{DAD-MS,supaug}$ ) Figura reproduïda de l'ARTICLE II.

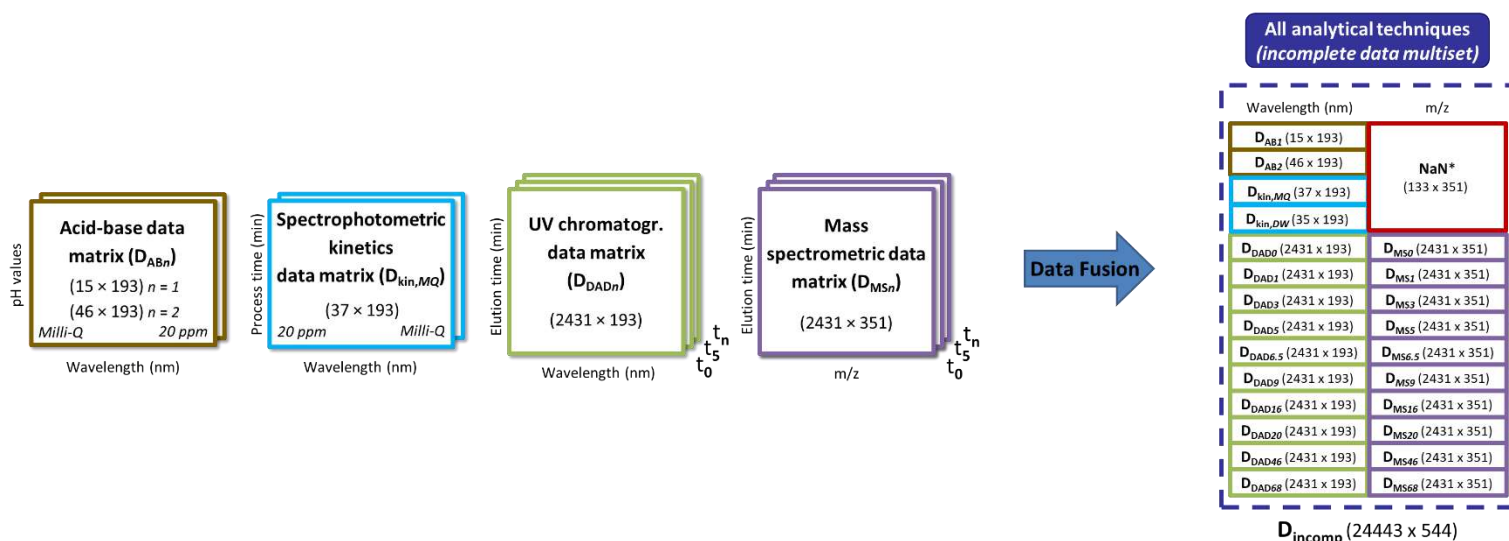
Adicionalment, també es va poder considerar l'anàlisi quimiomètrica conjunta de les alíquotes analitzades utilitzant els dos sistemes de detecció, UV-DAD i MS, simultàniament en cada injecció cromatogràfica. Això, implicaria realitzar un tipus diferent d'augmentació de la matriu de dades, que en quimiometria se sol anomenar de fusió de dades (en anglès, *data fusion*) (Mas, Tauler, et al., 2011; Tauler, Maeder, et al., 2020). Atès que, en els dos estudis cromatogràfics de fotodegradació de fàrmacs realitzats, ambdós sistemes de detecció emprats (DAD i MS) van analitzar les mateixes mostres cadascun d'ells i que, prèviament, es van sincronitzar i alinear els temps cromatogràfics segons el retard de temps existent entre tots dos detectors (veure la secció 4.2.1 anterior), l'augmentació de la matriu de dades es va realitzar en aquest per concatenació horitzontal (veure la **Figura 41I**) (Tauler, Maeder, et al., 2020). Per al SMX, per exemple, es va obtenir una nova matriu de dades "ample" augmentada tant en la direcció de les files com de les columnes (matriu superaugmentada), unint (o fusionant) les dues matrius "allargades"  $D_{DAD,aug}$  i  $D_{MS,aug}$ , donant com a resultat  $D_{DAD-MS,supaug}$ . En aquesta matriu de dades

superaugmentada per files i columnes, les files representen els espectres UV-Vis i MS en els diferents temps d'elució, segons cada parell de submatrius DAD o MS adjuntades. Aquest arranament ha estat possible perquè, com s'ha esmentat, s'ha fet concordar un mateix temps d'elució en ambdós detectors i, per tant, les diferents files tenen el mateix significat en tots dos detectors, requisit indispensable per a la concatenació horitzontal (fusió) de matrius de dades (veure secció 4.1). En el cas del TAM, aquesta nova matriu va rebre el nom de  $D_{400DAD,400MS,aug}$  o  $D_{765DAD,765MS,aug}$ , en funció de la potència d'irradiació emprada en cada estudi realitzat.

### 5.1.3. CONCATENACIÓ I AUGMENT DE Matrius DE Dades DE DETECCIONS INSTRUMENTALS MÚLTIPLES (UV I MS): FUSIÓ DE Dades INCOMPLETES

Finalment, si volem considerar la resolució simultània de totes les dades obtingudes, és a dir, resoldre conjuntament les dades de les titulacions àcid-base (en el cas del SMX), les del seguiment de la fotodegradació per espectroscòpia d'absorbància molecular i les referents a l'anàlisi per LC-DAD i LC-MS, ens trobem amb una situació particular ja que falten un o més blocs de dades per poder construir un bloc multi-conjunt complet com els descrits anteriorment. Això, a la pràctica, pot passar per moltes raons, per exemple, perquè una determinada tècnica instrumental no es pot utilitzar per investigar certs tipus d'experiments (com és el cas, on no disposem del MS durant el seguiment de la reacció de fotodegradació) (De Luca, Ragno, et al., 2014) o perquè alguns tipus de mesures no es van poder realitzar en alguns casos, com per exemple, en una estació determinada o en un període de temps determinat durant una campanya de seguiment ambiental (Alier & Tauler, 2013). La imputació d'aquests blocs de dades que falten no és raonable, ja que no es poden estimar arbitràriament. Això pot passar freqüentment quan es duen a terme les estratègies d'augmentació i de fusió de dades per a la seva anàlisi simultània, i resulta que per alguna raó falten alguns dels blocs de dades fusionats o de les matrius de dades concatenades. En alguns d'aquests casos però, encara es poden construir i analitzar estructures multi-conjunt de dades incompletes, com la matriu  $D_{incomp}$  mostrada en la **Figura 42** per a les dades obtingudes en l'estudi de la fotodegradació del SMX.

Així doncs, per analitzar aquest tipus especial d'estructura de dades i obtenir encara un model bilineal anàleg a l'esperat amb un multi-conjunt complet, es proposa utilitzar una variant especial de l'algorisme MCR-ALS que es detalla en la següent secció.

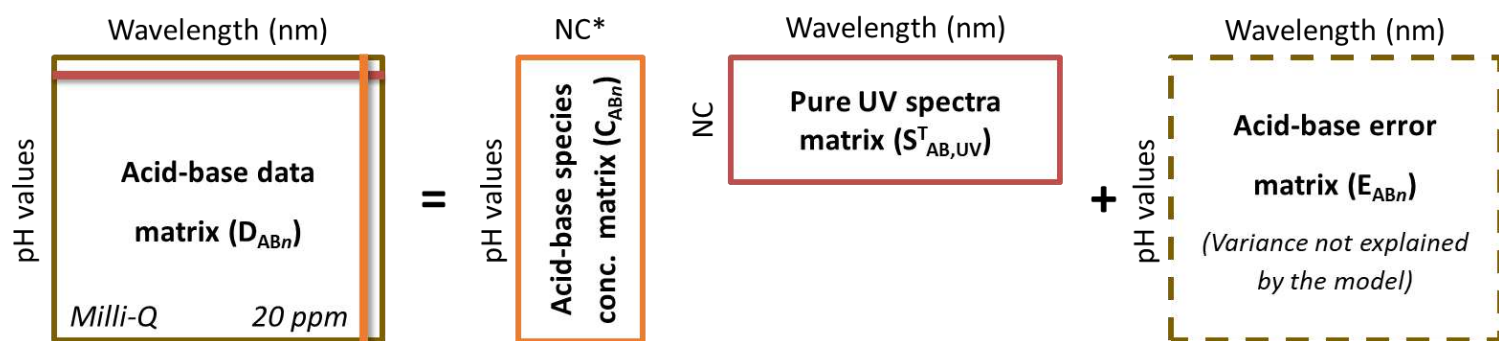


**Figura 42.** Estructura de dades incompleta ( $D_{incomp}$ ) formada en analitzar conjuntament totes les dades obtingudes en el procés de fotodegradació del sulfametoxazol (SMX). \*NaN: notació emprada per MATLAB® per indicar els valors absents.

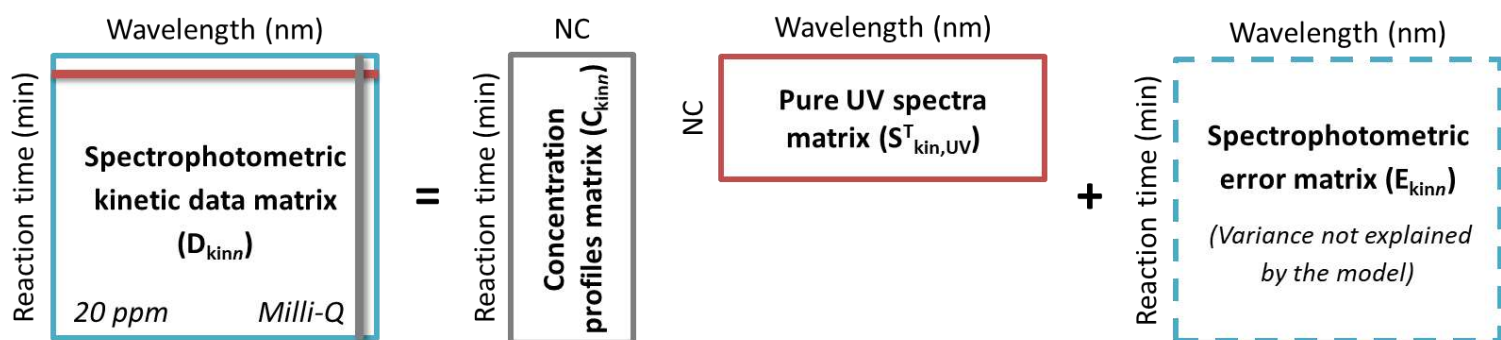
## 5.2. DESCOMPOSICIONS BILINEALS DELS SISTEMES ESTUDIATS

A continuació es detallen les descomposicions bilineals considerades en els diferents arranjaments de matrius de dades anteriorment descrits. De la **Figura 43** a la **Figura 48** es mostren gràficament aquestes descomposicions.

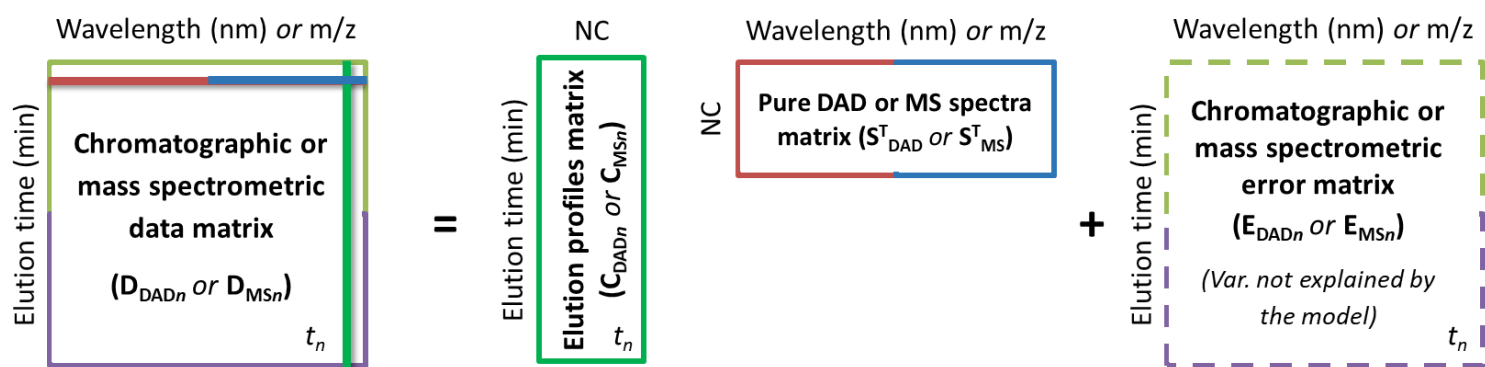
Els models de descomposició bilineal obtinguts a partir de les matrius de dades individuals proporcionades per un únic sistema de detecció instrumental (ja sigui UV o MS), és a dir, les descomposicions de les matrius  $D_{ABn}$ ,  $D_{kin,MQ}/D_{kin,DW}$  i  $D_{DADn}$  o  $D_{MSn}$ , en el cas del fàrmac SMX; i de les matrius  $D_{d400sp}/D_{d765sp}$ ,  $D_{400DADn}$ ,  $D_{765DADn}$ ,  $D_{400MSn}$  i  $D_{765MSn}$ , en el cas del fàrmac TAM, es poden expressar directament de manera simplificada mitjançant l'Equació (6) descrita en la secció 4.3.1.1 del Capítol 4. En aquest cas, cada matriu  $C$  individual (veure la notació de subíndex a la **Figura 43**) té a les seves files, respectivament, la concentració de les espècies àcid-base o cinètiques o els perfils d'elució LC de les espècies participants en el procés de degradació dels fàrmacs estudiats. D'altra banda, cada matriu  $S^T$  té els corresponents perfils espectrals UV-DAD o MS purs d'aquestes espècies resoltes (veure la **Figura 43**).



Bilinear Model:  $D_{ABn} = C_{ABn} S_{AB,UV}^T + E_{ABn}$



Bilinear Model:  $D_{kinn} = C_{kinn} S_{kin,UV}^T + E_{kinn}$



Bilinear Model:  $D_{DADn} = C_{DADn} S_{DAD}^T + E_{DADn}$  or  $D_{MSn} = C_{MSn} S_{MS}^T + E_{MSn}$

**Figura 43.** Models de descomposició bilinear construïts a partir dels arranjaments de matrius de dades individuals proporcionats per un únic sistema de detecció instrumental (ja sigui UV o MS) per als estudis de valoració àcid-base, de fotodegradació cinètica i d'anàlisi cromatogràfica LC-DAD i LC-MS del fàrmac SMX (matrius  $D_{ABn}$ ,  $D_{kin,n}$  i  $D_{DADn}/D_{MSn}$ ). Aquests models segueixen l'Equació (6) referida a la secció 4.3.1.1 del Capítol 4. \*NC: Nombre de components (és a dir, nombre d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE II.

En el cas de les matrius de dades augmentades per a varies mostres, construïdes per als diferents tipus d'experiments realitzats, és a dir, de les matrius  $\mathbf{D}_{AB,aug}$ ,  $\mathbf{D}_{kin,aug}$ ,  $\mathbf{D}_{DAD,aug}$  i  $\mathbf{D}_{MS,aug}$  per a, respectivament, la valoració àcid-base, la fotodegradació del fàrmac estudiat, i les anàlisis cromatogràfiques LC-DAD i LC-MS realitzades, l'extensió del model de descomposició bilineal utilitzant per a totes elles la mateixa notació matricial  $\mathbf{D}_{k,aug}$  es descriu a l'Equació (18) en notació MATLAB® i es representa gràficament a la **Figura 44** per a cada cas concret.

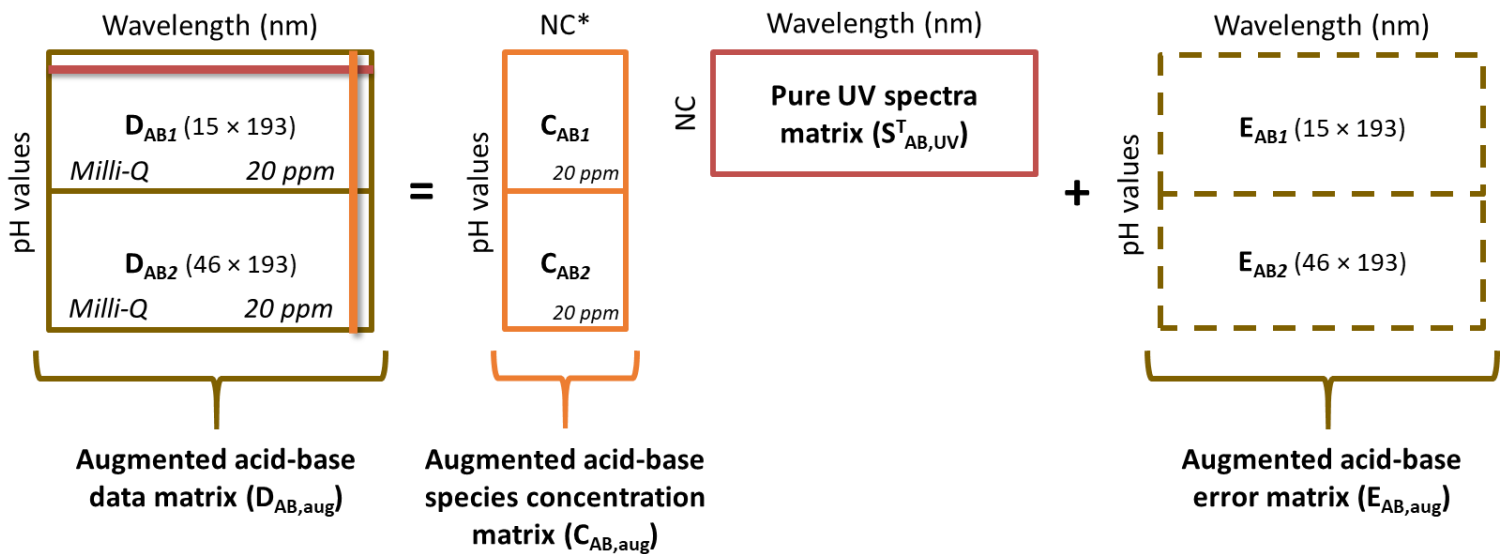
$$\begin{aligned}\mathbf{D}_{k,aug} &= [\mathbf{D}_{k,1}; \mathbf{D}_{k,2}; \dots; \mathbf{D}_{k,n}] \\ &= [\mathbf{C}_{k,1}; \mathbf{C}_{k,2}; \dots; \mathbf{C}_{k,n}] \mathbf{S}^T + [\mathbf{E}_{k,1}; \mathbf{E}_{k,2}; \dots; \mathbf{E}_{k,n}] \quad (18) \\ &= \mathbf{C}_{k,aug} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}_{k,aug}\end{aligned}$$

Aquesta equació, també es pot escriure de la següent manera:

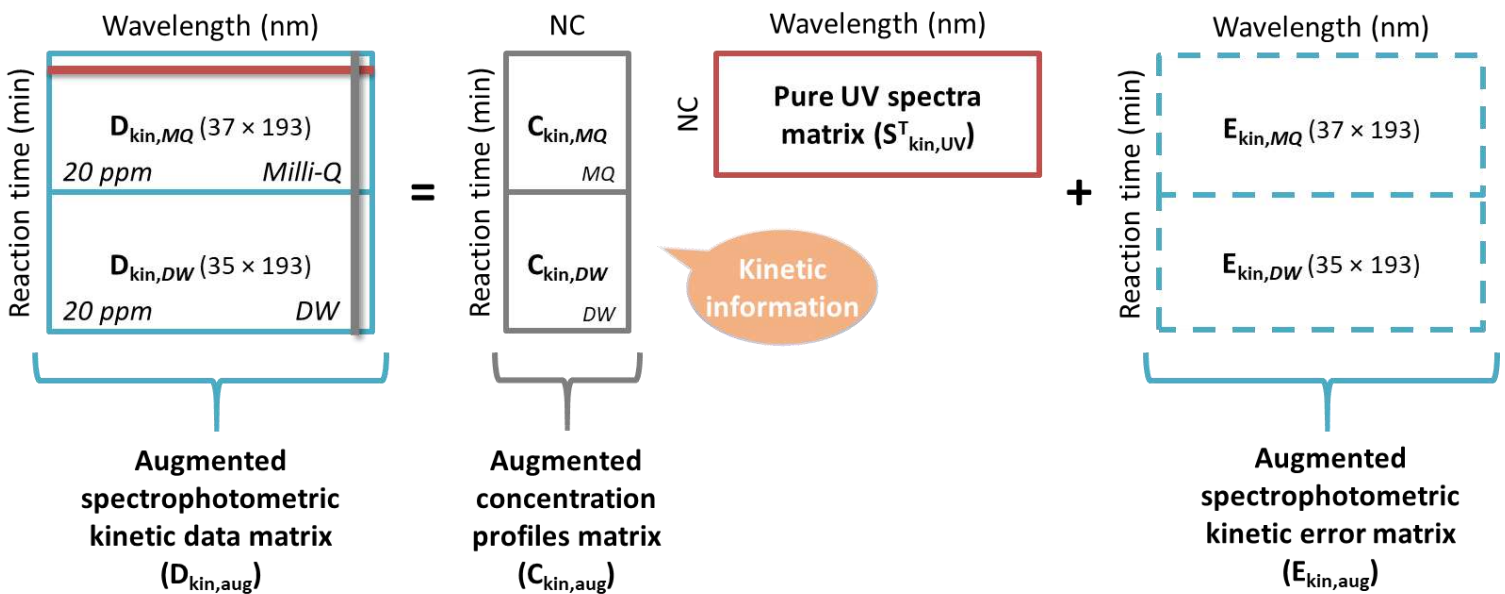
$$\mathbf{D}_{k,aug} = \begin{bmatrix} \mathbf{D}_{k,1} \\ \mathbf{D}_{k,2} \\ \dots \\ \mathbf{D}_{k,n} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_{k,1} \\ \mathbf{C}_{k,2} \\ \dots \\ \mathbf{C}_{k,n} \end{bmatrix} \mathbf{S}^T + \begin{bmatrix} \mathbf{E}_{k,1} \\ \mathbf{E}_{k,2} \\ \dots \\ \mathbf{E}_{k,n} \end{bmatrix} = \mathbf{C}_{k,aug} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}_{k,aug} \quad (19)$$

En aquestes Equacions (18) i (19),  $k$  denota els diferents tipus d'experiments realitzats (és a dir, àcid-base (AB), fotodegradació espectrofotomètrica UV-Visible (kin), LC-DAD (DAD) i LC-MS (MS), tal com mostra el subíndex concret de la matriu a la **Figura 44**),  $n = 1, \dots, N$  es refereix al nombre de matrius de dades diferents analitzades simultàniament en la matriu augmentada per columnes  $\mathbf{D}_{k,aug}$ ; i de la mateixa manera per a  $\mathbf{C}_{k,aug} = [\mathbf{C}_{k,1}; \mathbf{C}_{k,2}; \dots; \mathbf{C}_{k,n}]$ , en la matriu de perfils de concentració augmentada dels perfils àcid-base, de fotodegradació/cinètics o d'elució cromatogràfica, respectivament, dels components implicats en els diferents experiments/mostres analitzats simultàniament en la corresponent matriu  $\mathbf{D}_{k,aug}$  (veure també aquesta notació subíndex a la **Figura 44**). La matriu  $\mathbf{S}^T$ , en canvi, té els espectres UV-Vis o MS dels components resolts (veure la **Figura 44**). Cal tenir en compte que en el model bilineal de les Equacions (18) i (19) els espectres per a tots els components resolts ( $nc = 1, \dots, NC$ ) (en  $\mathbf{S}^T$ ) són comuns pels diferents conjunts de dades analitzats simultàniament en  $\mathbf{D}_{k,aug}$ . En canvi, els perfils de concentració en la matriu  $\mathbf{C}_{k,aug}$ , per

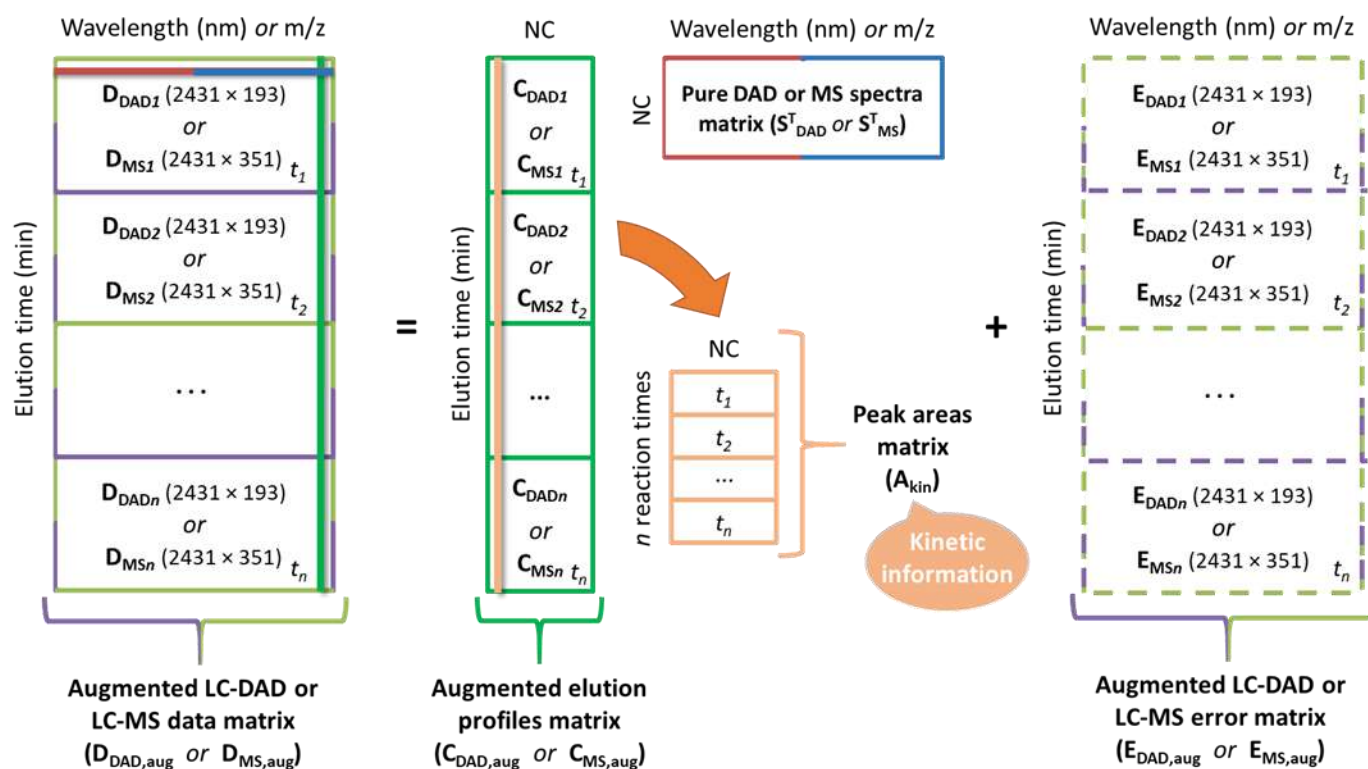
als mateixos components en cada conjunt de dades analitzades, poden ser diferents en les distintes submatrius de concentració  $C_{k,n}$  (veure la **Figura 44**).



$$\text{Bilinear Model: } D_{AB,aug} = [D_{AB1}; D_{AB2}] = [C_{AB1}; C_{AB2}] S_{AB,UV}^T + [E_{AB1}; E_{AB2}] = C_{AB,aug} S_{AB,UV}^T + E_{AB,aug}$$



$$\text{Bilinear Model: } D_{kin,aug} = [D_{kin,MQ}; D_{kin,DW}] = [C_{kin,MQ}; C_{kin,DW}] S_{kin,UV}^T + [E_{kin,MQ}; E_{kin,DW}] = C_{kin,aug} S_{kin,UV}^T + E_{kin,aug}$$



Bilinear Model:  $D_{DAD, aug} = [D_{DAD1}; D_{DAD2}; D_{DADn}] = [C_{DAD1}; C_{DAD2}; C_{DADn}] S_{DAD}^T + [E_{DAD1}; E_{DAD2}; E_{DADn}] = C_{DAD, aug} S_{DAD}^T + E_{DAD, aug}$

or

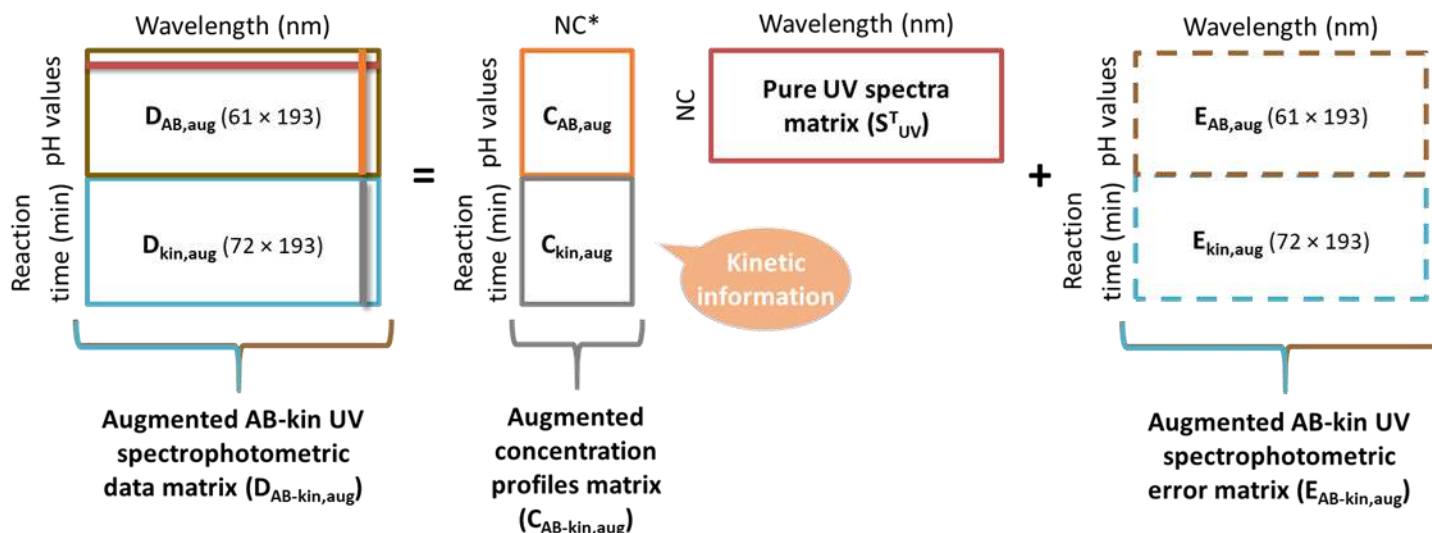
$$D_{MS, aug} = C_{MS, aug} S_{MS}^T + E_{MS, aug}$$

**Figura 44.** Models de descomposició bilinear construïts a partir de les disposicions de matrius de dades augmentades amb les diferents mostres proporcionades per un únic sistema de detecció instrumental (ja sigui UV o MS) per als estudis de valoració àcid-base, de fotodegradació cinètica i d'anàlisi cromatogràfica LC-DAD i LC-MS del fàrmac SMX (matrius  $D_{AB, aug}$ ,  $D_{kin, aug}$ , and  $D_{DAD, aug}/D_{MS, aug}$ ). Aquests models segueixen l'Equació (18) esmentada anteriorment. \*NC: Nombre de components (número de components MCR resolts). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE II.

A més, per al fàrmac SMX, l'Equació (18) o (19) també es pot utilitzar per descriure la descomposició del model bilinear de la matriu augmentada que s'obté quan els conjunts de dades de la valoració àcid-base i dels experiments de fotodegradació es concatenen verticalment en la matriu de dades  $D_{AB-kin, aug}$ , com s'ha mencionat anteriorment en la secció 5.1.1. En aquest cas, on  $D_{1-k, aug} = [D_{1, aug}; D_{k, aug}]$  amb  $k = 1, \dots, K$  diferents tipus d'experiments considerats per a la seva anàlisi combinada (és a dir, àcid-base (AB) i fotodegradació (kin), veure el subíndex de la matriu a la **Figura 45**), la matriu  $C_{1-k, aug} = [C_{1, aug}; C_{k, aug}] = [[C_{1,1}; \dots; C_{1,n}]; C_{k, aug}]$  és la matriu de concentració augmentada que té simultàniament els perfils de concentració de les espècies àcid-base i de les espècies de fotodegradació implicades en aquest estudi.



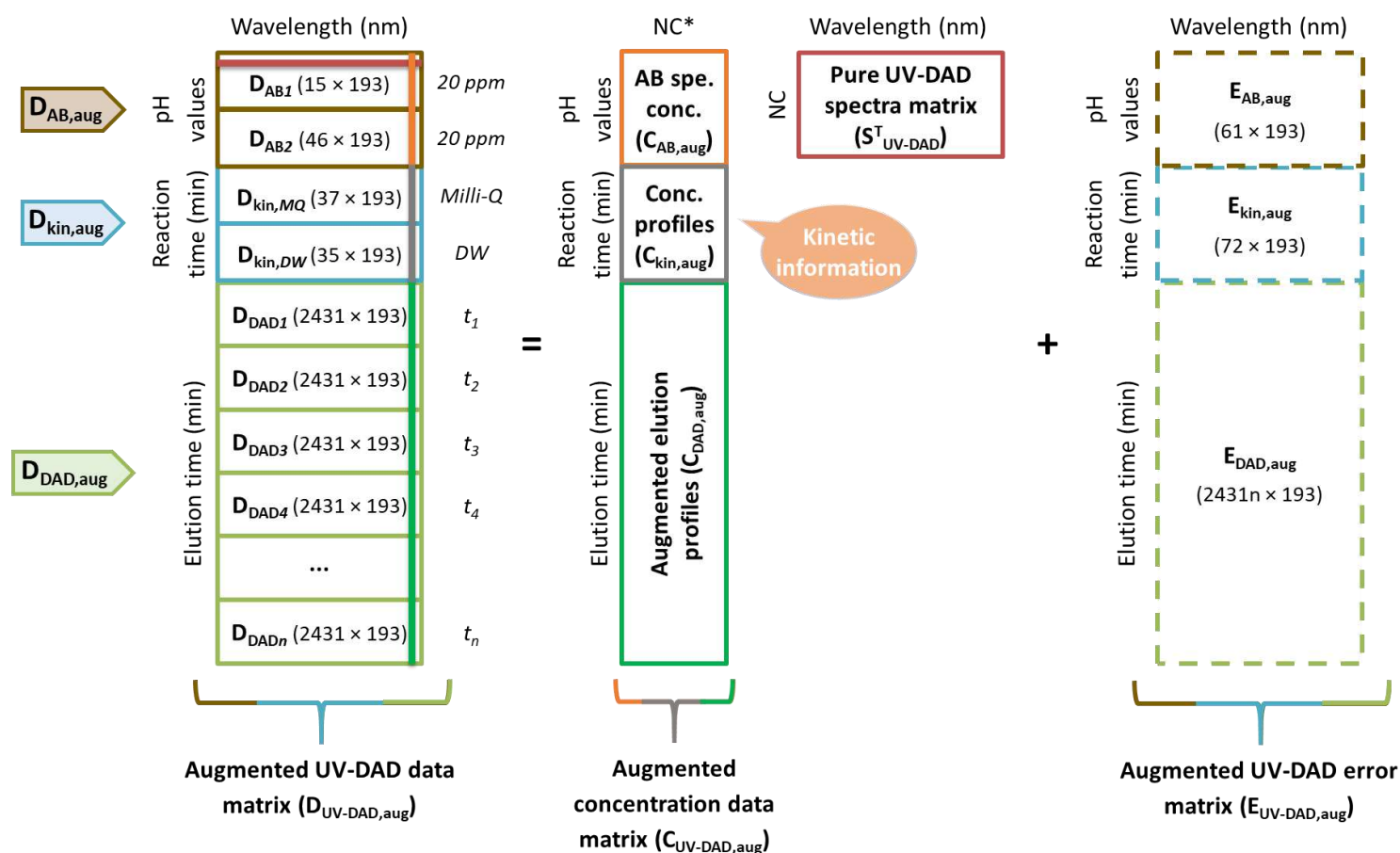
D'altra banda, igual que amb la matriu  $D_{k,aug}$  individual, la matriu  $S^T$  té el conjunt comú de perfils espectrals (és a dir, espectres UV-DAD, en aquest cas) dels  $NC$  components resolts presents en els diferents experiments concatenats (veure la **Figura 45**).



$$\text{Bilinear Model: } D_{AB-kin,aug} = [D_{AB,aug}; D_{kin,aug}] = [C_{AB,aug}; C_{kin,aug}] S^T_{UV} + [E_{AB,aug}; E_{kin,aug}] = C_{AB-kin,aug} S^T_{UV} + E_{AB-kin,aug}$$

**Figura 45.** Model de descomposició bilineal construït per a l'anàlisi conjunta (seguint una estratègia de fusió de dades) de les disposicions matriu augmentades multi-mostra proporcionades per un únic equip instrumental (en aquest cas, l'espectrofotòmetre UV-Visible), per als estudis de valoració àcid-base i de fotodegradació cinètica (matriu  $D_{AB-kin,aug}$ ). Aquest model segueix l'Equació (18) descrita anteriorment. \*NC: Nombre de components (número d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE II.

Adicionalment, l'Equació (18) o (19) també es pot utilitzar per explicar el model de descomposició bilineal de la matriu augmentada  $D_{UV-DAD,aug}$  (veure secció 5.1.2), creada a partir de tot el conjunt d'experiments analitzats amb la mateixa tècnica instrumental (en aquest cas, l'espectrofotometria UV-Visible, ja sigui a través de l'espectrofotòmetre durant el seguiment àcid-base i cinètic de la reacció o mitjançant l'anàlisi LC-DAD). Aquesta anàlisi proporcionarà la correspondència entre les espècies àcid-base i de fotodegradació directament, mostrant les seves respostes d'elució cromatogràfiques, i els seus corresponents perfils àcid-base i cinètics i els seus espectres UV-Vis purs associats en les matrius resoltes  $C_{UV-DAD,aug}$  i  $S^T$ , respectivament (veure la **Figura 46**).



$$\text{Bilinear Model: } D_{UV-DAD, aug} = [D_{AB, aug}; D_{kin, aug}; D_{DAD, aug}] = [C_{AB, aug}; C_{kin, aug}; C_{DAD, aug}] S^T_{UV-DAD} + [E_{AB, aug}; E_{kin, aug}; E_{DAD, aug}] \\ = C_{UV-DAD, aug} S^T_{UV-DAD} + E_{UV-DAD, aug}$$

**Figura 46.** Model de descomposició bilinear construït per a l'anàlisi conjunta (seguint una estratègia de fusió de dades) de les disposicions matricials augmentades multi-mostra proporcionades per diversos equips instrumentals (en aquest cas, l'espectrofotòmetre UV-Visible i el LC-DAD), que utilitzen en ambdós casos la mateixa tècnica de detecció (UV-DAD), per als estudis de valoració àcid-base, de fotodegradació cinètica i de LC-DAD del fàrmac SMX (matriu  $D_{UV-DAD, aug}$ ). Aquest model segueix l'Equació (18) descrita anteriorment. \*NC: Nombre de components (número d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE II.

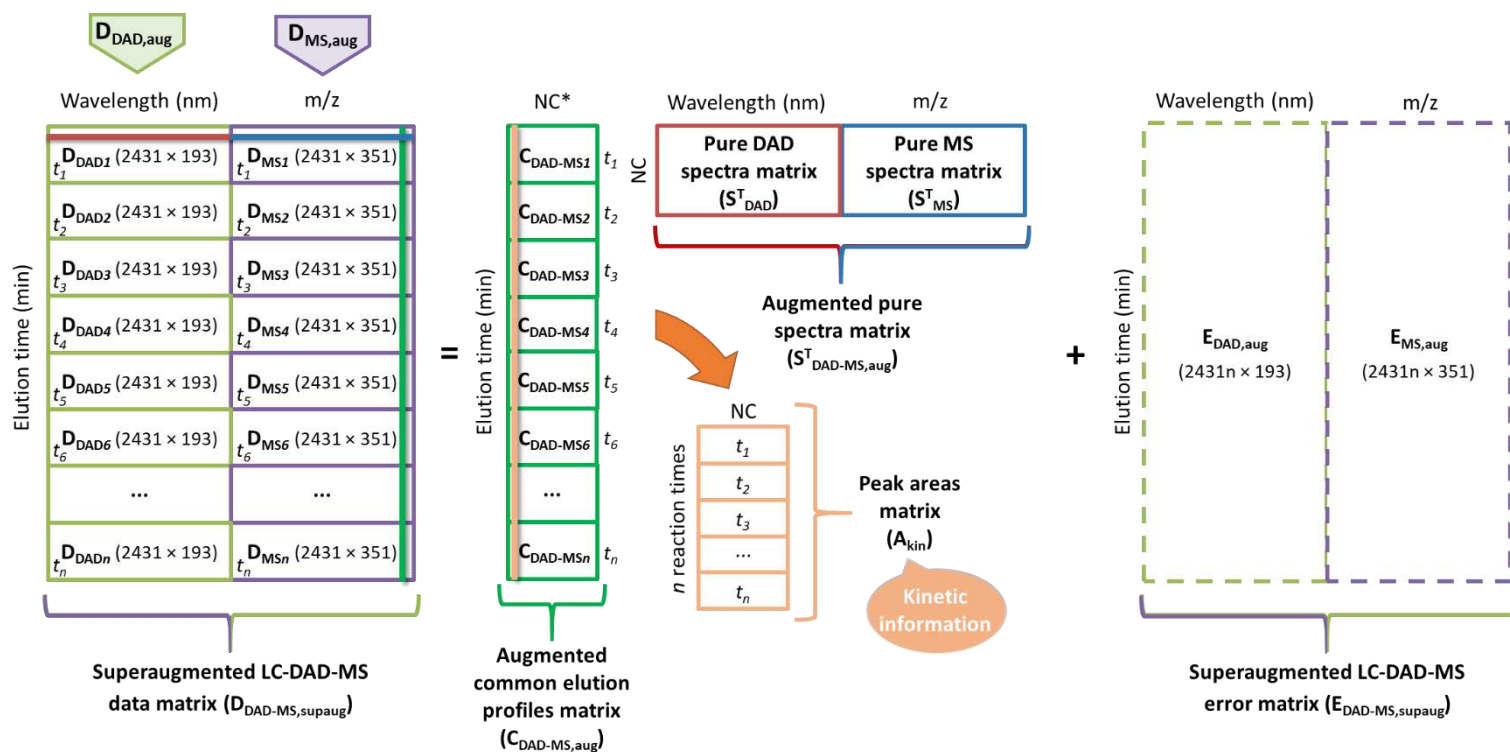
L'Equació (20), en canvi, descriu el model de descomposició bilinear creat per a l'estratègia de fusió de dades que considera l'anàlisi simultània de múltiples tècniques complementàries (en aquest cas, LC-DAD i LC-MS) disposades en una matriu completa superaugmentada per les files i les columnes (veure secció 5.1.2, matriu  $D_{DAD-MS, supaug}$ ). Aquest model proporciona informació complementària sobre les espècies de fotodegradació (en els perfils espectrals comuns UV-DAD i MS purs de la matriu  $S^T_{aug}$ , veure **Figura 47**), la qual cosa millora el poder de resolució del sistema estudiat (Mas, Tauler, et al., 2011).

$$\begin{aligned}
 \mathbf{D}_{1-k,\text{supaug}} &= [\mathbf{D}_{1,\text{aug}}, \mathbf{D}_{2,\text{aug}}, \dots, \mathbf{D}_{k,\text{aug}}] \\
 &= \left[ [\mathbf{D}_{1,1}; \mathbf{D}_{1,2}; \dots; \mathbf{D}_{1,n}], [\mathbf{D}_{2,1}; \mathbf{D}_{2,2}; \dots; \mathbf{D}_{2,n}], \dots, [\mathbf{D}_{k,1}; \mathbf{D}_{k,2}; \dots; \mathbf{D}_{k,n}] \right] \\
 &= [\mathbf{C}_1; \mathbf{C}_2; \dots; \mathbf{C}_n] [\mathbf{S}_1^T; \mathbf{S}_2^T; \dots; \mathbf{S}_k^T] \\
 &+ \left[ [\mathbf{E}_{1,1}; \mathbf{E}_{1,2}; \dots; \mathbf{E}_{1,n}], [\mathbf{E}_{2,1}; \mathbf{E}_{2,2}; \dots; \mathbf{E}_{2,n}], \dots, [\mathbf{E}_{k,1}; \mathbf{E}_{k,2}; \dots; \mathbf{E}_{k,n}] \right] \\
 &= \mathbf{C}_{\text{aug}} \mathbf{S}_{\text{aug}}^T + \mathbf{E}_{\text{supaug}}
 \end{aligned} \tag{20}$$

Aquesta Equació (20) també es pot escriure com:

$$\begin{aligned}
 \mathbf{D}_{1-k,\text{supaug}} &= [\mathbf{D}_{1,\text{aug}}, \mathbf{D}_{2,\text{aug}}, \dots, \mathbf{D}_{k,\text{aug}}] = \begin{bmatrix} \mathbf{D}_{1,1} & \mathbf{D}_{2,1} & \dots & \mathbf{D}_{k,1} \\ \mathbf{D}_{1,2} & \mathbf{D}_{2,2} & \dots & \mathbf{D}_{k,2} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \mathbf{D}_{1,n} & \mathbf{D}_{2,n} & \dots & \mathbf{D}_{k,n} \end{bmatrix} \\
 &= \begin{bmatrix} \mathbf{C}_1 \\ \mathbf{C}_2 \\ \dots \\ \mathbf{C}_n \end{bmatrix} [\mathbf{S}_1^T; \mathbf{S}_2^T; \dots; \mathbf{S}_k^T] + \begin{bmatrix} \mathbf{E}_{1,1} & \mathbf{E}_{2,1} & \dots & \mathbf{E}_{k,1} \\ \mathbf{E}_{1,2} & \mathbf{E}_{2,2} & \dots & \mathbf{E}_{k,2} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \mathbf{E}_{1,n} & \mathbf{E}_{2,n} & \dots & \mathbf{E}_{k,n} \end{bmatrix} \\
 &= \mathbf{C}_{\text{aug}} \mathbf{S}_{\text{aug}}^T + \mathbf{E}_{\text{supaug}}
 \end{aligned} \tag{21}$$

En aquestes Equacions (20) i (21),  $n$  es refereix al nombre de matrius diferents (mostres) adjuntades per columnes per als  $k$  diferents tipus d'experiments (és a dir, diferents tècniques de detecció emprades; en aquest cas, LC-DAD i LC-MS) considerats per a la seva anàlisi simultània, que estan concatenats en la direcció de les files. A més, a partir dels perfils d'elució comuns resolts en la matriu  $\mathbf{C}_{\text{aug}}$ , es poden calcular les seves àrees de pic en funció del temps de reacció i obtenir així les concentracions relatives dels components MCR corresponents, de manera que es poden deduir els respectius perfils cinètics de les espècies implicades en el procés de fotodegradació (veure **Figura 47**).

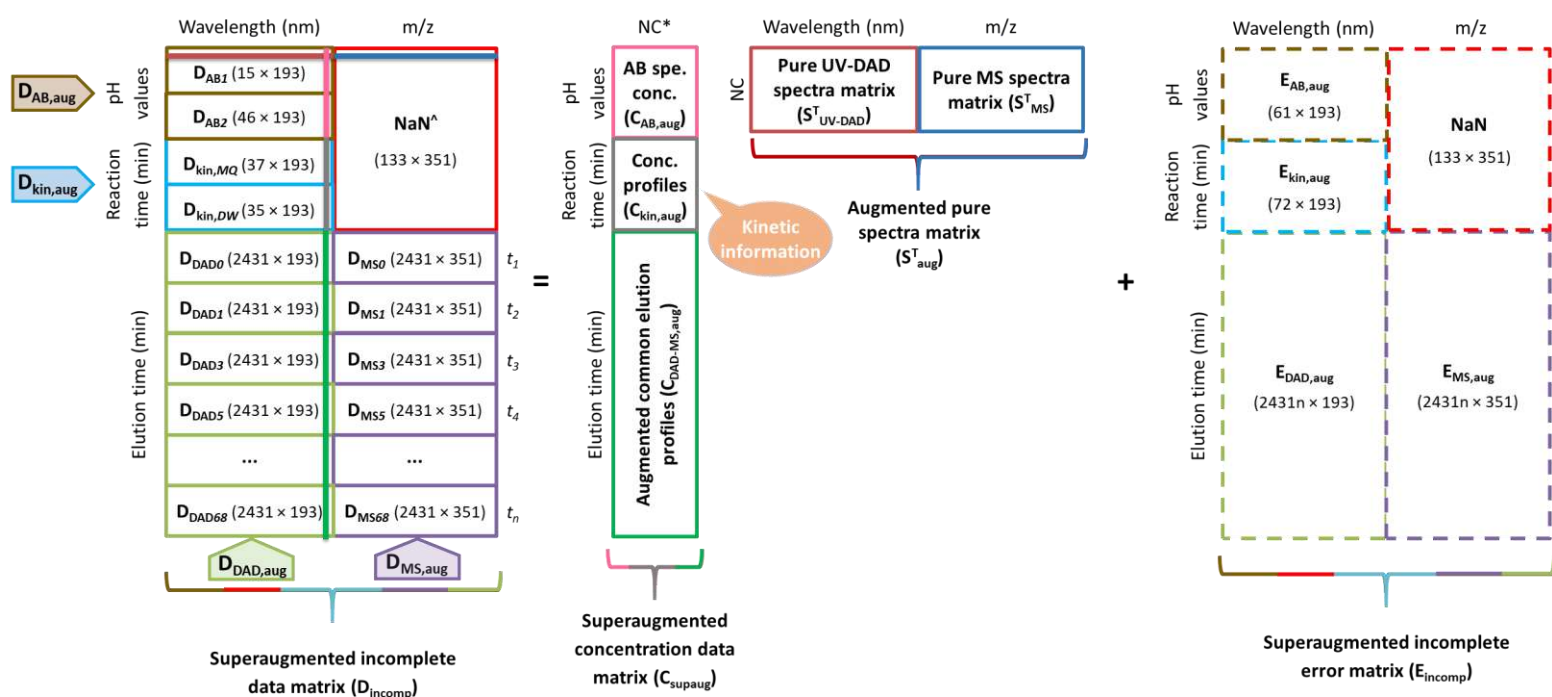


$$\begin{aligned} \text{Bilinear Model: } D_{DAD-MS,supaug} &= [D_{DAD,aug}, D_{MS,aug}] = C_{DAD-MS,aug} [S_{DAD}^T, S_{MS}^T] + [E_{DAD,aug}, E_{MS,aug}] \\ &= C_{DAD-MS,aug} S_{DAD-MS,aug}^T + E_{DAD-MS,supaug} \end{aligned}$$

**Figura 47.** Model de descomposició bilinear construït per a l'anàlisi conjunta (seguint una estratègia de fusió de dades) de les disposicions matricials augmentades multi-mostra proporcionades per un únic equip instrumental (en aquest cas, el LC-DAD-MS), per a l'estudi de l'anàlisi cromatogràfica del fàrmac SMX (matriu  $D_{DAD-MS,supaug}$ ). Aquest model segueix l'Equació (20) descrita anteriorment. \*NC: Nombre de components (número d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS). Figura reproduïda del Material Supl. de l'ARTICLE II.

Finalment, el model de descomposició bilinear creat per resoldre les estructures de dades incompletes ( $D_{incomp}$ ), que fusiona totes les dades obtingudes en un mateix estudi de fotodegradació de fàrmacs, es pot expressar mitjançant l'Equació (22). Aquest model permet fer la correspondència completa entre les espècies àcid-base (en el cas del SMX) i aquelles que intervenen en el procés de fotodegradació, interconnectant els perfils de distribució àcid-base, els perfils de concentració o cinètics, les elucions cromatogràfiques i els respectius espectres purs UV-Vis i MS de totes les espècies detectades en el sistema estudiat (veure **Figura 48**).

$$\begin{aligned}
 \mathbf{D}_{\text{incomp}} &= \left[ \left[ \mathbf{D}_{\text{I-k1,aug}}, \text{NaN} \right]; \mathbf{D}_{\text{1-k2,supaug}} \right] \\
 &= \left[ \left[ \mathbf{D}_{\text{I,aug}}, \mathbf{D}_{\text{II,aug}}, \dots; \mathbf{D}_{\text{k1,aug}} \right], \text{NaN} \right]; \left[ \mathbf{D}_{\text{1,aug}}, \mathbf{D}_{\text{2,aug}}, \dots, \mathbf{D}_{\text{k2,aug}} \right] \\
 &= \begin{bmatrix} \mathbf{C}_{\text{I,aug}} \\ \mathbf{C}_{\text{II,aug}} \\ \dots \\ \mathbf{C}_{\text{k1,aug}} \end{bmatrix} \left[ \mathbf{S}_1^T; \mathbf{S}_2^T; \dots; \mathbf{S}_{k2}^T \right] \\
 &+ \left[ \left[ \mathbf{E}_{\text{I,aug}}, \mathbf{E}_{\text{II,aug}}, \dots; \mathbf{E}_{\text{k1,aug}} \right], \text{NaN} \right]; \left[ \mathbf{E}_{\text{1,aug}}, \mathbf{E}_{\text{2,aug}}, \dots, \mathbf{E}_{\text{k2,aug}} \right] \\
 &= \mathbf{C}_{\text{supaug}} \mathbf{S}_{\text{aug}}^T + \mathbf{E}_{\text{incomp}}
 \end{aligned} \tag{22}$$

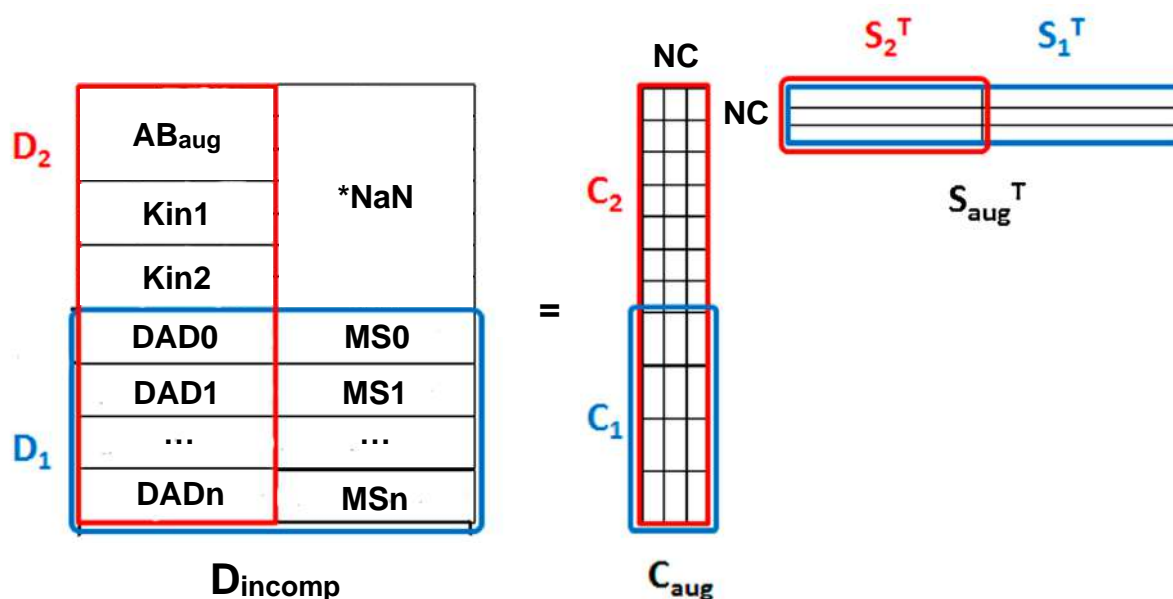


$$\begin{aligned}
 \text{Bilinear Model: } \mathbf{D}_{\text{incomp}} &= \left[ \left[ \mathbf{D}_{\text{AB,aug}}, \mathbf{D}_{\text{kin,aug}}, \text{NaN} \right]; \left[ \mathbf{D}_{\text{DAD,aug}}, \mathbf{D}_{\text{MS,aug}} \right] \right] \\
 &= \left[ \mathbf{C}_{\text{AB,aug}}, \mathbf{C}_{\text{kin,aug}}, \mathbf{C}_{\text{DAD-MS,aug}} \right] \left[ \mathbf{S}_{\text{UV-DAD}}^T, \mathbf{S}_{\text{MS}}^T \right] + \left[ \left[ \mathbf{E}_{\text{AB,aug}}, \mathbf{E}_{\text{kin,aug}}, \text{NaN} \right]; \left[ \mathbf{E}_{\text{DAD,aug}}, \mathbf{E}_{\text{MS,aug}} \right] \right] \\
 &= \mathbf{C}_{\text{supaug}} \mathbf{S}_{\text{aug}}^T + \mathbf{E}_{\text{incomp}}
 \end{aligned}$$

**Figura 48.** Model de descomposició bilinear construït per a l'anàlisi conjunta de totes les dades obtingudes en l'estudi del procés de fotodegradació del SMX: les dades àcid-base ( $\mathbf{D}_{\text{AB,aug}}$ ), les dades del seguiment cinètic de la degradació ( $\mathbf{D}_{\text{kin,aug}}$ ) i les dades de les anàlisis cromatogràfiques per LC-DAD ( $\mathbf{D}_{\text{DAD,aug}}$ ) i LC-MS ( $\mathbf{D}_{\text{MS,aug}}$ ). Aquest model segueix l'Equació (22) descrita anteriorment. \*NC: Nombre de components (número d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS), ^NaN: notació emprada per MATLAB® per indicar els valors absents.

Realment, aquest multi-conjunt de dades incompletes mostrat en l'anterior figura està constituït per dues submatrius completes, com es pot veure en la **Figura 49**. Una primera matriu àmplia que, per abreviar, anomenarem  $\mathbf{D}_1$ , formada per la

concatenació horitzontal o fusió de les matrius amb les dades cromatogràfiques augmentades per files i columnes dels detectors DAD i MS i, una segona matriu de dades augmentada per columnes molt llarga,  $D_2$ , que inclou d'una banda les dades de la valoració àcid-base i de la fotodegradació cinètica UV-Visible i, d'altra banda, les dades LC-DAD. L'augment per columnes d'aquesta darrera matriu és possible en aquest cas perquè la resolució espectral UV-Vis és coincident (és a dir, les columnes de la matriu tenen el mateix significat espectral) per als tres tipus de matrius de dades concatenades: titulació, dades cinètiques i LC-DAD, com s'ha esmentat prèviament.



**Figura 49.** Representació dels blocs compartits (submatrius de dades completes) en la descomposició bilineal de la matriu augmentada incompleta ( $D_{incomp}$ ). *\*NaN*: notació emprada per MATLAB® per indicar els valors absents. Figura adaptada de (De Luca, Ragno et al., 2014).

En la **Figura 49** s'observa que en aquest model bilineal, les matrius  $D_1$  i  $D_2$  comparteixen els blocs de dades cromatogràfiques LC-DAD, i que en la descomposició de dades de  $D_{incomp}$ ,  $C_1$  es comparteix a  $C_{aug}$  i  $S_2^T$  es comparteix a  $S_{aug}^T$ . La descomposició bilineal per MCR-ALS de les matrius  $D_1$  i  $D_2$  es pot realitzar de manera separada (Alier & Tauler, 2013) o simultàniament, utilitzant una nova implementació de l'algorisme ALS de resolució directa dels sistemes equacions on s'obvien les parts buides o NaN (treball pendent encara de publicació).

En la implementació ja publicada d'aquest procediment de resolució del MCR-ALS, dissenyat per resoldre múltiples conjunts de dades incomplets com el dispost a  $D_{incomp}$ , s'utilitzen diferents funcions d'error de mínims quadrats, una per a cadascuna

de les dues matrius de dades completes augmentades anteriorment definides,  $\mathbf{D}_1$  i  $\mathbf{D}_2$ . Aquestes dues funcions s'optimitzen simultàniament (sumant sospesant les dues funcions d'error individuals en una funció d'error total) per trobar una estimació òptima de la concentració i els perfils espectrals que descriuen simultàniament tots els conjunts de dades inclosos (Alier & Tauler, 2013).

En aquesta descomposició bilineal de  $\mathbf{D}_1$  i  $\mathbf{D}_2$  segons l'equació general del mètode MCR-ALS, l'Equació (6) del Capítol 4, la matriu de concentració  $\mathbf{C}_1$  té les mateixes files que  $\mathbf{D}_1$  i la matriu de concentració  $\mathbf{C}_2$  té les mateixes files que  $\mathbf{D}_2$ . D'altra banda, la matriu d'espectres purs  $\mathbf{S}_1^T$  té les mateixes columnes de  $\mathbf{D}_1$ , mentre que la matriu d'espectres purs  $\mathbf{S}_2^T$  té les mateixes columnes de  $\mathbf{D}_2$ . Els blocs de dades absents (matrius de dades que falten) es poden estimar a partir dels resultats finals. En el càlcul de les matrius de concentració a partir del conjunt de dades incomplet, ens trobem amb dues situacions diferents: a) l'avaluació de la matriu  $\mathbf{C}_1$  a partir de la matriu de dades  $\mathbf{D}_1$  que té en compte les dades corresponents només a les dades comunes entre DAD i MS; i b) l'avaluació de la matriu  $\mathbf{C}_2$  a partir de la matriu de dades  $\mathbf{D}_2$  que només té en compte les dades corresponents a les dades UV-Visible i DAD. En tots els casos, el càlcul matemàtic implica la multiplicació de la matriu de dades augmentada adequada,  $\mathbf{D}_1$  o  $\mathbf{D}_2$  per la pseudoinversa de la matriu de perfils de espectrals corresponent,  $\mathbf{S}_1^T$  i  $\mathbf{S}_2^T$  respectivament, segons les Equacions (8) i (9) del Capítol 4. Amb aquest objectiu, les files i columnes adequades de la matriu de dades incompleta representada en la **Figura 49** es seleccionaran per formar dues submatrius de dades invertibles rectangulars amb les que operar. Cada iteració de l'algorisme ALS resol, doncs, les següents equacions:

Tenint en compte la matriu de dades  $\mathbf{D}_1$ , el càlcul de la matriu de concentració  $\mathbf{C}_1$  utilitzant l'estimació actual de  $\hat{\mathbf{S}}_1^T$ : i l'optimització mínim-quadràtica no-negativa s'obté de:

$$\min_{\mathbf{C}_1, \text{restriccions}} \|\hat{\mathbf{D}}_{1, \text{PCA}} - \hat{\mathbf{C}}_1 \hat{\mathbf{S}}_1^T\|, \text{ amb } \hat{\mathbf{C}}_1 = \text{fnls}(\hat{\mathbf{D}}_{1, \text{PCA}}, \hat{\mathbf{S}}_1^T) \quad (23)$$

I, al mateix temps, el càlcul de la matriu espectral  $\hat{\mathbf{S}}_1^T$  a partir de l'estimació recentment obtinguda de  $\hat{\mathbf{S}}_1^T$ :

$$\min_{\hat{\mathbf{S}}_1^T, \text{restriccions}} \|\hat{\mathbf{D}}_{1,\text{PCA}} - \hat{\mathbf{C}}_1 \hat{\mathbf{S}}_1^T\|, \text{ amb } \hat{\mathbf{S}}_1^T = \text{fnls}(\hat{\mathbf{D}}_{1,\text{PCA}}, \hat{\mathbf{C}}_1) \quad (24)$$

On  $\hat{\mathbf{D}}_{1,\text{PCA}}$  es la matriu  $\mathbf{D}_1$  projectada per PCA amb el nombre de components considerats en la resolució. De la mateixa manera, les Equacions (2) i (4) es poden reescriure per al càlcul de  $\hat{\mathbf{C}}_2$  a partir de les estimacions de  $\hat{\mathbf{S}}_2^T$  i  $\hat{\mathbf{D}}_{2,\text{PCA}}$ , i viceversa, corresponents a l'anàlisi de la matriu  $\mathbf{D}_2$ .

La matriu  $\hat{\mathbf{C}}_{\text{aug}}$  final es calcula mitjançant la juxtaposició per columnes de les dues matrius de concentració:

$$\hat{\mathbf{C}}_{\text{aug}} = \{\hat{\mathbf{C}}_1; \hat{\mathbf{C}}_2\} \quad (25)$$

Quan hi ha coincidències a les files, la matriu  $\hat{\mathbf{C}}_1$  preval sobre  $\hat{\mathbf{C}}_2$  perquè  $\mathbf{D}_1$  és la matriu que hauria de contenir informació més fiable ja que s'ha obtingut amb l'espai vectorial complet de les columnes (veure **Figura 49**). Hi ha diferents possibilitats d'obtenir aquesta estimació final de la matriu  $\hat{\mathbf{C}}_{\text{aug}}$  a partir de  $\hat{\mathbf{C}}_1$  i  $\hat{\mathbf{C}}_2$  que s'estan estudiant en l'actualitat (treball pendent encara de publicació).

D'altra banda, la matriu espectral final corresponent s'estima mitjançant la següent equació:

$$\hat{\mathbf{S}}_{\text{aug}}^T = \{\hat{\mathbf{S}}_1^{T*}; \hat{\mathbf{S}}_2^T\} \quad (26)$$

On  $\hat{\mathbf{S}}_1^{T*}$  s'estima com la mitjana de les parts comunes de  $\hat{\mathbf{S}}_1^T$  i  $\hat{\mathbf{S}}_2^T$  corresponents a les columnes comunes de les matrius  $\mathbf{D}_1$  i  $\mathbf{D}_2$  (veure **Figura 49**).

$$\hat{\mathbf{S}}_1^{T*} = \frac{1}{2}(\hat{\mathbf{S}}_1^T + \hat{\mathbf{S}}_2^T) \quad (27)$$

Com en el cas anterior per la matriu de concentracions  $\hat{\mathbf{C}}_{\text{aug}}$ , hi ha també en aquest cas diferents possibilitats d'obtenir aquesta estimació final de la matriu espectral  $\hat{\mathbf{S}}_{\text{aug}}^T$ , que s'estan estudiant actualment (treball pendent encara de publicació).

Tanmateix, en l'aproximació actual, com que alguns dels paràmetres del model (les matrius factorials  $\hat{\mathbf{C}}_1$  i  $\hat{\mathbf{S}}_1^T$ ) estan presents en els dos models complets, l'anàlisi simultània d'aquests dos models bilineals per MCR-ALS es realitza mitjançant la minimització d'una suma global de quadrats residuals (en anglès, *residual squares sum*, RSS) dels dos models bilineals. Aquesta suma es pot expressar com la suma



de funcions d'error de mínims quadrats a minimitzar en les diferents iteracions per ALS corresponents a les matriu de dades  $\mathbf{D}_1$  i  $\mathbf{D}_2$ , que es defineixen de la següent manera:

$$RSS_1 = \sum_{i=1}^{I_1} \sum_{j=1}^{J_1} \left( \mathbf{d}_{1,ij} - \sum_{n=1}^N \hat{\mathbf{c}}_{1,i,n} \hat{\mathbf{s}}_{1,j,n}^T \right)^2 \quad (28)$$

obtinguda per a  $\mathbf{D}_1$  a partir dels residuals calculats utilitzant les matrius  $\hat{\mathbf{C}}_1$  i  $\hat{\mathbf{S}}_1^T$  estimades. I, de manera similar per a  $\mathbf{D}_2$ :

$$RSS_2 = \sum_{i=1}^{I_2} \sum_{j=1}^{J_2} \left( \mathbf{d}_{2,ij} - \sum_{n=1}^N \hat{\mathbf{c}}_{2,i,n} \hat{\mathbf{s}}_{2,j,n}^T \right)^2 \quad (29)$$

emprant, en aquest cas, les matrius  $\hat{\mathbf{C}}_2$  i  $\hat{\mathbf{S}}_2^T$  calculades. En aquestes dues equacions,  $I_1$ ,  $J_1$ ,  $I_2$  i  $J_2$  són, respectivament, el nombre de files i columnes de les matrius  $\mathbf{D}_1$  i  $\mathbf{D}_2$ .

Les Equacions (28) i (29), doncs, es poden combinar en una nova funció d'error global:

$$RSS = RSS_1 + RSS_2 \quad (30)$$

Aquesta funció d'error combinada, que inclou la suma residual de quadrats dels dos possibles multi-conjunts complets derivats del multi-conjunt original de dades incompletes, intenta minimitzar les dues funcions d'error  $RSS_1$  i  $RSS_2$  simultàniament.

Aquest procediment d'anàlisi simultània de conjunts de dades incompletes, ha estat emprada en aquesta Tesi a l'anàlisi de totes les dades obtingudes en l'estudi del procés de fotodegradació del SMX mitjançant les diverses tècniques descrites anteriorment. Cal remarcar que en aquest anàlisi de dades incompletes es pot també aplicar la restricció de model trilineal/igualtat de forma als perfils d'elució d'alguns dels components resolts (veure secció 5.3.2 més endavant) en algunes de les matrius de dades simultàniament analitzades.

En un estudi addicional, s'ha aplicat el mètode descrit anteriorment en l'anàlisi global de les dades obtingudes en el seguiment del procés de fotodegradació del TAM emprant l'espectroscòpia de fluorescència multidimensional conjuntament amb l'espectrofotometria UV-Visible i, posteriorment, analitzant per LC-DAD-FLD diferents

alíquotes obtingudes durant el procés de fotodegradació. Els resultats d'aquest estudi, estan en elaboració i seran publicats en un darrer article científic derivat d'aquesta Tesi doctoral (treball pendent encara de publicació).

### 5.3. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS EN ELS PROCESSOS DE DEGRADACIÓ ESTUDIATS

#### 5.3.1. FOTODEGRADACIÓ DEL TAMOXIFÈ (TAM)

➤ *Anàlisi del seguiment espectrofotomètric UV de la reacció de fotodegradació*

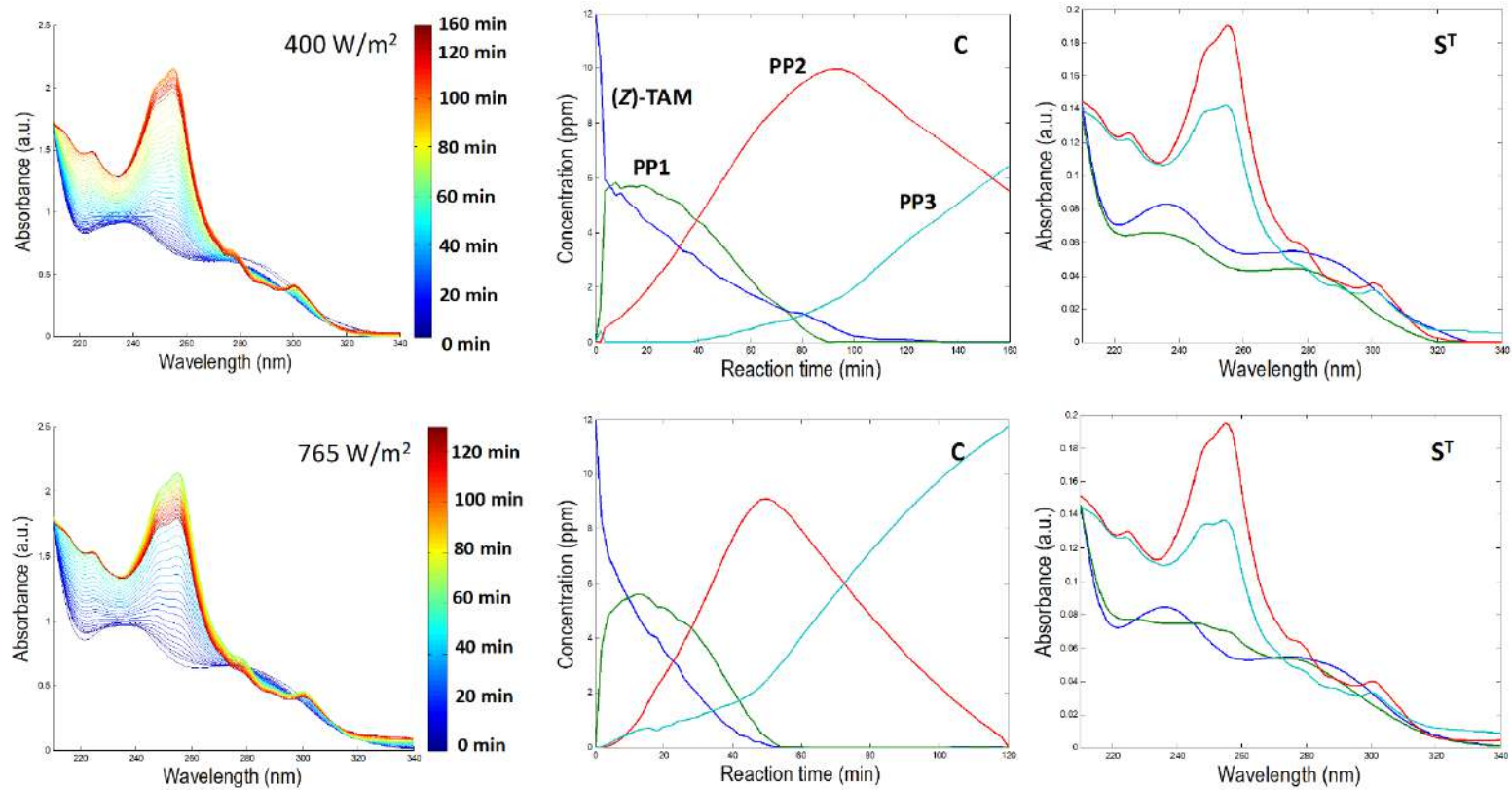
El procés de fotodegradació del TAM es va controlar en primer lloc mitjançant espectroscòpia d'absorció molecular UV-Visible. La **Figura 50** (a la part esquerra), presentada més endavant, mostra l'evolució dels espectres adquirits al llarg del temps de reacció (irradiació) dels dos experiments realitzats amb el SUNTEST® a 400 i 765 W·m<sup>-2</sup>; més concretament, durant els 160 i els 120 min que van durar ambdós experiments, respectivament. El gràfic d'aquestes dues matrius de dades ( $D_{d400sp}$  i  $D_{d765sp}$ ) proporciona una visió inicial de l'evolució del procés de fotodegradació. Es pot observar que durant la primera part dels experiments (els primers 40 min aproximadament) la variació dels espectres és més gran (canvien més de color) que més tard, durant la resta del procés. Aquest fet, suggereix que es produeixen grans transformacions químiques al començament del procés de fotodegradació, que evoluciona més lentament després.

L'anàlisi MCR-ALS de les dades espectrofotomètriques UV-Visible d'aquests dos experiments proporciona una primera estimació dels perfils cinètics (perfils de concentració, matriu **C** a l'Equació (6) i la **Figura 50**) de les espècies formades durant el procés de fotodegradació del TAM, i també dels espectres UV-Vis purs associats a aquests components (matriu  $S^T$  a l'Equació (6) i la **Figura 50**). L'anàlisi inicial per SVD de les matrius, va mostrar la possible presència d'almenys quatre espècies durant el procés de fotodegradació del TAM (rang químic o matemàtic en absència de soroll experimental de la matriu de dades associada a aquest procés). Les estimacions inicials dels seus espectres es van obtenir a partir dels espectres experimentals més purs (utilitzant el mateix mètode que en el SIMPLISMA (Windig, Bogomolov, et al., 2020)). Les restriccions utilitzades durant l'optimització ALS van ser la no negativitat

( $NM$ ) dels espectres purs i dels perfils cinètics, i la selectivitat ( $SeI.$ ) en el punt de partida de l'experiment de fotodegradació (inicialment, el ( $Z$ )-TAM és l'únic component a les condicions d'inici de l'experiment de fotodegradació). Suposant també que tots els fotoproductes de degradació formats tenen absorbància a la regió UV-Visible investigada, es va aplicar la restricció de sistema tancat (*closure*) als perfils de concentració (cinètics) per garantir el compliment del balanç de matèria. Es va confirmar el compliment d'aquesta restricció de sistema tancat per part de les dades en comprovar que l'ajust de les dades no va empitjorar quan es va aplicar aquesta restricció en comparació a quan no es va tenir en consideració. Les variàncies explicades ( $R^2$ , en %) i els valors de manca d'ajust (*lof*, en %) de l'anàlisi MCR-ALS per a quatre components del seguiment espectrofotomètric del procés de fotodegradació del TAM a les dues condicions de potència d'irradiació estudiades són els següents: per a la matriu  $D_{d400sp}$  (experiment a  $400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ), un *lof* de 0,53% i un  $R^2$  de 99,99%, i per la matriu  $D_{d765sp}$  (experiment a  $765 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ), un *lof* de 0,28% i un  $R^2$  de 99,99%. Per tant, en ambdós casos, es va obtenir un excel·lent ajust de les dades.

La **Figura 50** mostra també els perfils de concentració (perfils cinètics, matriu  $C$ ) i els espectres UV-Vis purs (matriu  $S^T$ ) resolts per MCR-ALS en aquests dos experiments de fotodegradació del TAM. Durant l'experiment a  $400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  (part superior de la figura), el tamoxifè (( $Z$ )-TAM), es representa amb una **línia blava**. Es pot observar en el gràfic que, després d'uns 5 min d'irradiació amb llum UV, la seva concentració va disminuir a la meitat de la concentració inicial (d'uns 12 ppm) i que aquesta espècie va continuar reduint-se fins a desaparèixer més tard (al voltant dels 120 min d'irradiació). Simultàniament, durant aquest període de temps, es va formar ràpidament un primer producte de transformació (**TP1**, representat amb una **línia verda** a la **Figura 50**), el perfil cinètic del qual va anar també disminuint i finalment va desaparèixer (prop dels 100 min de reacció). Al mateix temps, un nou fotoproducte (**TP2**, identificat amb una **línia vermella** a la **Figura 50**) va aparèixer a l'inici de l'experiment, assolint el seu nivell de concentració màxim als 90 min a  $400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  i, seguidament, va minvar la seva presència. Paral·lelament a la disminució de **TP1**, apareix un nou fotoproducte (**TP3**, representat amb una **línia cian** a la **Figura 50**),

amb un espectre molt semblant al **TP2**, mostrant una concentració creixent fins al final de l'experiment (els 160 min d'irradiació).



**Figura 50.** Evolució espectral al llarg del temps per al seguiment espectrofotomètric UV-Visible dels experiments de fotodegradació del fàrmac tamoxifè (TAM) a 400 i 765 W·m<sup>-2</sup> (matrius  $D_{d400sp}$  i  $D_{d765sp}$ ) i els seus perfils cinètics (C) i els espectres UV-VIS purs ( $S^T$ ) resolts per MCR-ALS. Figura reproduïda de l'ARTICLE I.

Quan la potència d'irradiació es va augmentar a 765 W·m<sup>-2</sup>, el procés de fotodegradació es va produir més ràpidament, però essencialment va seguir la mateixa via de reacció, com també es pot veure a la **Figura 50**. Les lleugeres diferències observades en els espectres UV-Vis d'ambdues resolucions, especialment amb **TP1** (línia verda), molt probablement es deuen a ambigüitats rotacionals encara no resoltes amb aquest enfocament de resolució individual de les dues matrius. Com es mostra a la **Figura 50**, aquesta espècie **TP1** té el seu perfil de concentració completament superposat amb els de les altres espècies, així com també el seu espectre UV es molt semblant al del **(Z)-TAM** inicial. Aquest fet, descrit al Capítol 4, no permet la resolució correcta i inequívoca dels perfils resolts. Tanmateix, els resultats de l'anàlisi MCR-ALS de la matriu combinada  $D_{d400sp,d765sp}$ , corresponent a l'anàlisi simultània del sistema a les dues potències d'irradiació, emprant el mateix nombre de components i les mateixes restriccions imposades en el

procés d'optimització ALS, són molt semblants: un *lof* de 0,33% i un  $R^2$  de 99,99%. Els espectres UV-Vis dels components purs (matriu  $S^T$ ) d'aquesta resolució conjunta són molt similars als mostrats a la **Figura 50** i l'espectre UV-Vis del **TP1** és aproximadament una mitjana dels obtinguts en les resolucions MCR-ALS individuals.

Malgrat aquesta informació rellevant sobre la cinètica de degradació del TAM obtinguda per espectroscòpia UV-Visible, només es pot considerar que és una descripció aproximada del procés a causa dels problemes associats amb la resolució de processos cinètics (Izquierdo-Ridora, Saurina, et al., 1997; Mas, Tauler, et al., 2011) on els perfils de concentració es troben molt superposats i poden ser linealment dependents. Com s'ha constatat, les espècies químiques amb una cinètica semblant i els fotoproductes amb espectres UV-Vis molt similars, no es distingeixen fàcilment amb aquest enfocament de resolució de les dades. A més, també és possible que alguns dels fotoproductes formats no mostrin absorció UV-Visible i, per tant, no es puguin detectar mitjançant aquesta tècnica. L'ús complementari de la metodologia analítica LC-DAD-MS, i del potencial intrínsec de la separació cromatogràfica, pot proporcionar una visió més detallada de les diferents espècies formades durant el procés de fotodegradació i de la seva via de reacció, així com permetre una correcta resolució de totes elles.

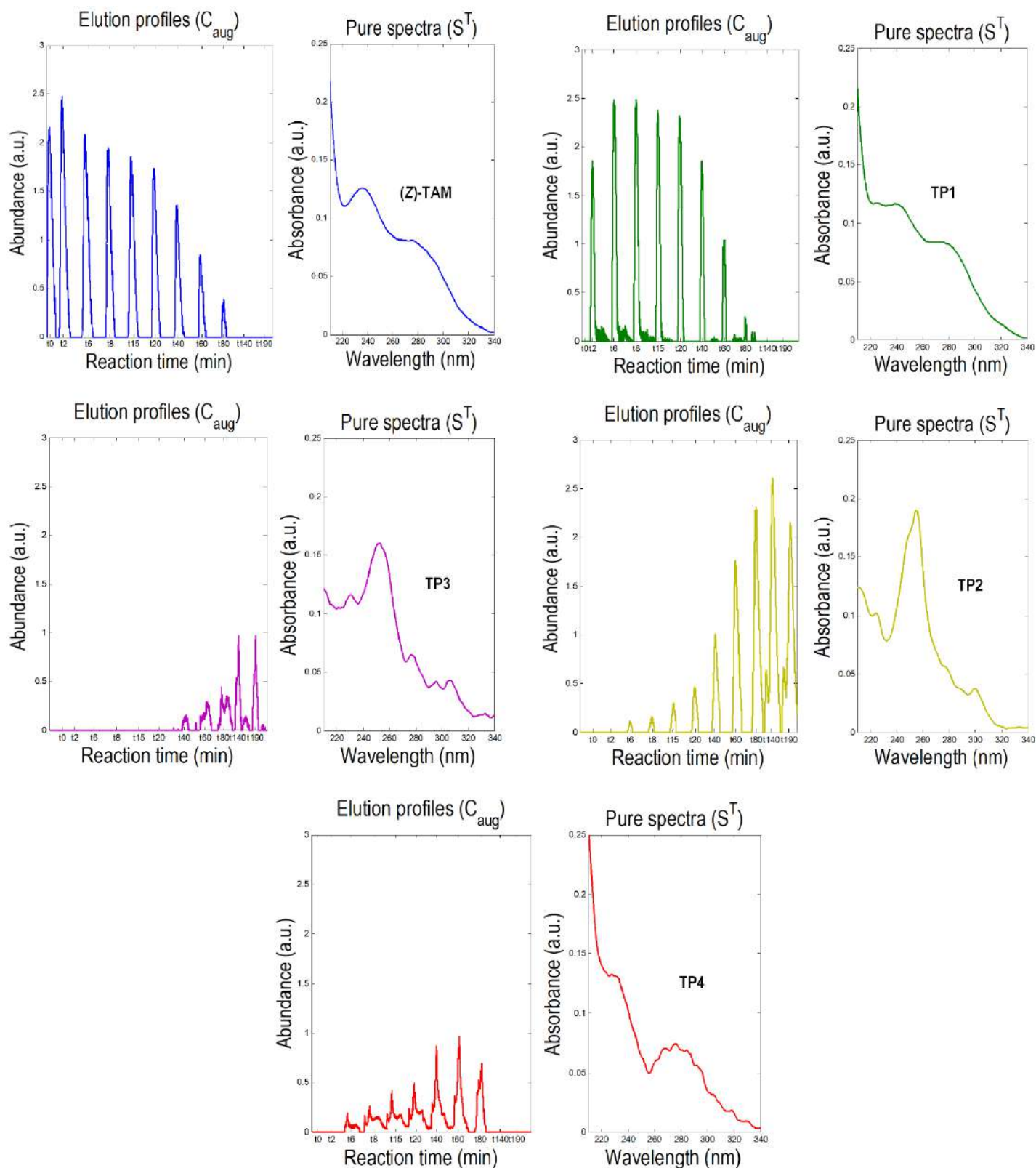
### ➤ *Anàlisi cromatogràfica (LC-DAD i LC-MS) del procés de fotodegradació*

Així doncs, es van analitzar per LC-DAD-MS 11 alíquotes de mostra de la solució del TAM recollides en diversos moments al llarg de la reacció de fotodegradació per a cada experiment realitzat en les dues condicions de potència d'irradiació estudiades. Per millorar la resolució dels possibles pics cromatogràfics coeluits, es va aplicar el mètode MCR-ALS als conjunts de dades obtinguts mitjançant mètodes de detecció d'adquisició completa (*full scan*) UV-DAD i MS, tal com s'ha explicat en el Capítol 3. Els resultats de LC-MS es van utilitzar majoritàriament per a la identificació i confirmació dels fotoproductes formats. Els resultats obtinguts en les anàlisis MCR-ALS individuals i simultànies del conjunt d'alíquotes es troba resumit a la Taula 2 de l'**ARTICLE I**. Les restriccions utilitzades en aquestes anàlisis MCR-ALS van ser la no-negativitat dels perfils **C** i  $S^T$  i la unimodalitat i la selectivitat del perfil **C**. Aquestes dues últimes restriccions van ser especialment útils per resoldre els perfils d'espècies d'alguns dels fotoproductes i per ignorar les contribucions de fons. Com es mostra a

la Taula 2 de l'**ARTICLE I**, el nombre de components considerats en cada resolució individual va variar de 2 (en el temps de reacció 0 min) a 7 (en els últims valors de temps de reacció). Els senyals LC-DAD i LC-MS enregistrats tenen encara algunes contribucions de soroll instrumental, de línia base i de fons associades. Quan aquestes contribucions són sistemàtiques i no canvien a l'atzar, es poden modelar com a components MCR-ALS addicionals (amb un perfil cromatogràfic (**C**) i una senyal espectral (**S<sup>T</sup>**)). Així, per aconseguir una millor resolució del sistema, s'acostumen a introduir en el model més components que els químicament rellevants associats al procés investigat. En aquest cas particular, es va modelar la presència de fortes contribucions cromatogràfiques de la línia base (relacionades amb l'eluent cromatogràfic o fase mòbil, que presentava un senyal important en LC-DAD) i del senyal del soroll de fons instrumental dels detectors amb dos components MCR-ALS addicionals (no rellevants químicament) que van permetre un millor ajust de les dades i una millora de la resolució dels perfils dels altres quatre fotoproductes i del **(Z)-TAM** inicial. A aquests dos components addicionals de MCR-ALS només es van aplicar restriccions de no-negativitat en ambdós modes (perfils **C** i **S<sup>T</sup>**). Finalment, només cinc dels set components resolts per MCR-ALS, inclòs el TAM inicial, es van assignar a productes de fotodegradació del TAM. Els valors de la manca d'ajust (*lof*) de la resolució d'aquestes matrius de dades sempre van ser bons, entre l'1 i el 3% en el cas de les dades LC-DAD, i entre el 2 i el 5% en el cas de les dades LC-MS, les quals tenien més soroll de fons.

Seguidament, un cop conegudes les espècies presents a cada temps de reacció (és a dir, a cada alíquota examinada), es va realitzar l'anàlisi simultània MCR-ALS del conjunt complet d'injeccions cromatogràfiques per a cada potència estudiada i detecció emprada (matrius **D<sub>400DAD,aug</sub>**, **D<sub>765DAD,aug</sub>**, **D<sub>400MS,aug</sub>** i **D<sub>765MS,aug</sub>**). Les restriccions utilitzades en aquestes anàlisis MCR-ALS van ser: la no-negativitat de **C** i **S<sup>T</sup>** i la unimodalitat de **C**. A més el número i correspondència entre les espècies en les diferents mostres analitzades (diferents injeccions) també es va limitar per tal d'establir la presència/absència dels components en elles (en les diferents injeccions cromatogràfiques) en la matriu de concentracions augmentada **C<sub>aug</sub>**. Els resultats (*lof* i  $R^2$ ), globalment són bons, i es troben resumits també a la Taula 2 de l'**ARTICLE I**.

En la **Figura 51** es mostra com a exemple els perfils d'elució ( $C_{aug}$ ) i els espectres UV-Vis purs ( $S^T$ ) obtinguts en la resolució de la matriu  $D_{400DAD, aug}$ .



**Figura 51.** Perfils d'elució ( $C_{aug}$ ) i espectres UV-Vis purs ( $S^T$ ) resolts mitjançant l'anàlisi MCR-ALS simultània de les dades LC-DAD de les 11 al·lotques de mostra de l'experiment de fotodegradació del TAM realitzat a  $400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $D_{400DAD, aug}$ ). Figura reproduïda de l'ARTICLE I.

En la **Figura 51** el component **blau** s'assigna al tamoxifè inicial ((**Z**)-**TAM**), i el component **verd** al primer producte de transformació format immediatament després de la seva exposició inicial a la llum (**TP1**). A causa de la similitud entre els espectres UV-Vis d'aquests dos components, es pot suposar que el component **verd** hauria de tenir una estructura molt semblant al tamoxifè, indicant per tant que podria ser el seu isòmer ((**E**)-**TAM**). El seu espectre de MS va confirmar aquesta hipòtesi i també els resultats anteriors trobats a la literatura (Šalamoun, Macka, et al., 1990). Els components **TP2 (groc)** i **TP3 (magenta)** de la **Figura 51** es corresponen, respectivament, amb els components **vermell** i **cian** de la **Figura 51**, obtinguts anteriorment en l'anàlisi dels experiments de monitorització espectroscòpica UV-Visible. Aquestes dues espècies s'han diferenciat correctament entre si a partir dels seus perfils d'elució cromatogràfics lleugerament desplaçats, tot i que els seus espectres UV-Vis són també molt similars. La resolució dels seus espectres de MS confirmarà aquests dos fotoproductes i donarà més informació sobre la seva identitat. Finalment, es pot assignar una nova darrera espècie (**TP4**) al component **vermell** de la **Figura 51**, que apareix després de 6 min d'irradiació UV i desapareix al final del procés de fotodegradació. Aquest component, però, no es va resoldre en l'anàlisi dels experiments de monitorització amb espectroscòpica UV-Visible de la degradació. Les bandes d'absorbància de cadascun dels components resolts es detallen més endavant en abordar la resolució simultània del seguiment espectrofotomètric UV-Visible de la degradació i les anàlisis cromatogràfiques LC-DAD.

La resolució simultània de les matrius LC-MS augmentades  $D_{400MS, aug}$  i  $D_{765MS, aug}$ , en canvi, va ser més delicada. La presència d'isòmers entre els fotoproductes obtinguts ((**Z**)-**TAM/TP1** i **TP2/TP3**), tal com es confirmarà més endavant, implica que aquestes espècies tindran la mateixa massa molecular (mateix ió molecular,  $[M + H]^+$ ) i, probablement, una fragmentació semblant. Aquest fet, dificulta la resolució de les diferents espècies emprant únicament els espectres de masses en existir ambigüitats entre els diferents components. Les restriccions d'unimodalitat (U) i selectivitat (Sel.), com s'ha comentat anteriorment, són especialment útils per resoldre els perfils dels fotoproductes d'isòmers i per ignorar les contribucions del soroll de fons. De fet, la seva correcta aplicació ha permès la resolució adequada d'aquests compostos en el detector UV-DAD, a causa de la seva elució cromatogràfica lleugerament desplaçada i de petites diferències en els seus espectres



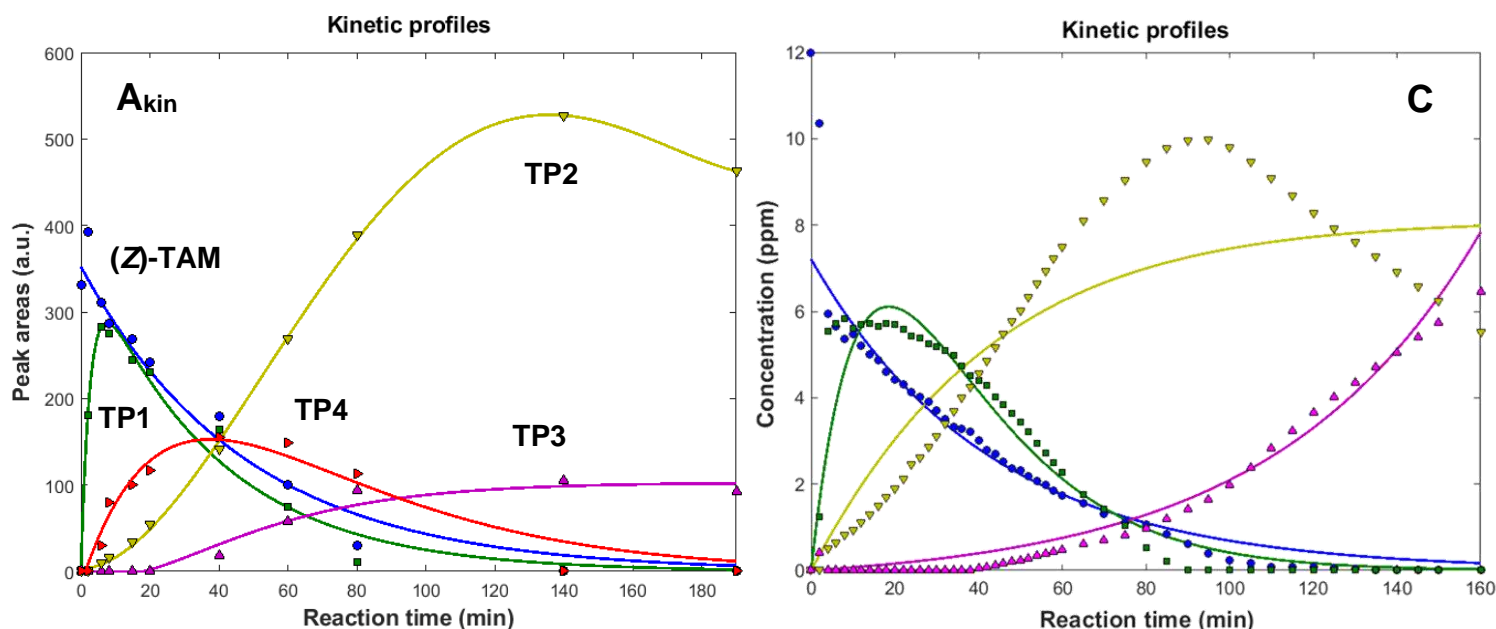
UV-Vis (veure la **Figura 51**). Tanmateix, en el cas d'utilitzar només el detector de MS, aquestes espècies no es podrien resoldre de manera inequívoca completament sense emprar aquestes restriccions. En canvi, la resolució conjunta mitjançant la fusió de dades LC-DAD i LC-MS ha permès una resolució interpretable dels espectres de MS d'aquests components i la correcta identificació de les diferents espècies obtingudes.

- *Anàlisi simultània del seguiment espectrofotomètric UV de la fotodegradació i les dades LC-DAD. Resolució de les espècies i interpretació dels perfils cinètics.*

De la mateixa manera, l'anàlisi MCR-ALS simultània del seguiment del procés de fotodegradació per espectrofotometria UV i de les dades LC-DAD (matrius  $D_{d400sp,400DAD,aug}$  i  $D_{d765sp,765DAD,aug}$ ), que es podria considerar també un tipus de fusió de dades utilitzant una mateixa tècnica de mesura instrumental però diferent tipus d'experiments químics, ha permès una millor estimació dels perfils cinètics. Amb aquesta anàlisi, les espècies detectades en els experiments espectrofotomètrics UV de seguiment de la degradació (on, recordem, hi ha menys selectivitat degut al solapament dels perfils de concentració i, en el cas del TAM, també dels perfils espectrals en presentar espècies molt semblants), es veuen obligades a tenir el mateix espectre UV-Vis que les presents a les anàlisis LC-DAD i, per tant, a tenir un espectre UV-Vis únic que facilita la seva correcta resolució i interpretació. En conseqüència, s'obté una relació clara entre les espècies de reacció, els seus perfils cinètics, els seus corresponents perfils d'elució cromatogràfics i els seus espectres UV-Vis purs. Les restriccions utilitzades en aquestes anàlisis simultànies per MCR-ALS són les mateixes que les aplicades anteriorment a la resolució de les matrius de dades LC-DAD. Es va utilitzar un model MCR-ALS amb un nombre total de quatre espècies químiques addicionals al **(Z)-TAM** inicial (es van assignar dos components MCR-ALS extres, sense significat químic, a les contribucions cromatogràfiques de la línia base i del soroll de fons) per tal de resoldre millor aquestes matrius de dades. Els paràmetres de la qualitat d'aquestes anàlisis es troben resumits també a la Taula 2 de l'**ARTICLE I**.

Segons els resultats obtinguts fins ara, el compost inicial pur **(Z)-TAM** (**blau**) i el seu producte de transformació inicial (**TP1**, **verd**) tenen un espectre d'absorció lleugerament diferent: **(Z)-TAM** presenta una forta banda d'absorció UV a 277 nm amb

una cua a longituds d'ona superiors a 310 nm i una altra banda d'absorció a 236 nm. **TP1**, en canvi, no presenta aquesta banda a 236 nm i només presenta una banda UV a 277 nm. Això està d'acord amb els espectres UV-Vis que es troben a la literatura per aquests isòmers (Šalamoun, Macka, et al., 1990). Per tant, el primer fotoproducte de transformació podria ser l'(**E-TAM**, l'isòmer del compost inicial (**Z-TAM**, que es forma immediatament quan s'irradia llum UV sobre el compost. D'altra banda, els fotoproductes **TP2** i **TP3** també presenten espectres força similars, tot i que va ser possible diferenciar dues bandes característiques en els seus respectius espectres d'absorbància. El component identificat com a **TP3** (magenta) té bandes d'absorció a 236, 255, 280 i més enllà de 300 nm, mentre que el compost designat com a **TP2** (groc) només té les bandes d'absorció a 255 i 300 nm. Aquesta darrera espècie també té una vall inusual entre 220 i 240 nm. A la literatura (Šalamoun, Macka, et al., 1990), els espectres UV-Vis amb aquestes lleugeres diferències corresponen al **fenantrè I** i el **fenantrè II**, respectivament. **TP4** (vermell) mostra una banda d'absorció UV forta a prop de 280 nm. No es va trobar informació sobre aquest espectre UV-Vis per al **TP4** a la literatura. Com es mostrarà més tard, l'espectre de MS obtingut per a aquesta espècie va permetre la seva posterior identificació.



**Figura 52.** Evolució dels perfils de concentració (**C**, dreta) i de les àrees de pic cromatogràfiques LC-DAD (**A<sub>kin</sub>**, esquerra) en funció del temps de reacció (irradiació UV) a partir de l'anàlisi MCR-ALS de les matrius  $D_{d400sp}$  i  $D_{400DAD, aug}$ , respectivament. Els punts de dades són els marcadors i les línies són les estimacions de l'ajustament de corbes dels respectius perfils cinètics. Figura adaptada de l'ARTICLE I.

De la representació dels perfils de concentració de la matriu **C** i de les àrees de pic dels perfils d'elució dels diferents components resolts per MCR-ALS en funció del temps de reacció (irradiació UV) es pot derivar una estimació aproximada dels perfils cinètics de les espècies detectades per LC-DAD-MS, com es mostra a la **Figura 52** per a l'experiment de fotodegradació del TAM a  $400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ .

L'ajust de corbes (en anglès, *curve fitting*) aplicat tant als perfils de concentració del seguiment espectrofotomètric directe com a les àrees dels perfils (pics) cromatogràfics dels components resolts en funció del temps de reacció permet investigar el model cinètic associat a una sèrie de reaccions consecutives i paral·leles (Capellos & Bielski, 1972; El Seoud, Baader, et al., 2016) durant el procés de degradació. Les equacions i el model cinètic finalment considerat es pot descriure a partir de les reaccions químiques:



On, en funció del temps, trobem les equacions diferencials cinètiques següents:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] - k_3[A] = -(k_1 + k_3)[A] \quad (32)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B], \quad \frac{d[C]}{dt} = k_2[B], \quad \frac{d[D]}{dt} = k_3[A] \quad (33)$$

Resolent aquestes equacions diferencials, trobem finalment les equacions dels perfils de concentració de totes les espècies que intervenen en el model cinètic en funció del temps de reacció i de les concentracions inicials, que es corresponen amb les corbes ajustades:

$$[A]_t = [A]_0 e^{-(k_1+k_3)t} \quad (34)$$

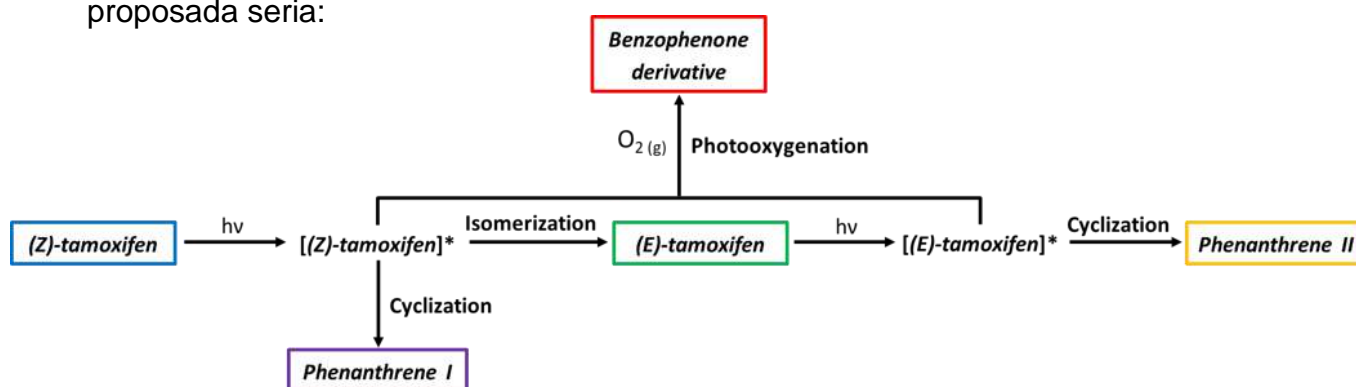
$$[B]_t = [A]_0 \left( \frac{k_1 + k_3}{k_2 - k_1 + k_3} \right) (e^{-(k_1+k_3)t} - e^{-k_2t}) \quad (35)$$

$$[C]_t = [A]_0 - [A]_t - [B]_t - [D]_t \quad (36)$$

$$[D]_t = \frac{k_3[A]_0}{k_1 + k_3} (1 - e^{-(k_1+k_3)t}) \quad (37)$$

La disminució de la concentració del (**Z**-TAM inicial (l'espècie **blava**, identificada com [A] en les equacions cinètiques) ha estat ajustada amb una sola funció exponencial, mentre que l'evolució del **TP1** (espècie **verda**, identificada com a [B] en el model proposat) ha estat ajustada amb una funció que considera dos exponencials. **TP2** i **TP3** (les espècies **groga** i **magenta**, [C] i [D] en el model, respectivament) també es van ajustar mitjançant funcions multi-exponencials. La concentració de l'espècie inicial (**Z**-TAM disminueix gradualment fins que desapareix abans del final de l'experiment de fotodegradació. L'espècie **verda** (**TP1**), que es va formar instantàniament al començament de la irradiació amb llum UV, assoleix el seu màxim als 8 min de temps de reacció i desapareix després de 140 min d'irradiació de llum. Les espècies **groga** i **magenta** (**TP2** i **TP3**, respectivament), evolucionen des del principi i encara estan presents al final de l'experiment de fotodegradació. El **TP2** sembla ser que apareix primer i arriba a una concentració més alta que el **TP3**. L'últim component químic resolt (**vermell**, **TP4**) (no mostrat a la dreta de la **Figura 52**), sembla ser que es va formar a partir d'una reacció secundària de la fotodegradació perquè apareix un cop iniciat el procés de fotodegradació (cap als 6 min d'irradiació) i desapareix abans d'aturar la reacció (abans dels 140 min d'irradiació), segons la informació que es pot extreure de la **Figura 51** dels perfils d'elució d'aquest component.

A partir de l'evolució temporal dels perfils cinètics resolts en els experiments de seguiment de la fotodegradació i en els cromatogràfics (veure **Figura 52**), es pot proposar un model amb dues reaccions paral·leles, on el (**Z**-TAM es transforma primer molt ràpidament per donar el seu isòmer, (**E**-TAM, que probablement es troba en equilibri, i després ambdós isòmers es fotodegraden per donar els seus derivats **fenantrè I** (**TP3**) i **fenantrè II** (**TP2**), respectivament. D'altra banda, el **TP4** sembla que es forma a partir d'una reacció secundària. Per tant, la via de reacció completa proposada seria:



**Figura 53.** Via de fotodegradació proposada pel fàrmac tamoxifè (TAM) en solució.

Segons aquesta proposta, la via de fotodegradació de la degradació del TAM en solució implica que el (**Z**)-TAM, quan és exposat a la llum UV, dona una espècie intermèdia de reacció (estat excitat) que experimenta una reacció d'isomerització o una reacció de fotociclització, donant (**E**)-TAM i **fenantrè I**, respectivament. A més, quan l'isòmer (**E**)-TAM torna a ser excitat per la llum UV, s'arriba a un altre intermedi de reacció i té lloc una altra fotociclització, donant lloc al **fenantrè II** (Šalamoun, Macka, et al., 1990). Finalment, segons la literatura, es postula que quan hi ha oxigen present en el medi de reacció, aquests intermedis de reacció podrien interaccionar amb les molècules d'oxigen i produir el fotoproducte desconegut (**TP4**) (DellaGreca, lesce, et al., 2007; Ferrando-Climent, Gonzalez-Olmos, et al., 2017).

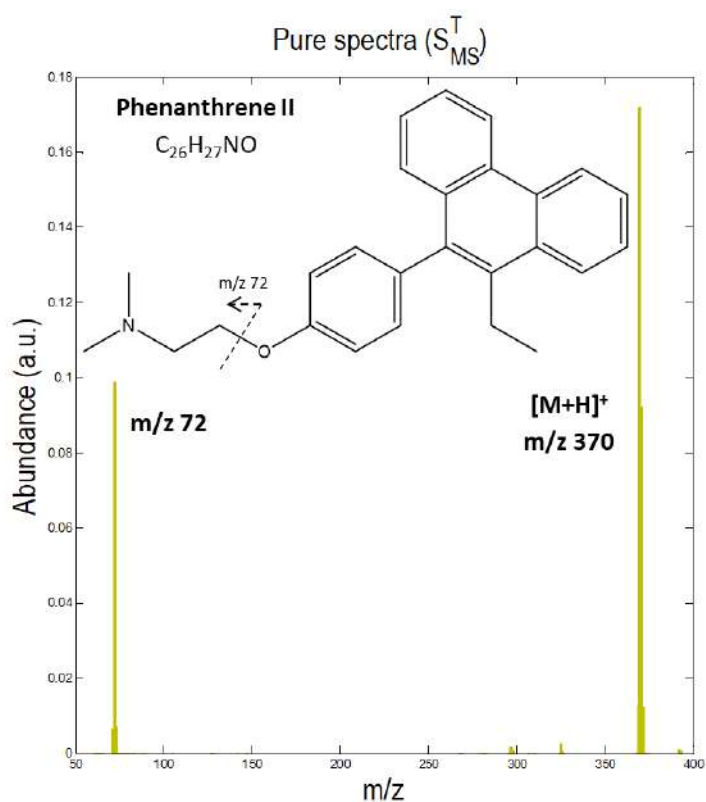
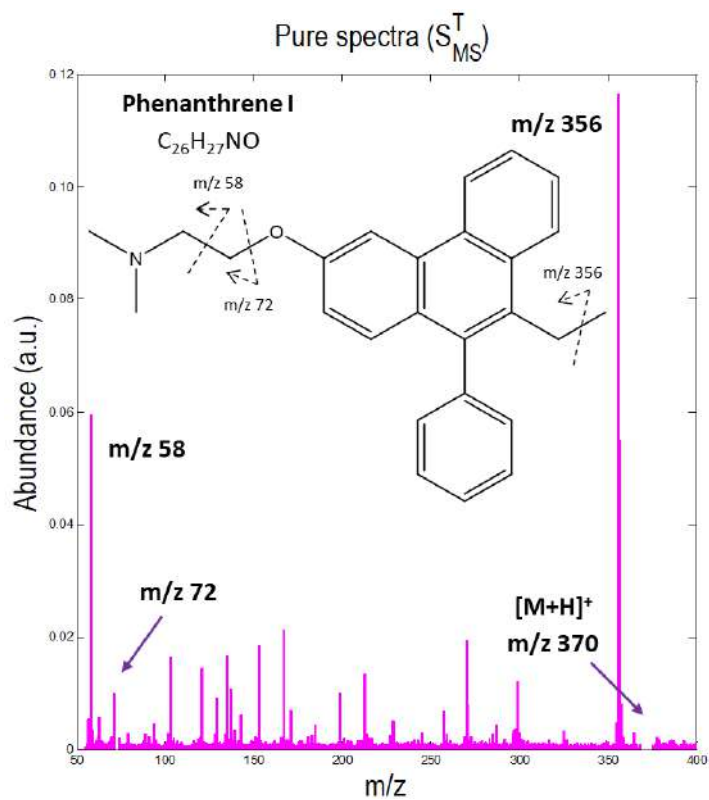
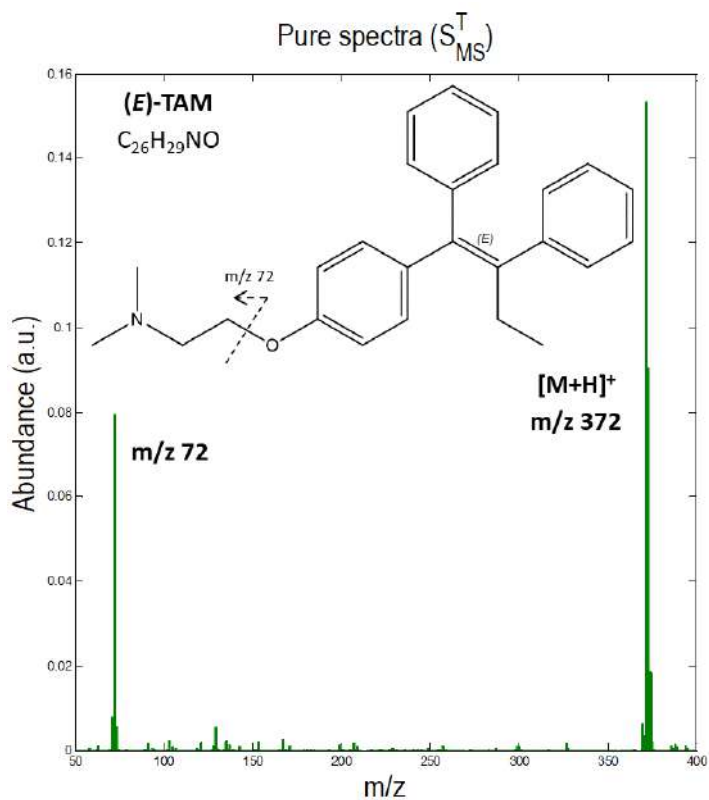
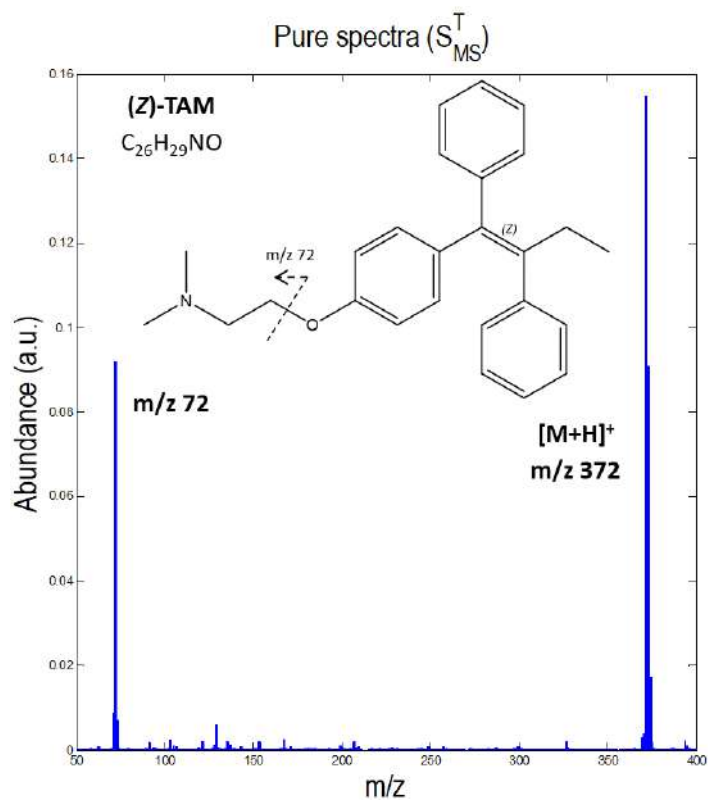
En el sistema investigat, doncs, ocorren simultàniament dos tipus de reaccions: equilibris de fotoisomerització i reaccions cinètiques de fotodegradació. Per tant, aquest sistema és més complex que un procés cinètic tradicional d'un sol tipus. En aquest punt, es van intentar estimar les constants de velocitat i validar la via de degradació proposada mitjançant un modelatge híbrid rígid i flexible del MCR (HS-MCR-ALS) (De Juan, Maeder, et al., 2000). Però, degut a la complexitat esmentada del sistema simultani d'isomerització, aquest modelatge híbrid del MCR-ALS no va ser viable d'aplicar amb l'aproximació implementada actualment. Finalment, es va optar per emprar l'eina *Curve Fitting Toolbox*<sup>TM</sup> (The MathWorks Inc., 2020a) del MATLAB<sup>®</sup> per a realitzar l'ajust de corbes sobre els perfils resolts per MCR-ALS, és a dir no durant l'optimització ALS, si no al final de la resolució. Aquesta eina, permet fer l'ajust de corbes component a component emprant per a cadascun d'ells el model que més s'ajusti a les dades, tot i que aquest sigui diferent.

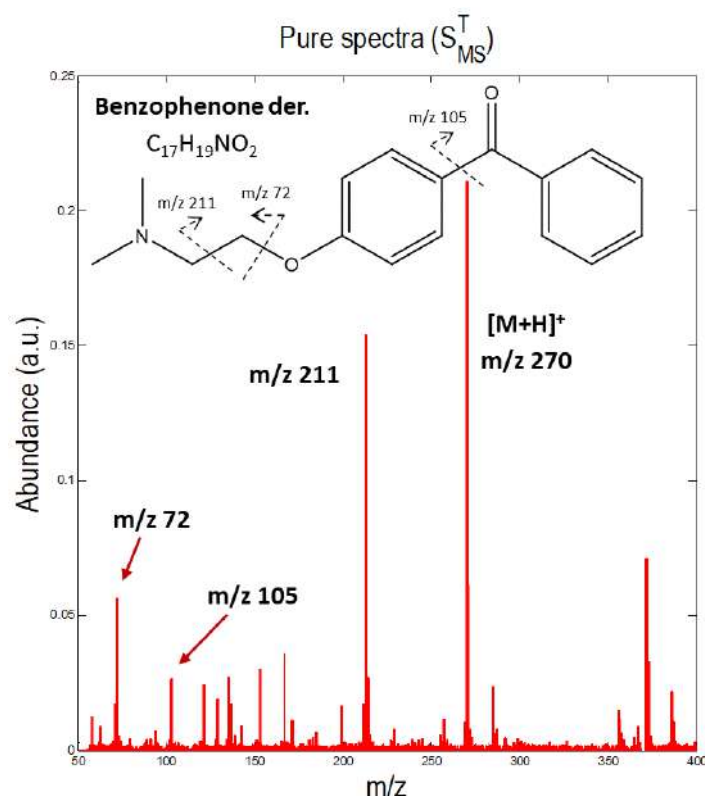
Tanmateix, per a fer l'ajust, es van emprar les equacions proposades anteriorment pels perfils de concentració de totes les espècies que intervenen en el model cinètic proposat en funció del temps de reacció i de les concentracions inicials de les espècies (Equacions (34)-(37)). L'eina *Curve Fitting Toolbox*<sup>TM</sup>, permet fer un càlcul independent d'una mateixa constant en cadascuna de les equacions dels perfils cinètics a modelar on hi sigui present. Amb la implementació actual del mètode HS-MCR-ALS, en canvi, es calculen totes les constants cinètiques al mateix temps (forçant la rigidesa del càlcul matemàtic per a que tinguin el mateix valor sigui quina sigui l'equació cinètica on apareixen) i, per tant, aquestes constants adoptaran un únic valor per tot el model cinètic proposat que no té en compte la isomerització del TAM.

De tota manera, gràcies a la representació gràfica dels perfils de concentració resolts per MCR-ALS del seguiment espectrofotomètric UV de la fotodegradació per a les diferents espècies que intervenen en el procés (veure **Figura 52** dreta), es possible determinar de forma independent el temps de vida mitjà ( $t_{1/2}$ ) per a l'espècie del TAM, d'aproximadament 5 – 10 min, essent aquest valor del mateix ordre que el descrit anteriorment a la literatura (Z. Chen, Park, et al., 2008; Ferrando-Climent, Gonzalez-Olmos, et al., 2017).

➤ *Anàlisi simultània de les dades LC-DAD-MS. Identificació i confirmació dels fotoproductes trobats*

Per identificar i confirmar les espècies dels fotoproductes proposats descrites anteriorment, les matrius de dades LC-DAD i LC-MS ( $\mathbf{D}_{\text{DAD, aug}}$  i  $\mathbf{D}_{\text{MS, aug}}$ ) es van concatenar (fusionar) i analitzar simultàniament, també per a ambdues condicions de potència d'irradiació estudiades. Aquesta resolució simultània és molt potent i descriu tot el sistema amb una fiabilitat encara més gran en disposar al mateix temps de la selectivitat intrínseca de la cromatografia i de les deteccions UV-DAD i MS. La Taula 2 de l'**ARTICLE I** mostra els resultats de l'anàlisi MCR-ALS de la matriu superaugmentada en la direcció de les files i les columnes de l'experiment de fotodegradació realitzat a  $400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $\mathbf{D}_{400\text{DAD},400\text{MS},\text{supaug}}$ ). Les restriccions utilitzades en aquesta anàlisi MCR-ALS es troben també resumides a la taula. Igual que en l'anàlisi LC-DAD per a l'experiment a  $400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ , només cinc dels set components resolts per MCR-ALS es van assignar finalment a la fotodegradació investigada. Els dos components addicionals de MCR-ALS van ser necessaris per modelar la presència de la línia de base i les contribucions del soroll de fons existents. Els resultats obtinguts per a la matriu de l'experiment a  $765 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $\mathbf{D}_{765\text{DAD},765\text{MS},\text{supaug}}$ ) van ser molt semblants als obtinguts en l'experiment produït amb la irradiació més baixa. Tot i que, en aquest cas, es va recuperar una sisena espècie química addicional; que finalment, però, no es va caracteritzar perquè no es va trobar informació sobre un espectre de MS pur que tingués un  $m/z$  367 com a ío molecular a la literatura. Tanmateix, tampoc es disposava de l'espectre UV-Vis associat a aquest component que ajudés a la caracterització d'aquesta espècie.





**Figura 54.** Identificació de fotoproductes a partir dels seus espectres MS purs (submatriu  $S_{MS}^T$ ) resolts mitjançant l'anàlisi MCR-ALS simultània de les dades fusionades HPLC-DAD-MS de l'experiment de fotodegradació del TAM realitzat a  $400\text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  (matriu  $D_{400DAD,400MS,supaug}$ ). Figura reproduïda de l'ARTICLE I.

La **Figura 54** mostra els espectres de masses purs resolts per MCR-ALS per a l'experiment de monitorització LC-DAD-MS de la fotodegradació del TAM realitzada en la condició de potència d'irradiació més baixa. En el mode ESI+, l'ió molecular protonat  $[M + H]^+$  es forma tant per als compostos parentals com per als fotoproductes. Els espectres MS del primer i segon components MCR-ALS (**blau** i **verd**) van confirmar que el **TP1** és l'**isòmer (E) del TAM**, amb el mateix pic de base a  $m/z\ 372\ [M + H]^+$  i amb idèntica fórmula molecular ( $C_{26}H_{29}NO$ ), però diferent intensitat de relació de fragmentació massa/càrrega ( $m/z$ ) de l'ió de confirmació ( $m/z\ 72$ ), assignada a l'ió dimetilaminopropilè, produït per la divisió de la cadena lateral (DellaGreca, Iesce, et al., 2007; Ferrando-Climent, Gonzalez-Olmos, et al., 2017; Šalamoun, Macka, et al., 1990). Aquesta relació d'intensitats de fragmentació  $m/z$  diferent va permetre distingir aquests dos compostos.

Tot i tenir el mateix ió molecular  $[M + H]^+$  a  $m/z\ 370$  i espectres UV-Vis molt similars, els fotoproductes **TP2** i **TP3** es van identificar com a **fenantrè II** i **fenantrè I**, respectivament. Aquestes dues espècies, a més, van donar un patró de fragmentació



diferent a causa de la pèrdua d'un grup metil en el cas del **fenantrè I** ( $-\text{CH}_3$ , 15 Da). Així, la divisió de l'ió molecular comú dels fotoproductes va produir, per al **fenantrè II**, un ió fragment a  $m/z$  72. En canvi, la fragmentació  $m/z$  58 semblava ser més favorable per al **fenantrè I** (veure **Figura 54**). Ambdós fotoproductes presenten, però, la mateixa fórmula molecular  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}$  (DellaGreca, Ilesce, et al., 2007; Ferrando-Climent, Gonzalez-Olmos, et al., 2017; Šalamoun, Macka, et al., 1990).

Segons la literatura (Mallory & Mallory, 1984), la fotoisomerització *cis-trans* és una reacció fotoquímica ràpida típica dels alquens i la formació de productes com el **fenantrè I** o **II** a causa d'una reacció de fotociclització es pot observar en la fotoquímica de compostos de tipus estilbè. De fet, la reacció de fotociclització només es produeix mitjançant l'absorció d'un fotó de llum UV per l'isòmer *cis*, però no pas per l'isòmer *trans* del derivat de l'estilbè (Mallory & Mallory, 1984). Això implica que el **(Z)-TAM** (que és el compost utilitzat com a fàrmac citostàtic), sintèticament més accessible i estable, que es pot identificar com un derivat de l'isòmer *trans* de l'estilbè, pateix inicialment una fotoisomerització *cis-trans* reversible per donar el derivat de l'isòmer *cis*-estilbè (**(E)-TAM**) requerit mecànicament per iniciar la fotociclització (Mallory & Mallory, 1984). A causa d'aquesta preferència de regioselectivitat, s'observa que (veure la **Figura 52**) en la fotodegradació del fàrmac TAM, el **fenantrè II (TP2, groc)**, que prové de l'isòmer *cis*-estilbè (**(E)-TAM**), apareix abans i arriba a una concentració més alta que el **fenantrè I (TP3, magenta)**, que es forma a partir de l'altre isòmer. De fet, en l'estudi realitzat per (Šalamoun, Macka, et al., 1990), com més llarga va ser l'exposició a la radiació UV del *trans*-tamoxifè (**(Z)-TAM**), més **fenantrè II** es va trobar a la barreja de reacció. Aquest fet ens indica que una de les vies de degradació del fàrmac (la via **(Z)-TAM**  $\rightarrow$  **(E)-TAM**  $\rightarrow$  **fenantrè II**) està més afavorida que l'altre (**(Z)-TAM**  $\rightarrow$  **fenantrè I**) (veure **Figura 53**).

La reacció de fotociclització que porta a la formació dels fenantrèns, de fet, es produeix mitjançant una espècie intermèdia anomenada dihidrofenantrè que pot no detectar-se, especialment en condicions oxidatives (DellaGreca, Ilesce, et al., 2007; Mallory & Mallory, 1984). Per tant, quan el TAM s'irradia amb llum UV, a causa de la presència d'anells de fenil geminals, ambdós isòmers són capaços de deshidrogenar-se, donant lloc als dos possibles productes del fenantrè. Aquest tipus de reaccions (anomenades reaccions pericíclics) són una part important de la química dels

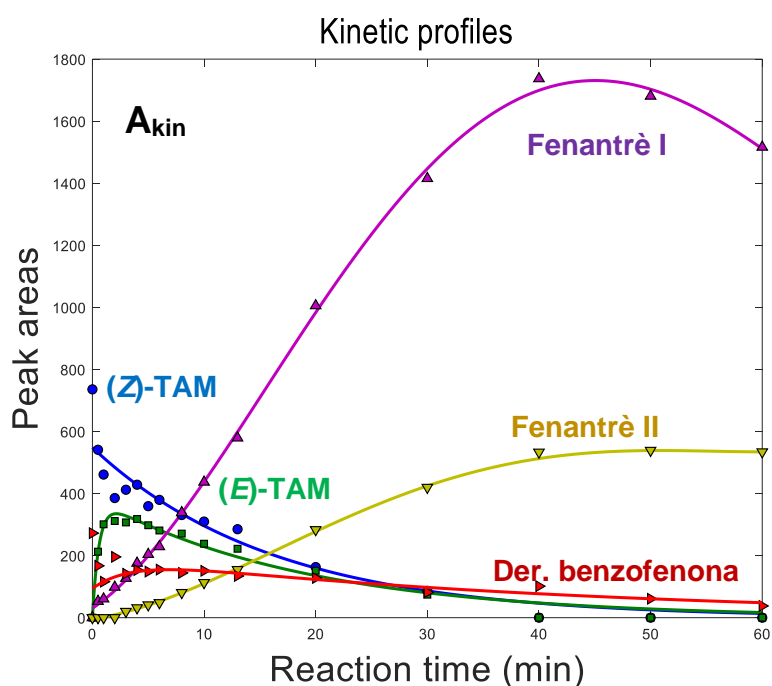
estilbens i, concretament, la fotociclització és molt útil en vies sintètiques com a pas final per generar un anell aromàtic fusionat en posició benzílica.

La fotodegradació del TAM en presència d'oxigen, segons la literatura, també produeix una reacció de fotooxigenació amb la formació d'un derivat de la benzofenona amb un ió molecular  $[M + H]^+$  a  $m/z$  270 i fórmula molecular  $C_{17}H_{19}NO_2$  (DellaGreca, Iesce, et al., 2007; Ferrando-Climent, Gonzalez-Olmos, et al., 2017). Aquest derivat de la benzofenona es pot assignar al **TP4** (component **vermell**). Es van obtenir, a més, ions fragment d'aquest fotoproducte a  $m/z$  72, 105 i 211, els quals formen part de l'estructura proposada i, per tant, en confirmen la identificació. El seu espectre UV-Vis pur, mostrat anteriorment, presenta un màxim d'absorbància a 280 nm. Molt probablement, la fotooxigenació va ser, en aquest cas, una reacció secundària que es va produir durant el procés de presa d'alíquotes de la mostra (per a la seva anàlisi cromatogràfica posterior), a causa de la presència d'oxigen atmosfèric a la solució. Es va anar introduint més oxigen dins la cubeta en destapar-la i prendre alíquotes a mesura que la reacció procedia i el nivell de solució anava minvant. Aquest fotoproducte no va aparèixer, de fet, durant els experiments d'irradiació controlats contínuament per espectroscòpia UV on la cubeta de mesura sempre va estar tancada i la mostra no va tenir cap interacció amb l'aire/oxigen.

La fotooxigenació que condueix al derivat de la cetona és una reacció menor que sembla no implicar espècies reactives de l'oxigen singlet ( $^1O_2$ ). Més probablement, les molècules excitades del TAM van quedar atrapades per l'oxigen molecular diradical de l'estat fonamental triplet ( $^3O_2$ ) (DellaGreca, Iesce, et al., 2007). L'extracció de l'hidrogen  $\beta$  i el desplaçament del doble enllaç donarien lloc a un intermedi hidroperòxid que, probablement mitjançant una escissió de Hock (Wang, 2010), acabaria formant aquest derivat de la benzofenona (DellaGreca, Iesce, et al., 2007). La formació d'aquest subproducte, no obstant, pot reduir el flux de llum UV útil per a les reaccions que depenen de la llum que es produeixen en el procés de fotodegradació del TAM, ja que la benzofenona i, molt probablement, també el seu derivat, actua com a filtre de la radiació UV i és capaç de absorbir aquesta radiació i dissipar-la en forma de calor.

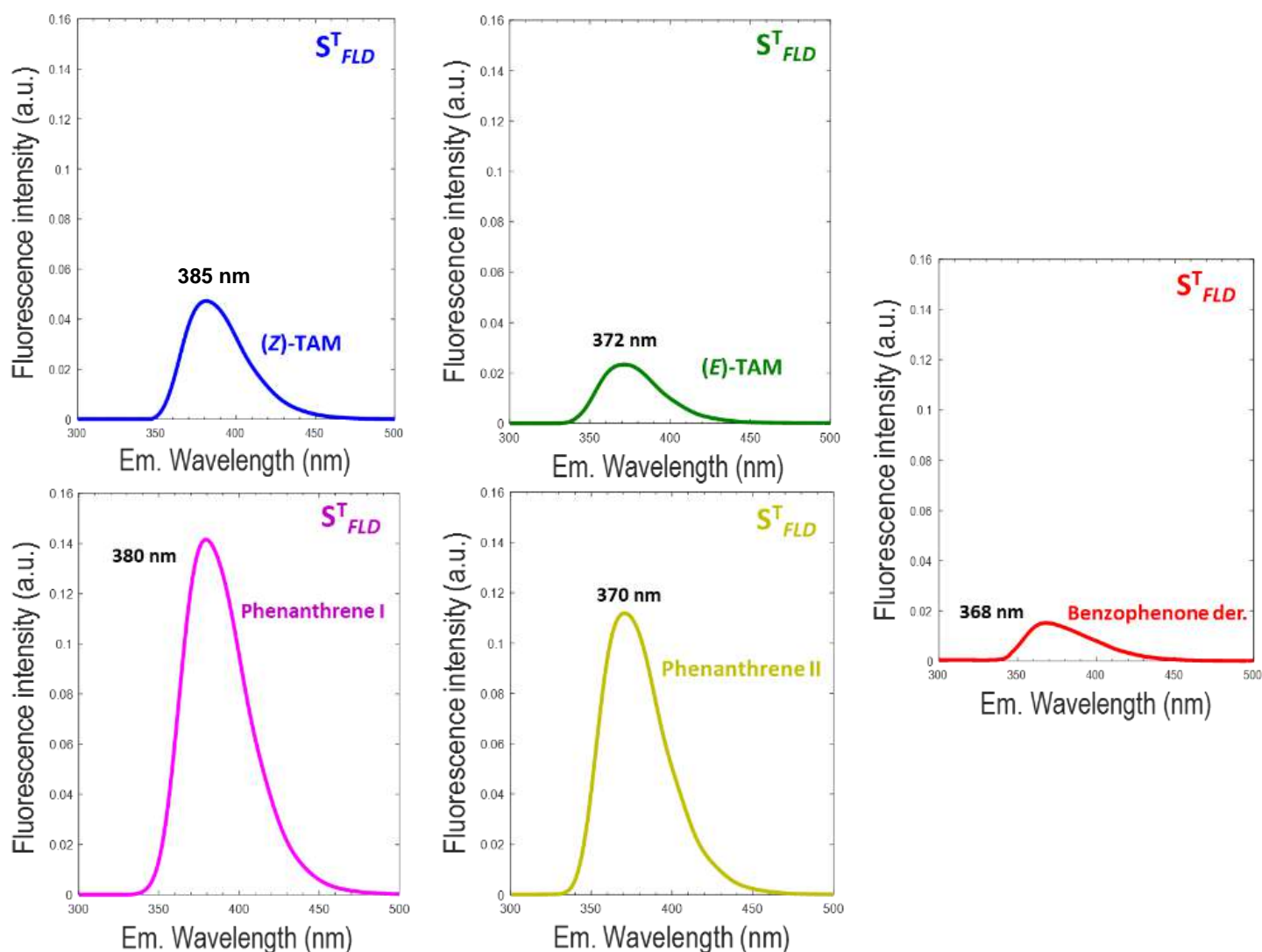
➤ *Anàlisi global de les dades. Estudi posterior per espectroscòpia de fluorescència i LC-DAD-FLD.*

Com s'ha esmentat anteriorment, es va realitzar també un estudi posterior del procés de degradació del TAM emprant com a mètode de seguiment addicional l'espectroscòpia de fluorescència. En aquest estudi, es va emprar la cromatografia líquida acoblada a un detector de díodes en series (DAD), que es va utilitzar en tàndem amb un detector de fluorescència (FLD) per tal d'analitzar les diferents alíquotes de reacció amb aquests dos tipus de senyals. 16 alíquotes de la reacció van ser analitzades amb aquest procediment. Els resultats obtinguts van permetre confirmar els fotoproductes detectats, en mostrar un espectre UV-Vis similar a l'anteriorment detectat, i també la via de degradació prèviament proposada, en obtenir-se la mateixa evolució dels perfils de concentració/cinètics i d'elució per a les diferents espècies resoltes. La **Figura 55** mostra les àrees de pic (els marcadors) dels diferents perfils d'elució d'aquestes espècies en funció del temps de reacció. Els colors emprats en el gràfic es corresponen amb els anteriorment utilitzats en assignar els diferents fotoproductes. Les línies són les estimacions de l'ajustament de corbes mitjançant el model cinètic prèviament proposat. Si es compara aquest gràfic amb els de la **Figura 52** es pot veure que l'evolució de les diferents espècies detectades és molt semblant; el que permet donar més credibilitat a la via de degradació proposada.



**Figura 55.** Evolució de les àrees de pic LC-DAD-FLD ( $A_{kin}$ ) en funció del temps de reacció (irradiació UV). Els punts de dades són els marcadors i les línies són les estimacions de l'ajustament de corbes dels respectius perfils cinètics.

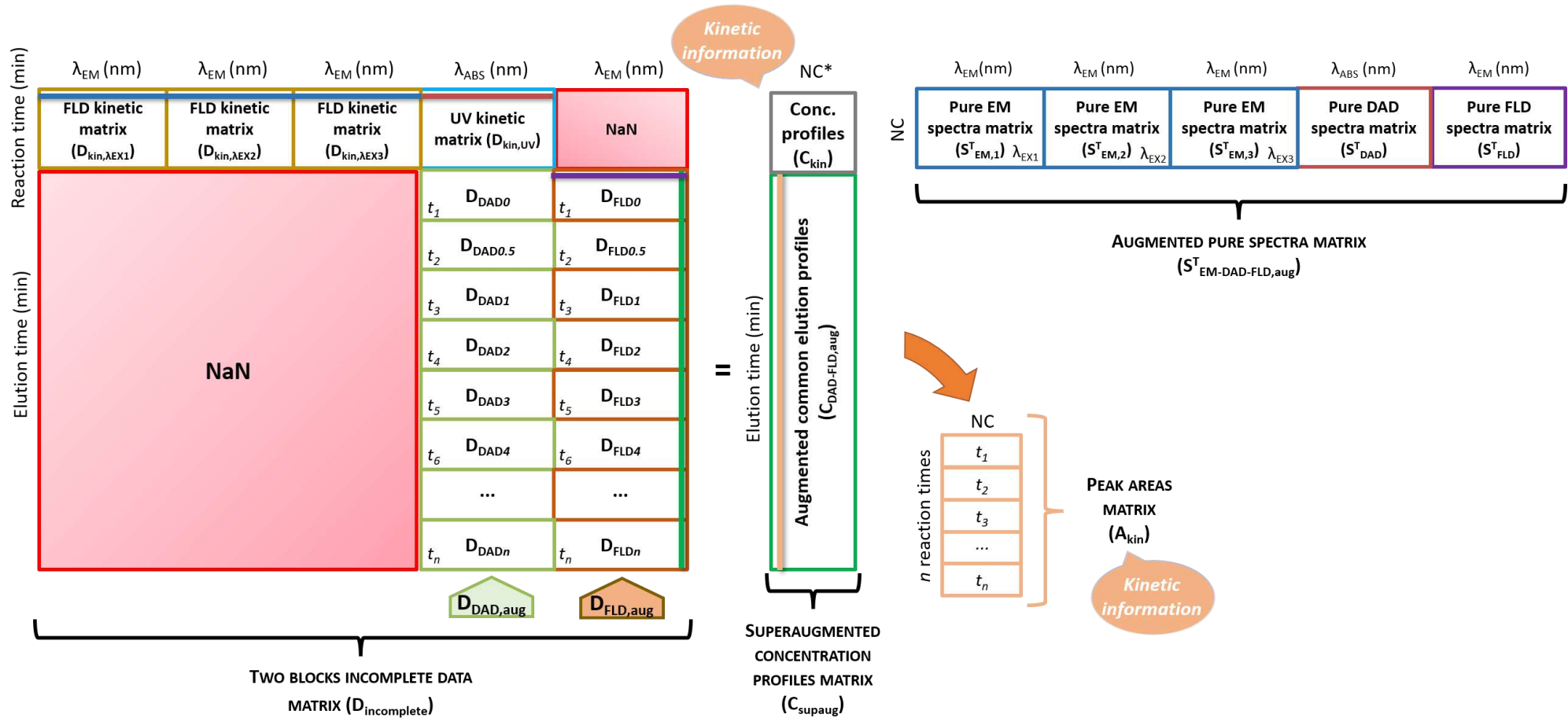
D'altra banda, com a informació complementària obtinguda a partir de l'anàlisi de les dades LC-DAD-FLD, s'han pogut resoldre els espectres purs d'emissió (fluorescència) pels diferents components detectats. Aquests, es mostren en la **Figura 56** i presenten un únic màxim d'emissió, diferent per a cada un dels fotoproductes resultants. Segons la literatura, la resposta de fluorescència del **fenantrè I** és fins a tres vegades més gran que la del **fenantrè II** (Šalamoun, Macka, et al., 1990). Aquesta diferència és probablement causada per la presència i posició del grup donador d'electrons  $-OCH_2CH_2N(CH_3)_2$ , que tendeix a millorar la fluorescència degut a l'augment de la densitat electrònica del sistema aromàtic del fenantrè. La molècula de **fenantrè I** podria, doncs, formar una estructura més rígida i plana, que sol ser més favorable per a la fluorescència.



**Figura 56.** Espectres d'emissió purs resolts (submatriu  $S^T_{FLD}$ ) obtinguts en la resolució per MCR-ALS de les dades LC-DAD-FLD dels diferents fotoproductes presents en el procés de fotodegradació del TAM. La longitud d'ona d'excitació va ser fixada a 255 nm.

Altrament, per tal de reduir al màxim les ambigüitats rotacionals associades als resultats bilineals del MCR-ALS es va realitzar, posteriorment, l'anàlisi global simultània de les dades prèviament descrites conjuntament amb les obtingudes en aquest nou estudi que inclou els espectres d'emissió de les espècies formades. Aquesta anàlisi, realitzat de nou mitjançant l'augmentació i concatenació de les dades en estructures multi-conjunt amb blocs incomplets, està encara pendent de finalització i de ser publicada com a un nou article científic. La **Figura 57** mostra, a mode d'exemple, la descomposició d'un d'aquests multi-conjunts de dades amb dos blocs incomplets. En aquest cas, es tracta de l'estructura incompleta de dades formada a partir de les dades procedents del seguiment del procés de fotodegradació del TAM fluorimètrica i espectrofotomètricament (absorbància UV), i de les dades obtingudes a partir de l'anàlisi cromatogràfica LC-DAD-FLD posterior de les alíquotes extretes durant la monitorització del mateix procés de fotodegradació.

En aquest exemple, es poden considerar 3 subconjunts de dades completes: el primer, es troba integrat per les dades del seguiment cinètic de la fotodegradació enregistrades per fluorimetria i espectroscòpia d'absorbància molecular; el segon, inclou les dades només d'absorbància i les obtingudes en l'anàlisi LC-DAD; i per últim, un bloc de dades que contempla conjuntament les dades adquirides per cromatografia, ja sigui emprant el detector DAD o el de fluorescència (FLD).



$$\begin{aligned}
 \text{Bilinear Model: } D_{incomplete} &= [[ [D_{kin,\lambda EX1}, D_{kin,\lambda EX2}, D_{kin,\lambda EX3}, D_{kin,UV}], NaN ]; [NaN, [D_{DAD,aug}, D_{FLD,aug}]]] \\
 &= [C_{kin}; C_{DAD-FLD,aug}] [[S^T_{EM,1}, S^T_{EM,2}, S^T_{EM,3}], [S^T_{DAD}, S^T_{FLD}]] + E_{incomplete} \\
 &= C_{superaug} S^T_{EM-DAD-FLD,aug} + E_{incomplete}
 \end{aligned}$$

**Figura 57.** Descomposició bilinear del multi-conjunt de dades format per: les dades de seguiment fluorimètric i espectrofotomètric del procés de degradació del TAM, i les dades de l'anàlisi cromatogràfica LC-DAD-FLD. Aquesta distribució de dades està formada per dos blocs de dades incomplets.

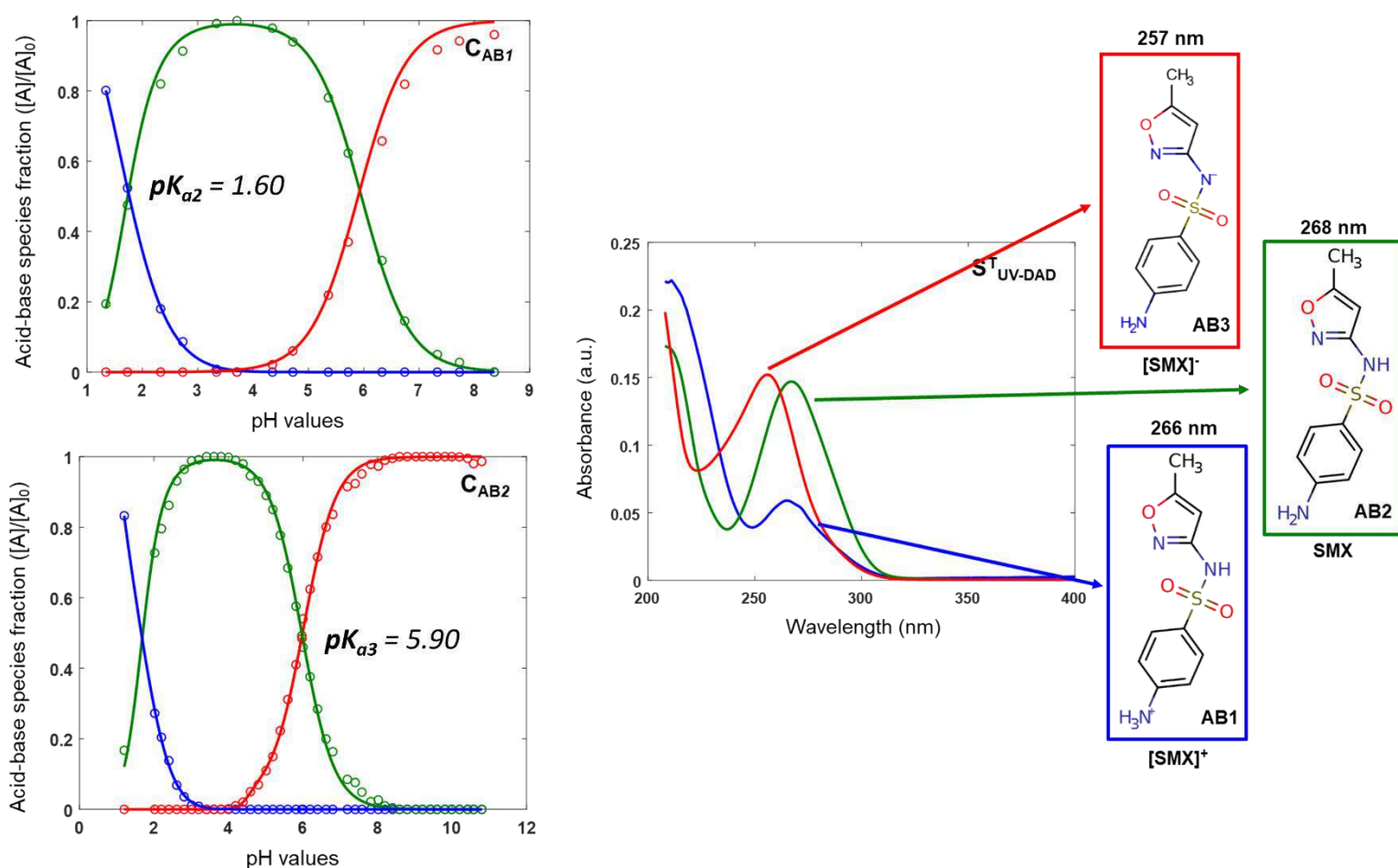
### 5.3.2. FOTODEGRADACIÓ DEL SULFAMETOXAZOL (SMX)

#### ➤ Anàlisi de les dades de la valoració àcid-base

Els resultats de l'anàlisi simultània MCR-ALS dels dos conjunts de dades espectrofotomètriques àcid-base ( $D_{AB,aug}$ ), amb les restriccions de no-negativitat (en els perfils  $C_{aug}$  i  $S^T$ ), de sistema tancat (en els perfils de concentració de la matriu  $C_{aug}$ , ja que la concentració de SMX és constant durant tot l'experiment àcid-base a 20 ppm en ambdós casos) i de selectivitat/rang local, es mostren a la **Figura 58**. Les restriccions de rang local s'apliquen per limitar la presència d'algunes espècies en una regió específica (en el perfil  $C_{aug}$ ), és a dir, quan la concentració d'una espècie àcid-base se sap que disminueix prop de zero en la valoració àcid-base, o al començament de la valoració quan se sap que aquesta espècie en concret encara no existeix. Utilitzant aquesta restricció, es millora la resolució de les espècies en els experiments de valoració espectrofotomètrica, evitant en molts casos les ambigüitats rotacionals (Tauler & Maeder, 2020b). Els valors de manca d'ajust (*lof*) i de variància explicada ( $R^2$ ), ambdós en %, resultants de l'anàlisi MCR-ALS de la matriu de dades àcid-base augmentada són, respectivament, 1,60 i 99,97%. Aquests valors obtinguts són bons tot i haver introduït en l'optimització ALS la restricció de de sistema tancat (*closure*), que normalment fa augmentar la manca d'ajust del sistema en aplicar-se com a restricció d'igualtat de forma rígida (existeixen formes més flexibles d'aplicació d'aquesta restricció que no van emprar-se en aquests cas). De tota manera, l'augment produït està dins dels nivells de tolerància considerats normals (sovint, un *lof* d'un 5%). Així doncs, en la valoració àcid-base del fàrmac SMX mitjançant l'espectrofotometria UV-Visible, es van resoldre tres espècies àcid-base diferents.

En primer lloc, el component **blau**, assignat a l'espècie **AB1**, que mostra un màxim d'absorció a 266 nm i apareix en el rang de pH 1 – 4 (veure la **Figura 58**). Aquesta és l'espècie més àcida detectada en els experiments de valoració i, segons estudis anteriors (Trovó, Nogueira, Agüera, Sirtori, et al., 2009), correspon a la forma protonada (catiònica) del SMX ( $[SMX]^+$ ). En segon lloc, l'espècie **AB2**, assignada al component **verd**, que existeix en el rang de pHs 1 – 8 i té una absorció màxima aproximadament a 268 nm. Tal com es descriu en (Trovó, Nogueira, Agüera, Sirtori, et al., 2009), aquesta espècie es correspon amb la forma neutra (espècie no

carregada) del SMX. Finalment, es va resoldre el component **vermell**, assignat a l'espècie **AB3**, que mostra la seva màxima absorció a 257 nm i apareix a partir de pH 4 (veure la **Figura 58**). Aquesta és l'espècie del SMX més bàsica, que apareix en aquestes condicions de pH en la seva forma desprotonada (aniònica) ( $[\text{SMX}]^-$ ). Aquestes dues últimes espècies àcid-base del SMX són les més interessants per a aquest estudi i des d'un punt de vista ambiental, ja que degut al pH present al medi natural, són les dues espècies que estaran present en aigües superficials i rius majoritàriament.

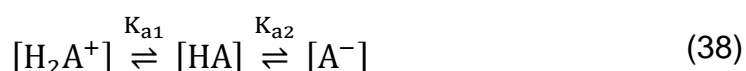


**Figura 58.** Perfils de distribució de les espècies àcid-base ( $C_{AB,au} = [C_{AB1}; C_{AB2}]$ ) i espectres UV-Vis purs ( $S^T$ ) resolts per a les dues valoracions espectrofotomètriques UV-Visible realitzades en l'estudi del procés de fotodegradació del sulfametoxazole (SMX). En els gràfics de distribució, les línies de punts representen les estimacions MCR-ALS obtingudes, i les línies sòlides fan referència als perfils d'ajustament de corbes calculats tenint en compte les equacions d'equilibri d'un àcid dipròtic. Estimació dels valors de les constants d'acidesa ( $pK_a$ ). Figura adaptada de la present en l'ARTICLE II.

A la **Figura 58** es mostren amb línies de punts els perfils  $C_{AB,n}$  resolts per MCR-ALS de les diferents espècies, mentre que els perfils calculats mitjançant l'ajustament de



corbes (utilitzant novament l'eina *Curve Fitting Toolbox™*) (The MathWorks Inc., 2020a) tenint en compte les equacions d'equilibri d'un àcid dipròtic (amb dos protons) (Maeder & Neuhold, 2007) es mostren en línies sòlides. Com es pot observar, ambdós perfils són força semblants i, per tant, el model àcid-base proposat s'ajusta correctament a les dades experimentals. Així doncs, el model químic finalment considerat i les respectives equacions d'equilibri emprades en l'ajust de corbes (més concretament, a les fraccions de cada una de les espècies àcid-base en funció del pH de la solució) es mostren a continuació:



$$f_{[\text{H}_2\text{A}^+]} = \frac{[\text{H}_2\text{A}^+]}{[\text{H}_2\text{A}^+] + [\text{HA}] + [\text{A}^-]} = \frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (39)$$

$$f_{[\text{HA}]} = \frac{[\text{HA}]}{[\text{H}_2\text{A}^+] + [\text{HA}] + [\text{A}^-]} = \frac{K_{a1}[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (40)$$

$$f_{[\text{A}^-]} = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{H}_2\text{A}^+] + [\text{HA}] + [\text{A}^-]} = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (41)$$

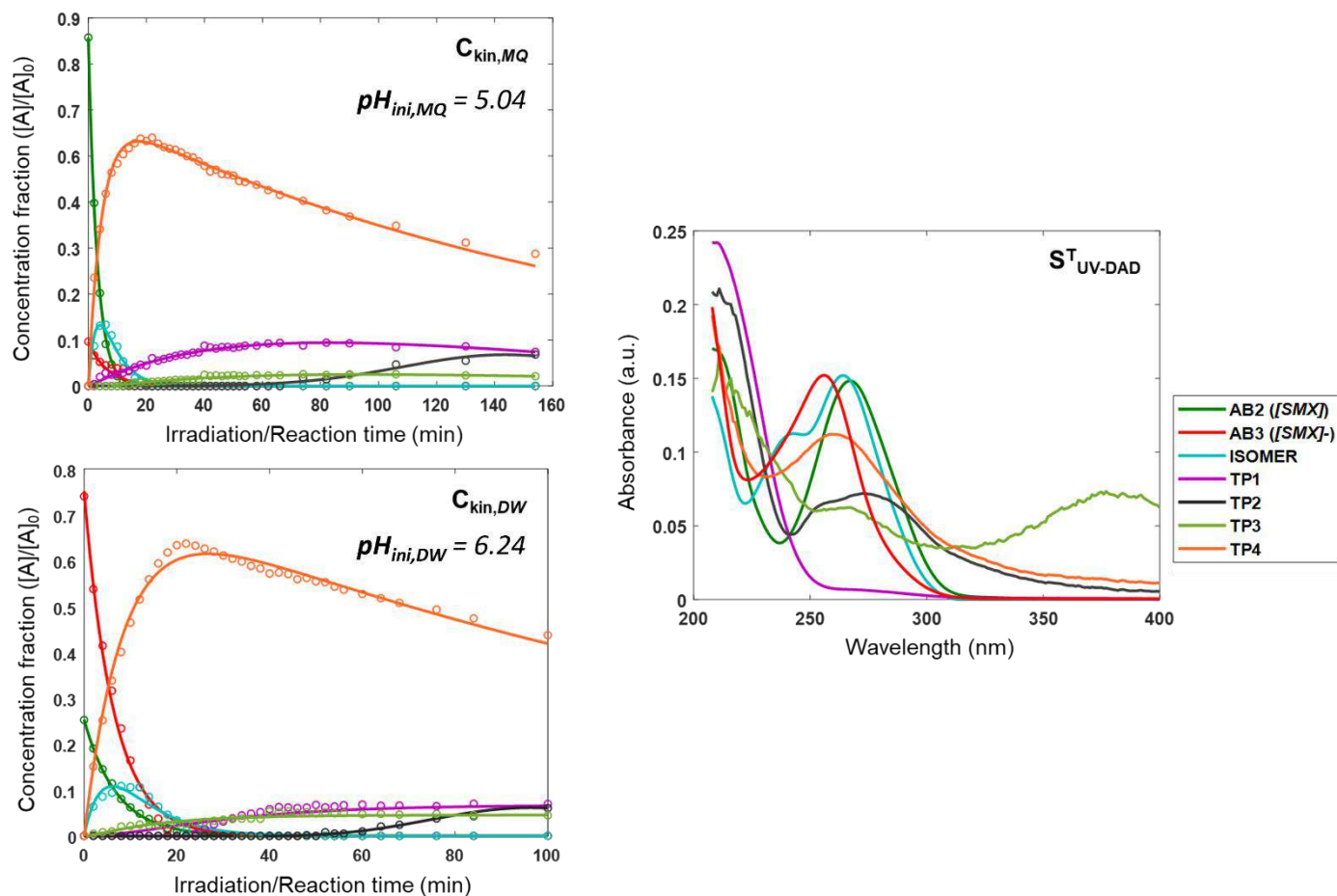
D'aquesta manera, a partir de l'ajust d'aquestes corbes (Equacions (39)-(41)), és possible obtenir una estimació dels valors de  $\text{p}K_a$  del fàrmac SMX. En aquest cas, els valors estimats van ser:  $\text{p}K_{a2} = 1,60$  i  $\text{p}K_{a3} = 5,90$ , tots dos valors són molt semblants als tabulats per a aquest fàrmac (Boreen, Arnold, et al., 2004; Şanlı, Şanlı, et al., 2010). Tot i que, teòricament, el fàrmac disposa d'una altra forma àcid-base ( $\text{p}K_{a1} = 0,25$ ), referent al N de l'anell pirrole que té la molècula de SMX, experimentalment no es va arribar a estudiar aquest rang de pH ni tampoc es va detectar la presència d'una espècie extra amb senyal a l'UV en la valoració àcid-base que permeti calcular aquest valor de  $\text{p}K_a$ .

Adicionalment, aquest estudi inicial àcid-base ens va permetre detectar que, depenent del pH inicial de la solució i, per tant, del tipus d'aigua utilitzat durant l'experiment de fotodegradació del fàrmac (Milli-Q o DW), les espècies del SMX inicials poden ser diferents. Aquesta hipòtesi es revela a la **Figura 59**, on es representen els perfils cinètics resolts per MCR-ALS dels experiments de fotodegradació del SMX emprant les dues solucions de fàrmac amb solvents diferents. En aquesta figura es pot observar que el SMX sense càrrega (**AB2, verd**) apareix en

una proporció superior al  $[\text{SMX}]^-$  (**AB3, vermell**) quan l'experiment de degradació es realitza amb aigua Milli-Q com a solvent (veure  $C_{\text{kin},MQ}$  a la **Figura 59** superior-esquerra) i, ans al contrari, la situació inversa succeeix quan s'utilitza aigua desionitzada (DW) (veure  $C_{\text{kin},DW}$  a la **Figura 59** inferior-esquerra). L'espècie del component **blau** (la forma catiónica del SMX,  $[\text{SMX}]^+$ , **AB1** a la **Figura 58**) només es va detectar a la regió més àcida ( $\text{pH} < 4$ ) dels experiments de valoració àcid-base. En canvi, en els experiments de fotodegradació del fàrmac, la solució de la mostra mai va ser prou àcida per tenir concentracions significatives d'aquesta espècie en equilibri.

➤ *Anàlisi del seguiment espectrofotomètric UV de la reacció de fotodegradació*

Per tal d'obtenir una millor resolució de l'especiació present en els experiments de fotodegradació del fàrmac, les dades corresponents a aquests experiments es van analitzar simultàniament amb les dels experiments àcid-base mitjançant la matriu de dades augmentada en la direcció de les columnes  $D_{\text{AB-kin,aug}}$ . La **Figura 59** mostra els resultats d'aquesta anàlisi simultània de dades mitjançant el mètode MCR-ALS. En aquest cas, les restriccions de no-negativitat (en els perfils  $C_{\text{aug}}$  i  $S^T$ ), sistema tancat (en el perfil  $C_{\text{aug}}$ ), correspondència de les espècies comunes entre els diferents experiments (submatrius en el perfil  $C_{\text{aug}}$ ) i de selectivitat/rang local (també en el perfil  $C_{\text{aug}}$ ) van ser utilitzades en l'optimització ALS. En aquest cas particular, s'assumeix que les espècies formades durant els experiments de fotodegradació, és a dir, els fotoproductes, no estan presents en els experiments àcid-base del fàrmac. A més, a l'inici del procés de fotodegradació, només poden estar presents les espècies del fàrmac SMX (en aquest cas, l'espècie sense càrrega, SMX, i la carregada negativament,  $[\text{SMX}]^-$ ). Aquesta informació, s'utilitza per evitar les ambigüitats rotacionals que, com s'ha vist en el Capítol 4, poden ser importants en l'anàlisi de les dades dels processos cinètics, on dos o més components poden superposar-se per manca de selectivitat entre ells o similitud dels seus perfils espectrals i/o per la manca d'independència lineal dels corresponents perfils de concentració. D'aquesta manera, es pot millorar la resolució de la matriu de dades augmentada,  $D_{\text{AB-kin,aug}}$ , tal com es mostra a la Taula 2 de l'**ARTICLE II**.



**Figura 59.** Perfils de concentració/cinètics ( $C_{kin, aug} = [C_{kin, MQ}; C_{kin, DW}]$ ) i espectres UV-Vis purs ( $S_{UV-DAD}^T$ ) resolts per MCR-ALS dels experiments de fotodegradació del fàrmac SMX realitzats amb les solucions de mostra amb aigua Milli-Q (MQ) i aigua destil·lada (DW), respectivament. En els gràfics dels perfils cinètics, les línies de punts són les estimacions MCR-ALS resoltes, i les línies sòlides són els perfils d'ajustament de corbes calculats tenint en compte un model de reaccions seqüencials i paral·leles de pseudo-primer ordre. Es detalla la identificació de les espècies presents en els experiments de fotodegradació cinètica: **AB2** i **AB3** (espècies àcid-base del SMX), espècie **isòmer** del SMX i productes de transformació del SMX (**TP1-TP4**). Figura reproduïda de l'ARTICLE II.

La **Figura 58** i la **Figura 59** mostren, respectivament, els perfils de distribució d'espècies àcid-base (matriu  $C_{AB, aug}$ ) i els perfils cinètics de concentració (matriu  $C_{kin, aug}$ ) resolts mitjançant l'anàlisi simultània MCR-ALS d'ambdós tipus d'experiments: fotodegradació i titulacions àcid-base. Tal com es mostra en la segona figura, els perfils cinètics resolts per MCR-ALS, representats amb les línies de punts, es van ajustar mitjançant l'eina *Curve Fitting Toolbox*<sup>TM</sup> (The MathWorks Inc., 2020a) per seguir parcialment un model de reaccions seqüencials i/o paral·leles de pseudo-primer ordre (El Seoud, Baader, et al., 2016), amb un model semblant als postulats en estudis anteriors per a aquest fàrmac (Voigt, Bartels, et al., 2017), donant com a

resultat els perfils mostrats en les línies sòlides amb els diferents colors per a les distintes espècies. Aquest model cinètic, tanmateix, no s'ha pogut materialitzar en un mecanisme de reacció concret per a totes les espècies, ja que no es disposa de prou informació per poder estipular les vies de degradació de tots els productes de transformació detectats. A part de les dues espècies inicials del SMX, els components SMX (**verd**) i  $[\text{SMX}]^-$  (**vermell**), respectivament, es van detectar cinc fotoproductes diferents. Els espectres UV-Vis i MS resolts de totes aquestes espècies es descriuen a la següent secció d'aquesta memòria, on s'identificaran temptativament les espècies a partir de la informació UPLC-DAD-MS i es proposarà el *pathway* de degradació per alguna d'elles.

Com es pot observar també en la **Figura 59**, la velocitat de la reacció de fotodegradació és força diferent segons el pH inicial de les solucions de mostra emprades (SMX-Milli-Q o SMX-DW). Així, s'observa que la solució de mostra que contenia aigua Milli-Q a pH 5,04 ( $C_{\text{kin},MQ}$ , **Figura 59** superior-esquerra) es va degradar més ràpidament que la solució de mostra d'aigua destil·lada ( $C_{\text{kin},DW}$ , **Figura 59** inferior-esquerra). Les espècies SMX inicials (els components **verd** i **vermell** de la figura) van desaparèixer abans dels 20 minuts d'irradiació quan es va utilitzar aigua Milli-Q. Per contra, quan es va utilitzar aigua destil·lada, el pH de la solució era de 6,24 i les espècies SMX van desaparèixer una mica més tard, després de més de 20 minuts de fotodegradació. Per tant, quan el pH augmenta, la velocitat de fototransformació del SMX s'alenteix i es produeix una degradació menor (Moore & Zhou, 1994; Voigt, Bartels, et al., 2017). Això es deu al fet que quan el pH és més bàsic, la forma aniònica del SMX (l'espècie **vermella** de la **Figura 58**,  $[\text{SMX}]^-$ ) és l'espècie predominant, que no es degrada tant per la llum UV com les altres espècies (Boreen, Arnold, et al., 2004). Aquesta hipòtesi es pot confirmar amb les constants de velocitat de degradació ( $k$ ) trobades a la bibliografia (Boreen, Arnold, et al., 2004; Moore & Zhou, 1994; Voigt, Bartels, et al., 2017), on s'observa que el valor de la constant de velocitat decreix a mesura que augmenta el pH del medi de reacció. Així, en l'estudi realitzat per (Voigt, Bartels, et al., 2017), per exemple, per a unes condicions de reacció amb únicament llum UV, trobem que per un pH 3 – 4,  $k = 1,63 \text{ min}^{-1}$ ; a pH 6 – 7, en canvi,  $k = 1,31 \text{ min}^{-1}$  i, finalment, a pH 8 – 9,  $k = 0,86 \text{ min}^{-1}$ . No obstant això, encara que a diferent velocitat, es van formar finalment els mateixos cinc

productes de transformació (TP) en els dos processos de fotodegradació del SMX estudiats en aquesta memòria.

En primer lloc, el component **cian** (assignat a un **isòmer** conformacional del SMX, tal com s'explicarà més endavant) va aparèixer des de l'inici del procés de fotodegradació, assolint la seva màxima presència als 10 min d'irradiació UV i va desaparèixer després de 40 min de reacció, fent-ho una mica abans en la degradació de la solució de mostra amb aigua Milli-Q. L'espècie assignada al component **taronja** (**TP4** a la **Figura 59**) va començar a créixer des del començament de la fotodegradació, assolint la seva màxima presència després de 20 min d'irradiació UV (10 min per a la solució de mostra amb aigua Milli-Q) i esdevenint l'espècie predominant durant la resta del procés de fotodegradació. L'espècie assignada al component **magenta** (**TP1** a la **Figura 59**), en canvi, presenta un comportament diferent segons quin sigui el procés de fotodegradació implicat. S'observa que apareix abans que l'espècie assignada al component **verd clar** (**TP3** a la **Figura 59**) durant la degradació de la solució de mostra amb aigua Milli-Q, mentre que succeeix el contrari en l'altra degradació estudiada. Finalment, en ambdós processos de fotodegradació, l'espècie assignada al component **negre** (**TP2** a la **Figura 59**) comença a aparèixer aproximadament després de 50 min d'irradiació i assoleix el mateix nivell de concentració que **TP1**.

Cal destacar però, que tot i haver realitzat la resolució MCR-ALS simultània de l'arranjament de dades augmentat (matriu  $\mathbf{D}_{UV-DAD, aug}$ ), que engloba les dades procedents de l'experiment àcid-base, el seguiment UV espectrofotomètric de la reacció de fotodegradació del fàrmac i les anàlisis cromatogràfiques LC-DAD, emprant les restriccions adients (especificades més endavant), els perfils cinètics resolts en la submatriu  $\mathbf{C}_{kin, aug}$  poden presentar encara ambigüitats rotacionals degut al gran solapament (falta de selectivitat) d'aquests perfils de concentració per part de moltes de les espècies detectades. Així doncs, en alguns casos, en analitzar les dades LC-DAD-MS i els perfils d'elució cromatogràfica de les diferents espècies resolts, que també donen informació de fins a quin temps de reacció/irradiació (és a dir, fins a quina de les alíquotes injectades i analitzades) un component de la reacció es encara present o no en el sistema estudiat, s'obtenen comportaments cinètics

distints per a algunes de les espècies detectades, tal com es comentarà més endavant.

➤ *Anàlisi de les dades cromatogràfiques LC-DAD-MS*

Al llarg del procés de fotodegradació, es van recollir deu alíquotes de mostres representatives de la mostra de SMX amb aigua Milli-Q durant diferents temps de reacció clau del procés de fotodegradació, les quals es van analitzar per LC-DAD-MS. L'anàlisi de les dades resultants amb MCR-ALS va permetre una excel·lent resolució de les espècies que apareixen durant tota la reacció de fotodegradació. Les diferents alíquotes de mostra es van analitzar primer per separat i, després, es van concatenar verticalment per a la seva anàlisi simultània. Per tant, es van obtenir un total de 10 matrius de dades LC-DAD i 10 més de LC-MS, que es van processar individualment i, a posteriori, simultàniament a través de les matrius de dades d'elució DAD i MS augmentades per columnes corresponents:  $\mathbf{D}_{\text{DAD, aug}}$  i  $\mathbf{D}_{\text{MS, aug}}$ . Finalment, amb la finalitat d'extreure la màxima informació del sistema estudiat, es va realitzar una anàlisi de manera conjunta de les dades fusionades LC-DAD i LC-MS utilitzant la matriu superaugmentada en la direcció de les files i les columnes  $\mathbf{D}_{\text{DAD-MS, supaug}}$ .

La **Figura 60** mostra els resultats obtinguts en l'anàlisi MCR-ALS d'aquesta darrera matriu augmentada. Es van aplicar les restriccions de no-negativitat i de selectivitat/rang local (tant en els perfils  $\mathbf{C}_{\text{aug}}$  com en  $\mathbf{S}^T$ ) i de correspondència d'espècies entre submatrius diferents (en el perfil  $\mathbf{C}_{\text{aug}}$ ). A més, es va provar l'ús de les restriccions de trilinealitat/igualtat de forma (Tauler, 2021; Tauler, Maeder, et al., 2020) per a alguns dels perfils d'elució dels components resolts (veure la **Figura 61** més endavant). Aquesta restricció serveix per forçar que els perfils de concentració (en aquest cas, els perfils d'elució cromatogràfica) d'un mateix component en les diferents matrius de dades simultàniament analitzades sobre les que s'aplica la restricció tinguin la mateixa forma durant cada iteració de l'optimització de l'ALS. En el cas de la cromatografia doncs, es força a que un mateix component que estigui present en varies injeccions cromatogràfiques tingui un perfil d'elució únic i que aquest només variï en intensitat i àrea en funció de la seva quantitat/abundància en les diferents mostres analitzades (matrius  $\mathbf{C}_{\text{elution}}$  i  $\mathbf{A}_{\text{kin}}$  en aquest estudi, respectivament). Aquesta restricció es basa en que, degut a les característiques

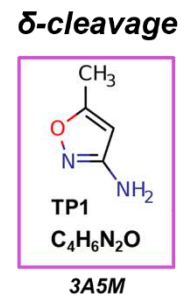
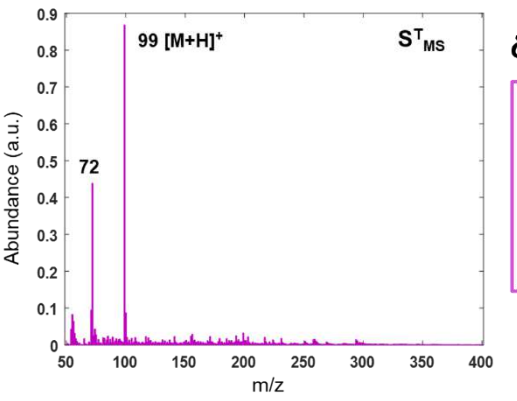
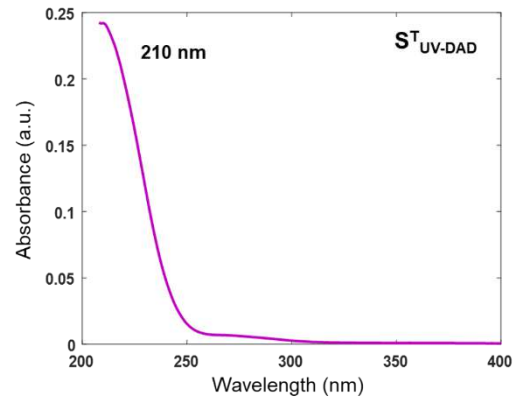
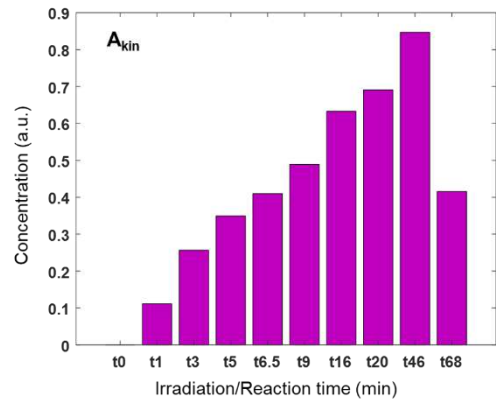
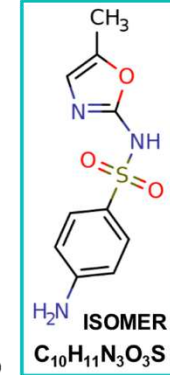
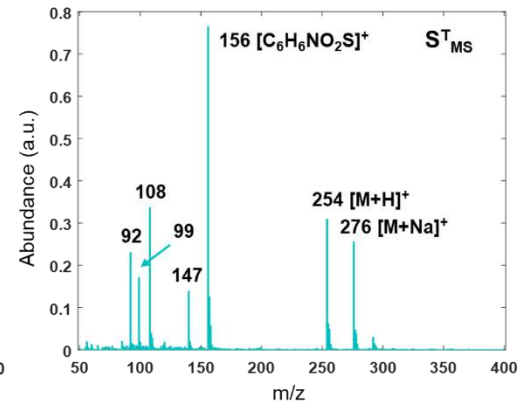
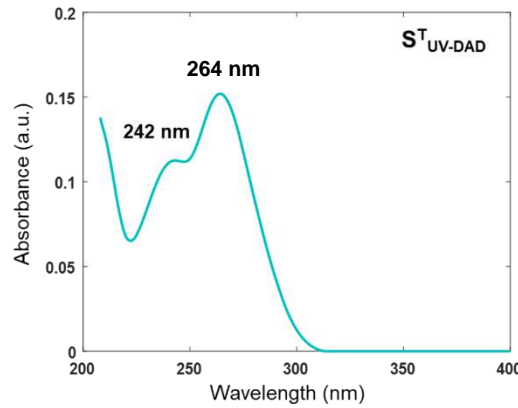
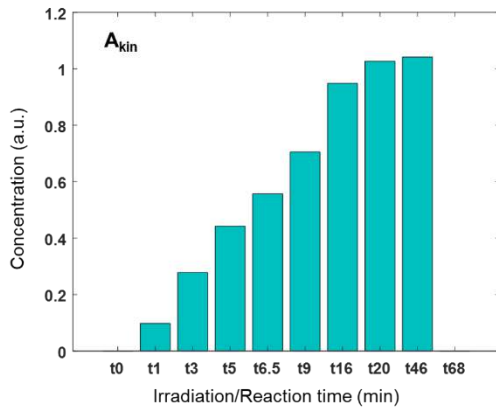
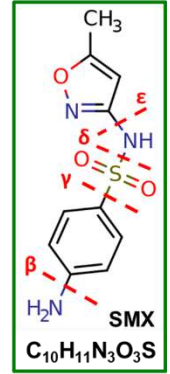
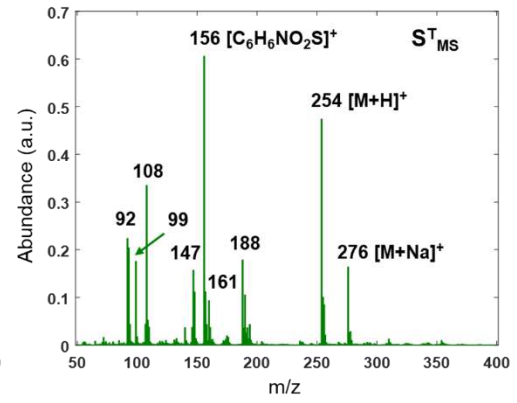
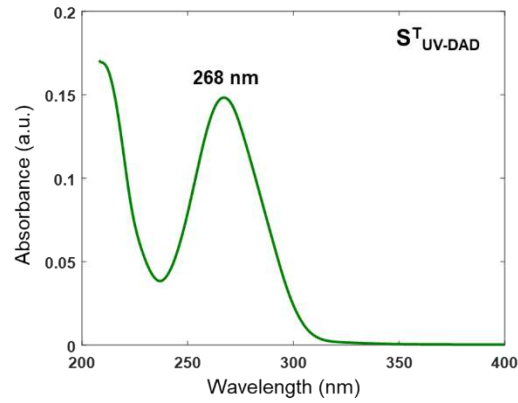
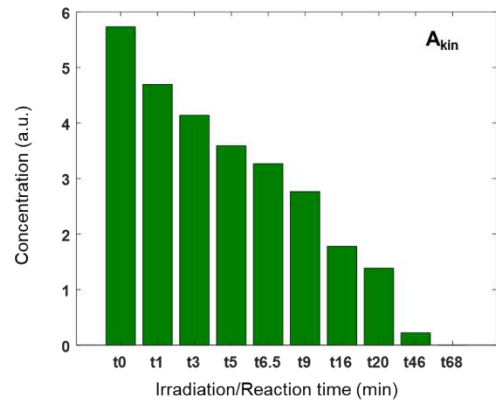
intrínseques ideals de la cromatografia, una espècie química sempre hauria d'eluir en un mateix temps de retenció per a unes mateixes condicions cromatogràfiques i una mateixa columna sigui quina sigui la concentració en la que es troba present, sempre que aquesta sigui superior al límit de detecció de la tècnica (en anglès, *Limit of Detection*, LOD). Aquest fet, és útil en els estudis de degradació on molt sovint tenim diferents espècies que es van formant al llarg del temps i d'altres que es van destruït i, per tant, apareixeran a diferents concentracions en les distintes injeccions cromatogràfiques simultàniament analitzades. A més, si un compost elueix correctament (és a dir, amb un únic pic cromatogràfic d'aparença gaussiana i sense cues que en distorsionin la seva forma), es relativament senzill fer correspondre els seus respectius perfils d'elució. Si bé, algunes vegades, la presència de cues o alteracions en la forma del pic no permeten aplicar aquesta restricció de manera satisfactòria, o també degut a la falta de reproductibilitat del comportament de la columna cromatogràfica en les diferents injeccions simultàniament analitzades.

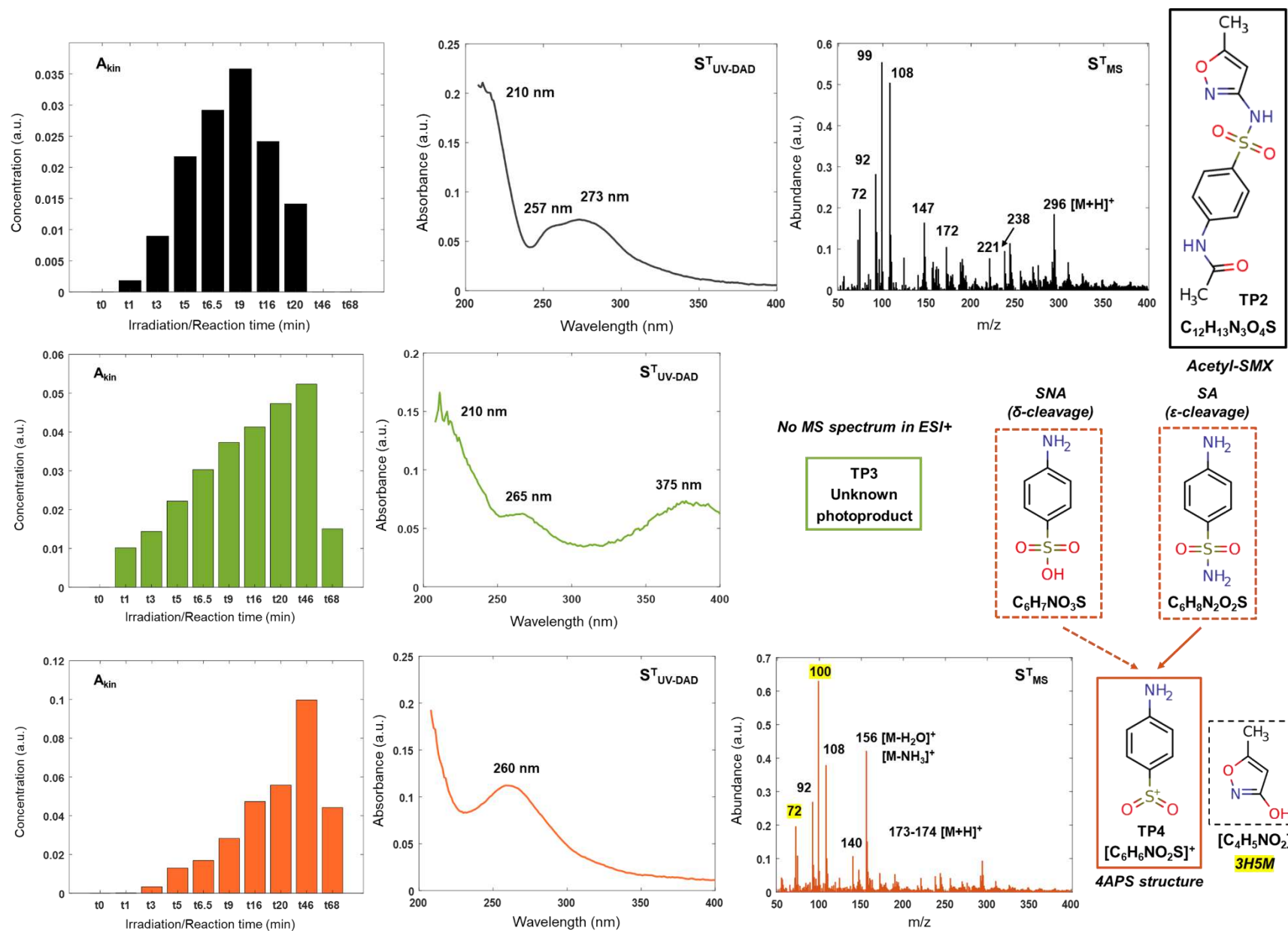
En el present estudi, de fet, com es pot veure en la **Figura 61**, aquesta restricció de trilinealitat que implica igualtat de forma dels perfils d'elució només s'ha pogut aplicar en 4 dels 6 components amb significat químic resolts. Les espècies **SMX**, **isòmer**, **3A5M** i **TP3**, que presentaven perfils d'elució molt reproduïbles, van ser aptes per aplicar aquest tipus de restricció, amb la qual cosa va ser possible obtenir també informació molt fiable respecte a la concentració relativa d'aquestes espècies al llarg del procés estudiat (matriu  $A_{kin}$  en la **Figura 60**). Aquesta restricció, en canvi, no es va poder aplicar a les espècies TP2 (Acetil-SMX, en **negre**) i TP4 (4APS, en **taronja**), degut a que presentaven perfils d'elució poc reproduïbles, com es pot comprovar en la **Figura 61**, on es representa la seva elució bilineal MCR-ALS en les diferents alíquotes analitzades (línies de punts) i els seus hipotètics perfils trilineals (línia sòlida) calculats a posteriori. En aquest cas, per tal d'obtenir la informació relativa a l'abundància/concentració de les espècies, es van calcular directament les àrees existents sota cada perfil en les distintes elucions cromatogràfiques. Un altre dels punts forts de l'aplicació d'aquesta restricció de trilinealitat és que permet disminuir i, fins i tot, eliminar les ambigüitats rotacionals existents en les resolucions MCR-ALS obtingudes. Així, les solucions que s'obtenen amb aquest mètode acostumen a ser úniques, tal com s'ha explicat en el Capítol 4.

La implementació d'aquesta restricció en l'ALS es troba descrita en el **BLOC 2** per a les dades de fluorescència d'EX-EM, que també són trilineals. Tanmateix, en el Material Suplementari de l'**ARTICLE II** es presenta una representació gràfica de la seva implementació per a dades cromatogràfiques. A grans trets, aquesta es basa en realitzar una descomposició de valors singulars (SVD) sobre els perfil d'elució del component en qüestió susceptible de ser trilineal en les diferents matrius considerades. El primer valor i vectors singulars concentren la variància comuna de tots els perfils del mateix component en les diferents injeccions simultàniament analitzats. S'ha de tenir present, però, que per tal de poder implementar aquesta restricció, les diferents matrius considerades han de tenir les mateixes dimensions en els seus dos modes o direccions (files i columnes). En el cas de les dades LC-DAD-MS, aquestes direccions serien l'espectral (longituds d'ona o valors  $m/z$ ) i la cromatogràfica, referent als temps d'elució.

Adicionalment, a causa de la presència de les contribucions cromatogràfiques de la línia base i del fons instrumental, especialment en el sistema de detecció de MS, es van incorporar al modelatge MCR-ALS d'aquestes matrius més components MCR que els sis identificats anteriorment en l'anàlisi de les dades del seguiment cinètic de la reacció (SMX + cinc productes de transformació). Finalment, doncs, es van utilitzar un total de set components en la resolució MCR-ALS per a les dades LC-DAD i nou per a les dades de LC-MS, aconseguint d'aquesta manera una millor resolució dels components d'interès, una millora de la manca d'ajust (*lof*) i també la obtenció de valors de variància explicada de les dades més elevats (veure la Taula 2 de l'**ARTICLE II**). Per tal de resumir tots aquests resultats, a la **Figura 60** només es mostren els perfils de concentració (matriu  $\mathbf{A}_{kin}$ ) i els espectres UV i de MS dels components d'interès (és a dir, d'aquells amb significat químic) resolts (matriu  $\mathbf{S}_{DAD-MS, aug}^T = [\mathbf{S}_{DAD}^T, \mathbf{S}_{MS}^T]$ ), que són els que després es tindran en compte per a la seva identificació.







**Figura 60.** Perfils de concentració ( $A_{kin}$ ) i espectres UV-Vis i MS purs (matriu  $S_{DAD-MS,avg}^T = [S_{DAD}^T, S_{MS}^T]$ ) resultats en l'anàlisi simultània MCR-ALS de les dades LC-DAD i LC-MS de les mostres recollides durant l'experiment de fotodegradació del SMX (matriu  $D_{DAD-MS,supaug}$ ).  
 Figura adaptada de la present en l'ARTICLE II.

L'espècie assignada al component **verd**, identificada prèviament com l'espècie neutra del SMX inicial utilitzant el seu espectre UV-Vis (amb un màxim d'absorbància a 268 nm), **AB2**, es va poder confirmar a través del seu espectre de MS (veure **Figura 60**), el qual presenta un ió molecular protonat  $[M + H]^+$  a  $m/z$  254, un ió adducte amb sodi  $[M + Na]^+$  a  $m/z$  276 i un pic base a  $m/z$  156  $[C_6H_6NO_2S]^+$ . A més, la seva empremta d'ions fragment és similar a les informades en estudis anteriors (Gmurek, Horn, et al., 2015; Trovó, Nogueira, Agüera, Sirtori, et al., 2009). Aquesta espècie del SMX, que explica el 49,1% de la variància de les dades, encara està present després de 46 min de reacció, però desapareix abans dels 68 min d'irradiació UV (veure la **Figura 60**). L'ús d'àcid fòrmic al 0,1% (v/v) en la fase mòbil durant l'anàlisi cromatogràfica implica que les diferents espècies SMX inicials de les distintes mostres van ser protonades a causa del pH de la fase mòbil d'elució (al voltant de pH 4) i, en conseqüència, només es va detectar l'espècie neutra del SMX en l'anàlisi cromatogràfica.

L'espectre de MS resolt per MCR-ALS de l'espècie **cian** va confirmar la presència d'un **isòmer** conformacional del SMX (veure **Figura 60**). Aquesta espècie, que explica el 5,6% de la variància de les dades, mostra el mateix ió molecular  $[M + H]^+$ , ió adducte amb sodi  $[M + Na]^+$ , pic base  $[C_6H_6NO_2S]^+$  i comportament de fragmentació que el SMX inicial. Encara que amb una fórmula molecular idèntica ( $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ ), mostra diferents proporcions d'intensitat dels ions comuns en comparació amb l'espècie neutra del SMX. El seu espectre UV-Vis, contràriament, mostra bandes d'absorció diferents a 242 i 264 nm. Aquestes diferències, han permès al mètode MCR-ALS diferenciar ambdues espècies i resoldre-les correctament. L'explicació química d'aquest procés isomèric es troba en la reordenació de l'anell isoxazol del SMX induït per la irradiació UV (Poirier-Larabie, Segura, et al., 2016; Voigt, Bartels, et al., 2017), que dóna lloc a aquest isòmer oxazole que es mostra a la **Figura 60**. El nom IUPAC d'aquest compost és 4-amino-N-(5-metiloxazol-2-il)benzensulfonamida. Es va observar, a més, un temps de retenció molt menor d'aquest isòmer a la columna cromatogràfica de fase reversa en les condicions d'elució emprades ( $t_R = 2,70$  min per a l'espècie isòmer vs.  $t_R = 8,47$  min per a l'espècie del SMX, veure els perfils d'elució a la **Figura 61**), que també es va notificar en estudis anteriors (Trovó, Nogueira, Agüera, Fernandez-Alba, et al., 2009; Voigt, Bartels, et al., 2017). Aquesta espècie, doncs, es va acumular gradualment en la solució durant els 46 min inicials

d'irradiació UV, i després, la seva concentració va disminuir significativament quan aquest isòmer del SMX va patir també fotodegradació.

El primer producte de transformació, assignat al component **magenta (TP1)** en la **Figura 59** i la **Figura 60**, presenta una única banda d'absorció a 210 nm en el seu espectre UV-Vis. El seu espectre de MS, en canvi, presenta un ió molecular  $[M + H]^+$  a  $m/z$  99 i dos ions fragments a  $m/z$  72 i 56, respectivament. Aquest component, que explica el 3,6% de la variància de les dades, s'ha identificat com el 3-amino-5-metilisoxazol (**3A5M**), amb una fórmula molecular  $C_4H_6N_2O$  (Gmurek, Horn, et al., 2015; Su, Deng, et al., 2016; Yang, Lu, et al., 2017), que es forma a causa de l'escissió  $\delta$  de l'enllaç N-S del SMX (veure l'espècie SMX a la **Figura 60**) (Boreen, Arnold, et al., 2004; Kim, Kim, et al., 2017; Su, Deng, et al., 2016). Aquest compost, que elueix als 2,19 min (veure **Figura 61**), va augmentar la seva concentració durant els primers 46 min d'irradiació UV, la qual cosa és coherent amb la tendència de degradació del SMX, arribant a la seva màxima aparició als 46 min i, posteriorment, disminuint la seva concentració en temps de reacció posteriors (veure la **Figura 60**). Aquest resultat sembla indicar que el **3A5M** també és susceptible de ser fotodegradat.

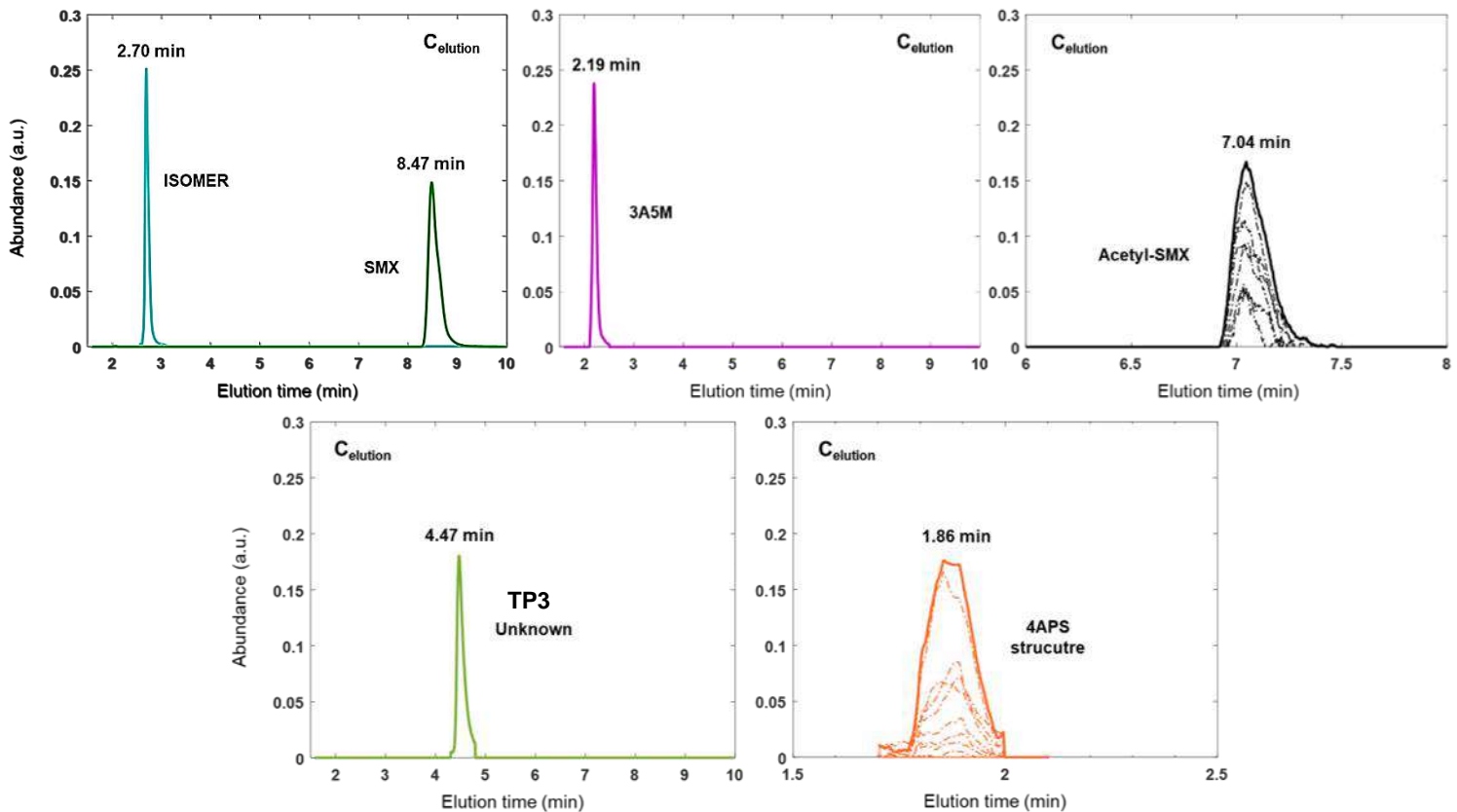
El segon fotoproducte, assignat al component **negre (TP2)** a la **Figura 59** i **Figura 60**, que explica <1% de la variància de dades, mostra tres màxims d'absorbància a 210, 257 i 273 nm en el seu espectre UV-Vis. El seu espectre de MS presenta un ió molecular  $[M + H]^+$  a  $m/z$  296 i múltiples ions fragments addicionals que ja apareixien a l'espectre de MS del SMX. Segons estudis anteriors (Bonvin, Omlin, et al., 2013; Gmurek, Horn, et al., 2015; Majewsky, Wagner, et al., 2014; Poirier-Larabie, Segura, et al., 2016) i tenint en compte la seva possible fórmula molecular  $C_{12}H_{13}N_3O_4S$ , aquest component s'ha identificat com a l'espècie *N*<sup>4</sup>-acetilsulfametoxazol (Acetil-SMX) (veure **Figura 60**). Aquesta identificació es pot confirmar utilitzant els ions fragments  $m/z$  238 i 99, que corresponen respectivament a escissions  $\beta$  i  $\delta$  dels enllaços N-C i N-S d'aquesta molècula (Boreen, Arnold, et al., 2004; Kim, Kim, et al., 2017; Su, Deng, et al., 2016). Cal tenir en compte que l'acetil-SMX, amb elució a 7,04 min (veure **Figura 61**), segueix una cinètica similar a la dels altres TPs, i no es va detectar a l'inici de l'experiment de fotodegradació. La seva concentració és menor en comparació amb els altres TPs i amb el compost original inicial (veure la **Figura 60**). El grup acetil ( $-COCH_3$ ) necessari per a la formació d'aquest compost pot provenir de

la fotodegradació posterior que pot patir el **3A5M (TP1)** després de la seva formació. Alguns estudis (Bonvin, Omlin, et al., 2013; Majewsky, Wagner, et al., 2014), indiquen que l'acetil-SMX és troba també com a metabòlit excretat pel cos humà en prendre aquest fàrmac.

El tercer producte de transformació, assignat al component **verd clar (TP3)** a la **Figura 59** i la **Figura 60**, que explica més variació de les dades que **TP2** (1,5%), presenta tres bandes d'absorció a 210, 265 i 375 nm en el seu espectre UV-Vis. No obstant això, no es va detectar cap espectre de masses per a aquest compost en ESI+, a la polaritat emprada, cosa que fa impossible la seva identificació completa. Segons la literatura (Bonvin, Omlin, et al., 2013; Gmurek, Horn, et al., 2015; Su, Deng, et al., 2016; Yang, Lu, et al., 2017), alguns dels fotoproductes del SMX només es poden detectar mitjançant ESI-, com és el cas del fotoproducte anomenat "TP270-", detectat en l'estudi de (Su, Deng, et al., 2016) i que també s'ha trobat en el procés de fotòlisi UV del SMX. Aquest TP es forma obrint l'anell isoxazol. Aquesta ruptura de l'anell podria explicar la presència d'una banda d'absorbància a longituds d'ona properes als 360-370 nm, com la que s'obté en el present compost. Per confirmar aquesta hipòtesi, s'hauria de realitzar una anàlisi LC-MS addicional amb polaritat negativa que confirmés i identifiqués aquest fotoproducte. L'abundància d'aquesta espècie, que elueix als 4,47 min (veure **Figura 61**), creix de manera lineal fins a assolir la seva màxima presència als 46 min d'irradiació UV i decau poc després. Igual que el **TP2**, la seva abundància també és menor en comparació amb els altres TPs (**Isòmer** i **3A5M**) i amb el **SMX** inicial (veure **Figura 60**).

Finalment, el quart fotoproducte, assignat al component **taronja (TP4)** a la **Figura 59** i la **Figura 60**, mostra un màxim d'absorbància al voltant dels 260 nm en el seu espectre UV-Vis. El seu espectre de MS, en canvi, presenta diversos ions fragments. Segons alguns estudis anteriors (Boreen, Arnold, et al., 2004), quan el SMX es fotodegrada, la molècula es trenca principalment a través d'una divisió  $\delta$  de l'enllaç N-S (veure l'espècie SMX a la **Figura 60**), donant **3A5M** (identificat com a **TP1** en aquest estudi) i àcid sulfanílic (SNA), els dos fragments resultants a banda i banda de l'enllaç trencat. No obstant això, la molècula SMX també es pot trencar per una escissió  $\epsilon$  donant la sulfanilamida (SA) i un compost derivat del **3A5M** que també conté el grup isoxazol (en l'article de (Kim, Kim, et al., 2017), aquest compost s'anomena 3-hidroxi-5-metilisoxazol, 3H5M). Tot i que el SNA té un màxim

d'absorbància a 250 nm, la SA mostra aquesta banda a 260 nm (John Wiley & Sons Inc., n.d.). Tots dos compostos tenen un espectre de MS de baixa resolució molt similar, amb un ió molecular  $[M + H]^+$  a  $m/z$  173 i 174 per a el SNA i la SA, respectivament. Tanmateix, també presenten una via de fragmentació molt similar, amb un pic base a  $m/z$  156  $[M - H_2O]^+$  o  $[M - NH_3]^+$  (per al SNA i la SA, respectivament) i ions fragment a  $m/z$  92, 108 i 140 (John Wiley & Sons Inc., n.d.).



**Figura 61.** Perfils d'elució normalitzats (matriu  $C_{elution}$ ) obtinguts per als components MCR-ALS resolts amb significat químic (sis espècies diferents: SMX inicial, el seu isòmer conformacional i els quatre productes de transformació TP1-TP4) durant l'anàlisi simultània per MCR-ALS de les dades LC-DAD-MS del procés de fotodegradació del SMX, aplicant les restriccions de trilinealitat/igualtat de forma a les espècies **SMX**, **isòmer**, **3A5M** i **TP3**. Aquesta restricció no es va aplicar a les espècies TP2 (Acetil-SMX, en **negre**) i TP4 (4APS, en **taronja**), on es representen la seva elució bilineal MCR-ALS de les diferents al·lotes analitzades (línies de punts) i els seus hipotètics perfils trilineals calculats (línia sòlida).

Segons aquesta informació, i tenint en compte que l'abundància de l'ió molecular del component **TP4** a la **Figura 60** és molt baixa (és a dir, probablement l'ió molecular s'ha fragmentat del tot), és possible assignar aquest fotoproducte a l'estructura 4-aminofenilsulfonil (**4APS**) (Kim, Kim, et al., 2017), sent el seu fragment l'ió positiu amb fórmula molecular  $[C_6H_6NO_2S]^+$ , obtinguda després de la pèrdua dels grups hidroxil ( $-OH$ ) i amino ( $-NH_3$ ) del SNA i la SA, respectivament.

Tanmateix, a causa de l'absorbància màxima observada, aquesta estructura probablement prové de la SA, més que del SNA en aquest estudi. A més, els ions fragment  $m/z$  72 i 100  $[M + H]^+$ , que apareixen juntament amb l'espectre de masses d'aquest component, es podrien assignar a un dels fragments resultants generats quan s'obté la SA mitjançant la divisió  $\epsilon$  del SMX, l'espècie 3H5M. Aquest fet, podria donar suport a la hipòtesi que l'estructura 4APS prové de la SA. No obstant això, per confirmar quin és l'ió precursor d'aquesta estructura, seria recomanable realitzar una nova anàlisi amb un espectròmetre de masses d'alta resolució emprant la monitorització selectiva d'ions com a mètode d'escaneig (en anglès, *Selected Reaction Monitoring*, SRM). L'abundància d'aquesta espècie, que elueix a 1,86 min (d'acord amb la **Figura 61**) i explica el 17,8% de la variància de les dades, creix exponencialment fins a assolir la seva màxima presència als 46 min d'irradiació UV; tot i que decau poc després, com passa amb el **TP3** (veure la **Figura 60**). La seva concentració, però, és el doble de la del **TP3**, sent el tercer producte de transformació més abundant després de l'**isòmer** i el **3A5M** en comparació amb l'espècie **SMX** inicial.

Els components descrits anteriorment, es presenten seguint la quantitat de variància explicada per cadascun d'ells per separat, tal com es mostra a la Taula 3 de l'**ARTICLE II**. Considerant l'anàlisi simultània de totes les dades experimentals recollides (és a dir, de la valoració àcid-base, del seguiment cinètic per espectrofotometria UV de la fotodegradació i de l'anàlisi LC-DAD-MS), la quantitat total de variància explicada ( $R^2$ ) pel model MCR-ALS de 12 components (3 espècies àcid-base del SMX + isòmer conformacional del SMX + 4 TPs + 4 espècies de contribució de línia base/soroll de fons) quan són avaluats tots simultàniament és del 97,8%. Tanmateix, la suma de les variàncies individuals explicades per cada component MCR-ALS per separat és de 115,6%. Aquesta diferència del 18,2% de la variància, indica la quantitat de superposició de variància existent entre els perfils dels components seleccionats. Cal remarcar que, com s'ha mencionat en el Capítol 4, a diferència del PCA on els components són ortogonals (és a dir, el que explica un component no ho explica un altre), en el MCR-ALS, hi ha una part de la variància de les dades que és comuna entre els diferents components resolts. Així doncs, en el PCA, els perfils (vectors) que s'obtenen pels *scores* i *loadings* de cada component són en realitat una combinació lineal ortogonal dels perfils (espectrals, de

concentració, elució,...) dels factors que causen realment la variància observada. En canvi, en el mètode MCR-ALS, es recuperen directament els perfils de les contribucions causants de la variància, que sovint són molt més interpretables des d'un punt de vista químic. Aquests perfils, però, tenen certa variància compartida ja que les fonts naturals de variància es superposen entre sí (Alier Pedemonte, 2014; Rutan, de Juan, et al., 2020). Aquest, de fet, es un dels principals motius de l'existència d'ambigüitats en les solucions del MCR-ALS (Tauler & Maeder, 2020b).





## ARTICLE I: TAMOXIFÈ

Marín-García, M.; Ioele, G.; Franquet-Griell, H.; Lacorte, S.; Ragno, G.; Tauler, R. (2018).

Investigation of the photodegradation profile of tamoxifen using spectroscopic and chromatographic analysis and multivariate curve resolution.

*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 174, 128–141.

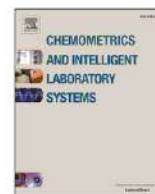
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.01.011>





Contents lists available at ScienceDirect

## Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemometrics](http://www.elsevier.com/locate/chemometrics)

## Investigation of the photodegradation profile of tamoxifen using spectroscopic and chromatographic analysis and multivariate curve resolution

Marc Marín-García<sup>a</sup>, Giuseppina Ioele<sup>b</sup>, Helena Franquet-Griell<sup>a</sup>, Sílvia Lacorte<sup>a</sup>, Gaetano Ragno<sup>b</sup>, Romà Tauler<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup> Department of Pharmacy, Health and Nutritional Sciences, University of Calabria, 87036 Rende CS, Italy

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Tamoxifen  
Drug photostability  
UV spectroscopy  
LC-DAD-MS  
Fused data  
MCR-ALS

## ABSTRACT

Photodegradation of tamoxifen (TAM) is investigated by chemometric analysis of the multiset data obtained by LC-DAD/MS and UV spectrophotometry. A hydroalcoholic solution of TAM was submitted to photodegradation by means of a dedicate irradiation cabinet able to simulate natural irradiation sources. The irradiance conditions were stressed by increasing the irradiation power to produce a rapid photodegradation of TAM. Drug photodegradation was monitored through UV spectrophotometry and the obtained photoproducts were investigated in detail by DAD/MS liquid chromatography. Data collected from the combination of both instrumental techniques were fused and processed jointly using the Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) method. A total number of five compounds were identified during the drug photodegradation and their kinetic evolution was described. The process included the isomerization of TAM to its (*E*)-form and the subsequent cyclization of these both compounds to give two phenanthrene derivatives. A photooxygenation process can also occur, giving a benzophenone derivative photoproduct as a result thereof. The multivariate resolution method proposed in this work allowed the resolution of this complex multicomponent system by the direct analysis of the experimental data.

### 1. Introduction

In the last years, the increasing production and release of synthetic organic chemical compounds into the environment, especially pharmaceutical drugs, has made that these substances have accumulated significantly on biological ecosystems as extensive and persistent pollutants, especially on surface water systems [1–6]. The current purification systems for environmental cleaning remove a considerable amount of these chemicals, but these technologies are not able to eliminate completely these compounds yet [7]. In addition, the possible negative effects for the nature are not only caused by the original compounds released into the environment, but also by their degradation products or metabolites [8]. Therefore, it is important to know how these organic pollutants can be transformed in the environment. Photodegradation due to UV-light (solar) irradiation represents one of the most important natural transformation processes of the organic products [9].

Tamoxifen (TMX or TAM), (2-[4-[(1*Z*)-1,2-diphenylbut-1-en-1-yl]

phenoxy)ethyl)dimethylamine, is a non-steroidal antiestrogen drug used to prevent and treat breast cancer in men and women [10–12]. The parent compound is synthesized as a mixture of (*E*)- and (*Z*)-isomers, although the (*E*)-isomer has no clinical use and only the (*Z*) one acts as an estrogen antagonist [13,14]. TAM has been considered one of the most studied cytostatic drugs [3] and many reviews about its presence in aquatic environment have been recently published [15,16]. Despite its low water solubility (<1 mg/L) [17], the occurrence of this drug in environmental matrices has increased considerably in the last years [1,6, 18]. The high octanol/water partition coefficient of the drug (log  $K_{ow}$  7.88) indicates a great absorption affinity in fatty tissues, soil, and sediments. This behavior can cause bioaccumulation and increase the toxicity of this drug [6,16].

Photosensitivity of TAM is well known [7,19,20], but only few papers describe its photodegradation profile in detail [21–23]. An elimination study of TAM using advanced oxidation processes (AOPs) as degradation method was recently published [24]. Photoisomerization,

\* Corresponding author.

E-mail address: [Roma.Tauler@idaea.csic.es](mailto:Roma.Tauler@idaea.csic.es) (R. Tauler).

<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.01.011>

Received 21 September 2017; Received in revised form 27 December 2017; Accepted 24 January 2018

Available online 31 January 2018

0169-7439/© 2018 Published by Elsevier B.V.

photocyclization and photooxygenation appear to be involved in the photodegradation process of this drug [21,23,24].

In the last few years, multicomponent systems involving equilibria and kinetic chemical processes have been investigated by combining several analytic and chemometric methods with satisfactory results [25–32]. In this work, a new analytical approach, based on the Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) technique, to monitor and investigate the photodegradation of TAM in water solution is proposed. This approach combines UV spectrophotometric and LC-DAD-MS data with chemometric procedures. The degradation process was investigated in water after prolonged simulated sunlight irradiation. The main photoproducts, isolated by chromatographic techniques, have been identified by UV and mass spectrometry spectroscopic tools.

## 2. Materials and procedures

### 2.1. Chemicals

(Z)-Tamoxifen ((Z)-TAM) ( $\geq 99\%$ ) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Methanol (MeOH) and water, both HPLC-grade ( $\geq 99.9\%$ ), were supplied by Merck-Millipore (Darmstadt, Germany). To avoid light contact, all used materials were covered with aluminum foil.

### 2.2. Instruments

Photodegradation experiments were performed in a light cabinet SUNTEST<sup>®</sup> CPS (Atlas Material Testing Solutions, IL, USA) equipped with a xenon arc lamp of 1500 W. This system closely simulated sunlight exposure and was equipped with filters to select several spectral regions.

UV-VIS spectra were recorded using a UV-Visible molecular absorption spectrophotometer HP-Agilent 8453 (Agilent Technologies, CA, USA) with a diode array detector (DAD).

Chromatographic equipment consisted of an ultra-performance liquid chromatograph connected to a UV-Visible diode array Waters<sup>®</sup> ACQUITY<sup>®</sup> PDA Detector (Waters Corporation, MA, USA) and coupled to a benchtop triple quadrupole Waters<sup>®</sup> ACQUITY<sup>®</sup> TQ Detector (Waters Corporation, MA, USA) (UPLC-DAD-MS/MS). The analytes were separated on a 2.1 × 150 mm ID, particle size 5  $\mu$ m, ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (Agilent Technologies, CA, USA).

### 2.3. Sample preparation

A 100 mg/L stock solution of (Z)-TAM was prepared using a 50:50 methanol/water mixture as solvent, due to the poor solubility of the drug in water. This solution was diluted to 12 mg/L (12 ppm) before every degradation experiment, using always the same solvent mixture.

### 2.4. Photodegradation experiments

In agreement with the rules of the International Conference on Harmonization, ICH guidelines Q1B [33], a coated quartz filter segment was interposed between the xenon arc lamp and the sample which filters the spectral range 300–800 nm. The light stressing tests were conducted at two different irradiation power conditions: approximately at 400 and 765 W/m<sup>2</sup>, corresponding to 24 and 46 kJ/min·m<sup>2</sup>, respectively. The inner temperature in the light cabinet was always maintained constant at 35 °C. The samples were exposed to light in quartz cells perfectly stoppered, to avoid any evaporation of the solvent.

UV-VIS spectra were recorded at the following conditions: wavelength range 200–400 nm, scan rate 1 nm/s, time response 1 s, and spectral band 1 nm. The UV-VIS spectra were recorded just after sample preparation (t = 0), every 2 min until to 60 min, then every 5 min up to 150 min, and finally at 160 min when 400 W/m<sup>2</sup> irradiation power was selected. When the higher value was chosen, the experiment was stopped after 120 min, collecting spectra every 2 min.

During both experiments, 11 sample aliquots were collected from the photoreactor vessel and analyzed by LC-DAD-MS at the following exposure times: 0, 2, 6, 8, 15, 20, 40, 60, 80, 140 and 190 min when 400 W/m<sup>2</sup> irradiation power was selected and at 0, 2, 4, 8, 15, 25, 40, 50, 80, 100, 200 min for the 765 W/m<sup>2</sup> irradiation power value.

### 2.5. LC-DAD-MS analysis

Chromatographic analysis was performed with a 70:30 methanol/water mixture as mobile phase in isocratic elution conditions using the following instrumental parameters: injection volume 10  $\mu$ L, flow rate 400  $\mu$ L/min, cone voltage 55 V, spray voltage 3.5 kV, extractor voltage 3 V, desolvation gas flow 600  $\mu$ L/min, source temperature 150 °C, solvent temperature 400 °C, acquisition rate 0.05 s (UV-DAD) and 0.21 s (MS), and time of analysis 30 min. A positive electrospray ionization source (ESI+) was used as radiation source. Acquisitions were analyzed in full scan mode. UV-DAD detection was performed in the scan range 200–400 nm. MS detector worked with the mass range 50–500 Da.

### 2.6. Software

UV Spectrophotometer ChemStation software (Agilent Technologies, CA, USA) and MassLynx<sup>®</sup> 4.1, from the Mass Spectrometer (Waters Corporation, MA, USA), were used for control, data acquisition and initial data preprocessing. DataBridge was the file converter provided with MassLynx<sup>®</sup> to convert LC-DAD-MS raw files (.raw) into Common Data Format files (.cdf). A Bioinformatics Toolbox<sup>™</sup> MATLAB<sup>®</sup> routine (The Mathworks, Inc., MA, USA) was employed to read.cdf files format into MATLAB<sup>®</sup>. UV Spectrophotometric data were directly exported to.csv files and imported to MATLAB<sup>®</sup>. All chemometric analyses were performed under MATLAB<sup>®</sup> computer environment. MCR-ALS (2.0 GUI version [34]) method (from “http://www.mcrals.info/”) was implemented as MATLAB<sup>®</sup> function. Curve Fitting Toolbox<sup>™</sup> 3.5.1 was also employed to estimate kinetic profiles.

## 3. Data structure

The data sets obtained from the photodegradation experiments were arranged in different data matrices listed in Table 1. Fig. 1 details the matrix structure of the different data sets obtained from the different TAM exposure experiments at the UV radiation power of 400 W/m<sup>2</sup>.

Table 1  
Names and dimensions of the different data matrices obtained in the TAM photodegradation experiments (see Fig. 1).

W/m <sup>2</sup>	Data matrix	Nr. Rows (Reaction or elution time values)	Nr. Columns (Wavelengths or n/%)
400	D <sub>400sp</sub>	50	131
	D <sub>400DAD</sub> <sup>a</sup>	985 <sup>b</sup>	131
	D <sub>400DAD,avg</sub>	10244	131
	D <sub>400sp,400DAD,avg</sub>	10294	131
	D <sub>400MS</sub> <sup>a</sup>	985 <sup>b</sup>	351
	D <sub>400MS,avg</sub>	10244	351
	D <sub>400DAD,400MS,sp,avg</sub>	10244	482
765	D <sub>765sp</sub>	61	131
	D <sub>765DAD</sub> <sup>a</sup>	1042	131
	D <sub>765DAD,avg</sub>	11462	131
	D <sub>765sp,765DAD,avg</sub>	11523	131
	D <sub>765MS</sub> <sup>a</sup>	1042	351
	D <sub>765MS,avg</sub>	11462	351
	D <sub>765DAD,765MS,sp,avg</sub>	11462	482
400 and 765	D <sub>400sp,765sp</sub>	111	131

<sup>a</sup> n = 1, ..., 11 sample aliquots (chromatographic run number).

<sup>b</sup> 394 time values, between 15.7 and 22.5 min of elution time, for 0 min of UV-light irradiation reaction time (n = 1); 985 time values, between 13 and 30 min of elution time, for the remainder aliquots (n = 2, ..., 11).

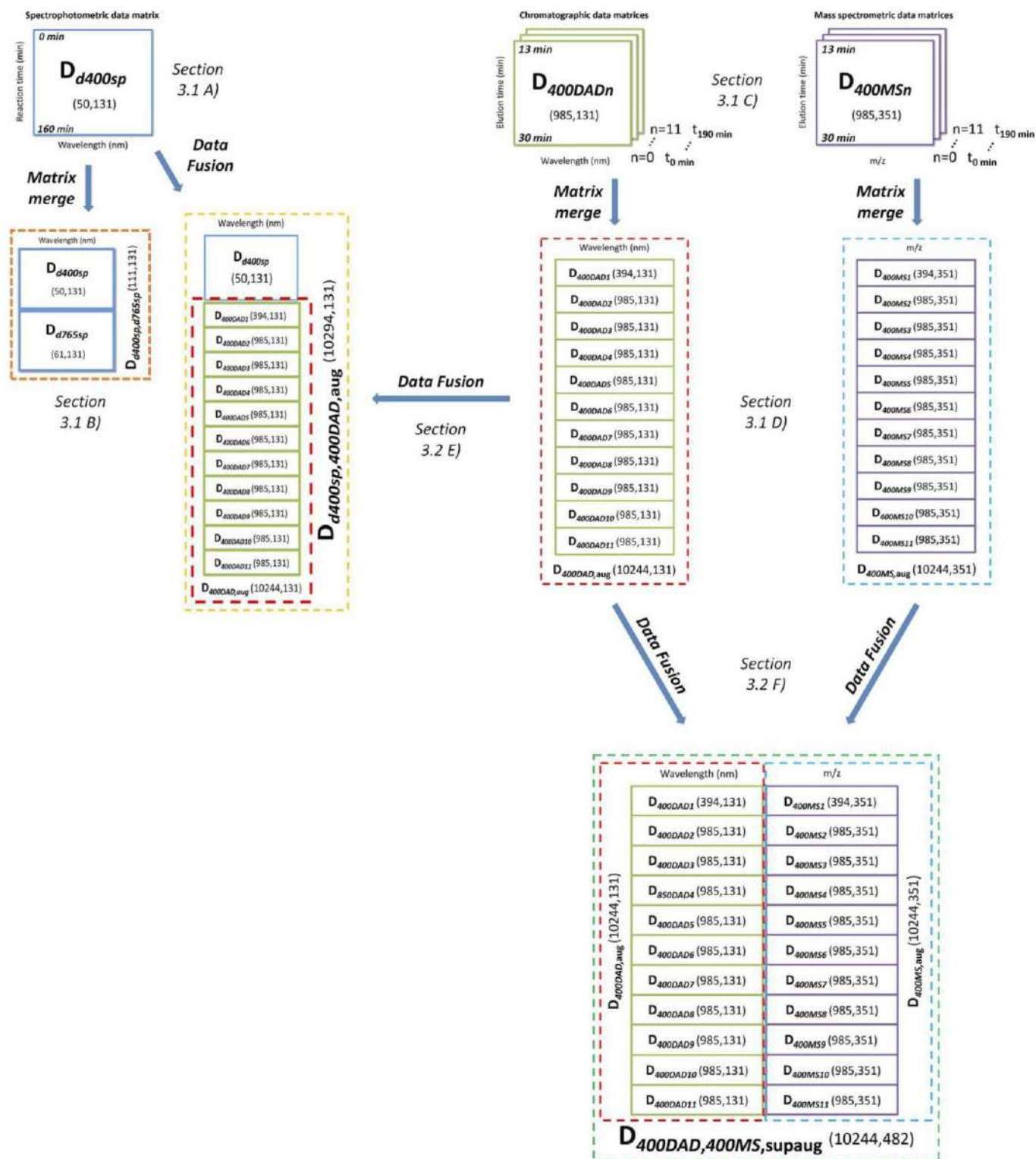


Fig. 1. Matrix arrangements of the different data sets obtained in the TAM photodegradation experiment at 400 W/m<sup>2</sup> and analyzed by MCR-ALS.

3.1. Single instrumental detection (UV or MS) data matrix arrangement

A) Data matrices  $D_{d400sp}$  of size (50,131) and  $D_{d765sp}$  of size (61,131) refer to the UV spectrophotometric analysis of TAM photodegradation at the two different irradiation power conditions: 400 and 765 W/m<sup>2</sup>, respectively. All collected spectra were acquired at 131 wavelengths, between 210 and 340 nm. When the lower

irradiation power was selected, 50 UV-VIS spectra were acquired between 0 min and 160 min of irradiation time (see Fig. 1) while for the higher irradiation power, 61 UV-VIS spectra were acquired between 0 min and 120 min. These two data matrices have the information concerning the UV-VIS spectral evolution and concentration changes of the chemical species involved in the respective photodegradation process [28].

- B) A comparison study of the photodegradation of TAM at the two irradiation power conditions was performed through the simultaneous analysis of  $D_{d400sp}$  and  $D_{d765sp}$  data matrices, which was achieved by building a column-wise augmented matrix  $D_{d400sp,d765sp}$  of size  $(61 + 50 = 111,131)$  (see Fig. 1). The analysis of this augmented data matrix allows the comparison of the two experiments. In this new data arrangement, the columns in each one of the two merged data matrices were the same: 131 wavelengths (210–340 nm) [28].
- C) A deeper investigation of the species produced during photodegradation was achieved by chromatographic analysis on the TAM samples collected at the different irradiation times above reported. Therefore, a total number of 22 sample aliquots of the TAM solution along the photodegradation experiments ( $11 \times 2$ ) were analyzed by LC-DAD and LC-MS, giving the corresponding data matrices sets (see Fig. 1):
- The 11 aliquots collected under the lower irradiation power and analyzed by LC-DAD gave 11 data matrices  $D_{400DADn}$ , where  $n=1, \dots, 11$  sample aliquots, and, the same 11 aliquots analyzed by LC-MS, also gave 11 data matrices  $D_{400MSn}$  (see Fig. 1). The rows of these data matrices contained the spectra (UV-DAD or MS) at the different elution times (394 time values between 15.7 and 22.5 min of elution time, for the aliquot at 0 min of irradiation ( $n=1$ ), and 985 time values, between 13 and 30 min of elution time, for the other aliquots ( $n=2, \dots, 11$ )). The columns of these matrices had, respectively, the chromatographic data profiles recorded at the 131 wavelengths ( $D_{400DADn}$  in the range 210–340 nm) and at the 351 m/z values ( $D_{400MSn}$  in the range 50–400 m/z) [30,32].
  - Similarly, for the other experiment carried out at the higher irradiation power, 11 data matrices  $D_{765DADn}$  of size (1042,131) and 11 data matrices  $D_{765MSn}$  of size (1042,351) were obtained. Once again, in these data matrices, the rows contained the spectrometric responses (UV-DAD or MS) at the different elution times (1042 time values in all cases, in the range 12–30 min) and the columns had the chromatographic data profiles recorded at different wavelengths ( $D_{765DADn}$  at the 131 wavelengths in the range 210–340 nm) or at the different m/z values ( $D_{765MSn}$  at the 351 m/z values in the range 50–400 m/z), respectively.
- D) A more involved analysis of the photodegradation process was achieved using the complete information from the two chromatographic approaches, LC-DAD and LC-MS, by means of the joint analysis of the 11  $D_{DADn}$  and 11  $D_{MSn}$  data matrices, using first each one of the two LC detection methods separately. This analysis could be achieved as shown in Fig. 1 by building the two ‘tall’ column-wise augmented matrices for each one of the two detection systems at both irradiation power conditions:  $D_{400DAD,aug}$  (of size  $(394 + 10 \times 985,131)$  or  $(10244,131)$ ) at 400 W/m<sup>2</sup> and UV-DAD detection,  $D_{765DAD,aug}$  (of size  $(11 \times 1042,131)$  or  $(11462,131)$ ) at 765 W/m<sup>2</sup> and UV-DAD detection, and  $D_{400MS,aug}$  (of size  $(394 + 10 \times 985,351)$  or  $(10244,351)$ ) at 400 W/m<sup>2</sup> and MS detection, and  $D_{765MS,aug}$  (of size  $(11 \times 1042,351)$  or  $(11462,351)$ ) at 765 W/m<sup>2</sup> and MS detection. These four column-wise augmented data matrices contained the complete set of chromatographic data arrays from the 11 sample aliquots (at the different photodegradation reaction times). This matrix augmentation procedure was possible because all the aliquots were analyzed by the same instrumental technique, either LC-DAD or LC-MS. In such a way, to assemble these data matrices in a column-wise way, the number and meaning of the columns in each of the data sets must be necessarily the same, either the 131 wavelengths (210–340 nm) or the 351 m/z values (50–400 m/z) [28,30]. These four column-wise augmented

matrices,  $D_{400DAD,aug}$ ,  $D_{765DAD,aug}$ ,  $D_{400MS,aug}$ , and  $D_{765MS,aug}$ , were first analyzed separately.

### 3.2. Multiple instrumental detection (UV and MS) data matrix arrangements: data fusion (UV, LC-DAD, and LC-MS data)

- E) In the particular case of UV-DAD detection system, an additional data matrix arrangement was possible by considering that the photodegradation experiments monitored by UV spectrophotometry and LC-DAD runs produced individual data matrices having in common the same vector column space (wavelengths) spanned by the UV-VIS spectra of the common components [35]. In this case, the UV spectrophotometric data matrices obtained during the initial monitoring of the photodegradation reaction at both studied irradiation power conditions,  $D_{d400sp}$  (50,131) and  $D_{d765sp}$  (61,131), could be set on top of their respective column-wise augmented LC-DAD data matrices:  $D_{400DAD,aug}$  (10244,131) and  $D_{765DAD,aug}$  (11462,131) (see Fig. 1). These two new column-wise augmented matrices will be named  $D_{d400sp,400DAD,aug}$  (of size  $(50 + 394 + 10 \times 985,131)$  or  $(10294,131)$ ) and  $D_{d765sp,765DAD,aug}$  (of size  $(61 + 11 \times 1042,131)$  or  $(11523,131)$ ).
- F) Additionally, it was still possible to consider the possibility of the joint chemometric analysis of the 11 aliquots using simultaneously the two detection systems, UV-DAD and MS, in each chromatographic run. This would imply performing a different type of matrix augmentation. Since the same samples were analyzed by both detection systems, the data matrix augmentation could be performed also row-wisely (see Fig. 1) [36]. In this case, a new supraaugmented data matrix was obtained for each irradiation power condition:  $D_{400DAD,400MS,supaug}$  of size (10244,482) and  $D_{765DAD,765MS,supaug}$  of size (11462,482) for 400 and 765 W/m<sup>2</sup>, respectively, with 482 columns each one (131 wavelengths + 351 m/z values). In these supraaugmented data matrices, the rows represented the UV-VIS and MS spectra at different elution times.

## 4. Data pretreatment and analysis

### 4.1. Data synchronization and preprocessing

In all chromatographic experiments, the elution time window between 13 and 30 min was selected and further processed by MCR. In the chromatographic elution before 13 min no chemical species of interest were detected; only very low intensity signals, mostly due to the solvent and instrumental noise (background contributions) were present. After 30 min, no further elution of sample components was observed. Noise contributions were largely removed from the selected elution time window by applying a Savitzky-Golay smoothing data filter [37]. The final chromatographic data had then a better signal to noise quality.

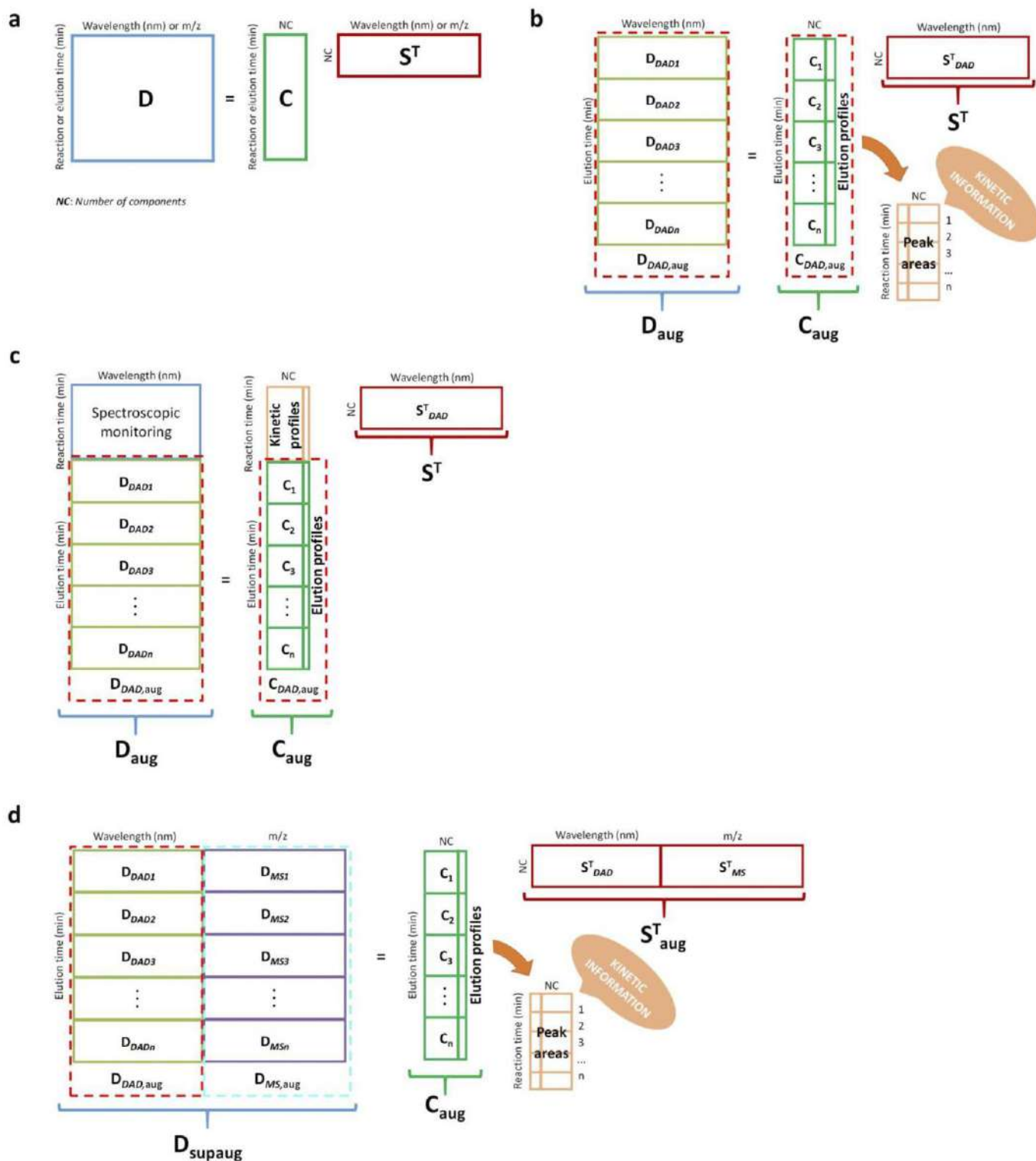
Due to the different frequency of the two chromatographic detectors (UV-DAD and MS) in spectra acquisition, as above described, a data pretreatment was additionally needed to check for the correspondence in time of the elution profiles in both detectors and for the further simultaneous chemometric analysis (data fusion). Since the spectra acquisition speed of the DAD system was faster than the spectra acquisition of the MS detection system, a higher number of UV than MS spectra were acquired. To match the two detection systems, a linear interpolation (and smoothing) was used to synchronize UV-DAD and MS detector signals at the same time frequencies. Moreover, since the two detection systems were in tandem, a brief time delay on peak signal recording occurred, due to the transfer tubing between UV-DAD (first) and MS (second) detectors. This time delay was estimated to be approximately 0.2020 min (12 s) and required the time axis shifting of MS data to previously acquired UV-DAD time scale.

4.2. MCR-ALS data analysis method

MCR-ALS is a mixture analysis chemometric method which decomposes in a bilinear way an experimental data matrix, **D**, having the

analytical mixed responses of multiple components, into their pure contributions (profiles) in its two data modes [38]:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \tag{1}$$



**Fig. 2.** MCR-ALS bilinear models for the analysis of the different data matrices generated from the experimental data collected during TAM photodegradation study: a) for the UV spectrophotometric monitoring experiment or for a single chromatographic run, b) for the simultaneous analysis of the set of data matrices at the different chromatographic runs ( $n = 1, \dots, 11$ ) using UV-DAD, c) for the simultaneous analysis of the UV spectroscopic monitoring experiment and of the whole set of the LC-DAD chromatographic runs, and d) for the simultaneous chemometric analysis of the different sample aliquots using both chromatographic detection systems (UV-DAD and MS).



In this data decomposition,  $C$  is a matrix with the concentration profiles of the mixture constituents,  $S^T$  matrix has their pure spectra profiles, and  $E$  has the residual variance not explained by the MCR model,  $CS^T$ . This equation is an extension of the Beer-Lambert's law to multi-wavelength and multi-sample analyses and summarizes the set of linear equations defining the concentration and spectral contributions of each component in the chemical mixture system [25]. This section describes the application of the MCR-ALS bilinear method to the analysis of the different data matrices generated during the photodegradation study (see Fig. 2):

- 1) The UV spectrophotometric monitoring of the photodegradation experiments provided a data matrix  $D$  (either  $D_{d400sp}$  or  $D_{d765sp}$  in Section 3.1 A) where rows are the spectra collected at different reaction times and columns are kinetic traces at different wavelengths [26,28]. The MCR bilinear model applied to them is defined, as explained before, by Equation (1) and shown graphically in Fig. 2a.  $C$  and  $S^T$  matrices give the concentration and UV-VIS spectra profiles of the components (chemical species) formed during the UV-light irradiation experiments, respectively. When the simultaneous analysis of  $D_{d400sp}$  and  $D_{d765sp}$  data matrices is done to compare the photodegradation of TAM drug solutions at the two studied irradiation power conditions ( $D_{d400sp,d765sp}$ ), the resulting  $C$  matrix is a column-wise augmented matrix ( $C_{aug}$ ) which contains the concentration profiles of the chemical species formed during each one of the UV-light irradiation experiments, and  $S^T$  is a matrix that has their related UV-VIS spectra, common in both photodegradation experiments.
- 2) The chromatographic analysis of the set of aliquots extracted from the degradation experiments gives, for every sample, a data matrix ( $D_{400DADn}$  or  $D_{765DADn}$  in LC-DAD and  $D_{400MSn}$  or  $D_{765MSn}$  in LC-MS, where  $n = 1, \dots, 11$  sample aliquots) that can also be analyzed by MCR-ALS using a bilinear model similar to that shown in Equation (1) and Fig. 2a. One of these data matrices (see Section 3.1C) has one single chromatographic run and it contains in its rows the UV-VIS or MS spectra recorded at the different elution times and in its columns the chromatograms related to different wavelengths or different  $m/z$  values [30,39].  $C$  and  $S^T$  matrices give the concentration (elution) and UV-VIS or MS spectra profiles of the components (species) present in the aliquot at the considered reaction (degradation) time.
- 3) The set of data matrices at the different chromatographic runs ( $n = 1, \dots, 11$ ) obtained by the LC-DAD and LC-MS analysis of the 11 reaction sample aliquots can be merged, for both irradiation power conditions, in column-wise augmented data matrices  $D_{aug}$ , as it was previously described in Section 3.1 D) ( $D_{400DAD,aug}$ ,  $D_{765DAD,aug}$ ,  $D_{400MS,aug}$ , and  $D_{765MS,aug}$ ) and shown in Fig. 1 for  $400\text{ W/m}^2$ . The application of MCR-ALS to these column-wise augmented data matrices is described by Equation (2) below and it is shown graphically in Fig. 2b for the case of the LC-DAD detection:

$$D_{aug} = [D_1; D_2; \dots; D_n] = [C_1; C_2; \dots; C_n]S^T + [E_1; E_2; \dots; E_n] \\ = C_{aug}S^T + E_{aug}, \quad (2)$$

where  $C_{aug} = [C_1; C_2; \dots; C_n]$ , with  $n = 1, \dots, 11$  chromatographic runs, is a column-wise augmented concentration matrix formed by the  $C_n$  submatrices containing the pure elution profiles of the individual species involved in each chromatographic run, and  $S^T$  is a matrix that has their related UV-VIS or MS spectra, common to all chromatographic runs of all sample aliquots simultaneously analyzed [28,30,31]. From the resolved elution profiles, their peak areas can be calculated as a function of the reaction time, and the corresponding kinetic profiles of the components involved in the photodegradation process can be derived. In the case of MS detection, these components can be identified from their resolved mass spectra.

- 4) The set of chromatographic runs using the LC-DAD system can be also simultaneously analyzed with the matrix obtained in the UV-Visible

spectroscopic monitoring of the degradation experiments, as it was explained previously in Section 3.2 E) and shown in Fig. 1 for  $400\text{ W/m}^2$  ( $D_{d400sp,400DAD,aug}$  and  $D_{d765sp,765DAD,aug}$  augmented data matrices) [32]. The MCR-ALS analysis of these two augmented data matrices can be also analyzed by the bilinear model in Equation (2). In this case, moreover, the concentration submatrix corresponding to the UV-Visible spectroscopic monitoring experiment provides the kinetic reaction profiles of the resolved components (see Fig. 2c). This analysis will provide directly the correspondence between the reaction species, their chromatographic elution responses, and their corresponding kinetic profiles and UV-VIS spectra.

- 5) Finally, it is indeed also possible (as already shown in Section 3.2 F) and Fig. 1 for the supraaugmented data matrices  $D_{400DAD,400MS,supaug}$  and  $D_{765DAD,765MS,supaug}$ ) the simultaneous chemometric analysis of the different aliquots using both detection systems (UV-DAD and MS). This implies performing the MCR-ALS analysis on the supraaugmented data matrix ( $D_{supaug}$ ). This analysis of the 'fused' UV-DAD and MS data by the bilinear model is described in Equation (3) below and in Fig. 2d, where  $C_{aug}$  is the column-wise augmented concentration matrix formed by the  $C_n$  submatrices containing the pure elution profiles of the individual species involved in each chromatographic run, common for both detection systems, and  $S_{aug}^T$  is the row-wise augmented matrix with their related UV-VIS ( $S_{DAD}^T$ ) and MS spectra ( $S_{MS}^T$ ), common to all chromatograms analyzed [32]:

$$D_{supaug} = [D_{1,DAD}; D_{2,DAD}; \dots; D_{n,DAD}] + [D_{1,MS}; D_{2,MS}; \dots; D_{n,MS}] \\ = [C_1; C_2; \dots; C_n] [S_{DAD}^T; S_{MS}^T] + [ \\ \times [E_{1,DAD}; E_{2,DAD}; \dots; E_{n,DAD}], [E_{1,MS}; E_{2,MS}; \dots; E_{n,MS}] \\ = C_{aug}S_{aug}^T + E_{supaug}. \quad (3)$$

This analysis requires the time synchronization between UV-DAD and MS detectors (see Section 4.1). In this simultaneous analysis, besides, from the resolved elution profiles in  $C_{aug}$  matrix, their peak areas can be calculated as a function of the reaction time, and the corresponding kinetic profiles of the components involved in the photodegradation process can be derived.

MCR-ALS algorithm uses an iterative Alternating Least Squares (ALS) optimization procedure for the decomposition of the data matrix, under a suitable set of constraints. This optimization runs until the model  $CS^T$  minimizes as much as possible the error in the reproduction of the original data set,  $D$  [32]. MCR-ALS requires the initial postulation of the number of components which can be derived from the results of the Singular Value Decomposition (SVD) [40] of the original data matrix,  $D$ . In the case of photodegradation studies, however, where the reaction pathway is often unknown and different photoproducts can be generated, the determination of the number of species involved in the process by SVD is sometimes difficult due to linear dependence in the concentration profiles ( $C$ ) of the reaction products [25,27]. This is because the chemical rank (mathematical rank in absence of noise) can give a lower number of components than the real number of absorbing species [41]. These chemical rank deficiencies can be decreased, at least partially, by appropriate experimental and data analysis procedures [42]. Initial estimates, either of  $S^T$  or  $C$  matrices, needed to start the iterative ALS optimization can be obtained from purest experimental spectra or purest elution profiles respectively, using a similar procedure than for the SIMPLISMA method [43,44].

MCR-ALS constraints are used to provide meaningful shapes to the profiles in  $C$  and  $S^T$  matrices and to suppress or minimize as much as possible the ambiguity in the final solutions [32]. Constraints are chemical or mathematical properties that the pure component profiles should accomplish. They can be applied in a different way to the concentration and spectral directions ( $C$  and  $S^T$  matrices), to the profiles of the different components and to the different submatrices in a multiset

structure [31]. The constraints used in this photodegradation study were: *non-negativity* (NN), which avoids the presence of negative values in the concentration and spectral profiles; *unimodality* (U), which allows only the presence of a single maximum per concentration/elution profile; *closure* (C), which forces concentration profiles within the closed system to add up to a certain constant value to fulfill the mass balance condition; and *selectivity* or *local rank information*, with which some of the components may be forced to be absent at some time/elution or spectral ranges [38]. In multiset data structures, the constraint named *correspondence of species* acts as a selectivity/local rank constraint setting the absence of some compounds in full concentration submatrices of the augmented  $\mathbf{C}_{\text{aug}}$  matrix [36]. More details about the different steps of the MCR-ALS procedure can be found in the literature [26,38].

Additionally, the set of constraints applied in a specific case, may not guarantee the achievement of a unique solution, and rotational ambiguities can also be present because linear combination of the finally obtained MCR resolutions, fulfilling also the applied constraints, can give the same data fit [42]. It is for this reason that simultaneous analysis of multiple correlated experiments, for example those done under different initial conditions, via row- and/or column-wise data matrix augmentation strategies, can help to decrease rank deficiency problems, and decrease the extension of rotational ambiguities too, allowing a better estimation of the correct number of reaction species and the correct resolution of the studied system. The parameters used to indicate the fit quality of the MCR-ALS results are the percentage of lack of fit (% lof) and the explained variance ( $R^2$ ), which are defined as follows:

$$\% \text{ lof} = 100 \cdot \sqrt{\frac{\sum_{ij} (d_{ij} - d_{ij}^*)^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad (4)$$

$$R^2 = 100 \cdot \frac{\sum_{ij} d_{ij}^2 - \sum_{ij} (d_{ij} - d_{ij}^*)^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2} \quad (5)$$

where  $d_{ij}$  is the matrix element in the row  $i$  and column  $j$  from the original

data matrix ( $\mathbf{D}$ ) and  $d_{ij}^*$  is the same element obtained with the MCR-ALS model [30,45].

## 5. Results and discussion

### 5.1. Analysis of TAM photodegradation UV spectrophotometric data

TAM photodegradation process was firstly monitored by UV-Visible spectroscopy. Fig. 3 (on the left) shows the evolution of the acquired spectra along time for the two experiments performed with the SUNT-EST<sup>®</sup> at 400 and 765 W/m<sup>2</sup>. The plot of these two data matrices ( $\mathbf{D}_{d400sp}$  and  $\mathbf{D}_{d765sp}$ ) provided an initial view of the evolution of the photodegradation process. It can be observed that during the first part of the experiments the spectra variation was larger than afterwards, during the remaining process. This fact suggests that major chemical transformations occur at the beginning of the photodegradation process which evolves more slowly thereafter.

MCR-ALS analysis of the UV-Visible spectrophotometric data from these two experiments ( $\mathbf{D}_{d400sp}$  and  $\mathbf{D}_{d765sp}$  in Table 1) provided a first estimation of the kinetic profiles (concentration profiles,  $\mathbf{C}$  matrix in Equation (1) and Fig. 2a) for the species formed during the photodegradation process, and also of the pure UV-VIS spectra associated with them ( $\mathbf{S}^T$  matrix in Equation (1) and Fig. 2a). Initial SVD analysis showed the possible presence of at least four species during the photodegradation process. Initial estimates of their spectra were obtained from the purest experimental spectra. Constraints used during the ALS optimization were non-negativity of pure spectra and of kinetic profiles, and selectivity at the starting point of the photodegradation experiment (initial (Z)-TAM is the only component at the starting time conditions of the photodegradation experiment). Assuming also that all the degradation photo-products formed have absorbance in the investigated UV region, closure constraint was applied to concentration (kinetic) profiles to ensure a mass balance equation. The fulfillment of this closure constraint by the data was confirmed because the data fitting was not worse when this constraint was applied. Explained variances and lack of fit values (in %) of the MCR-ALS analysis at the two irradiation power conditions are

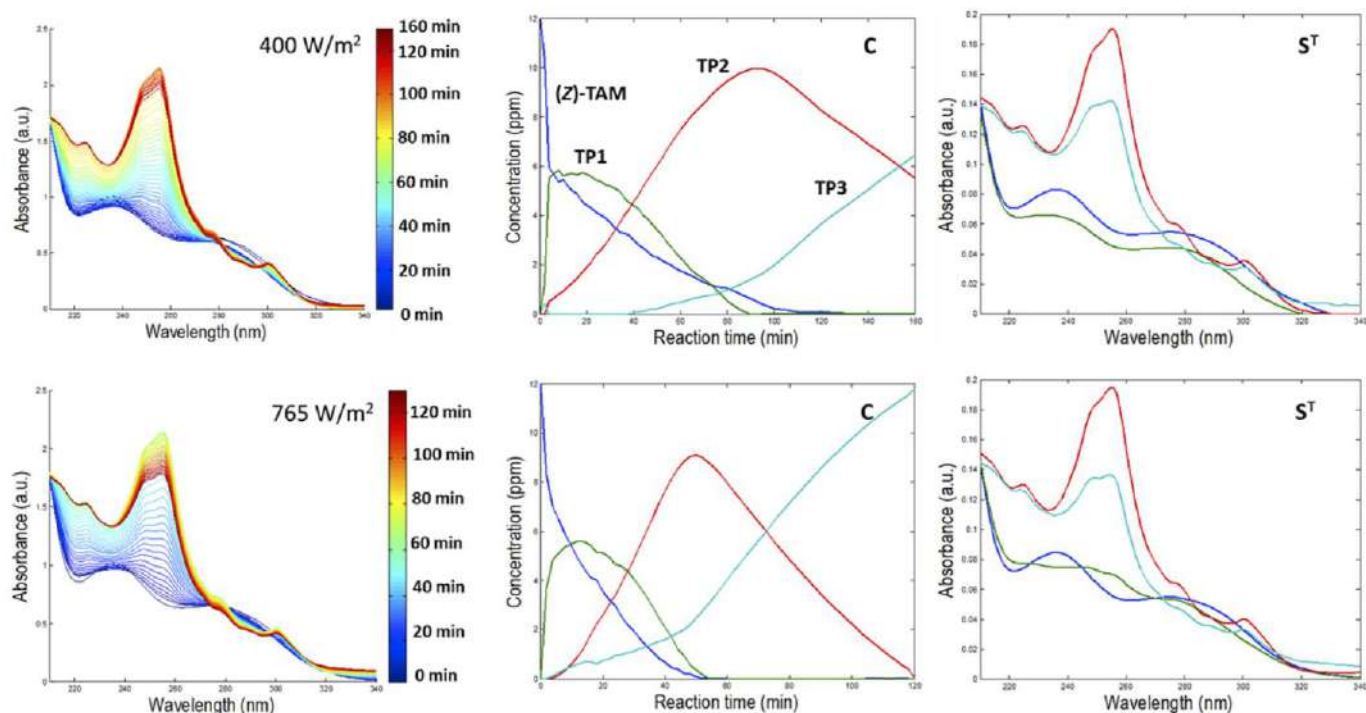


Fig. 3. Spectral evolution along time for the UV spectrophotometric monitoring of TAM photodegradation experiments at 400 and 765 W/m<sup>2</sup> ( $\mathbf{D}_d$  matrices) and their MCR-ALS resolved kinetic profiles ( $\mathbf{C}$ ) and pure UV-VIS spectra ( $\mathbf{S}^T$ ).

**Table 2**  
Summary of the MCR-ALS results obtained in the analysis of the data matrices (see Section 3.1 and 3.2) from the different TAM photodegradation experiments.

Matrix	Reaction time (min)	Number of components (NC)	Constraints	Lack of fit (%)	Explained variance (%)
$D_{d400sp}$	0–160	4	NN, C, Sel	0.53	99.99
$D_{d765sp}$	0–120	4	NN, C, Sel	0.28	99.99
$D_{d400sp, d765sp}$	0 160, 0 120	5	NN, C, Sel	0.33	99.99
	0	2	NN, U, Sel	0.71	99.91
	2	3		0.99	99.99
	6	5		0.69	99.99
	8	5		0.82	99.99
	15	6		0.92	99.99
$D_{400DADn}$ ( $n=1, \dots, 11$ )	20	6		1.17	99.98
	40	5		0.85	99.99
	60	6		1.14	99.98
	80	7		0.73	99.99
	140	6		0.65	99.99
	190	5		0.73	99.99
$D_{400DAD, aug}$	0–190	7	NN, U, Corr	6.05	99.63
$D_{d400sp, 400DAD, aug}$	0 160, 0 190	7	NN, U, Corr	9.94	99.01
	0	2	NN, U, Sel	2.02	99.96
	2	3		1.85	99.97
	6	4		1.80	99.96
	8	5		1.88	99.96
	15	4		2.27	99.95
$D_{400MSn}$ ( $n=1, \dots, 11$ )	20	5		1.84	99.96
	40	6		1.68	99.97
	60	6		2.36	99.94
	80	6		3.13	99.90
	140	6		2.88	99.91
	190	6		3.16	99.89
$D_{400MS, aug}$	0–190	8	NN, U, Corr	17.71	96.86
$D_{400DAD, 400MS, aug}$	0–190	7	NN, U, Corr	5.40	99.71

NN: Non-negativity, U: Unimodality, C: Closure, Sel: Selectivity, Corr: Correspondence of species. *Note:* Only non-negativity constraints (in C and  $S^T$ ) were applied to the non-chemically relevant components.

given below in Table 2. In both cases, excellent data fits were obtained.

Fig. 3 also shows the concentration profiles (kinetic profiles, C matrix) and the pure UV-VIS spectra ( $S^T$  matrix) resolved by MCR-ALS in these two photodegradation experiments. During the experiment under 400 W/m<sup>2</sup>, tamoxifen ((Z)-TAM), is represented by a blue line. After 2 min of UV-light irradiation, its concentration decreased to half its initial concentration (12 ppm) and continued being reduced until disappearing afterwards. Simultaneously, a first transformation product (TP1, green line in Fig. 3) was rapidly formed and its kinetic profile decreased and finally disappeared. A new photoproduct (TP2, red line in Fig. 3) appeared at the beginning of the experiment reaching its maximum concentration level at 90 min at 400 W/m<sup>2</sup> and decreased thereafter. Concurrently with the decrease of TP1, a new photoproduct (TP3, cyan line in Fig. 3) appears, with a very similar spectrum to TP2, with increasing concentration until the end of the experiment. When the irradiation power was increased to 765 W/m<sup>2</sup>, the photodegradation process occurred more quickly, but essentially, it followed the same pathway, as it can also be seen in Fig. 3. The slight differences observed on the UV-VIS spectra of both resolutions, especially with TP1 (green line), are probably due to still unresolved rotational ambiguities. As shown in Fig. 3, this species has its concentration profile completely overlapped under the other concentration species profiles, as well as its UV spectrum. In Table 2, results of the MCR-ALS analysis of the merged matrix  $D_{d400sp, d765sp}$ , corresponding to the simultaneous analysis of the system at the two irradiation powers are given. UV-VIS spectra of the pure components ( $S^T$  matrix) were very similar to those present in Fig. 3 and the TP1's UV-VIS spectrum was approximately an average of those obtained in the individual MCR-ALS resolutions.

Despite this useful information about the degradation kinetics of TAM obtained by UV-Visible spectroscopy, only a rough description of the process was achieved, because of the likely problems associated with the resolution of kinetic processes [32,46]. Chemical species with similar kinetics and photoproducts with very similar UV-VIS spectra would not be easily distinguished using this approach. Moreover, it is also possible that some of the formed photoproducts do not show UV-Visible

absorption and, thus, cannot be detected using this technique. The complementary use of the LC-DAD-MS powerful analytical methodology can provide a deeper insight on the distinct species formed during the photodegradation process and of their reaction pathway.

### 5.2. Analysis of TAM photodegradation LC-DAD and LC-MS data

11 sample aliquots of the TAM solution were collected and analyzed by LC-DAD-MS at various times along the photodegradation reaction, for each experiment at the two studied irradiation power conditions. To improve the resolution of the coeluted chromatographic peaks, MCR-ALS was applied to the data sets obtained using UV-DAD and MS full scan detection methods ( $D_{400DADn}$ ,  $D_{765DADn}$ ,  $D_{400MSn}$  and  $D_{765MSn}$  data matrices in Table 1) as above explained. Results from LC-MS were used for the identification and confirmation of the formed photoproducts.

Table 2 summarizes MCR-ALS results obtained in the individual and simultaneous analysis of all the analyzed aliquots ( $D_{400DADn}$  and  $D_{400MSn}$  with  $n=1, \dots, 11$  sample aliquots), using the irradiation power of 400 W/m<sup>2</sup>, both for LC-DAD and LC-MS. Constraints used in these MCR-ALS analyses were non-negativity of C and  $S^T$  profiles, and unimodality and selectivity of C profile. These two last constraints were especially useful to resolve the species profiles of some of the photoproducts and to disregard background contributions. The number of components considered in each case varied from 2 (at reaction time 0 min) to 7 (at the latest reaction time values). Recorded LC-DAD and LC-MS signals have associated instrumental noise, baseline, and background contributions. When these contributions are not changing randomly, they can be modelled as additional MCR-ALS components (with a chromatographic profile (C) and spectra signal ( $S^T$ )). Thus, more components than the chemically relevant ones are usually introduced into the model to achieve a better resolution of the system. In this particular case, the presence of strong baseline and background contributions were modelled with two extra (non-chemically relevant) MCR-ALS components which allowed a better data fit and improved the resolution of the profiles of the four other photoproducts and of initial (Z)-TAM. Only non-negativity

constraints in both modes ( $C$  and  $S^T$ ) were applied to these two extra MCR-ALS components. Therefore, only five of the seven components resolved by MCR-ALS, including initial TAM, were finally assigned to the investigated photodegradation products (see below). Lack of fit values were always good, between 1 and 3% in the case of LC-DAD data, and between 2 and 5% in the case of LC-MS data.

Results of the simultaneous MCR-ALS analysis of the complete set of

chromatographic runs, at the irradiation power of  $400 \text{ W/m}^2$  and using only one of the two detection systems ( $D_{400DAD, \text{aug}}$  and  $D_{400MS, \text{aug}}$  augmented data matrices, see Equation (2)), are given in Table 2. In this case, MCR-ALS analysis gives the  $C_{\text{aug}}$  matrix, which has the elution profiles of all resolved species formed during the photodegradation process separately for each chromatographic run, and the  $S^T$  matrix which has their corresponding pure UV-VIS or MS spectra, which are the

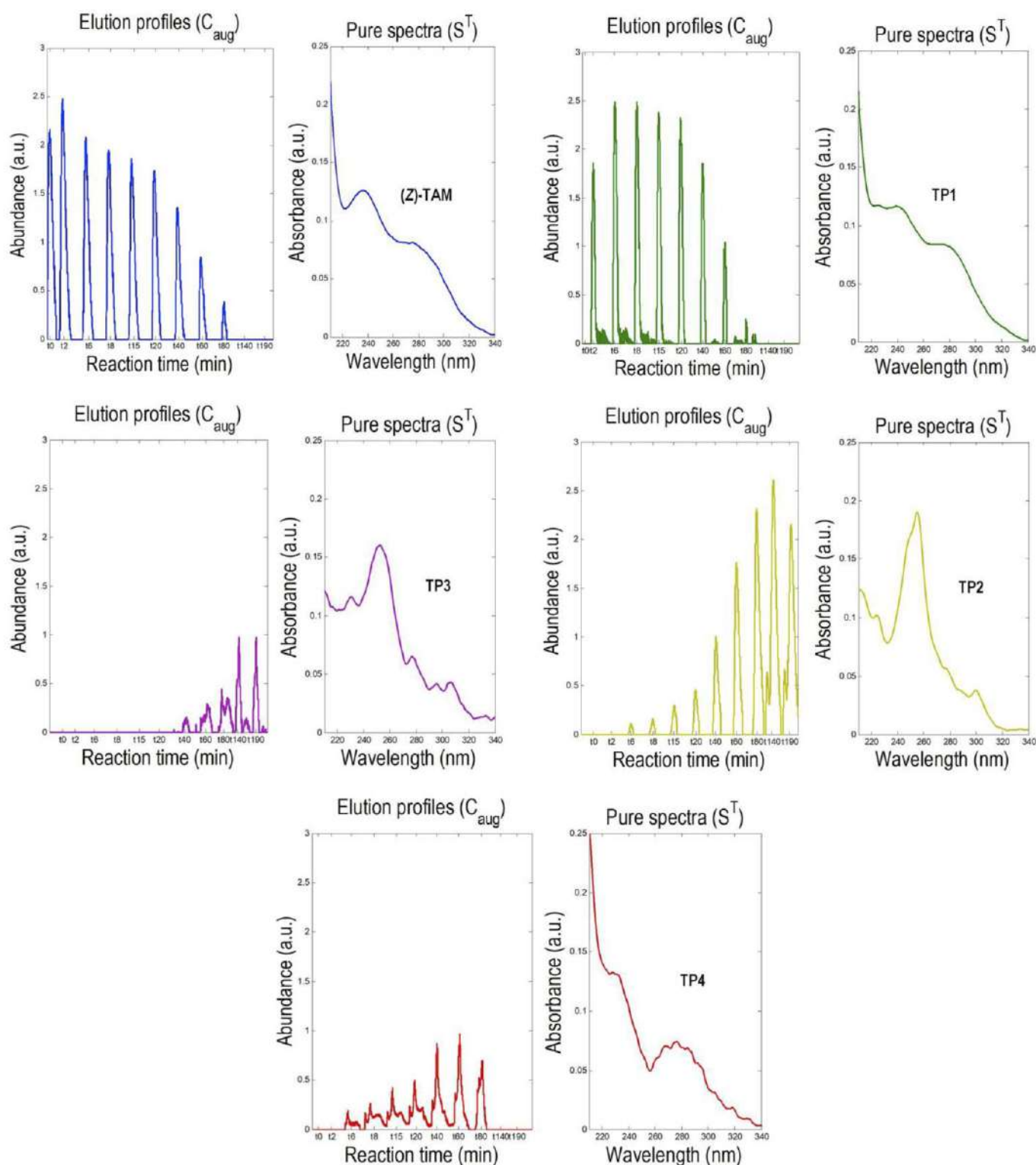


Fig. 4. Elution profiles ( $C_{\text{aug}}$ ) and pure UV-VIS spectra ( $S^T$ ) resolved by simultaneous MCR-ALS analysis of the LC-DAD data of the 11 sample aliquots from TAM photodegradation experiment at  $400 \text{ W/m}^2$  ( $D_{400DAD, \text{aug}}$ ).

same for the same species in the different chromatographic runs (see Fig. 2b). Constraints used in this MCR-ALS analysis were: non-negativity of  $C$  and  $S^T$  and unimodality of  $C$ . Correspondence between species in the different runs [36] was also constrained to set their presence/absence in the different chromatographic runs of the augmented  $C_{\text{aug}}$  concentration matrix. Seven MCR-ALS components were obtained in this analysis: five species (including initial TAM) and two extra non-chemically relevant components.

Fig. 4 shows  $C_{\text{aug}}$  and  $S^T$  matrices for the resolution of  $D_{400\text{DAD},\text{aug}}$ , where the blue component is assigned to the initial tamoxifen ((Z)-TAM), and the green component to the first transformation product immediately formed after initial light exposure (TP1). Due to the similarity between the UV-VIS spectra of these two components, it can be assumed that the green component should have a very similar structure to tamoxifen, indicating therefore that it could be its isomer ((E)-TAM). Its MS spectrum can confirm this hypothesis and also previous results in the literature [23]. TP2 (yellow) and TP3 (magenta) components in Fig. 4 should correspond to the red and cyan components in Fig. 3, obtained in the analysis of the UV-Visible spectroscopic monitoring experiments. These two species have been now correctly differentiated each other due to their slightly shifted chromatographic elution profiles, although their UV-VIS spectra were very similar. The resolution of their MS spectra will confirm them and give more information about the identity of these two photoproducts. A new last species (TP4) can be assigned to the red component, which appears after 6 min of light irradiation and disappears by the end of the photodegradation process. This component, however, was not detected in the UV-Visible spectroscopic monitoring experiments.

From the changes of the peak areas of the resolved elution profiles of the different components with time (see Fig. 2b), a rough estimation of the kinetic profiles of the species detected by LC-DAD and resolved by MCR-ALS can be derived, as is shown in Fig. 5 for the 400 W/m<sup>2</sup> experiment. Curve fitting was applied to peak areas of the MCR-ALS resolved elution profiles of the different components as a function of the reaction time using a series of single or multi-exponential functions according to a kinetic model of parallel reactions [47]. The decay of (Z)-TAM (blue) has been adjusted by a single exponential function while the evolution of TP1 (green species) has been adjusted by a bi-exponential function. TP2 and TP3 (yellow and magenta species, respectively) were also adjusted by multi-exponential functions. The concentration of the initial (Z)-TAM species decreases gradually until it

disappears before the end of the photodegradation experiment. Green species (TP1), which was formed instantly at the beginning of the UV-light irradiation, reaches its maximum at 8 min reaction time, and disappears after 140 min of light irradiation. Yellow and magenta species (TP2 and TP3, respectively), evolve from the beginning and are still present at the end of the photodegradation experiment. TP2 seems to appear first and reaches a higher concentration than TP3. The last red component (TP4) (not shown in Fig. 5) seems to be formed from a secondary reaction because it appeared during the photodegradation process and disappeared before it ended.

Resolution of  $D_{400\text{MS},\text{aug}}$  LC-MS augmented matrix was more challenging. The presence of isomers among the obtained photoproducts ((Z)-TAM and TP1, and TP2 and TP3), as confirmed in the next section, implies that these species will have the same molecular mass (same molecular ion  $[M+H]^+$ ) and, probably, similar fragmentation. Unimodality and selectivity constraints, as discussed above, are especially useful to resolve the profiles of isomeric photoproducts and to disregard background contributions. In fact, their application allowed the proper resolution of these compounds in the UV-DAD detector, due to their slightly shifted chromatographic elution and to minor differences in their UV-VIS spectra (see Fig. 4). However, in the case of using only the MS detector, these species could not be completely resolved. The joint resolution through LC-DAD and LC-MS data fusion, as explained in Section 5.4, allows an interpretable resolution of the MS spectra and the correct identification of the different obtained species.

### 5.3. Simultaneous analysis of TAM photodegradation UV spectrophotometric and LC-DAD data

Another data fusion was done in the simultaneous MCR-ALS analysis of the UV spectroscopic monitoring experiments (matrices  $D_{d400\text{sp}}$  and  $D_{d765\text{sp}}$ ) and of the LC-DAD chromatographic data sets grouped in the corresponding augmented matrices ( $D_{400\text{DAD},\text{aug}}$  and  $D_{765\text{DAD},\text{aug}}$ ), which it was performed by creating the new column-wise augmented data matrices  $D_{d400\text{sp},400\text{DAD},\text{aug}}$  and  $D_{d765\text{sp},765\text{DAD},\text{aug}}$ , as explained in Section 3.2 E) and shown in Fig. 1 for 400 W/m<sup>2</sup>. In this case (see Equation (2)), the new  $C_{\text{aug}}$  augmented matrix has the kinetic traces of the species formed during the photodegradation process and their elution profiles in each chromatographic run (see Fig. 2c). However, the  $S^T$  matrix has the common pure UV-VIS spectra of the species in both, in the photodegradation experiments and chromatographic runs.

The simultaneous MCR-ALS analysis of the UV spectrophotometric and LC-DAD (data fusion) allowed for the improved estimation of the kinetic profiles. With this analysis, the species detected in the UV spectrophotometric experiments are forced to have the same UV spectrum as those present in the LC-DAD analyses and, therefore, to have a unique UV spectrum, which facilitates its correct resolution. Consequently, a clear relationship between the reaction species, their kinetic profiles, their corresponding chromatographic elution profiles, and their pure UV-VIS spectra is obtained. In addition, the identification of the different photoproducts will be facilitated by the LC-MS analysis, especially when LC-DAD and LC-MS data are simultaneously analyzed.

Table 2 gives a summary of the results of this MCR-ALS analysis for the lower irradiation power condition experiment. Constraints used in this simultaneous MCR-ALS analysis were the same as those previously applied in the resolution of the LC-DAD data matrices. A MCR-ALS model with a total number of four species plus (Z)-TAM was used (two extra MCR-ALS components were assigned to baseline and background contributions). In this case, the  $C_{\text{aug}}$  and  $S^T$  matrices were practically the same as those already shown in Fig. 4.

According to the results obtained until now, the pure compound (Z)-TAM (blue) and its initial transformation product (TP1, green) have a slightly different absorbance spectrum: (Z)-TAM exhibits a strong UV absorption band at 277 nm with a tail at wavelengths over 310 nm and another absorption band at 236 nm. TP1, instead, does not present this band at 236 nm and only exhibits a UV band at 277 nm. This is in

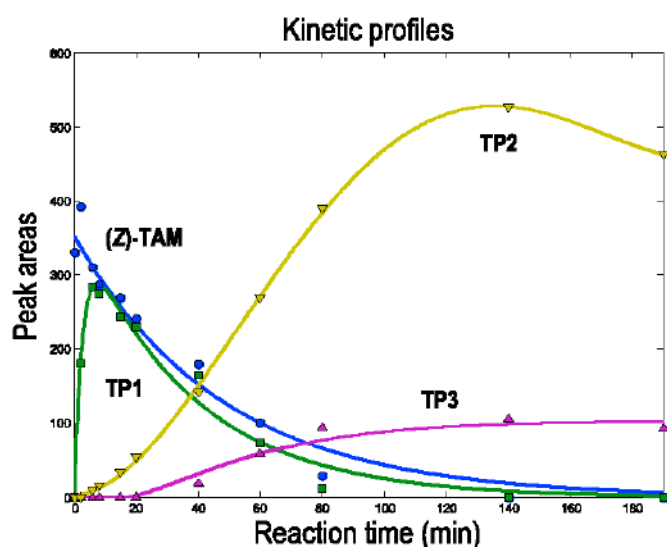
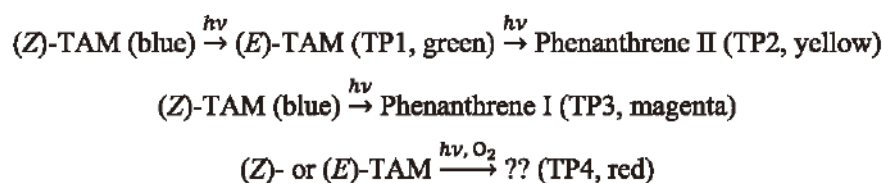


Fig. 5. Evolution of the LC-DAD chromatographic peak areas as a function of the reaction time (kinetic profiles) from the MCR-ALS analysis of  $D_{400\text{DAD},\text{aug}}$ . Data points are the markers and lines are the kinetic profiles curve fitting estimations (see explanation in the manuscript).

agreement with the UV-VIS spectra found in the literature [23]. Therefore, the first transformation photoproduct could be (*E*)-TAM, the isomer of (*Z*)-TAM initial compound, which is immediately formed when UV-light was irradiated. On the other hand, TP2 and TP3 photoproducts exhibit rather similar spectra too, although it was possible to differentiate two characteristic bands in their respective absorbance spectra. The component designed as TP3 (magenta) has absorption bands at 236, 255, 280, and over 300 nm, whereas the compound designed as TP2 (yellow) has only the absorption bands at 255 and 300 nm. This last species has also an unusual valley between 220 and 240 nm. In the literature [23], UV-VIS spectra with these slight differences correspond to Phenanthrene I and II, respectively. TP4 (red) shows a strong UV absorption band near 280 nm. No information about this UV-VIS spectrum for TP4 was found in the literature. As it will be shown below, the MS spectrum obtained for this species allows for its possible identification.

Based on the time evolution of the kinetic profiles resolved in the kinetic and chromatographic experiments (see Fig. 5), a model with two parallel reactions can be then proposed. (*Z*)-TAM is firstly very fast transformed to give its isomer, (*E*)-TAM, which stands probably in equilibrium, and thereafter both isomers photodegraded to give their derivatives Phenanthrene I (TP2) and II (TP3), respectively. On the other hand, TP4 seems to be formed from a secondary reaction. The full reaction pathway could be:



According to this proposal, the photodegradation pathway for the photodegradation of TAM in solution implies that (*Z*)-TAM, when exposed to UV-light, gives a reaction intermediate (excited state) which undergoes an isomerization reaction or a photocyclization reaction, giving (*E*)-TAM and Phenanthrene I, respectively. Moreover, when the isomer (*E*)-TAM is excited again by UV-light, another reaction intermediate is reached and another photocyclization takes place, giving Phenanthrene II [23]. Finally, according to the literature, it is postulated that when oxygen is present, these reaction intermediates could interact with oxygen molecules and produce the unknown photoproduct (TP4) [21]. The investigated system has simultaneously two types of reactions: photoisomerization equilibria and photodegradation kinetics. Therefore, this system is more complex than traditional kinetic single type of process. At this point, future work is planned to estimate rate constants and validate the proposed pathway using hard-soft modelling (HS-MCR-ALS) could be performed [26,30–32].

#### 5.4. Simultaneous analysis of TAM photodegradation LC-DAD-MS data and final photoproduct identification

In order to identify and confirm the proposed photoproduct species described above, LC-DAD and LC-MS data matrices ( $D_{DAD, \text{aug}}$  and  $D_{MS, \text{aug}}$ ) were fused (merged) and analyzed simultaneously, also at both irradiation power conditions, using the row- and column-wise superaugmented data matrices ( $D_{\text{supaug}}$ ) (see Equation (3)). Resolved elution profiles of all species formed during the photodegradation process were obtained separately for each chromatographic run ( $C_{\text{aug}}$ ), and the pure UV-VIS and MS spectra of all these species were arranged in the new row-wise augmented matrix of the pure DAD and MS spectra ( $S_{\text{aug}}^T$ ) (see Fig. 2d), which are common to all chromatographic runs. This approach is very powerful and describes the entire system with even higher reliability. Table 2 shows the MCR-ALS results of the analysis of the  $D_{\text{supaug}}$

data matrix from the lower irradiation power condition experiment ( $D_{400DAD, 400MS, \text{supaug}}$ ). Constraints used in this MCR-ALS analysis are given in the table. As in the LC-DAD analysis for the 400 W/m<sup>2</sup> experiment, only five among the seven MCR-ALS resolved components were finally assigned to the investigated photodegradation pathway. The two extra MCR-ALS components were needed to model the presence of the baseline and the background contributions. The results obtained for the 765 W/m<sup>2</sup> experiment matrix ( $D_{765DAD, 765MS, \text{supaug}}$ ) were very close to those obtained from the 400 W/m<sup>2</sup> experiment. Although, in this case, a sixth extra species was recovered by MCR, but it was not further characterized because no information about a pure MS spectrum containing  $m/z$  367 as molecular ion was found in the literature.

Fig. 6 shows the pure mass spectra ( $S_{MS}^T$  submatrix) resolved by MCR-ALS for the lower irradiation power condition LC-DAD-MS monitoring experiment. In ESI<sup>+</sup> mode, the protonated molecular ion  $[M+H]^+$  was formed for both parental compounds and photoproducts. MS spectra of the first and second MCR-ALS components (blue and green) confirmed that TP1 should be the (*E*)-isomer of TAM, with the same base peak at  $m/z$  372  $[M+H]^+$  and with identical molecular formula ( $C_{26}H_{29}NO$ ), but different  $m/z$  fragmentation ratio of the confirmation ion ( $m/z$  72), assigned to dimethylaminopropylene ion produced by cleavage of the side-chain [21,23,24]. This different  $m/z$  fragmentation ratio allowed distinguishing between these two compounds. The UV-VIS spectra ob-

tained in this analysis ( $S_{DAD}^T$  submatrix) were practically identical to those obtained previously in the preceding LC-DAD data analysis (see Fig. 4).

Despite of having the same molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  370 and very similar UV-VIS spectra [21,23,24], photoproducts TP2 and TP3 were identified as Phenanthrene II and I, respectively. They gave a different fragmentation pattern, due to a loss of a methyl group in the case of Phenanthrene I (-CH<sub>3</sub>, 15 Da). Thus, the cleavage of the common molecular ion of the photoproducts produced, for Phenanthrene II, a fragment ion at  $m/z$  72. In contrast,  $m/z$  58 fragmentation seemed to be more favorable for Phenanthrene I. Both photoproducts have, however, the same molecular formula  $C_{26}H_{27}NO$ .

According to the literature [48], *cis-trans* photoisomerization is a typical alkene photochemical fast reaction, and the formation of products such as Phenanthrene I or II due to a photocyclization reaction can be observed in the photochemistry of stilbene-type compounds. In fact, the photocyclization reaction proceed only by absorption of a photon of UV-light by the *cis*-isomer, but not by the *trans*-isomer of the stilbene derivative [48]. This implies that the synthetically more accessible and stable (*Z*)-TAM (compound used as cytostatic drug), which is a *trans*-isomer stilbene derivative, suffers initially a reversible *cis-trans* photoisomerization, to give the mechanistically required *cis*-isomer ((*E*)-TAM) for starting the photocyclization [48]. Because of this regioselectivity preference, it is observed that (see Fig. 5), in the photodegradation of TAM drug, Phenanthrene II (TP2, yellow), which comes from the *cis*-isomer ((*E*)-TAM), appeared before and reached higher concentration than Phenanthrene I (TP3, magenta), which is formed from the other isomer. Photocyclization reaction, in fact, occurs via a dihydrophenanthrene intermediate which may be undetected especially under oxidative conditions [21,48]. Therefore, when TAM is UV-light irradiated, due to the presence of geminal phenyl rings, both isomers are capable of dehydrogenate, leading to two possible phenanthrene products. This

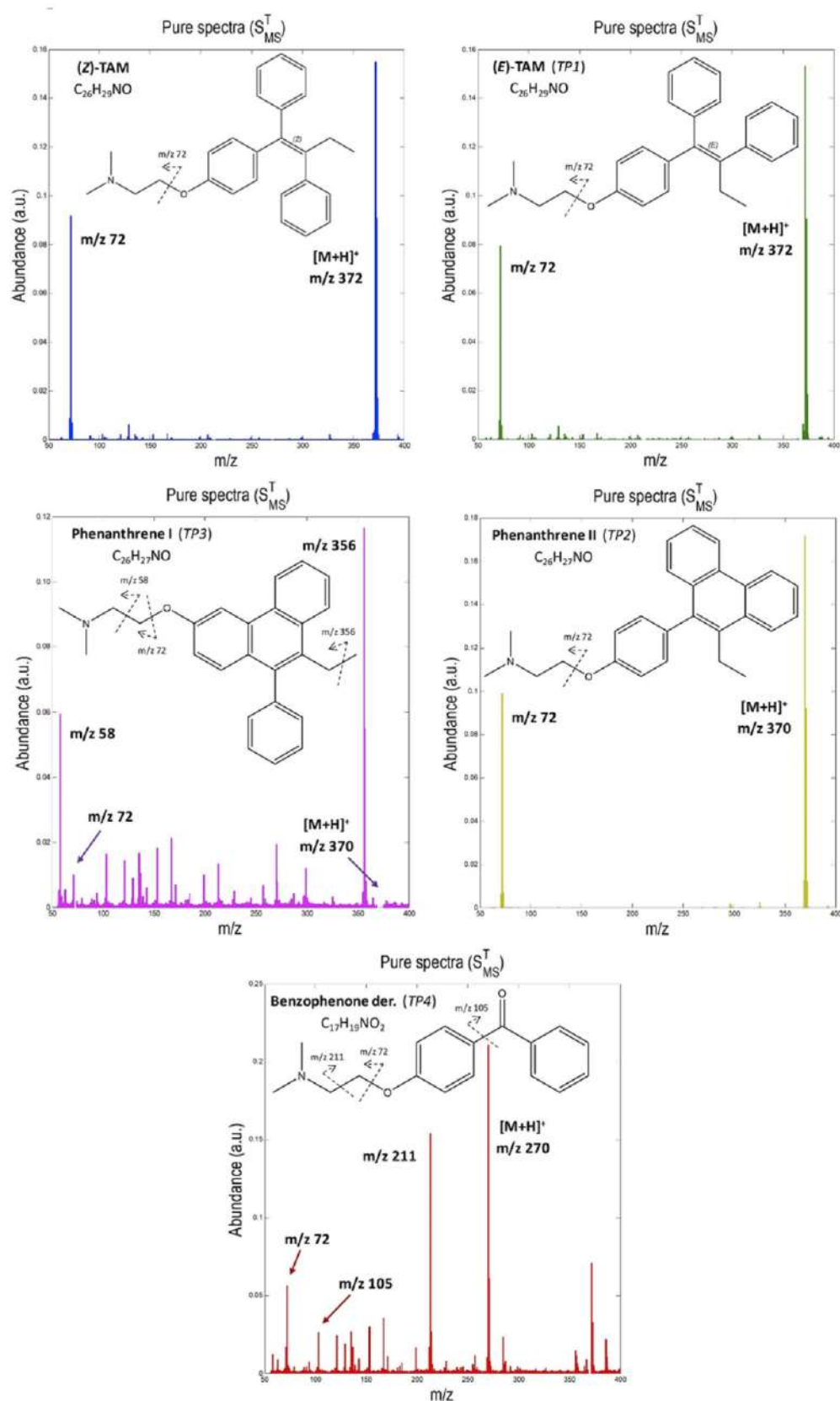


Fig. 6. Identification of photoproducts from their pure MS spectra ( $S_{MS}^T$  sub-matrix) resolved by simultaneous MCR-ALS analysis of the fused HPLC-DAD-MS data from TAM photodegradation experiment at  $400\text{ W/m}^2$  ( $D_{400DAD,400MS, \text{supaug}}$ ).

kind of reactions (pericyclic reactions) are an important part of the stilbene chemistry and, specifically, photocyclization is very useful in synthetic routes as final step to generate a fused aromatic ring at a benzylic position.

Photodegradation of TAM in presence of oxygen, according to the literature, also produces a photooxygenation reaction with the formation of a benzophenone derivative with a molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  270 and molecular formula  $C_{17}H_{19}NO_2$  [21,24]. This benzophenone derivative can be assigned to the TP4 (red component). Fragment ions at  $m/z$  72, 105 and 211 from this photoproduct were obtained and confirm this identification. Its pure UV-VIS spectrum was already given (see Fig. 4). Most probably, photooxygenation was, in this case, a secondary reaction occurring during the sample aliquots removing process, due to the presence of atmospheric oxygen in the solution. This photoproduct did not appear, indeed, during the irradiation experiments continuously monitored by UV spectroscopic because the UV measurement cuvette was always stopped/closed with little air/oxygen interaction. Photooxygenation leading to the ketone derivative is a minor reaction which appears not to involve singlet oxygen reactive species ( $^1O_2$ ). More probably, the excited molecules of TAM were trapped by diradical ground-state molecular oxygen ( $^3O_2$ ) [21]. Extraction of  $\beta$ -hydrogen and shift of the double bond would lead to a hydroperoxide intermediate which, probably via a Hock-cleavage, would give this benzophenone derivative [21]. The formation of this by-product can reduce the useful UV-light flux for the light-dependent reactions occurring in the photodegradation process, since benzophenone and, most likely, its derivative as well, acts as a filter for UV radiation and it is able to absorb this radiation and dissipate it as heat.

## 6. Conclusions

The photodegradation of the antiestrogen drug TAM in aqueous solution was investigated in detail by a combination of spectrometric and chromatographic techniques and chemometric data analysis. Four different photoproducts and initial (*Z*)-TAM, with different kinetic profiles, were resolved and identified.

For all the components, their pure UV-VIS and MS spectra and kinetic profile were estimated. Partial MS fragmentation, using high cone voltage, of the obtained products confirmed the proposed structures. The photodegradation pathway of TAM showed a first photoisomerization of the drug followed by a photocyclization reaction of both isomers. An additional photoproduct can be formed when the isomers are excited by UV-light in presence of oxygen through a photooxygenation reaction. No evidence of a different photodegradation pathway was observed when a higher irradiation power was selected, only an increase in the degradation rate was detected.

MCR-ALS method was able to resolve the mixture of products formed during the photodegradation reaction despite their incomplete chromatographic separation at isocratic conditions. The simultaneous analysis of fused DAD-MS data from these two different instrumental techniques provided a better resolution of the species formed during the photodegradation process. Due to slightly shifted chromatographic elution, minor differences in UV-VIS spectra, and different  $m/z$  fragmentation ratio, isomeric compounds ((*Z*)-TAM and (*E*)-TAM, and Phenanthrene I and II, respectively) were finally correctly identified.

## Acknowledgments

Research grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) for projects CTM2014-60199-P and CTQ2015-66254-C2-1-P are acknowledged by the authors as financial support. Marc Marín-García also acknowledges the FPI grant BES-2016-076678 from MINECO.

## References

- [1] J.P. Besse, J.F. Latour, J. Garric, Anticancer drugs in surface waters. What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environ. Int.* 39 (2012) 73–86.
- [2] H. Franquet-Griell, C. Gómez-Canela, F. Ventura, S. Lacorte, Predicting concentrations of cytostatic drugs in sewage effluents and surface waters of Catalonia (NE Spain), *Environ. Res.* 138 (2015) 161–172.
- [3] C. Gómez-Canela, F. Ventura, J. Caixach, S. Lacorte, Occurrence of cytostatic compounds in hospital effluents and wastewaters, determined by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3801–3814.
- [4] A. Nikolaou, S. Meric, D. Fatta, Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1225–1234.
- [5] S.D. Richardson, T.A. Ternes, Water analysis: emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2813–2848.
- [6] J. Zhang, V.W. Chang, A. Giannis, J.Y. Wang, Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: a review, *Sci. Total Environ.* 445–446 (2013) 281–298.
- [7] P.H. Roberts, K.V. Thomas, The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment, *Sci. Total Environ.* 356 (2006) 143–153.
- [8] T. Kosjek, E. Heath, B. Kompare, Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1379–1387.
- [9] C.J. Halsall, Environmental organic chemistry, in: R. Harrison (Ed.), *Principles of Environmental Chemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2007, pp. 279–313.
- [10] M. Clemons, S. Danson, A. Howell, Tamoxifen (Nolvadex): a review: antitumour treatment, *Canc. Treat. Rev.* 28 (2002) 165–180.
- [11] V. Craig Jordan, The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer, *Curr. Probl. Canc.* 16 (1992) 134–176.
- [12] V.C. Jordan, Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer, *Br. J. Pharmacol.* 147 (Suppl. 1) (2006) S269–S276.
- [13] R.K. Pandey, R.D. Wakharakar, P. Kumar, Wittig horner approach for the synthesis of tamoxifen, *Synth. Commun.* 35 (2005) 2795–2800.
- [14] D.W. Robertson, J.A. Katzenellenbogen, Synthesis of the (*E*) and (*Z*) isomers of the antiestrogen tamoxifen and its metabolite, hydroxytamoxifen, in tritium-labeled form, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 2387–2393.
- [15] L. Ferrando-Climent, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: from hospital effluents through urban wastewater to natural environment, *Environ. Pollut.* 193 (2014) 216–223.
- [16] N. Negreira, M.L. de Alda, D. Barceló, Cytostatic drugs and metabolites in municipal and hospital wastewaters in Spain: filtration, occurrence, and environmental risk, *Sci. Total Environ.* 497–498 (2014) 68–77.
- [17] C. Gómez-Canela, N. Cortés-Francisco, F. Ventura, J. Caixach, S. Lacorte, Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry as analytical tools to characterize multi-class cytostatic compounds, *J. Chromatogr. A* 1276 (2013) 78–94.
- [18] T. Kosjek, E. Heath, Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment, *Trac. Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1065–1087.
- [19] Z. Chen, G. Park, P. Herckes, P. Westerhoff, Physicochemical treatment of three chemotherapy drugs: irinotecan, tamoxifen, and cyclophosphamide, *J. Adv. Oxid. Technol.* 11 (2008) 254–260.
- [20] T. Kojima, S. Onoue, F. Katoh, R. Teraoka, Y. Matsuda, S. Kitagawa, M. Tsubako, Effect of spectroscopic properties on photostability of tamoxifen citrate polymorphs, *Int. J. Pharm.* 336 (2007) 346–351.
- [21] M. DellaGreca, M.R. Iesce, M. Isidori, A. Nardelli, L. Previtera, M. Rubino, Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water. Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms, *Chemosphere* 67 (2007) 1933–1939.
- [22] N. Negreira, J. Regueiro, M. López de Alda, D. Barceló, Transformation of tamoxifen and its major metabolites during water chlorination: identification and in silico toxicity assessment of their disinfection byproducts, *Water Res.* 85 (2015) 199–207.
- [23] J. Salamoun, M. Macka, M. Nechvátal, M. Matoušek, L. Knesel, Identification of products formed during UV irradiation of tamoxifen and their use for fluorescence detection in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 514 (1990) 179–187.
- [24] L. Ferrando-Climent, R. Gonzalez-Olmos, A. Anfruns, I. Aymerich, L. Corominas, D. Barceló, S. Rodríguez-Mozaz, Elimination study of the chemotherapy drug tamoxifen by different advanced oxidation processes: transformation products and toxicity assessment, *Chemosphere* 168 (2017) 284–292.
- [25] M. De Luca, G. Ioele, S. Mas, R. Tauler, G. Ragno, A study of pH-dependent photodegradation of amiloride by a multivariate curve resolution approach to combined kinetic and acid-base titration UV data, *Analyst* 137 (2012) 5428–5435.
- [26] M. De Luca, S. Mas, G. Ioele, F. Oliverio, G. Ragno, R. Tauler, Kinetic studies of nitrofurazone photodegradation by multivariate curve resolution applied to UV-spectral data, *Int. J. Pharm.* 386 (2010) 99–107.
- [27] M. De Luca, G. Ragno, G. Ioele, R. Tauler, Multivariate curve resolution of incomplete fused multiset data from chromatographic and spectrophotometric analyses for drug photostability studies, *Anal. Chim. Acta* B37 (2014) 31–37.
- [28] M. De Luca, R. Tauler, G. Ioele, G. Ragno, Study of photodegradation kinetics of melatonin by multivariate curve resolution (MCR) with estimation of feasible band boundaries, *Drug Test. Anal.* 5 (2013) 96–102.
- [29] C. Gómez-Canela, G. Bolívar-Subirats, R. Tauler, S. Lacorte, Powerful combination of analytical and chemometric methods for the photodegradation of 5-Fluorouracil, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 137 (2017) 33–41.



- [30] A. Jayaraman, S. Mas, R. Tauler, A. de Juan, Study of the photodegradation of 2-bromophenol under UV and sunlight by spectroscopic, chromatographic and chemometric techniques, *J. Chromatogr. B* 910 (2012) 138–148.
- [31] S. Mas, A. de Juan, S. Lacorte, R. Tauler, Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard- and soft-modelling approach, *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 18–28.
- [32] S. Mas, R. Tauler, A. de Juan, Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9260–9268.
- [33] Q1B Stability Testing, Photostability testing of new drug substances and products, in: I.C.o.H. (ICH), 1996.
- [34] J. Jaumot, A. de Juan, R. Tauler, MCR-ALS GUI 2.0: new features and applications, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 140 (2015) 1–12.
- [35] R. Tauler, Multivariate curve resolution applied to second order data, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133–146.
- [36] R. Tauler, M. Maeder, A. de Juan, 2.24-Multiset data analysis: extended multivariate curve resolution, in: T.R. Brown S, R. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 473–505.
- [37] A. Savitzky, M.J.E. Golay, Smoothing and differentiation of data by simplified least Squares procedures, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627–1639.
- [38] A. de Juan, S.C. Rutan, R. Tauler, 2.19-Two-Way data analysis: multivariate curve resolution iterative resolution methods, in: T.R. Brown S, R. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 325–344.
- [39] A. de Juan, R. Tauler, Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 195–210.
- [40] G.H. Golub, C.F. Van Loan, *Matrix Computations*, second ed., The John Hopkins University Press, London, 1989.
- [41] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, A. Izquierdo-Ridorsa, Multivariate resolution of rank-deficient spectrophotometric data from first-order kinetic decomposition reactions, *J. Chemometr.* 12 (1998) 183–203.
- [42] S.C. Rutan, A. de Juan, R. Tauler, 2.15-Introduction to Multivariate Curve Resolution, *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 249–259.
- [43] W. Windig, J. Gullment, Interactive self-modelling mixture analysis, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1425–1432.
- [44] W. Windig, S. Markel, Simple-to-use interactive self-modelling mixture analysis of FTIR microscopy data, *J. Mol. Struct.* 292 (1993) 161–170.
- [45] R. Tauler, M. Maeder, 2.20-Two-Way data analysis: multivariate curve resolution error in curve resolution, in: T.R. Brown S, R. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 345–363.
- [46] A. Izquierdo-Ridorsa, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, Second-order multivariate curve resolution applied to rank-deficient data obtained from acid-base spectrophotometric titrations of mixtures of nucleic bases, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 183–196.
- [47] C. Capellos, B.H.J. Bielski, *Kinetic Systems: Mathematical Description of Chemical Kinetics in Solution*, John Wiley & Sons, Inc., University of Michigan, 1972.
- [48] F.B. Mallory, C.W. Mallory, Photocyclization of stilbenes and related molecules, in: W.G.e.a. Dauben (Ed.), *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc., Bryn Mawr College, Bryn Mawr, Pennsylvania, 1984, pp. 1–456.

## ARTICLE II: SULFAMETOXAZOL

Marín-García, M.; De Luca, M.; Ragno, G.; Tauler, R. (2022). Coupling of spectrometric, chromatographic, and chemometric analysis in the investigation of the photodegradation of sulfamethoxazole.

*Talanta*, 239, 122953.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122953>





Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## Coupling of spectrometric, chromatographic, and chemometric analysis in the investigation of the photodegradation of sulfamethoxazole

Marc Marín-García<sup>a</sup>, Michele De Luca<sup>b</sup>, Gaetano Ragno<sup>b</sup>, Romà Tauler<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup> Department of Pharmacy, Health, and Nutritional Sciences, University of Calabria, 87036, Rende, CS, Italy

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Sulfamethoxazole (SMX)  
Environmental pollutants  
Drug photostability  
UV-Visible spectrophotometry and LC-DAD-MS  
Chemometric methods  
Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS)  
Data fusion strategy  
Workflow

### ABSTRACT

A workflow is proposed for the study of the photodegradation process of the sulfamethoxazole (SMX) based on the combination of different experimental techniques, including liquid chromatography, mass spectrometry, UV-Visible spectrophotometry, and the treatment of all the analytical data with advanced chemometric methods. SMX, which is one of the most widely used antibiotics worldwide and has been found at remarkable concentrations in various rivers and effluents over all Europe, was degraded in the laboratory under a controlled source of UV radiation, which simulates the environmental solar radiation (Suntest). Kinetic monitoring of the photodegradation process was performed using UV-Visible spectrophotometric measurements and by further Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Mass Spectrometry analysis (LC-DAD-MS). Additionally, the acid-base properties were also investigated to see how the pH can affect the speciation of this substance during the photodegradation process. Based on the Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) application, the proposed chemometric method coped with the large amounts of data generated by the different analytical techniques used to monitor the evolution of the photodegradation process. Their simultaneous analysis involved applying a data fusion strategy and an advanced MCR-ALS constrained analysis, which allowed and improved the description of the complete degradation process, detecting the different species of the reaction, and identifying the possible transformation products formed. A total number of six species were resolved in the degradation process of SMX. In addition to the initial SMX, a second species corresponded to a conformational isomer, and the other four species represented different photoproducts, which have also been identified. Furthermore, three different acid-base species of SMX were obtained, and their  $pK_a$  values were estimated.

### 1. Introduction

Antibiotics, which have been broadly used for several decades, have emerged one of the most important groups of pharmaceuticals in modern medical science [1]. Among these compounds, the sulpha drugs, also named sulphonamides, are a group of synthetic antimicrobial agents containing a sulfonamide group, derivatives of the sulphanilamide, the first effective chemotherapeutic agent to be widely used for the treatment of bacterial infections in humans [2]. Due to their extensive use, these drugs are found in different water sources, e.g., in surface and ground waters [3]. The current purification systems for environmental water treatment in wastewater treatment plants (WWTPs) remove a considerable amount of these chemicals, but these technologies are not yet able to completely eliminate these compounds [4–6]. Possible adverse effects for wildlife (see below) are caused not only by the

original compounds released into the environment but also by their degradation products or metabolites [7,8]. Although antibiotics are not as persistent and bio-accumulative as other organic pollutants, many recent studies have reported their presence in the aquatic environment from trace to micro levels (from  $\text{ng L}^{-1}$  to  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), especially in conventional sewage treatment plants [9]. They have also been detected in rivers and lakes, and their persistence in surface water and sediments has been indirectly confirmed [5,10].

Although sulphonamides have been used since the 1970s, the potentially harmful effects on the environment are still poorly understood. However, due to their widespread use, their potential adverse impact on the environment is of primary public interest [1], and it is essential to know how these organic pollutants can be transformed in the environment. Due to the resistance of some antibiotics to biodegradation, photodegradation by UV-light (solar) irradiation represents one of the

\* Corresponding author.

E-mail address: [Roma.Tauler@idaea.csic.es](mailto:Roma.Tauler@idaea.csic.es) (R. Tauler).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122953>

Received 2 August 2021; Received in revised form 4 October 2021; Accepted 8 October 2021

Available online 14 October 2021

0039-9140/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

most important transformation processes for these organic products and plays a significant role during cleaning procedures in wastewater treatment plants [11].

Sulfamethoxazole (SMX) is the commonly used name for 4-amino-*N*-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzenesulfonamide. It is currently prescribed to treat urinary tract infections, ear infections, conjunctivitis, bronchitis, sinusitis, and toxoplasmosis [2,12]. Furthermore, it is used in aquaculture and livestock [9]. SMX is also used in veterinary medicine as a feed additive to promote growth and weight gain as well as for treating diseases or as preventative medicine [1,12]. For that reason, in some studies, it is detected as a residue in pork meat [13] or farm soil [14].

SMX has been identified, along with other pharmaceuticals, in many municipal sewage treatment plant effluents in several countries in Europe, including Spain [15]. The found concentrations ranged from 0.01 to 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  [9]. It has also been detected in surface and groundwater at concentration levels up to 500  $\text{ng L}^{-1}$ , in WWTP influents at 440  $\text{ng L}^{-1}$ , and about 90  $\text{ng L}^{-1}$  in their effluents [16]. Generally, when that drug is absorbed into the body, some biotransformation reactions occur, and SMX is metabolized into more polar compounds, which shows that most of this substance is decomposed. However, a significant amount of the original drug, around 15–25%, is not metabolized, and the parent compound will leave the organism via urine or be excreted into the feces [1].

Sulfamethoxazole is hydro-soluble and a weak chelating compound, which binds organic matter to the soil through cation binding and cation exchange mechanism [1]. Consequently, it can migrate from human and animal bodies and enter the aquatic environment unimpeded [17]. Additionally, it is sufficiently stable to maintain some significant activity. Furthermore, some excreted metabolites can even be transformed back to the original active drug [18]. Due to its low biodegradability, sulfamethoxazole can persist in the environment for a long time. It has been shown that even at low concentrations, it may pose a severe environmental risk by altering the microbial community structure, which can eventually result in a thorough induction of antibacterial resistance or cause cross-resistance in pathogenic bacteria [10,17]. In addition, SMX can affect the aquatic ecosystem by inhibiting the life activity of aquatic organisms [19]. For these reasons, it is crucial to study how sulfamethoxazole can be degraded and what transformation products (by-products) are formed as a result.

In the last two decades, the use of chemometric methods has become more popular in the study of different types of chemical processes and analytical problems [20–30]. Analytical systems and samples are usually far from being simple and are often composed of many chemical constituents that must be simultaneously analyzed. In other cases, some interesting analytes should be analyzed in the presence of many other chemical interferences. Therefore, more complex instrumentation is needed to cope with these systems, as well as, more sophisticated data analysis tools are required in order to handle and interpret the information contained in the data generated by them [31]. In particular, the study of the degradation and transformation of pharmaceutical compounds implies the analysis of multicomponent systems involving multiple equilibria and kinetic chemical processes, which should also be investigated by combining several analytical and chemometric methods [32–37]. Spectrophotometric and mass spectrometric methods are helpful for monitoring and studying the chemical reactions of organic compounds in solution, like photodegradation and titration processes. Thus, from the combination of these experimental techniques and from the analysis of the obtained data with chemometric methods, it is possible to carefully investigate the drug degradation processes and identify the different transformation products.

In this paper, a complete step-by-step workflow for the study of the photodegradation process of SMX is proposed, based on the application

of the Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) chemometric method [31,38]. For this aim, SMX was exposed to UV radiation in the laboratory, simulating the environmental solar radiation (Suntest). Monitoring of the photodegradation reaction was performed by UV–Visible spectrophotometry, and different sample aliquots collected during the process were further analyzed by LC-DAD-MS. The study of the acid-base properties of this compound was also carried out to see how the pH can affect its speciation and degradation.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Sulfamethoxazole (SMX), 4-amino-*N*-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzenesulfonamide, was purchased as an analytical standard ( $\geq 99\%$ ) (Sigma-Aldrich, MO, USA). SMX solutions were prepared using water from a Milli-Q® Integral 3 Water Purification System (Millipore Corporation, MA, USA) as a solvent, except for one solution prepared with deionized water (DW). All used sample materials were covered with aluminum foil to avoid any light contact. The SMX's acid-base titration experiments were performed by using hydrochloric acid 37% (v/v) and sodium hydroxide, both from Sigma-Aldrich and analytical reagent purity. Water and methanol (both HPLC grade) and formic acid 98% (v/v) from Merck-Millipore (Darmstadt, Germany) were used for the later chromatographic analysis.

### 2.2. Materials

#### 2.2.1. Light stressing test instrument (suntest)

Photodegradation tests were performed using a solar simulator Suntest CPS (Atlas Material Solution, IL, USA), equipped with a 1500 W Xenon arc lamp and specific filters limiting light transmission below 290 nm (UV-C region). This system closely simulated sunlight exposure of samples. A 10-mm quartz glass cuvette, which does not absorb in the UV region, was employed as a sample vessel. The cuvette was laid down inside the Suntest instrument because, in that position, the incident light beam was perpendicular to the surface of the flat irradiance sensor. In this case, the fluence rate and the irradiance can be considered equivalent [39].

#### 2.2.2. Acid-base titration

An Orion 5-Star Plus meter (Thermo Scientific, MA, USA) with a refillable Ag/AgCl pH/ATC Triode electrode was used in the acid-base titration experiments. NIST buffer solutions of pH 4.01, 7.00, and 10.01 were used as calibration sets. An electrode calibration procedure was done every time before a bunch of pH measurements.

#### 2.2.3. Monitoring system: UV–Visible spectrophotometry

The changes in the SMX absorbance spectrum during photodegradation and acid-base titration experiments were monitored using a UV–Visible molecular absorption spectrophotometer HP-Agilent 8453 (Agilent Technologies, CA, USA) with a diode array detector (DAD).

#### 2.2.4. Chromatographic equipment

To perform the chromatographic analysis, an Ultra-Performance Liquid Chromatograph (UPLC) connected to a UV–Visible diode array detector (PDA Detector, Waters 9960 series, MA, USA) was used. This equipment was coupled to a benchtop triple quadrupole mass detector (TQ Detector, Acquity Waters, MA, USA) (UPLC-DAD-MS/MS). The

analytical determination was performed using a  $2.1 \times 100$  mm ID, particle size  $1.7 \mu\text{m}$ , ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_8$  column (Waters Corporation, MA, USA).

### 2.2.5. Software

UV-Visible Spectrophotometer ChemStation B.02.01 software (Agilent Technologies, CA, USA) and MassLynx® 4.1, from the Mass Spectrometer (Waters Corporation, MA, USA), were used for control, data acquisition, and initial data preprocessing. DataBridge was the file converter provided with MassLynx® to convert LC-DAD-MS raw files (.raw) into Common Data Format files (.cdf). PLS\_Toolbox 8.5.2 (Eigenvector Research, Inc., WA, USA) was employed to read .cdf files into MATLAB® (R2017b, The Mathworks, Inc., MA, USA) computer environment and to apply some data preprocessing (Poisson scaling [40] and Savitzky-Golay smoothing [41], see Section 2.4). UV-Visible spectrophotometric data were directly exported to .csv files and imported to MATLAB®. All chemometric analyses were performed under MATLAB® computer environment, where the MCR-ALS method (2.0 GUI version from Ref. [42]) was applied for data analysis and processing. Additionally, Curve Fitting Toolbox™ 3.5.12 [43] from MATLAB® was employed to estimate the acid-base and kinetic profiles.

## 2.3. Experimental procedures

### 2.3.1. Sample preparation

A 20 ppm ( $\text{mg L}^{-1}$ ) stock solution of SMX was prepared using Milli-Q water as solvent. Another stock solution with the same concentration was also prepared with deionized water (DW). Additionally, to study UV-Visible absorption spectrum changes of SMX with pH (see acid-base titration experiments below), hydrochloric acid solutions of 0.60 M, 1.50 M, and 2.48 M, respectively, were prepared as well as a 1.00 M sodium hydroxide solution.

### 2.3.2. Kinetic monitoring of photodegradation experiments by UV-Visible spectrophotometry

In agreement with the International Conference on Harmonization rules, ICH guidelines Q1B [44], a coated quartz filter segment was interposed between the Xenon arc lamp and the sample inside the solar simulator equipment, which filtered the spectral range 300–800 nm. The light stressing tests were conducted with the irradiance set to  $600 \text{ W m}^{-2}$ , which corresponds to a dose of light of approximately  $36 \text{ kJ (min m}^{-2})^{-1}$ . A comparable quantity of light was previously used in similar studies [33–36]. The inner temperature in the light cabinet was always maintained constant at  $35^\circ\text{C}$ . The samples were exposed to light in quartz cuvettes perfectly stoppered to avoid any solvent evaporation.

To monitor the kinetic photodegradation of SMX, two standard solutions of 20 ppm of this drug in Milli-Q and deionized water were prepared. These solutions were initially scanned spectrophotometrically, just after their preparation ( $t = 0$ ) against a blank solution (Milli-Q and DW, respectively) and baseline corrected (see Section 2.4). The absorption measurements were performed in the spectral range from 200 to 400 nm and with a spectral resolution between consecutive wavelengths of 1 nm. This wavelength range includes the absorption band of SMX with a maximum wavelength of 266 nm (at neutral pH).

Since the pH of deionized water is slightly higher (more basic) than that of Milli-Q water, SMX in these solutions (at pH 6.24 and 5.04, respectively) can have different acid-base speciation (its  $\text{pK}_{\text{a}2}$  is in the range 5.7–5.9, depending on the solvent used [45–47]). Consequently, both SMX solutions were photodegraded in the sunlight test chamber. One UV-Vis spectrum was acquired initially every 2 min. Due to the photodegradation reaction of the SMX, the acquired UV-Vis spectra changed over time. When this spectral variation was unnoticeable from one scan to another (i.e., the spectra of two consecutive measures

overlap considerably), the time between scans was increased (i.e., scan frequency decreased).

Therefore, for the SMX-DW sample solution, one UV-Vis spectrum was initially recorded every 2 min until reaching 56 min of reaction. Then, when no spectral changes were detected, scan frequency was decreased to 4 min up to the 68 min of reaction. Finally, the time interval between scans was further increased, and the UV-Vis spectrum was recorded at 76, 84, and 100 min of reaction. Similarly, for the SMX-Milli-Q sample solution, one UV-Vis spectrum was recorded every 2 min until reaching 54 min of reaction. After, every 4 min up to the 66 min and then, every 8 min until reach 90 min of reaction. Finally, the UV-Vis spectrum was recorded at 106, 134, and 154 min of reaction. These different time intervals were chosen for an optimal selection of the sample aliquots to be further analyzed by LC-DAD and LC-MS experiments (see below).

### 2.3.3. Acid-base titration experiments

Previously reported  $\text{pK}_{\text{a}}$  values of SMX are  $1.6 \pm 0.2$  and  $5.7 \pm 0.2$  [45–47]. This means that this compound has different protonated species, whose formation can also be monitored using UV-Visible spectrophotometry. The difference between these species can be easily reflected by their corresponding maximum absorbance wavelength [9]. Previous studies have already shown that the kinetic reaction rate of SMX is also affected by pH [16,48].

Therefore, two different acid-basic titration experiments were performed to study how pH affects SMX speciation during photodegradation and to identify the UV-Vis spectra of the distinct acid-base species. These experiments were carried out using the stock solution of SMX at 20 ppm, prepared with Milli-Q water (at initial pH values of 5.04 and 5.22). First, the pH value of the SMX initial solution was set to pH 9.72 and 11.23, respectively, using the 0.1 M sodium hydroxide solution. Afterward, successive additions of hydrochloric acid lowered the pH of the solution, and subsequent UV-Visible spectra were acquired, up to an acidic pH (around pH 1.00 in both cases). Accordingly, 18 and 49 UV-Vis spectra were acquired at different pH values (see Table S1 of Supplementary Material for the complete set of pH values where UV-Vis spectra were measured).

### 2.3.4. Liquid chromatography (LC-DAD-MS) analysis

To further investigate and identify the photodegradation products of SMX, different sample aliquots were taken during the photodegradation process at several reaction times and analyzed by LC-DAD-MS. Based on the results observed in the changes of UV-Visible spectra along with the kinetic spectrophotometric experiments (see Section 5.2), ten representative SMX sample aliquots were collected from the photoreactor vessel at different reaction times: 0, 1, 3, 5, 6.5, 9, 16, 20, 46, 68 min. These samples were picked up from the SMX-Milli-Q solution. A blank aliquot (Milli-Q water) was also prepared and injected.

Chromatographic analysis of these samples was performed with an 80:20 HPLC water/methanol mixture solution (acidified with 0.1% (v/v) formic acid) as mobile phase. Isocratic chromatographic elution at  $20^\circ\text{C}$  was used. Furthermore, the following instrumental parameters were also applied: injection volume  $5 \mu\text{L}$ , flow rate  $200 \mu\text{L min}^{-1}$ , cone voltage 42 V, spray voltage 3.5 kV, extractor voltage 3 V, desolvation gas flow  $600 \mu\text{L min}^{-1}$ , source temperature  $150^\circ\text{C}$ , solvent temperature  $350^\circ\text{C}$ , acquisition rate 0.05 s (UV-DAD) and 0.21 s (MS), and time of analysis (run time) 20 min. A positive electrospray ionization source (ESI (+)) was employed as a radiation source in the mass spectrometer. Acquisitions were collected in full scan mode (i.e., recording all wavelengths and mass values) at the selected range: 200–400 nm and 50–400 Da, for the UV-DAD and MS detection, respectively. All these instrumental working conditions were chosen according to previous studies [49–51]. Flow rate and column temperature were adjusted according to the chromatographic column used.

#### 2.4. Data pretreatment: cutting, synchronization, and preprocessing

Raw data from the different analytical techniques used in this study needed a prior treatment (preprocessing) before being chemometrically analyzed. In the case of the acid-base titration and UV-Visible spectrophotometric photodegradation datasets, baseline correction over the spectral direction (i.e., columns) was applied, and the desired wavelength channels (208–400 nm) were selected. Baseline's offset spectra correction was performed by subtracting the minimum measured spectra value from all other spectra values; in this way, all spectra values are positive and the minimum value is equal to zero. In addition, for the acid-base datasets, six UV-Vis spectra were also discarded due to an outlier behavior during their measurement (see Table S1 of Supplementary Material).

For all the chromatographic runs, either UV-DAD or MS, the same elution time window between 1.58 and 10 min was processed and analyzed with the MCR-ALS procedure (see Section 4). No chemical species of interest was detected before 1.58 min and after 10 min of elution, and only the presence of the elution front and very low-intensity signals mainly from the solvent (MeOH) and instrumental background and noise were observed. Negative intensity absorbance values were removed from the UV-DAD detector datasets. Poisson scaling procedure [40,52] was also applied to MS datasets using the *poissonscale* function from PLS\_Toolbox (see software Section 2.2.5). Finally, noise contributions were largely removed from the selected elution time window by applying a Savitzky-Golay smoothing data filter [41].

Due to the different frequency of the two chromatographic detectors (UV-DAD and MS) in spectra acquisition (see Section 2.3.4), another data pretreatment was additionally needed to check for the correspondence in time of the elution profiles in both detectors, allowing then their further simultaneous chemometric analysis (data fusion). Since the spectra acquisition speed of the UV-DAD system (20 points s<sup>-1</sup>) was faster than the spectra acquisition of the MS detection system (4.76 points s<sup>-1</sup>), a higher number of UV than MS spectra were acquired per unit of time. To match the two detection systems, a linear interpolation (and smoothing) strategy was used to synchronize UV-DAD and MS detector signals at the same time frequencies. *interp1* MATLAB function [53] was used for this purpose. Moreover, since the two detection systems were in tandem, a brief time delay on peak signal recording occurred due to the transfer tubing between UV-DAD (first) and MS (second) detectors. This time delay was estimated to be approximately 0.109 min (6.5 s) for the applied flow rate and requires the time axis shifting of MS data to the previously acquired UV-DAD time scale. This is achieved by cutting the initial part of the elution time direction (rows) of the MS datasets (about 30 retention times). This means that there was eluted material analyzed in every chromatographic run that was only perceived by the MS detector at the beginning of the chromatographic analysis. However, as said before, during this initial time window, elution of sample constituents was not observed.

Finally, in order to simultaneously analyze the set of data matrices obtained by the different analytical techniques employed in this work (UV-Visible spectrophotometry, LC-DAD, and LC-MS), a data block normalization procedure was needed. Since absorbance and mass abundance signals intensities of the different detectors differ considerably among them, the data matrices from the same analytical platform were scaled (divided) by the first singular value (SVD) [54] of the considered data set. Thus, the set of matrices obtained from the acid-base titration and from the photodegradation experiments, both monitored by the same UV-Visible spectrophotometer, were jointly scaled. On the other side, the set of chromatographic runs analyzed by LC-DAD were scaled all together and separately from the data sets provided by the coupled MS detector.

### 3. Data structure and arrangements

Details of the data sets and matrices obtained from the acid-base

titration and photodegradation experiments, as well as of those coming from the LC-DAD-MS analysis, are listed in Table 1. Furthermore, Fig. 1 details the data matrix structure of all these different data sets.

#### 3.1. Single instrumental detection (UV or MS) data matrix arrangements

During the experiments monitored by UV-Visible spectroscopy, a series of UV-Vis spectra were collected as a function of time or pH. Likewise, for the LC-DAD-MS analysis, every individual chromatographic run provided a series of chromatographic elution profiles linked to the different spectral channels (either wavelengths or *m/z* values) acquired. Using all the experimental data available, seven different data arrangements were designed to investigate in depth the chemical speciation of the SMX photodegradation process. To better understand each one of these data set arrangements, they are discussed in detail here below and illustrated in Fig. 1.

- A) The data collected during the acid-base titration experiments were arranged in a  $D_{ABn}$  data matrix, with *n* equal to the sequential number of experiments performed, where rows are the UV-Vis spectra acquired at the different pH values and columns are the pH traces of the different wavelengths selected. Hence, data matrices  $D_{AB1}$  of size (15,193) and  $D_{AB2}$  of size (46,193) refer to the UV-Visible spectrophotometric monitoring of the SMX acid-base titration process (see Fig. 1). For this first data matrix, 15 UV-Vis spectra were acquired between pH 8.36 and 1.34 (spectral measurements were performed starting from a basic pH to an acidic one, see Section 2.3), while for the second data matrix, 46 UV-Vis spectra were collected between pH 10.80 and 1.20. All obtained spectra were recorded at 193 wavelengths, between 208 and 400 nm. These two data matrices have information about the UV-Vis spectral evolution and about concentration changes of the different acid-base species involved in the SMX acid-base titration process [33].

**Table 1**

Names and dimensions of the different data matrices obtained in the SMX acid-base titration, photodegradation, and chromatographic studies (see Fig. 1).

Type of data arrangement	Data matrix	Nr. of rows (Nr. of pH, reaction, or elution time values)	Nr. of columns (Nr. of wavelengths or <i>m/z</i> )
Single instrumental detection (Section 3.1)	$D_{ABn}^a$	15 <sup>b</sup>	193
	$D_{AB,aug}$	61	193
	$D_{kin,MQ}$	37	193
	$D_{kin,DW}$	35	193
	$D_{kin,aug}$	72	193
	$D_{AB}^{kin,aug}$	133	193
	$D_{DADn}^c$	2431	193
	$D_{DAD,supaug}$	24310	193
	$D_{MSn}^c$	2431	351
Multiple instrumental detections (Data fusion, Section 3.2)	$D_{UV-DAD,aug}$	24443	131
	$D_{DAD-MS,supaug}$	24310	544

<sup>a</sup> *n* Identification number of the considered acid-base titration experiment.

<sup>b</sup> 15 pH values for the 1st titration ( $D_{AB1}$ ) and 46 pH values for the 2nd one ( $D_{AB2}$ ).

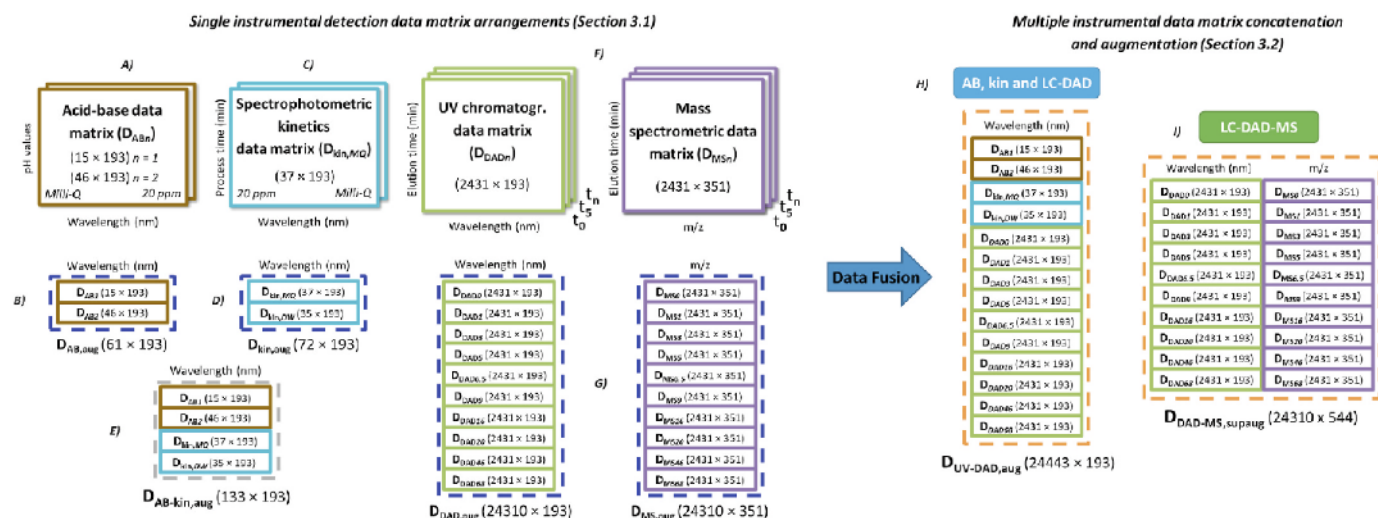
<sup>c</sup> *n* = 1, ..., 10. Identification number of the sample aliquot analyzed chromatographically (chromatographic run number).

'aug' and 'supaug' stand for augmented and supraaugmented data matrices (see Sections 3.1 and 3.2).

AB indicates the spectrometric (UV) acid-base titration experiments.

Kin indicates the spectrometric (UV) photodegradation kinetic experiments.

MQ and DW refer to the SMX' Milli-Q and distilled water sample solutions, respectively.



**Fig. 1.** Individual data matrices obtained in the analysis of A) the acid-base UV-Visible spectrometric acid-base titrations ( $D_{ABn}$ ), C) the UV-Visible spectrometric kinetic photodegradations ( $D_{kin,MQ}$  and  $D_{kin,DW}$ ), and F) the LC-DAD ( $D_{DADn}$ ) and LC-MS ( $D_{MSn}$ ) chromatographic runs of SMX samples. Column-wise augmented data matrices obtained in the simultaneous analysis of B) the UV-Visible spectrometric acid-base titrations ( $D_{AB,aug}$ ), D) the UV-Visible spectrometric kinetic photodegradations ( $D_{kin,aug}$ ), E) the UV-Visible spectrometric acid-base titrations and the kinetic photodegradations ( $D_{AB-kin,aug}$ ), and G) the LC-DAD ( $D_{DAD,aug}$ ) and LC-MS ( $D_{MS,aug}$ ) multiple chromatographic runs. H) Column-wise augmented data matrix obtained in the simultaneous analysis of the UV-spectrometric acid-base titrations, the kinetic photodegradations, and the multiple LC-DAD chromatographic runs ( $D_{UV-DAD,aug}$ ). I) Row- and column-wise superaugmented data matrix (data fusion) obtained in the simultaneous analysis of the LC-DAD and LC-MS multiple chromatographic runs ( $D_{DAD-MS,supaug}$ ). See Sections 3.1 and 3.2 of the manuscript for the meaning of notations and data arrangements.

- B) A complete study of SMX acid-base titration was performed through the simultaneous analysis of  $D_{AB1}$  and  $D_{AB2}$  data matrices, which was achieved by building the column-wise sample-augmented matrix (i.e., attaching one matrix to the bottom of the previous one) giving,  $D_{AB,aug}$ , of size  $(15 + 46 = 61, 193)$ . In this new data arrangement (see Fig. 1), the columns of each of the two vertically concatenated data matrices were the same: 193 wavelengths (208–400 nm) [36].
- C) Data matrices  $D_{kin,MQ}$  of size  $(37, 193)$  and  $D_{kin,DW}$  of size  $(35, 193)$  refer to the 37 and 35 UV-Vis spectra (with 193 wavelengths) obtained during the monitoring of the SMX photodegradation process using the two different solvent solutions: Milli-Q (MQ) and deionized water (DW), respectively (see Fig. 1). In this case, the rows of these matrices are related to the UV-Vis spectra acquired at the different irradiation (reaction) times, and columns are the kinetic traces at the different wavelengths selected. For the SMX-MQ sample solution, the UV-Vis spectra were collected at 37-time values between 0 min and 154 min of photodegradation reaction time (Suntest irradiation time). Furthermore, for the SMX-DW sample solution, the UV-Vis spectra were collected at 35-time values between 0 min and 100 min of photodegradation. All gathered spectra were acquired between 208 and 400 nm. These two data matrices have information concerning the UV-Vis spectral evolution and concentration changes of the chemical species involved in the respective photodegradation processes [34].
- D) A comparison study of the photodegradation of SMX using the two different solvent solutions (SMX-DW and SMX-Milli-Q) was performed through the simultaneous analysis of  $D_{kin,MQ}$  and  $D_{kin,DW}$  data matrices, which was achieved by building the column-wise sample-augmented matrix  $D_{kin,aug}$  of size  $(72, 193)$  (see Fig. 1). The analysis of this augmented data matrix allows the comparison of the degradation processes in the two cases and provides interesting information about the dependence of the initial pH on the photodegradation process of SMX, as well as about its reaction kinetics. In this new data arrangement, the same column vector space (193 wavelengths, 208–400 nm) is also

- shared between the two augmented data matrices, like in the simultaneous analysis of both acid-base titration matrices.
- E) An additional data augmentation arrangement using a data fusion strategy was performed when the data sets from the acid-base titration and from the UV-Visible spectrophotometric photodegradation experiments were simultaneously analyzed. With this type of simultaneous analysis, it is possible to determine which SMX' acid-base species are present at the initial reaction time ( $t = 0$ ) and during the photodegradation experiments with the different solvent solutions. This analysis was achieved by creating an augmented column-wise data matrix,  $D_{AB-kin,aug}$  of size  $(61 + 72, 193)$  or  $(133, 193)$ , where the respective acid-base titration and photodegradation column-wise sample-augmented matrices ( $D_{AB,aug}$  and  $D_{kin,aug}$ ) were further vertically concatenated, one on the top of the other (see Fig. 1) [33].
- F) A deeper investigation of the species produced during photodegradation was achieved by chromatographic analysis of the SMX samples collected at the different irradiation times above reported. Hence, ten sample aliquots of the SMX-Milli-Q solution selected along the photodegradation experiment were analyzed by LC-DAD-MS, giving a data matrix set for each chromatographic detector (see Fig. 1). PDA Detector (UV-DAD) gave 10 data matrices  $D_{DADn}$  ( $2431, 193$ ), where  $n = 1, \dots, 10$  sample aliquots, and the same ten aliquots analyzed by LC-MS also gave 10 data matrices  $D_{MSn}$  ( $2431, 351$ ). The rows of these data matrices contained the spectra (UV-DAD or MS) at the different elution times (2431-time values between 1.58 and 10.00 min of elution time). The columns of these matrices had, respectively, the chromatographic data profiles recorded at the different spectral channels acquired: 193 wavelengths ( $D_{DADn}$  in the range 208–400 nm) and 351  $m/z$  values ( $D_{MSn}$  in the range 50–400  $m/z$ ) [34].
- G) A more involved analysis of the SMX photodegradation process was achieved using the complete information from the two chromatographic approaches, LC-DAD and LC-MS, by means of the simultaneous analysis of the 10  $D_{DADn}$  and 10  $D_{MSn}$  data matrices, first using each one of the two LC detection methods separately and then simultaneously (see below). This analysis



could be achieved as shown in Fig. 1 by building the two ‘large’ column-wise elution-augmented matrices concatenated vertically for each one of the two detection systems:  $\mathbf{D}_{\text{DAD, aug}}$  of size  $(10 \times 2431, 193)$  or  $(24310, 193)$  for the UV-DAD detection, and  $\mathbf{D}_{\text{MS, aug}}$  of size  $(24310, 351)$  for the MS detection. These two column-wise augmented data matrices contained the complete set of chromatographic data arrays from the 10 sample aliquots selected at the different photodegradation reaction times. These matrices had their common column vector space: either 193 wavelengths (208–400 nm) for LC-DAD data or 351  $m/z$  values (50–400  $m/z$ ) for LC-MS data, respectively [20].

### 3.2. Multiple instrumental detections (UV and MS) data matrix concatenation and augmentation (UV-Visible monitoring, LC-DAD, and LC-MS data fusion)

To increase the power of resolution of the studied system, a more involved data fusion strategy which considers the simultaneous analysis of the different types of experiments and the complementary instrumental techniques (in this case, UV-Visible kinetic and titration monitoring, LC-DAD, and LC-MS) was performed.

- H) In the particular case of the UV-DAD detection system, an additional data matrix augmentation arrangement was possible by considering that the experiments monitored by UV-Visible spectrophotometry (acid-base titration and photodegradation) and LC-DAD runs produced individual data matrices having in common the same vector column space (wavelengths) spanned by the UV-Vis spectra of the constituents of the analyzed samples [34]. Thus, the augmented UV-Visible spectrophotometric data matrices obtained during the acid-base titration experiment and the initial monitoring of the photodegradation reaction,  $\mathbf{D}_{\text{AB, aug}}$   $(61, 193)$  and  $\mathbf{D}_{\text{kin, aug}}$   $(72, 193)$ , respectively, could be vertically concatenated with the column-wise augmented LC-DAD data matrix  $\mathbf{D}_{\text{DAD, aug}}$   $(24310, 193)$  to give the new ‘tall’ column-wise augmented data matrix (see Fig. 1)  $\mathbf{D}_{\text{UV-DAD, aug}}$  of size  $(61 + 72 + 24310, 193)$  or  $(24443, 193)$ .
- I) It was also possible to consider the joint chemometric analysis of the ten SMX aliquots using the two detection systems, UV-DAD and MS, simultaneously in each chromatographic run. This would imply performing a different type of data matrix augmentation, which in chemometrics is usually called data fusion [20,31]. Since the same samples were analyzed by both detection systems, and the chromatographic times were synchronized and aligned according to the detector time delays (see Section 2.4 above), the data matrix augmentation could also be performed by horizontal concatenation (see Fig. 1) [55]. In this case, a new ‘wide’ row-wise supraaugmented data matrix was obtained, joining  $\mathbf{D}_{\text{DAD, aug}}$   $(24310, 193)$  and  $\mathbf{D}_{\text{MS, aug}}$   $(24310, 351)$  matrices, giving  $\mathbf{D}_{\text{DAD-MS, supraug}}$  of size  $(24310, 193 + 351)$  or  $(24310, 544)$ . In this row-wise supraaugmented data matrix, the rows represented the UV-Vis and MS spectra at the different elution times, according to each pair of DAD-MS submatrices appended.

## 4. Data analysis

Data arrangements and data matrix augmentations described above were analyzed with different implementations of the Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) method, which are described below.

### 4.1. Multivariate Curve Resolution (MCR) bilinear models

Multivariate Curve Resolution (MCR) defines a family of techniques

whose goal is the resolution of the underlying chemical contributions to a particular data set arranged in a data matrix. They have been broadly used to analyze different types of multivariate data, like in the study of chemical processes, reactions, or in the general situation of evolving multicomponent systems (like in chromatography) [21,25–27,29,30,33,36]. The aim of using the MCR method is to decompose the experimental data matrix into a reduced set of contributions or pure components or chemical species (in this case, photoproducts), using a bilinear model derived from the generalized Lambert-Beer’s law [56]. MCR methods are soft-modeling approaches that, by imposing some constraints, reduce the ambiguities associated with bilinear model decompositions from previously known physical and chemical properties of the profiles characterizing the attributes of the resolved pure components [56].

The general bilinear extension of the Beer-Lambert’s law to multi-variable (i.e., multiwavelength or  $m/z$  range values, in this work) and to multi-sample analyses (either at different pH values, reaction/irradiation, or chromatographic elution times) summarizes compactly, the set of linear equations defining the concentration and spectral contributions of each component in each sample of the studied chemical system [56]. This generalization can be written in an element-wise (for a single data value) way in Equation 1 or in a more compact linear algebra notation (Equation 2).

$$d_{i,j} = \sum_{nc=1}^{NC} c_{i,nc} s_{nc,j} + e_{i,j} \quad (1)$$

where, for  $i = 1, \dots, I$  number of samples analyzed and  $j = 1, \dots, J$  number of wavelengths or  $m/z$  values collected,  $d_{i,j}$  is the measurement performed on sample  $i$  at the wavelength (or  $m/z$  value)  $j$ ,  $NC$  is the number of considered components,  $c_{i,nc}$  is the concentration of component  $nc$  in sample  $i$ ,  $s_{nc,j}$  is the signal (absorbance or intensity) of component  $nc$  at the wavelength or  $m/z$  values  $j$ , and  $e_{i,j}$  is the residual or non-explained data at sample  $i$  and wavelength or  $m/z$  values  $j$  using the proposed model with the  $NC$  components (i.e., by the bilinear MCR model).

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (2)$$

In this Equation 2, the experimental data matrix ( $\mathbf{D}$ ) is decomposed into the two-factor matrices,  $\mathbf{C}$  and  $\mathbf{S}^T$ , where  $\mathbf{C}$  is the factor matrix with the concentration profiles of the different components (mixture constituents of the analyzed samples),  $\mathbf{S}^T$  is the factor matrix with the spectra profiles of these components, and  $\mathbf{E}$  has the residual data variance not explained by the MCR model,  $\mathbf{C} \mathbf{S}^T$ .

The different bilinear decompositions considered in this work for the different data set arrangements are given in Figs. S1–S4 of the Supplementary Material. The bilinear decomposition models obtained from the individual data matrices provided by a single instrumental detection system, i.e., from matrices  $\mathbf{D}_{\text{AB}}$ ,  $\mathbf{D}_{\text{kin,MQ}}/\mathbf{D}_{\text{kin,DW}}$ , and  $\mathbf{D}_{\text{DAD}}$  or  $\mathbf{D}_{\text{MS}}$  (see Section 3.1), can be directly expressed in a simplified way by Equation 2. In this case, each individual  $\mathbf{C}$  matrix (see the subscript notation in Fig. S1) has in its rows, respectively, the acid-base or photodegradation concentration or LC elution profiles of the SMX’s species, and each  $\mathbf{S}^T$  matrix has their corresponding pure UV-DAD or MS spectra profiles (see Fig. S1). In the case of the sample-augmented data matrices built for the different types of experiments performed, i.e., matrices  $\mathbf{D}_{\text{AB, aug}}$ ,  $\mathbf{D}_{\text{kin, aug}}$ ,  $\mathbf{D}_{\text{DAD, aug}}$ , and  $\mathbf{D}_{\text{MS, aug}}$  for, respectively, the acid-base titration, the drug photodegradation, and the LC-DAD and LC-MS analysis (see Section 3.1), the extension of the bilinear decomposition model using for all of them the same  $\mathbf{D}_{\text{k, aug}}$  matrix notation is described by Equation 3 and graphically represented in Fig. S2 of Supplementary Material for each case.

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_{\text{k, aug}} &= [\mathbf{D}_{\text{k,1}}; \mathbf{D}_{\text{k,2}}; \dots; \mathbf{D}_{\text{k,n}}] = [\mathbf{C}_{\text{k,1}}; \mathbf{C}_{\text{k,2}}; \dots; \mathbf{C}_{\text{k,n}}] \mathbf{S}^T + [\mathbf{E}_{\text{k,1}}; \mathbf{E}_{\text{k,2}}; \dots; \mathbf{E}_{\text{k,n}}] \\ &= \mathbf{C}_{\text{k, aug}} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}_{\text{k, aug}} \end{aligned} \quad (3)$$

In this Equation 3, where  $k$  denotes these different types of experiments (i.e., acid-base (AB), UV-Visible spectrophotometric photodegradation (kin), LC-DAD (DAD), and LC-MS (MS), see matrix subscript in Fig. S2),  $n = 1, \dots, N$  refers to the number of different data matrices simultaneously analyzed in the column-wise augmented matrix  $\mathbf{D}_{k,\text{aug}}$ ; and in the same way for  $\mathbf{C}_{k,\text{aug}} = [\mathbf{C}_{k,1}; \mathbf{C}_{k,2}; \dots; \mathbf{C}_{k,n}]$ , as the augmented concentration profiles matrix of the acid-base, photodegradation or chromatographic elution profiles of the components involved in the different experiments/samples simultaneously analyzed in the corresponding  $\mathbf{D}_{k,\text{aug}}$  matrix (see the subscript notation in Fig. S2). The  $\mathbf{S}^T$  matrix, on the other hand, has the UV-DAD or MS spectra profiles of the resolved components (see Fig. S2). It should be noted that the bilinear model of Equation 3 implies that a common set of spectra profiles (in  $\mathbf{S}^T$ ) are obtained for all the components ( $nc = 1, \dots, NC$ ) resolved in the different data sets simultaneously analyzed in  $\mathbf{D}_{k,\text{aug}}$ . In contrast, the concentration profiles in  $\mathbf{C}_{k,\text{aug}}$  for the same components in each data set can be different in the  $\mathbf{C}_{k,n}$  concentration submatrices (see Fig. S2 of Supplementary Material).

Moreover, Equation 3 can also be used to describe the bilinear model decomposition of the augmented matrix obtained when the data sets from the acid-base titration and from the photodegradation experiments were vertically concatenated in the data matrix  $\mathbf{D}_{\text{AB kin,aug}}$  (see Section 3.1). In this case, where  $\mathbf{D}_{1-k,\text{aug}} = [\mathbf{D}_{1,\text{aug}}; \mathbf{D}_{k,\text{aug}}]$  with  $k = 1, \dots, K$  different types of experiments considered for their combined analysis (i.e., acid-base (AB) and photodegradation (kin), see matrix subscript in Fig. S3), the  $\mathbf{C}_{1-k,\text{aug}} = [\mathbf{C}_{1,\text{aug}}; \mathbf{C}_{k,\text{aug}}] = [[\mathbf{C}_{1,1}; \dots; \mathbf{C}_{1,n}]; \mathbf{C}_{k,\text{aug}}]$  matrix is the augmented concentration matrix that simultaneously has the concentration profiles of the acid-base and of the photodegradation species involved in this study. On the other hand, as with the individual  $\mathbf{D}_{k,\text{aug}}$  matrix, the  $\mathbf{S}^T$  matrix has the common set of spectra profiles (i.e., UV-DAD spectra, in this case) of the resolved  $NC$  components present in the different concatenated experiments (see Fig. S3 of Supplementary Material).

Additionally, Equation 3 can also be used to explain the bilinear decomposition model of the augmented matrix  $\mathbf{D}_{\text{UV DAD,aug}}$  (see Section 3.2), created from the whole set of experiments analyzed using the same instrumental technique (the UV-Visible spectrophotometry, either through the spectrophotometer during acid-base and kinetic monitoring or by the LC-DAD analysis). This analysis will provide the correspondence between the acid-base and photodegradation species directly, showing their chromatographic elution responses, and their corresponding acid-base and kinetic profiles and UV-Vis spectra in the resolved  $\mathbf{C}_{\text{UV DAD,aug}}$  and  $\mathbf{S}^T$  matrices, respectively (see Fig. S3) [37].

Finally, Equation 4 describes the bilinear decomposition model created for the data fusion strategy that considers the simultaneous analysis of multiple complementary techniques (in this case, LC-DAD and LC-MS) arranged in a row- and column-wise supraaugmented matrix (see Section 3.2, matrix  $\mathbf{D}_{\text{DAD MS,supaug}}$ ). This model gives complementary information about the photodegradation species (in the common pure UV-DAD and MS spectra profiles in  $\mathbf{S}_{\text{aug}}^T$  matrix, see Fig. S4), which increases the power of resolution of the studied system [20].

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_{1-k,\text{supaug}} &= [\mathbf{D}_{1,\text{aug}}; \mathbf{D}_{2,\text{aug}}; \dots; \mathbf{D}_{k,\text{aug}}] \\ &= [[\mathbf{D}_{1,1}; \mathbf{D}_{1,2}; \dots; \mathbf{D}_{1,n}], [\mathbf{D}_{2,1}; \mathbf{D}_{2,2}; \dots; \mathbf{D}_{2,n}], \dots, [\mathbf{D}_{k,1}; \mathbf{D}_{k,2}; \dots; \mathbf{D}_{k,n}]] \\ &= [\mathbf{C}_1; \mathbf{C}_2; \dots; \mathbf{C}_n][\mathbf{S}_1^T; \mathbf{S}_2^T; \dots; \mathbf{S}_k^T] \\ &+ [[\mathbf{E}_{1,1}; \mathbf{E}_{1,2}; \dots; \mathbf{E}_{1,n}], [\mathbf{E}_{2,1}; \mathbf{E}_{2,2}; \dots; \mathbf{E}_{2,n}], \dots, [\mathbf{E}_{k,1}; \mathbf{E}_{k,2}; \dots; \mathbf{E}_{k,n}]] \\ &= \mathbf{C}_{\text{aug}}\mathbf{S}_{\text{aug}}^T + \mathbf{E}_{\text{supaug}} \end{aligned} \tag{4}$$

In this Equation 4,  $n$  refers to the number of different matrices (samples) column-wise appended for the  $k$  different types of experiments (i.e., different detection techniques, in this case, LC-DAD and LC-MS) considered for their simultaneous analysis, which are row-wise concatenated. In addition, from the resolved common elution profiles in  $\mathbf{C}_{\text{aug}}$ , their peak areas can be calculated as a function of the reaction time, and the corresponding kinetic profiles of the species involved in the

photodegradation process can also be derived (see Fig. S4 of Supplementary Material).

#### 4.2. The MCR-ALS optimization method

The MCR bilinear model Equations described above are solved using an Alternating Least Squares (ALS) algorithm [55–58], which for one data matrix is summarized by the following Equation:

$$\min_{\mathbf{C}, \mathbf{S}, \text{constraints}} \left\| \hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}} - \hat{\mathbf{C}}\hat{\mathbf{S}}^T \right\| \tag{5}$$

where  $\hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}$  is the data matrix reproduced (and filtered) by Principal Component Analysis (PCA) [59] using the preselected number of components  $NC$ , and  $\hat{\mathbf{C}}$  and  $\hat{\mathbf{S}}^T$  are the current estimates of the concentration and spectra factor matrices during the ALS optimization, resolved under a set of constraints until convergence criteria are achieved. This iterative method has the following steps (see flowchart in Fig. 2):

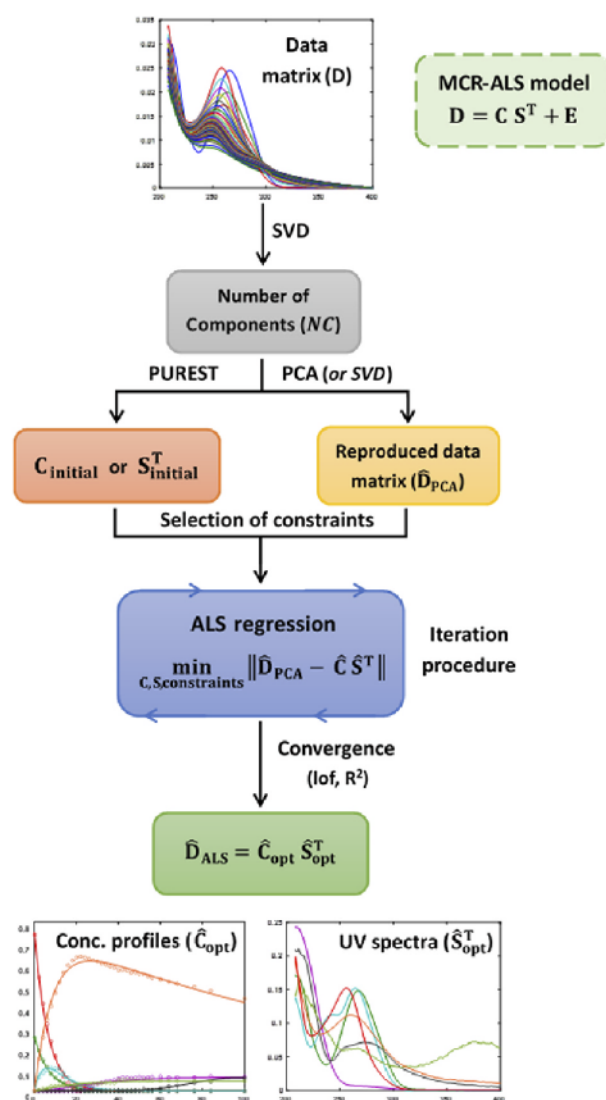


Fig. 2. Flowchart of the Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) algorithm procedure. The applied constraints are: non-negativity (NN), closure (Clos.), selectivity/local rank (Sel.), correspondence of species (Corr.), and trilinearity/equal shape (Tril.). See detailed explanation in Section 4.2.

- 1) Initial estimation of the number of components (contributions),  $NC$ , of the system, needed to explain the experimental variance of the  $\mathbf{D}$  matrix.
- 2) Calculation of  $\hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}$  for this number of components by Principal Component Analysis (PCA) [59] or by Singular Value Decomposition (SVD) [54].
- 3) Initial estimation of the concentration ( $\mathbf{C}_{\text{initial}}$ ) or spectra ( $\mathbf{S}_{\text{initial}}^T$ ) profiles of these components using the purest variables [60].
- 4) Selection of the appropriate constraints (see below).
- 5) Iterative calculation and optimization of these factor matrices,  $\hat{\mathbf{C}}$  and  $\hat{\mathbf{S}}^T$ , by ALS regression under the previously selected constraints and until convergence is achieved (see flowchart in Fig. 2).
- 6) Evaluation of the optimal lack of fit (lof) and explained data variance ( $\mathbf{R}^2$ ) (see below Equations 6 and 7) and of the finally resolved concentration (in  $\hat{\mathbf{C}}_{\text{opt}}$ ) and spectra (in  $\hat{\mathbf{S}}_{\text{opt}}^T$ ) profiles.

The number of components can be initially estimated by the singular value decomposition algorithm (SVD) [54] of the data matrix,  $\mathbf{D}$ , selecting the number of singular values which are larger than those related to noise and which describe most of the data variance of the original dataset ( $\mathbf{D}$ ). This number of components is also used to evaluate the PCA (or SVD) reproduced data matrix,  $\hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}}$ . The final selection of these independent chemical contributions will also consider the final results achieved, checking if the profiles finally resolved in  $\mathbf{C}$  and  $\mathbf{S}^T$  provide the sought chemical information of the system. This is especially important for the minor contributions, which can have small signals and contribute weakly to the overall data variance (close to the noise) but are particularly relevant for the study. The next step of the MCR-ALS procedure is to propose an initial estimation of the profiles of one of the two-factor matrices,  $\mathbf{C}$  or  $\mathbf{S}^T$ . These initial estimates can be obtained from the data matrix  $\mathbf{D}$ , selecting those of its rows or columns that differ most among all of them [60]. These row or column profiles can be used as a starting point for the ALS optimization (see flowchart in Fig. 2).

During the ALS optimization, some constraints are applied to give a chemical meaning to the resolved chemical concentration and pure spectra profiles, in  $\mathbf{C}$  and  $\mathbf{S}^T$  respectively, such as a) *Non-Negativity* (NN) to avoid negative values in  $\mathbf{C}$  and  $\mathbf{S}^T$  profiles; b) *Unimodality* (U) to have concentration profiles with a single peak maximum; c) *Closure* (Clos.) to force the profiles to sum a particular constant value (like in mass balance conditions in chemistry); d) *Selectivity and local rank* (Sel.), to force to zero the concentration of a species in those areas where it is known that it does not exist, or forcing spectral regions to zero where it is known that this component does not have any spectral response; e) *Correspondence between components in different experiments* (Corr.), to force the presence or absence of particular compounds in the different analyzed samples and the correspondence among them; and f) *Trilinearity or equally shaped factor profiles* (Tril.), to force the concentration profiles of the same component in the different simultaneously analyzed data matrices to have the same shape during each iteration of the ALS optimization (see the implementation of this constraint in Fig. S5 of Supplementary Material) [55,61]. It should be mentioned that the application of all these constraints is optional and very flexible, their use depends on the nature of the data and on the problem to be solved, and they can be applied in a different way to the factor matrices  $\mathbf{C}$  and  $\mathbf{S}^T$ .

When the ALS process converges (i.e., when the change in the standard deviation of the residuals between two consecutive iterations is less than a preselected threshold value like 0.1%), and the MCR-ALS

calculated data matrix  $\hat{\mathbf{D}}_{\text{ALS}} = \hat{\mathbf{C}} \hat{\mathbf{S}}^T$  is sufficiently similar (within experimental error) to the original data matrix  $\mathbf{D}$ , the calculated matrices  $\hat{\mathbf{C}}$  and  $\hat{\mathbf{S}}^T$  are given as the final solutions ( $\hat{\mathbf{C}}_{\text{opt}}$  and  $\hat{\mathbf{S}}_{\text{opt}}^T$  respectively). Otherwise, a new iteration is performed. The quality of the model data fitting at ALS convergence is usually evaluated by two parameters (see flowchart in Fig. 2):

- I. **Lack of fit (lof):** The lack of fit is defined by Equation 6 as the root square of the ratio between the sum of squares of the residuals between the experimental and calculated (by ALS) data values and the sum of squares of these data values, and multiplied by 100 (to have it as a percentage).

$$\% \text{ lof} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m d_{ij}^2}} \times 100 \quad (6)$$

- II. **Explained data variance in percentage ( $\mathbf{R}^2$ ):** The amount of experimental data variance explained by the MCR-ALS model is defined as shown in Equation 7

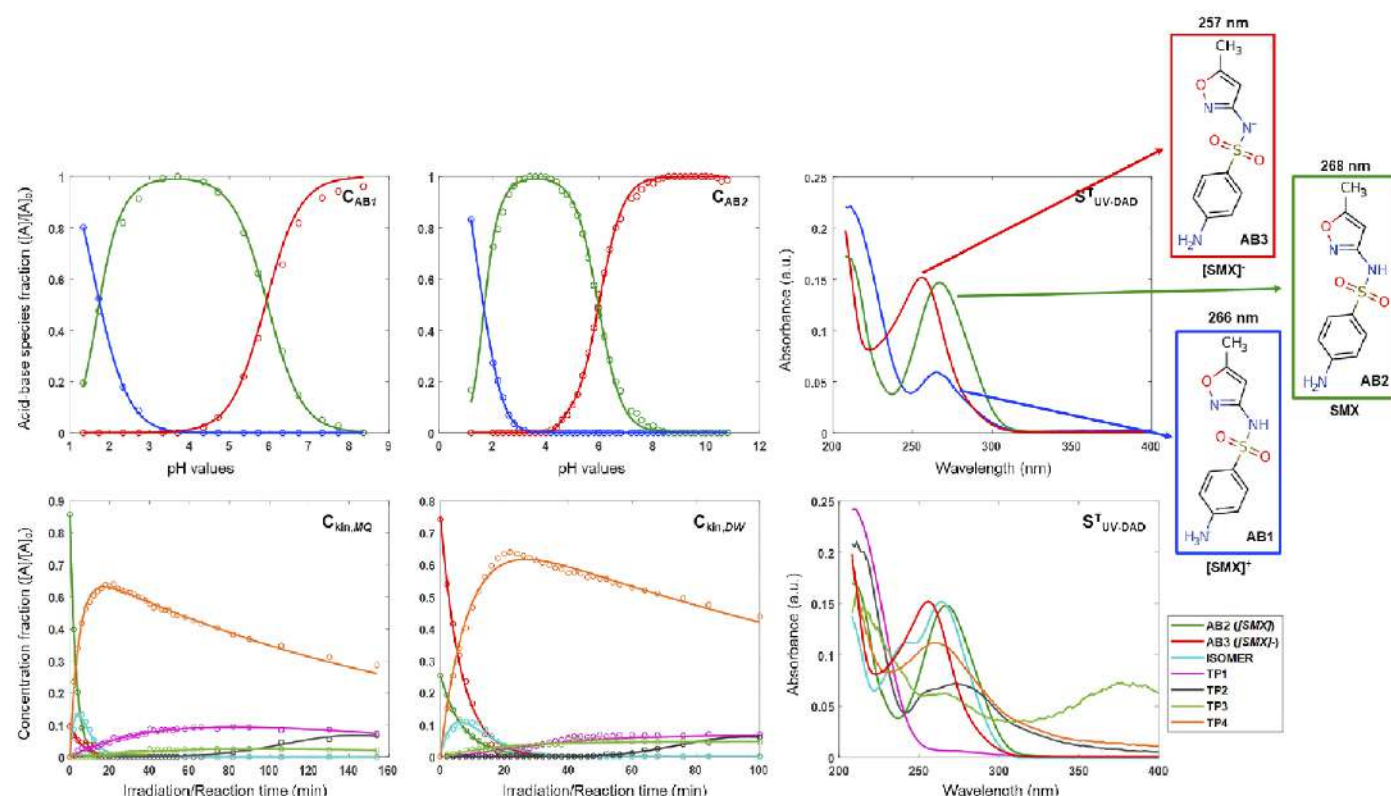
$$\mathbf{R}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m d_{ij}^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m d_{ij}^2} \times 100 \quad 7$$

where  $d_{ij}$  is the matrix element in the row  $i$  and column  $j$  from the original  $\mathbf{D}$  data matrix and  $\hat{d}_{ij}$  is the calculated data element by the bilinear model of MCR-ALS,  $\hat{\mathbf{C}} \hat{\mathbf{S}}^T$ .

## 5. Results and discussion

### 5.1. Analysis of the SMX acid-base titration data

The results of the simultaneous MCR-ALS analysis of the two acid-base spectrophotometric datasets ( $\mathbf{D}_{\text{AB, aug}}$ ), as explained in Section 4.1, with non-negativity (in  $\mathbf{C}$  and  $\mathbf{S}^T$  profiles), closure (in  $\mathbf{C}$  profile, as the SMX concentration is constant at 20 ppm in both cases), and selectivity/local rank constraints are shown in Fig. 3. Local rank constraints are applied to limit the presence of some species in a specific region (in  $\mathbf{C}$  profile), i.e., when the concentration of an acid-base species decreases close to zero in the acid-base titration, or at the beginning of the titration when this species is known not to exist yet. Using local rank constraints, the resolution of the species in the spectrophotometric titration experiments was improved, avoiding rotation ambiguities [58]. The resulting explained variance and lack of fit values (both in %) of the MCR-ALS analysis of the augmented acid-base data matrix  $\mathbf{D}_{\text{AB, aug}}$  are given in Table 2. Three acid-base species were resolved (see component explained data variance in Table 3 below). First, the blue component species **AB1** shows its maximum absorption at 266 nm and appears in the pH range 1–4 (see Fig. 3). This is the most acidic species detected in the titration experiments and, according to previous studies [9], corresponds to the protonated (cationic) form of the SMX ( $[\text{SMX}]^+$ ). Secondly, the green component species **AB2** exists in the pH range 1–9 and has a maximum absorption at approximately 268 nm. As described in Ref. [9], this species corresponds to the neutral form (non-charged species) of SMX. Finally, red component species **AB3**, which shows its maximum absorption at 257 nm and appears in the pH range 4–11, was resolved (see Fig. 3). This is the most basic SMX species, which appears at these pH conditions in its deprotonated (anionic) form ( $[\text{SMX}]^-$ ). These last two SMX acid-base species are the most interesting ones for this study and



**Fig. 3.** MCR-ALS resolved acid-base and kinetic profiles ( $C_{AB, aug}$  [ $C_{AB1}$ ;  $C_{AB2}$ ] and  $C_{kin, aug}$  [ $C_{kin, MQ}$ ;  $C_{kin, DW}$ ]) for the two UV–visible spectrometric titrations and the photodegradation experiments of SMX in Milli-Q and DW sample solutions, respectively. In the figures, dotted lines are the resolved MCR-ALS estimations, and solid lines are the calculated curve fitting profiles (see Section 2.2) considering diprotic acid equilibria equations and a pseudo-first-order sequential reactions model for  $C_{AB, aug}$  and  $C_{kin, aug}$ , respectively. On the right side of the figure, the eight MCR-ALS resolved UV–Vis spectra (in the  $S_{UV-DAD}^T$  matrix) obtained in the simultaneous analysis of the acid-base titration, the UV–Visible kinetic photodegradation, and the LG-DAD chromatographic experiments ( $D_{UV-DAD, aug}$ ) are given. Identification of the species present in the kinetic photodegradation experiments is detailed: AB2 and AB3 (SMX<sup>0</sup> acid-base species), SMX's isomer species, and TP1–TP4 SMX transformation products. Molecular structures and absorbance maxima of the acid-base species are also plotted. See results and discussion in Sections 5.1 and 5.2.

**Table 2**

Summary of the MCR-ALS results obtained in the analysis of the augmented data matrices (see Section 3.1 and 3.2) from the different SMX acid-base titration and photodegradation experiments.

Matrix	pH range or Reaction/duration time (min)	Nr. of components (NC)	Constraints	Lack of fit (%)	Explained variance (%)
$D_{AB, aug}$	AB1: 1.34–8.36 AB2: 1.20–10.80	3	NN (C & $S^T$ ), Clos. (C), Sel. (C)	4.03	99.83
$D_{kin, aug}$	MQ: 0–154 min DW: 0–100 min	6	NN (C & $S^T$ ), Corr. (C), Sel. (C)	1.51	99.97
$D_{DAD, aug}$	1.58–10.00 min	7	NN (C & $S^T$ ), Corr. (C), Sel. (C), Tril.	5.11	99.74
$D_{DMS, aug}$	1.58–10.00 min	9	NN (C & $S^T$ ), Corr. (C), Sel. (C), Tril.	6.93	99.72
$D_{AB, kin, aug}$	–	6	NN (C & $S^T$ ), Clos. (C), Corr. (C), Sel. (C)	1.60	99.97
$D_{UV-DAD, aug}$	–	9	NN (C & $S^T$ ), Corr. (C), Sel. (C), Tril.	4.85	99.76
$D_{DAD, MS, sup, aug}$	1.58–10.00 min	10	NN (C & $S^T$ ), Corr. (C), Sel. (C & $S^T$ )	9.77	99.04

NN: Non-negativity, Clos.: Closure, Corr.: Correspondence of species, Sel.: Selectivity/local rank, Tril.: Trilinearity/equal shape. Only NN (in C &  $S^T$ ) & Sel. (in C) constraints were applied to the non-chemically relevant components. See other matrix notations and abbreviations in Table 1.

from an environmental point of view since SMX will be present in surface waters and rivers with these two species. In Fig. 3, the MCR-ALS resolved  $C_{AB, i}$  profiles are shown in dotted lines, and those calculated by curve fitting (using Curve Fitting Toolbox™ [43]) considering diprotic acid equilibria equations [62] are shown in solid lines. Thus, from these curves, it is possible to obtain an estimation of the  $pK_a$  values of SMX very similar to those tabulated for this drug:  $pK_{a1} = 1.60$ ,  $pK_{a2} = 5.90$  [45–47].

This initial acid-base study indicated that depending on the initial pH and on the type of water used during the photodegradation experiment (Milli-Q or DW), the initial SMX species can be different. This hypothesis is

revealed in Fig. 3, where it can be observed that non-charged SMX (AB2, green) appears in a higher proportion than [SMX]<sup>−</sup> (AB3, red) when the experiment is carried out with Milli-Q water (see  $C_{kin, MQ}$  in Fig. 3 left-down) and, the reverse occurs when DW is used (see  $C_{kin, DW}$  in Fig. 3 right-down). The AB1 component species ([SMX]<sup>+</sup> cationic form) was only detected in the very acidic region of the acid-base titration experiments. In contrast, in the photodegradation experiments, the solution was never acidic enough to have significant concentrations of this species.

**Table 3**  
Identification (name, molecular formula, retention time, pH/reaction time of occurrence,  $m/z$  ion fragments, absorbance maxima, and explained variance) of the resolved MCR-ALS components obtained in the simultaneous analysis of the SMX titration and photodegradation data matrices.

MCR-ALS Component	Explained variance (%) <sup>a</sup>	Identified compound	pH/Exp. Reaction time range (min)	Exp. Retention time ( $t_{R0}$ , min)	Exp. $\lambda_{max}$ (nm)	Exp. $m/z$	Molecular formula
1 (AB1)	<1	[SMX] <sup>+</sup>	From pH 1 to pH 4	–	266	–	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$
2 (AB2)	49.1	SMX	From pH 1 to pH 8	8.47	268	92, 99, 108, 147, 156, 161, 254 [M+H] <sup>+</sup> , 276 [M+Na] <sup>+</sup>	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$
3 (AB3)	11.8	[SMX] <sup>-</sup>	From pH 4 to pH 11	–	257	–	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$
4 (Isomer)	5.6	Conformational isomer	Kfr: 1–30 min LC: 1–40 min	2.70	242, 254	92, 99, 108, 147, 156, 254 [M+H] <sup>+</sup> , 276 [M+Na] <sup>+</sup>	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$
5 (TP1)	3.6	3A5M	Kfr: 1–150 min LC: 1–68 min	2.19	210	56, 72, 99 [M+H] <sup>+</sup>	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$
6 (TP2)	<1	Acetyl-SMX	Kfr: 40–150 min LC: 1–20 min	7.04	210, 257, 273	72, 92, 99, 108, 147, 172, 221, 238, 296 [M+H] <sup>+</sup>	$C_{10}H_{11}N_3O_4S$
7 (TP3)	1.5	Unknown	Kfr: 1–150 min LC: 1–68 min	4.47	210, 265, 375	No MS spectrum in ESI <sup>+</sup>	–
8 (TP4)	17.8	4APS structure (SA)	Kfr: 1–150 min LC: 3–68 min	1.86	260	92, 108, 140, 156 [M – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 174 [M+H] <sup>+</sup>	$[C_{10}H_8NO_3S]^+$ $(C_8H_6N_2O_2S)$

SMX: sulfamethoxazole; 3A5M: 3-amino-5-methylisoxazole; Acetyl-SMX:  $N^1$ -acetyl-sulfamethoxazole; 4APS: 4-aminophenylsulfonyl structure; SA: sulfanilamide. ABn refers to the SMX acid-base species, n = 1, 2, or 3; TPn denotes the SMX transformation products; Kin and LC refer to the time range of occurrence according to the kinetic study and the chromatographic analysis, respectively.

<sup>a</sup> MCR-ALS explained data variance ( $R^2$ ) considering all eight components simultaneously is 97.8%, and the lack of fit (lof) is 14.9% (see Equations 6 and 7).

5.2. Analysis of the SMX photodegradation kinetic monitoring data

In order to obtain a better resolution of the speciation on the photodegradation experiments, they were simultaneously analyzed with the acid-base experiments using the column-wise augmented data matrix  $D_{AB\ kin, aug}$  (see Section 4.1). Fig. 3 and Table 2 show the results of this data analysis using the MCR-ALS method. In this case, non-negative (in  $C_{aug}$  and  $S^T$  profiles), closure (in  $C_{aug}$  profile), correspondence of the common species between the different experiments (submatrices in  $C_{aug}$  profile), and selectivity/local rank constraints (also in  $C_{aug}$  profile) were used. In this particular case, it is assumed that the species formed during the photodegradation experiments, i.e., the photoproducts, will not be present in the acid-base experiments. Moreover, at the beginning of the photodegradation process, only the SMX species (in this case, the non-charged SMX and the [SMX]<sup>-</sup> negatively charged species) can be present. This information is used to avoid rotation ambiguities and improve the resolution of this augmented data matrix,  $D_{AB\ kin, aug}$ , as shown in Table 2.

Fig. 3 shows the concentration profiles (kinetic profiles,  $C_{kin, aug}$  matrix) and the acid-base species distribution profiles ( $C_{AB, aug}$  matrix) resolved by the simultaneous MCR-ALS analysis of both types of experiments, photodegradation and acid-base titrations. As shown in Fig. 3, the MCR-ALS resolved  $C_{kin, aug}$  profiles (i.e., kinetic profiles) in dotted lines were fitted using the Curve Fitting Toolbox [43] to follow a pseudo-first-order sequential reaction model [63], as in previous studies [16], giving the profiles shown in solid lines with different colors. Apart from the two-initial species of the SMX, non-charged SMX (green) and [SMX]<sup>-</sup> (red) component species, respectively, five different photoproducts were detected. The resolved UV-Vis and MS spectra of all these species will be fully described in the next section, where they will be tentatively identified using UPLC-DAD-MS information. As also shown in Fig. 3, the photodegradation rate is quite different depending on starting pH of the water sample solutions (SMX-Milli-Q or SMX-DW). Milli-Q water sample solution at pH 5.04 ( $C_{kin, MQ}$ , Fig. 3 down-left) degraded faster than distilled water sample solution ( $C_{kin, DW}$ , Fig. 3 down-right). Initial SMX species disappeared before 20 min when Milli-Q water was used. Conversely, when distilled water was used, the solution pH was 6.24 and SMX species vanished a little bit later, after more than 20 min of photodegradation. When the pH increases, the photo-transformation rate of SMX slows down, and only a slight degradation occurred [16,48]. This is because when the pH is more basic, the anionic form of the SMX ([SMX]<sup>-</sup>, red species in Fig. 3) is the dominant species, which is not so much degraded by UV-light [45]. Nevertheless, although at different speeds, the same five transformation products (TP) were formed on both photodegradation processes.

First, cyan component species (assigned to a conformational isomer of SMX, as discussed in the next section) appeared from the beginning of the photodegradation process, reaching its maximum presence at 10 min of UV irradiation and disappearing after 40 min of reaction, a little earlier on Milli-Q water sample solution degradation. The orange component species (TP4 in Fig. 3) started to grow up from the beginning of the photodegradation, reaching its maximum presence after 20 min of UV irradiation (10 min for the Milli-Q water sample solution) and becoming the predominant component species during the rest of the photodegradation reaction process. Magenta component species (TP1 in Fig. 3) had a different behavior depending on the photodegradation process involved. It appeared before the light green component species (TP3 in Fig. 3) during the Milli-Q water sample solution degradation, while the opposite happened in the other degradation carried out. Finally, in both photodegradation processes, the black component species (TP2 in Fig. 3) started to appear approximately after 50 min of irradiation and reached the same concentration level as TP1.

### 5.3. Analysis of the SMX liquid chromatography data (LC-DAD-MS)

Ten representative sample aliquots from the Milli-Q water sample solution were collected from the photoreaction vessel (as is explained in Section 2.3) at different times of the photodegradation process and analyzed by LC-DAD-MS. Its analysis with MCR-ALS allowed an excellent resolution of the component species that appear during the entire photodegradation reaction. The whole experimental chromatographic data (either LC-DAD or LC-MS) were preprocessed according to the steps of the procedure detailed in Section 2.4. Sample aliquots were first analyzed separately (see MCR-ALS results in Table S2 of Supplementary Material), and then they were joined for their simultaneous analysis. This process was done with the 10 data matrices (one per sample aliquot) obtained from both detectors: the UV-DAD and the MS. Therefore, a total of 10 LC-DAD and 10 LC-MS data matrices were obtained, which were processed individually and simultaneously in the corresponding DAD and MS column-wise elution-augmented data matrices  $D_{DAD, aug}$ ,  $D_{MS, aug}$  and using the row- and column-wise super-augmented matrix  $D_{DAD-MS, supaug}$  (see method Section 4).

Figs. 4 and 5 and Tables 2 and 3 show the results obtained in the MCR-ALS analysis of these augmented data matrices. Non-negative, selectivity/local rank (both in  $C_{aug}$  and  $S^T$  profiles), and correspondence of species between submatrices (in  $C_{aug}$  profile) constraints were applied. In addition, the use of the trilinearity/equal shape constraints was tested [55] (see implementation in Fig. S5 of Supplementary Material) for some of the elution profiles of the resolved components (see Fig. 5). Due to the presence of the baseline and background contributions, especially from the MS detection system, more MCR components than the six previously identified in the kinetic monitoring data analysis (SMX + five transformation products) were incorporated into the MCR-ALS modeling of these matrices. A total number of seven MCR components for the LC-DAD data and nine for those from LC-MS were finally used, obtaining in this way a better resolution of the components of interest and also a better lack of fit and improved explained data variance values (see Table 2). To summarize these results, only the elution and spectra profiles of some of the resolved components of interest are shown in Fig. 4, which are then considered for their identification.

The **AB2** green component species, identified previously as the non-charged SMX species using its UV-Vis spectrum (with a single absorbance maximum at 268 nm), was confirmed by its MS spectrum (see Fig. 4) with its protonated molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  254, a sodium adduct ion  $[M+Na]^+$  at  $m/z$  276 and a base peak at  $m/z$  156  $[C_6H_6NO_2S]^+$ . Additionally, its fragmentation ions fingerprint was similar to those reported in previous studies [3,9,19]. This SMX species, which explains the 49.1% of the data variance, is still present after 46 min of reaction but disappears before 68 min of UV irradiation (see Fig. 5). The use of 0.1% (v/v) formic acid in the mobile phase during the chromatographic analysis implies that the initial SMX species in the different samples were protonated due to the pH of the elution phase (around pH 4) and, consequently, only non-charged SMX species was detected in the LC analysis.

The MS spectrum of the cyan species resolved by MCR-ALS confirmed the presence of an SMX's conformational *isomer* (see Fig. 4). This species, which explains 5.6% of the data variance, shows the same molecular ion  $[M+H]^+$ , sodium adduct ion  $[M+Na]^+$ , base peak  $[C_6H_6NO_2S]^+$ , and fragmentation behavior as the initial SMX. Although with an identical molecular formula ( $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ ), it shows different intensity ratios of the common ions compared with SMX species. Its UV-Vis spectrum, however, shows other absorption bands at 242 and 254 nm. The explanation of this isomeric process is in the rearrangement of the isoxazole ring of SMX induced by UV irradiation [16,49], leading to this oxazole isomer shown in Fig. 4. The IUPAC name of this compound is 4-amino-*N*-(5-methylisoxazol-2-yl)benzenesulfonamide. A much lower retention time of this isomer on the reversed-phase chromatographic column was observed ( $t_R = 2.70$  min for isomer species vs.  $t_R =$

8.47 min for SMX species, see elution profiles in Fig. 5), which was also reported in previous studies [3,9,16]. This species was gradually accumulated during the initial 46 min of UV irradiation, and then its concentration decreased significantly when this isomer of SMX underwent photodegradation.

The first transformation product (**TP1** in Fig. 4) presents a single absorption band at 210 nm on its UV-Vis spectrum. Its MS spectrum exhibits a molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  99 and two fragment ions at  $m/z$  72 and 56, respectively. This component species, which explains 3.6% of the data variance, has been identified as 3-amino-5-methylisoxazole (3A5M), with a molecular formula  $C_4H_6N_2O$  [10,19,51]. It is formed due to the  $\delta$ -cleavage of the N-S bond of SMX (see SMX species in Fig. 4) [10,45,50]. This compound, which elutes at 2.19 min, increased its concentration during the first 46 min of UV irradiation, which is consistent with the degradation trend of SMX, reaching its maximum occurrence at 46 min and then decreasing its concentration at later reaction times (see Fig. 5). This result indicated that 3A5M was also susceptible to be photodegraded.

The second photoproduct (**TP2** in Fig. 4), which explains <1% of the data variance, shows three absorbance maxima at 210, 257, and 273 nm on its UV-Vis spectrum. Its MS spectrum presents a molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  296 and multiple additional fragment ions that already appeared in the MS spectrum of SMX. According to previous studies [8,18,19,49] and considering its possible molecular formula  $C_{12}H_{13}N_3O_4S$ , this component species has been identified as *N*<sup>4</sup>-acetyl-sulfamethoxazole (Acetyl-SMX). This identification can be confirmed using the fragment ions  $m/z$  238 and 99, which correspond respectively to a  $\beta$ - and  $\delta$ -cleavages of the N-C and N-S bonds of this molecule [10,45,50]. It should be noted that acetyl-SMX, with elution at 7.04 min, follows similar kinetics as the other TPs, and it was not detected at the beginning of the photodegradation experiment. Its concentration is lower compared to the other TPs and to the initial parent compound (see Fig. 5). The acetyl group necessary for the formation of this compound may come from the subsequent photodegradation that 3A5M (**TP1**) underwent after its formation.

The third transformation product (**TP3** in Fig. 4), which explains more data variance than **TP2** (1.5%), presents three absorption bands at 210, 265, and 375 nm on its UV-Vis spectrum. However, no mass spectrum was detected for this compound in ESI+, making its complete identification impossible. According to the literature [10,18,19,51], some of the SMX photoproducts were only detected using ESI-, as is the case of "TP270-" in Ref. [10], which has also been found in the photolysis process of SMX and it is formed by opening the isoxazole ring. This break could explain the presence of an absorbance band at wavelengths close to 360–370 nm, such as that obtained in the present compound. Further LC-MS analysis using negative polarity should be performed to confirm and identify this photoproduct. The abundance of this species, which elutes at 4.47 min, grows linearly until reaching its maximum occurrence at 46 min of UV irradiation and decays afterward. Like **TP2**, its abundance is also minor compared to the other TPs (Isomer and 3A5M) and to the initial SMX (see Fig. 5).

Lastly, the fourth transformation photoproduct (**TP4** in Fig. 4) shows a single absorbance maximum at 260 nm on its UV-Vis spectrum. Its MS spectrum, on the other hand, presents several fragment ions. According to previous studies [45], when SMX photodegrades, the molecule breaks mostly through a  $\delta$ -cleavage of the N-S bond (see SMX species in Fig. 4), giving 3A5M (identified as **TP1** on this study) and sulfanilic acid (SNA), the two resulting fragments side-by-side of the broken bond. However, the SMX molecule can also be broken by an  $\epsilon$ -cleavage giving the sulfanilamide (SA) and a derived compound of 3A5M that also contains the isoxazole group (in Ref. [50] this compound is named 3-hydroxy-5-methylisoxazole, 3H5M). Although SNA has an absorbance maximum at 250 nm, SA shows this band at 260 nm [64]. Both compounds have a very similar low-resolution MS spectrum, with a molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  173 and 174 for SNA and SA, respectively, with also a very similar fragmentation pathway, with a base ion peak at  $m/z$  156  $[M - H_2O]^+$  or  $[M - NH_3]^+$  (for SNA and SA, respectively) and fragment ions at  $m/z$  92, 108, and 140 [64]. According to this information, and noting that the

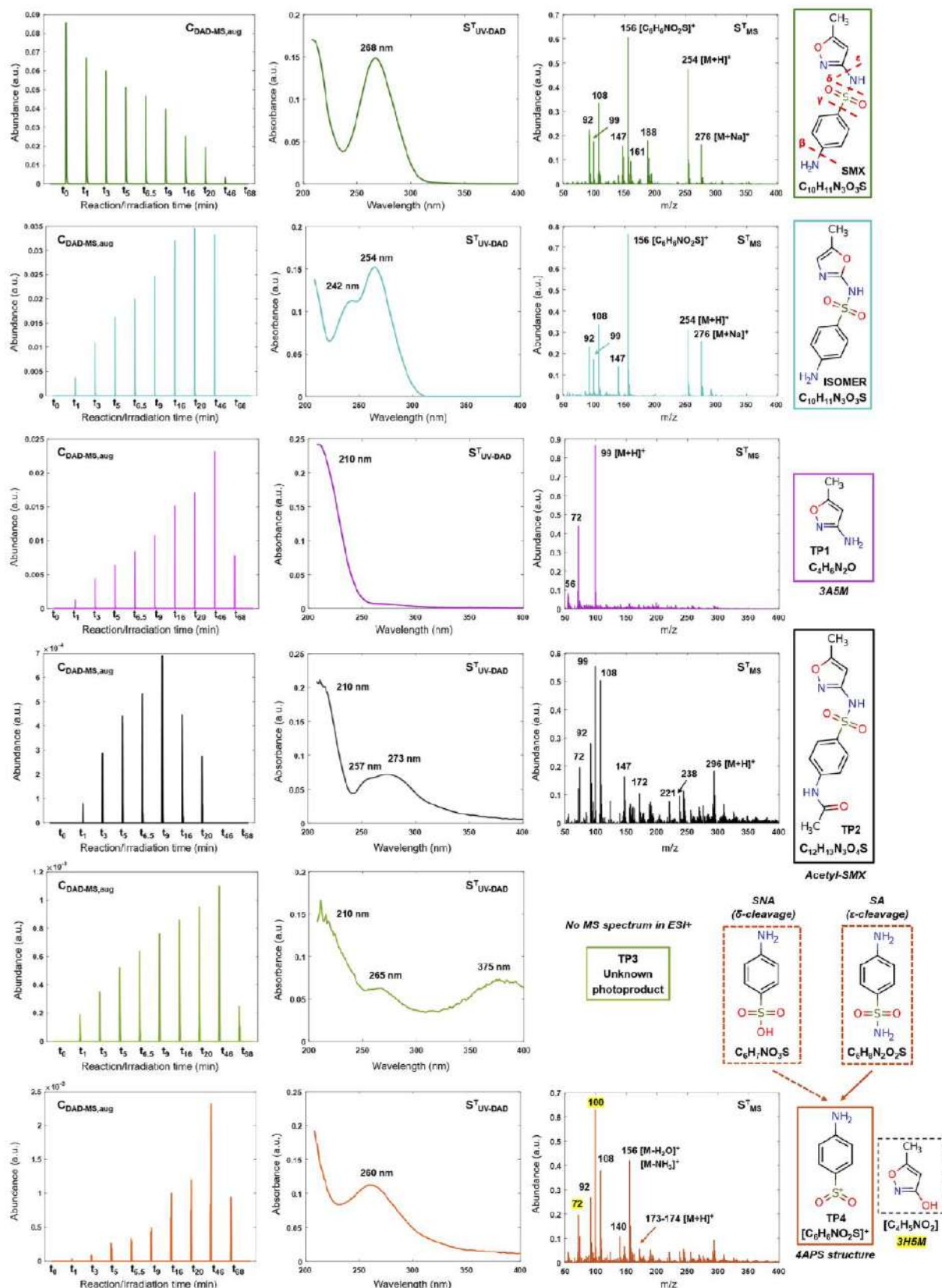
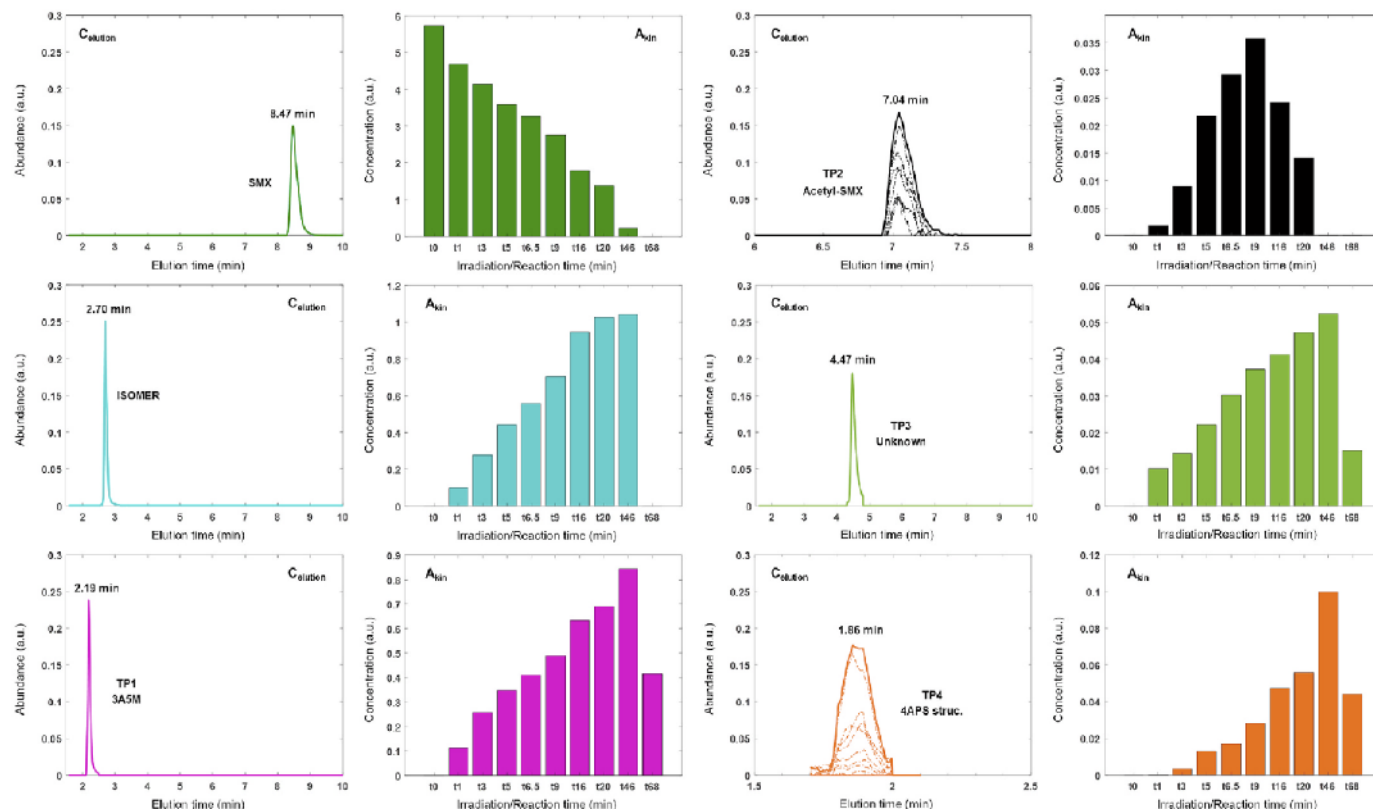


Fig. 4. Elution profiles ( $C_{DAD-MS,aug}$  matrix) and pure UV-Vis and MS spectra ( $S^T_{DAD-MS,aug} = [S^T_{DAD}, S^T_{MS}]$  matrix) resolved in the simultaneous MCR-ALS analysis of the LC-DAD and LC-MS data of the ten sample aliquots collected during the SMX photodegradation experiment ( $D_{DAD-MS,sup,aug}$  matrix). The identification of the SMX species, its conformational isomer, and of the different photoproducts (TP1-TP4) has been performed using their pure MS spectra ( $S^T_{MS}$  submatrix). See results and discussion in Section 5.3.



**Fig. 5.** Normalized elution and concentration profiles ( $C_{elution}$  and  $A_{kin}$  matrices, respectively) obtained for the chemical meaningful resolved MCR-ALS components (six species: initial SMX, its conformational isomer, and the four transformation products TP1–TP4) during the simultaneous MCR-ALS analysis of the LC-DAD-MS data by applying the *trilinearity/equal shape* constraints to the SMX, isomer, TP1, and TP3 species. This constraint was not applied to TP2 (Acetyl-SMX in black) and TP4 (4APS in orange) species, where their MCR-ALS bilinear elution (dotted lines) and trilinear profiles (single solid line) are plotted. See results and discussion in Section 5.3. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

concentration of the molecular ion of TP4 in Fig. 4 is very low (i.e., it has been fragmented), it is possible to assign this photoproduct to the 4-aminophenylsulfonyl structure (4APS) [50], its positive fragment ion with the molecular formula  $[C_6H_6NO_2S]^+$  obtained after the loss of the hydroxyl and amino groups of SNA and SA, respectively. Due to the maximum absorbance observed, this structure is likely coming from the SA, more than from SNA in this study. Additionally, fragment ions  $m/z$  72 and 99  $[M+H]^+$ , which appear together in the mass spectrum of this component, could be assigned to the resulting fragments generated when SA is obtained by the  $\epsilon$ -cleavage of SMX, the 3H5M. This fact could support the hypothesis that the 4APS structure comes from the SA. Nevertheless, a high-resolution selected reaction monitoring (SRM) analysis could be performed to confirm which is the precursor ion of this 4APS structure. The abundance of this species, which elutes at 1.86 min and explains the 17.8% of the data variance, grows exponentially until reaching its maximum occurrence at 46 min of UV irradiation and decays afterward, like occurs with TP3 (see Fig. 5). Its concentration, however, is twice that of TP3, being the third most abundant transformation product after the Isomer and 3A5M compared to the initial SMX species.

The components discussed above are presented following the amount of variance explained by each of them separately, as shown in Table 3. Considering the simultaneous analysis of all the experimental data collected (i.e., from the acid-base titration, the kinetic photodegradation, and the LC-DAD-MS analysis), the total amount of data variance explained by the MCR-ALS model of 12 components (3 SMX's acid-base species + SMX's conformational isomer + 4 TPs + 4 baseline/background contribution species) when they were evaluated simultaneously ( $R^2$  in Equation (7)) was 97.8%, and the sum of the individual variances explained by each MCR-ALS component separately was

115.6%. This difference of 18.2% of variance indicates the amount of variance overlap between the profiles of the selected components. In MCR-ALS, the resolved components are not orthogonal (like in PCA) and, therefore, there is a part of the variance which is common among them, as the natural sources of variance do overlap indeed [56].

## 6. Conclusions

The photodegradation of the antibacterial drug SMX in different aqueous solutions has been investigated in detail by a combination of spectrophotometric and liquid chromatographic techniques, with UV-Visible and MS detection systems, and by chemometric data analysis. Four different photoproducts apart from the parent SMX (in non-charged and deprotonated forms) and its conformational isomer, with different kinetic, elution, and spectra profiles, were resolved and identified by this combination of techniques. For all these components, their pure UV-Vis and MS spectra and kinetic profiles were estimated. In addition, three different acid-base species were also resolved during the titration study of this drug.

The proposed MCR-ALS method was able to resolve the mixture of products formed during the photodegradation reaction despite the incomplete chromatographic separation at isocratic conditions for some of these compounds. The simultaneous analysis of fused DAD-MS data using these two different instrumental techniques provided a better resolution of the species formed during the photodegradation process and the evaluation of reaction rate. Additionally, the joint analysis of the acid-base, kinetic monitoring, and LC-DAD data permitted the identification of which of the SMX acid-base species took part in the SMX degradation process, as well as to obtain an estimation of their  $pK_a$  values. In this sense, other compounds from the sulphonamides family



could certainly be studied by the proposed approach, including the complementary information about the acid-base and kinetics of the parent products together with the simultaneously LC-DAD and LC-MS analysis of the products formed during the photodegradation process, as proposed in this work.

Finally, it should be noted that in the natural environment it is possible that the photodegradation processes change and the different photoproducts remain unaltered for a longer time than for the obtained experimentally in this study. Additionally, other processes (such as biotransformation) can take place simultaneously altering the concentrations of these photoproducts. According to Ref. [10], significant differences in biotransformation among SMX photo-TPs were observed in the water/sediments system (dissipation half-lives,  $DT_{50}$ ): after 39 days for 3-amino-5-methylisoxazole (3A5M), after 7.6 days for SMX isomer, and after 31 days for sulfanilic acid/sulfanilamide (SNA/SA). In contrast to the biotransformation of the parent compound SMX which needed 153 days. This is because in the water/soil/biota environments other chemical pollutants and organic matter would interact with these photoproducts, making their degradation processes different from those obtained in this investigation using the sunlight conditions of the laboratory. For this reason, a subsequent study of the presence of the detected photoproducts in rivers and wastewater effluents is recommended.

#### Credit author statement

Marc Marín-García: Investigation, Resources, Formal analysis, Data Curation, Writing-Original Draft, Software, Visualization. Michele De Luca: Formal analysis, Visualization, Writing-Review and Editing. Gaetano Ragno: Validation, Writing-Review and Editing. Romà Tauler: Supervision, Conceptualization, Methodology, Writing-Review and Editing, Funding acquisition.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

Research grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness (MINECO) for project PID2019-105732GB-C21 and from the Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR) of the Government of Catalonia for project 2017-SGR-753 are acknowledged by the authors as financial support. Marc Marín-García also acknowledges the FPI grant BES-2016-076678 from MINECO. IDAEA-CSIC is a Center of Excellence Severo Ochoa (Spanish Ministry of Science and Innovation, Project CEX2018-000794-S).

#### Appendix A. Supplementary Material

Supplementary Material to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122953>.

#### References

- [1] B. Xu, D. Mao, Y. Luo, L. Xu, Sulfamethoxazole biodegradation and biotransformation in the water-sediment system of a natural river, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 7069–7076, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.086>.
- [2] S.P. Vijaya Chamundeswari, E. James Jebaseelan Samuel, N. Sundaraganesan, Molecular structure, vibrational spectra, NMR and UV spectral analysis of sulfamethoxazole, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 118 (2014) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.063>.
- [3] A.G. Trovó, R.F.P. Nogueira, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, C. Sirtori, S. Malato, Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation, *Water Res.* 43 (2009) 3922–3931, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.006>.
- [4] S.D. Richardson, T.A.ernes, Water analysis: emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2813–2848, <https://doi.org/10.1021/ac500508t>.
- [5] W.C. Li, Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil, *Environ. Pollut.* 187 (2014) 193–201, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015>.
- [6] S. Pérez, P. Eichhorn, D.S. Aga, Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 1361–1367, <https://doi.org/10.1897/04-211R.1>.
- [7] T. Kosjek, E. Heath, B. Kompare, Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant, in: *Anal. Bioanal. Chem.*, Springer, 2007, pp. 1379–1387, <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0969-1>.
- [8] M. Majewsky, D. Wagner, M. Delay, S. Bräse, V. Yargeau, H. Horn, Antibacterial activity of sulfamethoxazole transformation products (TPs): general relevance for sulfonamide TPs modified at the para position, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 1821–1828, <https://doi.org/10.1021/tx500267x>.
- [9] A.G. Trovó, R.F.P. Nogueira, A. Agüera, C. Sirtori, A.R. Fernández-Alba, Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: persistence, toxicity and photoproducts assessment, *Chemosphere* 77 (2009) 1292–1298, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.065>.
- [10] T. Su, H. Deng, J.P. Benskin, M. Radke, Biodegradation of sulfamethoxazole photo-transformation products in a water/sediment test, *Chemosphere* 148 (2016) 518–525, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.049>.
- [11] C.J. Halsall, Chapter 6. Environmental organic chemistry, in: *Princ. Environ. Chem.*, Royal Society of Chemistry, 2007, pp. 279–313, <https://doi.org/10.1039/9781847557780-00279>.
- [12] H. Gong, W. Chu, Photodegradation of sulfamethoxazole with a recyclable catalyst, *Ind. Eng. Chem. Res.* 54 (2015) 12763–12769, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b03849>.
- [13] B. Shao, D. Dong, Y. Wu, J. Hu, J. Meng, X. Tu, S. Xu, Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 174–181, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.05.007>.
- [14] P. Drilla, S.N. Dokianakis, M.S. Fountoulakis, M. Kornaros, K. Stamatelatos, G. Lyberatos, On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: the example of the antibiotic sulfamethoxazole, *J. Hazard Mater.* 122 (2005) 259–265, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.009>.
- [15] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr., A* 1292 (2013) 173–188, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>.
- [16] M. Voigt, I. Bartels, A. Nickisch-Hartfeld, M. Jaeger, Photoinduced degradation of sulfonamides, kinetic, and structural characterization of transformation products and assessment of environmental toxicity, *Toxicol. Environ. Chem.* 99 (2017) 1304–1327, <https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1373777>.
- [17] N. Kemper, Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecol. Indicat.* 8 (2008) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>.
- [18] F. Bonvin, J. Onlin, R. Rutler, W.B. Schweizer, P.J. Alaimo, T.J. Strathmann, K. McNeill, T. Kohn, Direct photolysis of human metabolites of the antibiotic sulfamethoxazole: evidence for abiotic back-transformation, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 6746–6755, <https://doi.org/10.1021/es303777k>.
- [19] M. Grurek, H. Horn, M. Majewsky, Phototransformation of sulfamethoxazole under simulated sunlight: transformation products and their antibacterial activity toward *Vibrio fischeri*, *Sci. Total Environ.* 538 (2015) 58–63, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.014>.
- [20] S. Mas, R. Tauler, A. de Juan, Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes, *J. Chromatogr., A* 1218 (2011) 9260–9268, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.035>.
- [21] M. Pérez-Cova, R. Tauler, J. Jaumot, Chemometrics in comprehensive two-dimensional liquid chromatography: a study of the data structure and its multilinear behavior, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 201 (2020) 104009, <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104009>.
- [22] C. Perez-Lopez, A. Ginebreda, M. Carrascol, D. Barceló, J. Abian, R. Tauler, Non-target protein analysis of samples from wastewater treatment plants using the regions of interest-multivariate curve resolution (ROI-MCR) chemometrics method, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 105752, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105752>.
- [23] E. Gorrochategui, J. Jaumot, S. Lacorte, R. Tauler, Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: overview and workflow, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 82 (2016) 425–442, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>.
- [24] A. De Juan, R. Tauler, in: *Chemometrics Applied to Unravel Multicomponent Processes and Mixtures: Revisiting Latest Trends in Multivariate Resolution*, *Anal. Chim. Acta*, Elsevier, 2003, pp. 195–210, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00724-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00724-4).
- [25] J.M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. MasPOCH, J. Coello, M. Blanco, Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 27 (2008) 696–713, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.010>.
- [26] A. De Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder, Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 23 (2004) 70–79, [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00101-3).

- [27] M.C. Antunes, J.E.J. Simão, A.C. Duarte, R. Tauler, Multivariate curve resolution of overlapping voltammetric peaks: quantitative analysis of binary and quaternary metal mixtures, *Analyst* 127 (2002) 809–817, <https://doi.org/10.1039/b200243b>.
- [28] T. Azzouz, R. Tauler, Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples, *Talanta* 74 (2008) 1201–1210, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.024>.
- [29] M. Alier, M. Felipe-Sotelo, I. Hernández, R. Tauler, Variation patterns of nitric oxide in Catalonia during the period from 2001 to 2006 using multivariate data analysis methods, *Anal. Chim. Acta* 642 (2009) 77–88, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.064>.
- [30] M. Marín-García, R. Tauler, Chemometrics characterization of the Llobregat river dissolved organic matter, *Chemometr. Intell. Lab. Syst. 201* (2020) 104018, <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104018>.
- [31] A. de Juan, R. Tauler, Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 163–176, <https://doi.org/10.1080/10408340600970005>.
- [32] C. Gómez-Canela, G. Boívar-Subirats, R. Tauler, S. Lacorte, Powerful combination of analytical and chemometric methods for the photodegradation of 5-Fluorouracil, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 137 (2017) 33–41, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.019>.
- [33] M. De Luca, G. Ioelle, S. Mas, R. Tauler, G. Ragno, A study of pH-dependent photodegradation of amiloride by a multivariate curve resolution approach to combined kinetic and acid-base titration UV data, *Analyst* 137 (2012) 5428–5435, <https://doi.org/10.1039/c2an35799b>.
- [34] M. Marín-García, G. Ioelle, H. Franquet-Griell, S. Lacorte, G. Ragno, R. Tauler, Investigation of the photodegradation profile of tamoxifen using spectroscopic and chromatographic analysis and multivariate curve resolution, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 174 (2018) 128–141, <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.01.011>.
- [35] M. De Luca, G. Ragno, G. Ioelle, R. Tauler, Multivariate curve resolution of incomplete fused multiset data from chromatographic and spectrophotometric analyses for drug photostability studies, *Anal. Chim. Acta* 837 (2014) 31–37, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.056>.
- [36] M. De Luca, G. Ioelle, F. Grande, S. Platikanov, R. Tauler, G. Ragno, Photostability study of multicomponent drug formulations via MCR-ALS: the case of the hydrochlorothiazide-amiloride mixture, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 186 (2020) 113332, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113332>.
- [37] A. Jayaraman, S. Mas, R. Tauler, A. de Juan, Study of the photodegradation of 2-bromophenol under UV and sunlight by spectroscopic, chromatographic and chemometric techniques, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 910 (2012) 138–148, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.038>.
- [38] A. de Juan, R. Tauler, Multivariate curve resolution alternating least squares for spectroscopic data, in: C. Ruckebusch (Ed.), *Data Handl. Sci. Technol.*, Elsevier Ltd, 2016, pp. 5–51, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63638-6.00002-4>.
- [39] L.O. Björn, Principles and nomenclature for the quantification of light, in: *Photobiol. Sci. Light Life*, third ed., Springer New York, 2015, pp. 21–25, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1468-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1468-5_2).
- [40] M.R. Keenan, P.G. Kotula, Accounting for Poisson noise in the multivariate analysis of ToF-SIMS spectrum images, *Surf. Interface Anal.* 36 (2004) 203–212, <https://doi.org/10.1002/sia.1657>.
- [41] A. Savitzky, M.J.E. Golay, Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627–1639, <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>.
- [42] J. Jaumot, A. de Juan, R. Tauler, MCR-ALS GUI 2.0: new features and applications, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 140 (2015) 1–12, <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.10.003>.
- [43] The MathWorks Inc., Curve Fitting Toolbox, 2020. <https://www.mathworks.com/products/curvefitting.html>.
- [44] ICH Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products, 1996. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1b-photostability-testing-new-active-substances-medicinal-products>.
- [45] A.L. Boreen, W.A. Arnold, K. McNeill, Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3933–3940, <https://doi.org/10.1021/es0353053>.
- [46] Z. Qiang, C. Adams, Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK<sub>a</sub>) for human and veterinary antibiotics, *Water Res.* 38 (2004) 2874–2890, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.017>.
- [47] N. Şanlı, S. Şanlı, G. Özkan, A. Denizli, Determination of pK<sub>a</sub> values of some sulfonamides by LC and LC-PDA methods in acetonitrile-water binary mixtures, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1952–1960, <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010001000022>.
- [48] D.E. Moore, W. Zhou, Photodegradation OF sulfamethoxazole: a chemical system capable OF monitoring seasonal changes IN UVB intensity, *Photochem. Photobiol.* 59 (1994) 497–502, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb02974.x>.
- [49] S. Poirier-Larabie, P.A. Segura, C. Gagnon, Degradation of the pharmaceuticals diflufenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions, *Sci. Total Environ.* (2016) 257–267, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.057>, 557–558.
- [50] H.Y. Kim, T.H. Kim, S.M. Cha, S. Yu, Degradation of sulfamethoxazole by ionizing radiation: identification and characterization of radiolytic products, *Chem. Eng. J.* 313 (2017) 556–566, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.080>.
- [51] Y. Yang, X. Lu, J. Jiang, J. Ma, G. Liu, Y. Cao, W. Liu, J. Li, S. Pang, X. Kong, C. Luo, Degradation of sulfamethoxazole by UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/persulfate (PDS): formation of oxidation products and effect of bicarbonate, *Water Res.* 118 (2017) 196–207, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.054>.
- [52] J.L.S. Lee, I.S. Gilmore, M.P. Seah, Quantification and methodology issues in multivariate analysis of ToF-SIMS data for mixed organic systems, *Surf. Interface Anal.* 40 (2008) 1–14, <https://doi.org/10.1002/sia.2713>.
- [53] 1-D Data Interpolation (Table Lookup) - MATLAB Interpl. <https://www.mathworks.com/help/malab/ref/interp1.html> (accessed July 5, 2021).
- [54] G.H. Golub, C.F. Van Loan, 2.4 the singular value decomposition, in: *Matrix Comput.*, fourth ed., The John Hopkins University Press, Baltimore, 2013, p. 780. <https://jhupbooks.press.jhu.edu/title/matrix-computations>.
- [55] R. Tauler, M. Maeder, A. de Juan, in: S.D. Brown, B. Walczak, R. Tauler (Eds.), 2.15 - Multiset Data Analysis: Extended Multivariate Curve Resolution, second ed. *Compr. Chemom.*, Elsevier, Oxford, 2020, pp. 305–336, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14702-x>.
- [56] S.C. Rutan, A. de Juan, R. Tauler, 2.06 - introduction to multivariate curve resolution, in: S.D. Brown, B. Walczak, R. Tauler (Eds.), *Compr. Chemom.*, second ed., Elsevier, Oxford, 2020, pp. 85–94, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14890-5>.
- [57] A. de Juan, S.C. Rutan, R. Tauler, in: S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), 2.10 - Two-Way Data Analysis: Multivariate Curve Resolution, Iterative Methods, second ed. *Compr. Chemom.*, Elsevier, Oxford, 2020, pp. 153–171, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14752-3>.
- [58] R. Tauler, M. Maeder, in: S.D. Brown, R. Walczak, R. Tauler (Eds.), 2.11 - Multivariate Curve Resolution—Error in Curve Resolution, second ed. *Compr. Chemom.*, Elsevier, Oxford, 2020, pp. 173–197, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14729-8>.
- [59] K.H. Esbensen, P. Geladi, in: S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), 2.02 - Principal Component Analysis: Concept, Geometrical Interpretation, Mathematical Background, Algorithms, History, Practice, second ed. *Compr. Chemom.*, Elsevier, Oxford, 2020, pp. 3–15, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64165-6.05002-3>.
- [60] W. Windig, J. Guilment, Interactive self-modeling mixture analysis, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1425–1432, <https://doi.org/10.1021/ac00014a016>.
- [61] R. Tauler, Multivariate curve resolution of multiway data using the multilinearity constraint, *J. Chemom.* 35 (2021) 35, <https://doi.org/10.1002/cem.3279>.
- [62] M. Maeder, Y.-M. Neuhold, 3 Physical/chemical models, in: S.C. Rutan, B. Walczak (Eds.), *Pract. Data Anal. Chem.*, first ed., Elsevier, Amsterdam, 2007, pp. 29–100, [https://doi.org/10.1016/S0922-3487\(07\)80006-2](https://doi.org/10.1016/S0922-3487(07)80006-2).
- [63] O.A. El Seoud, W.J. Bader, E.L. Bastos, in: Z. Wang, U. Wille, E. Juaristi (Eds.), *Practical Chemical Kinetics in Solution*, first ed. *Encycl. Phys. Org. Chem.*, John Wiley & Sons, Inc., 2016, pp. 1–68, <https://doi.org/10.1002/9781118468586.epoc1012>.
- [64] SpectraBase, john wiley sons, Inc. <https://spectrabase.com/>. (Accessed 8 July 2021).



## **MATERIAL SUPLEMENTARI ARTICLE II: SULFAMETOXAZOL**

Marín-García, M.; De Luca, M.; Ragno, G.; Tauler, R. (2022). Coupling of spectrometric, chromatographic, and chemometric analysis in the investigation of the photodegradation of sulfamethoxazole.

*Talanta*, 239, 122953.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122953>



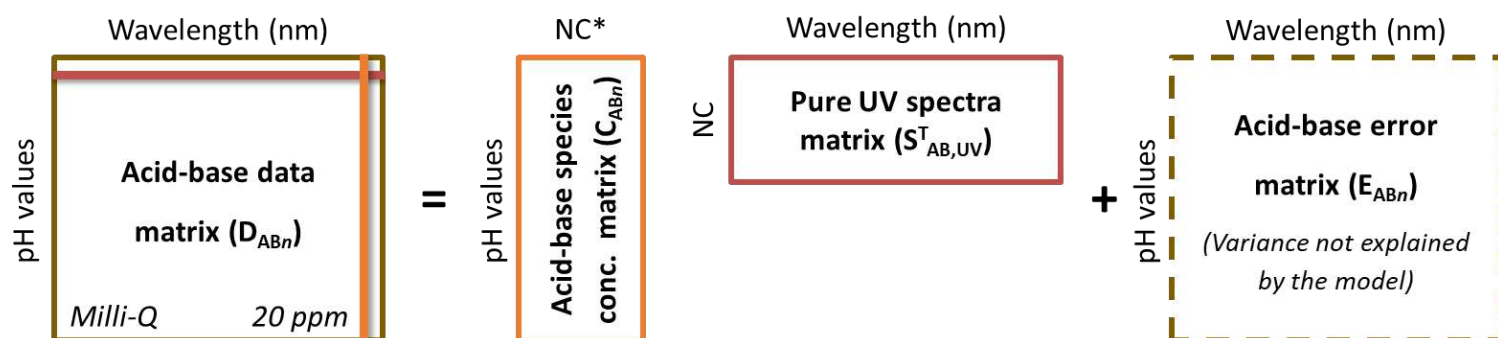
**Table S1.** pH values obtained at the two different SMX acid-base titration experiments performed ( $\mathbf{D}_{ABn}$  matrices). Red pH values (and their corresponding UV-VIS spectra) were further discarded from the chemometric analysis during the data pretreatment process (see Section 2.4).

Acid-Base experiments	Collected pH values								
$\mathbf{D}_{AB1}(15,193)$	1.34	1.73	2.33	2.73	3.34	3.71	4.35	4.72	5.36
	5.72	6.33	6.74	7.33	7.73	8.36	8.72	9.34	9.72
$\mathbf{D}_{AB2}(46,193)$	1.20	2.02	2.20	2.40	2.61	2.81	3.01	3.20	3.41
	3.61	3.80	4.00	4.19	4.39	4.59	4.80	5.01	5.19
	5.39	5.59	5.81	5.97	6.00	6.19	6.39	6.62	6.80
	7.02	7.19	7.40	7.58	7.82	8.02	8.20	8.40	8.59
	8.80	9.03	9.21	9.42	9.60	9.81	9.99	10.20	10.42
	10.58	10.80	11.07	11.23					

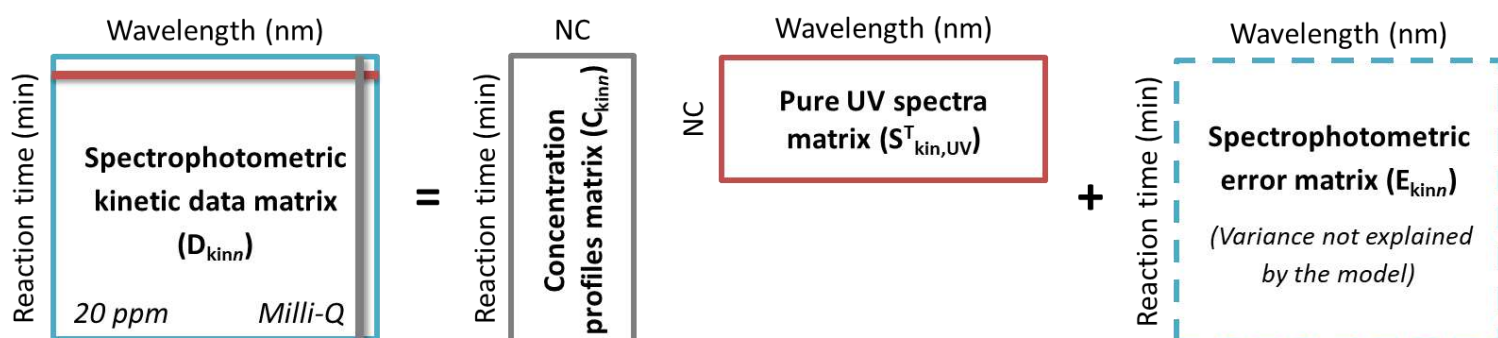
**Table S2.** MCR-ALS results of the analyses of the LC-DAD and LC-MS individual sample aliquots at the different photodegradation reaction times ( $\mathbf{D}_{DADn}$  and  $\mathbf{D}_{MSn}$  matrices). Only non-negativity (in  $\mathbf{C}$  and  $\mathbf{S}^T$ ) and Selectivity/local rank (in  $\mathbf{C}$ ) constraints were applied.

Reaction time (min)	LC-DAD			LC-MS		
	No. of comp. (NC)	Lack of fit (%)	Explained variance (%)	No. of comp. (NC)	Lack of fit (%)	Explained variance (%)
0	2	0.17	99.99	4	1.94	99.96
1	2	0.65	99.99	5	4.16	99.81
3	4	0.34	99.99	6	4.91	99.82
5	4	1.33	99.98	6	3.89	99.85
6.5	5	1.98	99.96	6	5.32	99.71
9	5	1.51	99.97	6	3.74	99.86
16	5	1.81	99.96	7	4.55	99.79
20	6	1.97	99.96	7	4.23	99.82
46	6	1.88	99.98	7	4.75	99.77
68	6	1.73	99.98	7	4.73	99.78

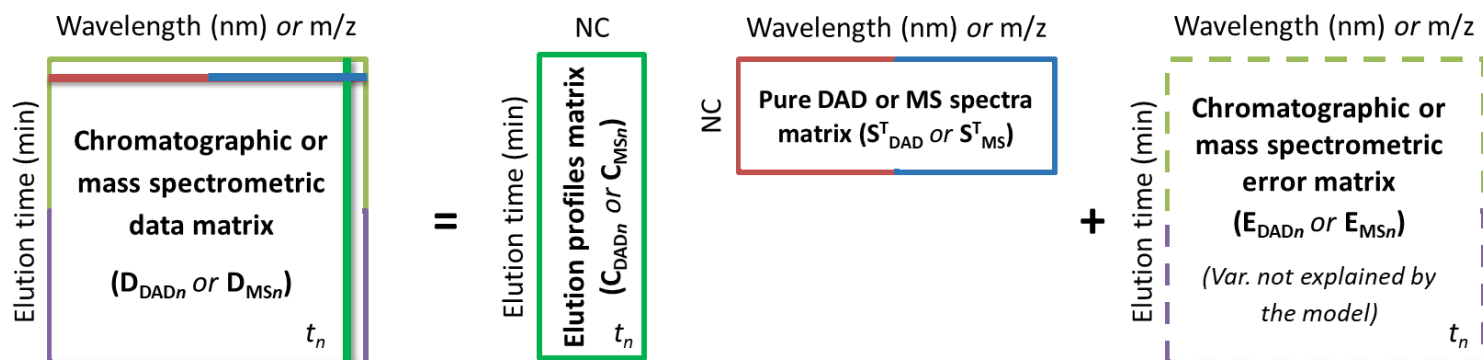
**Figure S1.** MCR bilinear decomposition models built from the individual data matrix arrangements provided by a single instrumental detection system (either UV or MS) for the acid-base titration and photodegradation studies of SMX ( $D_{ABn}$ ,  $D_{kinn}$ , and  $D_{DADn}/D_{MSn}$  matrices). These models follow **Equation 2** referred in the main manuscript. \*NC: Number of Components (# of resolved MCR components).



Bilinear Model:  $D_{ABn} = C_{ABn} S_{AB,UV}^T + E_{ABn}$

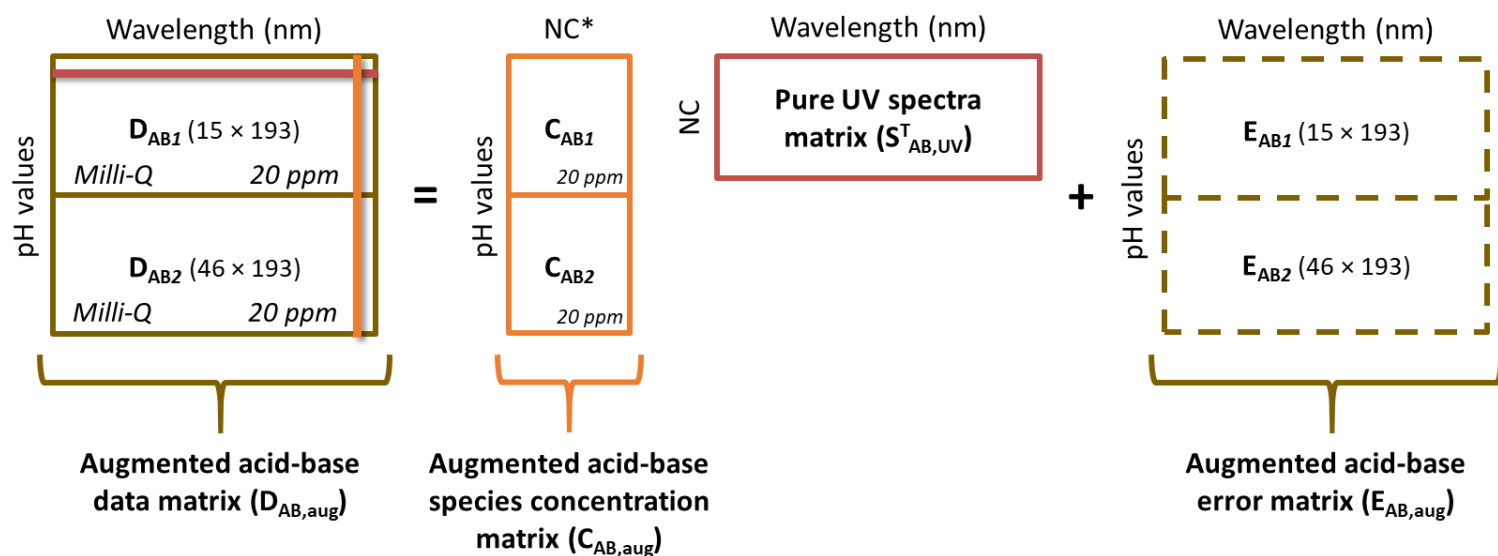


Bilinear Model:  $D_{kinn} = C_{kinn} S_{kin,UV}^T + E_{kinn}$

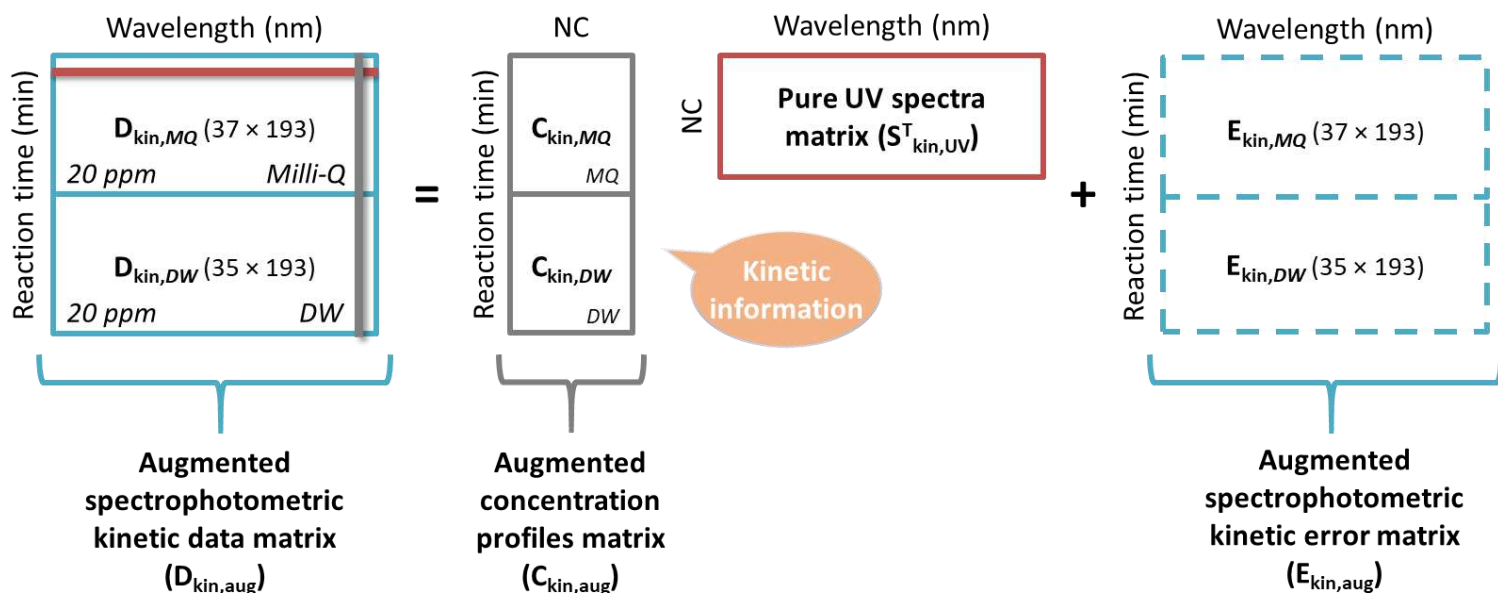


Bilinear Model:  $D_{DADn} = C_{DADn} S_{DAD}^T + E_{DADn}$  or  $D_{MSsn} = C_{MSsn} S_{MS}^T + E_{MSsn}$

**Figure S2.** MCR bilinear decomposition models built from the sample-augmented data matrix arrangements provided by a single instrumental detection system (either UV or MS) for the acid-base titration and photodegradation studies of SMX ( $D_{AB,aug}$ ,  $D_{kin,aug}$ , and  $D_{DAD,aug}/D_{MS,aug}$  matrices). These models follow **Equation 3** mentioned in the main manuscript. \*NC: Number of Components (# of resolved MCR components).



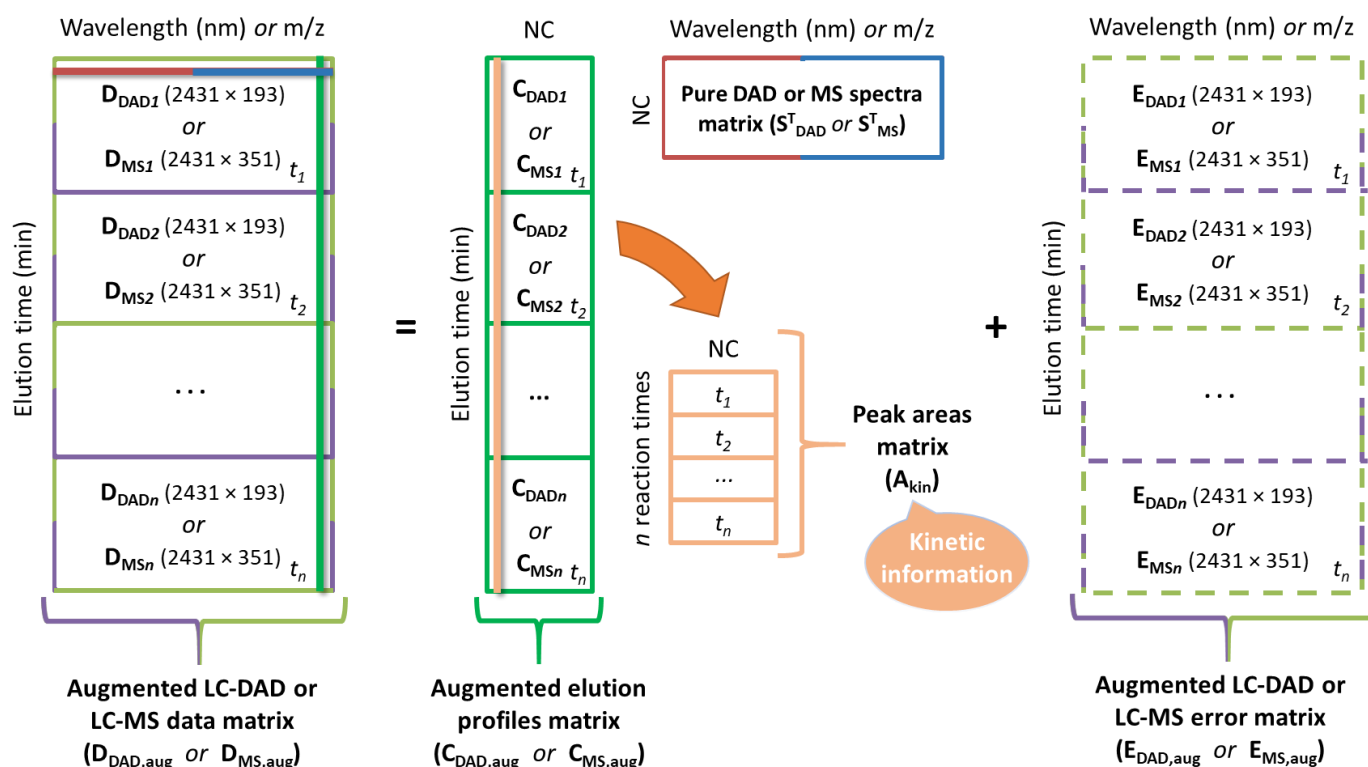
$$\text{Bilinear Model: } D_{AB,aug} = [D_{AB1}; D_{AB2}] = [C_{AB1}; C_{AB2}] S_{AB,UV}^T + [E_{AB1}; E_{AB2}] = C_{AB,aug} S_{AB,UV}^T + E_{AB,aug}$$



$$\text{Bilinear Model: } D_{kin,aug} = [D_{kin,MQ}; D_{kin,DW}] = [C_{kin,MQ}; C_{kin,DW}] S_{kin,UV}^T + [E_{kin,MQ}; E_{kin,DW}] = C_{kin,aug} S_{kin,UV}^T + E_{kin,aug}$$



Figure S2 (continuation).

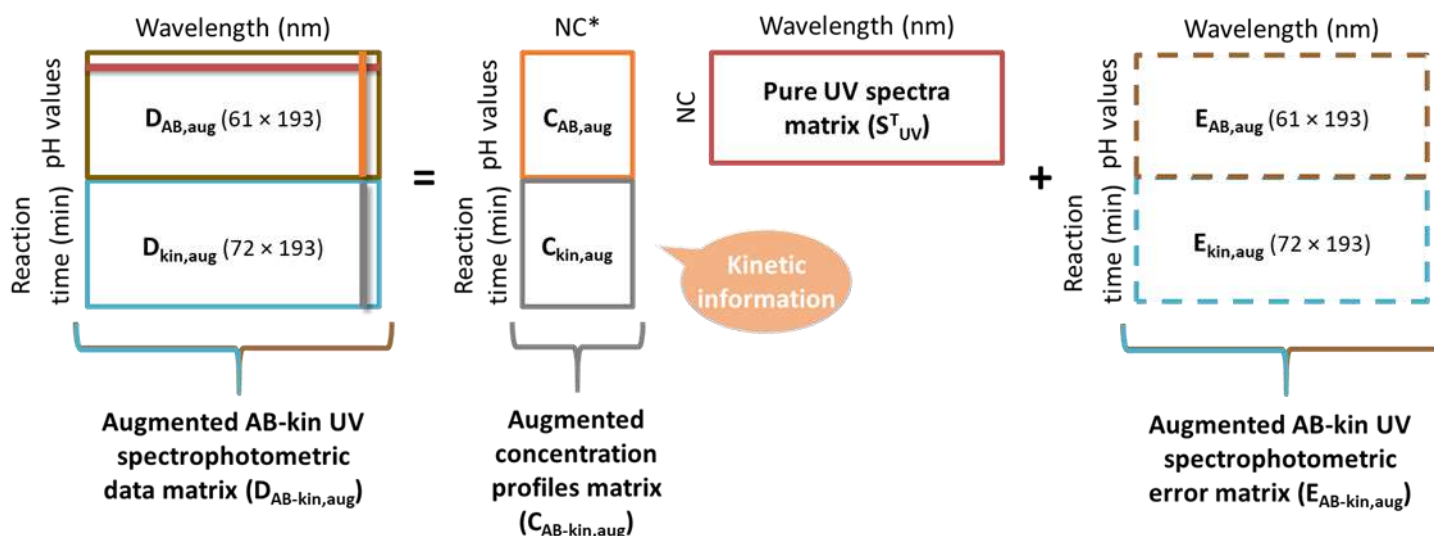


$$\text{Bilinear Model: } D_{DAD, aug} = [D_{DAD1}; D_{DAD2}; D_{DADn}] = [C_{DAD1}; C_{DAD2}; C_{DADn}] S_{DAD}^T + [E_{DAD1}; E_{DAD2}; E_{DADn}] = C_{DAD, aug} S_{DAD}^T + E_{DAD, aug}$$

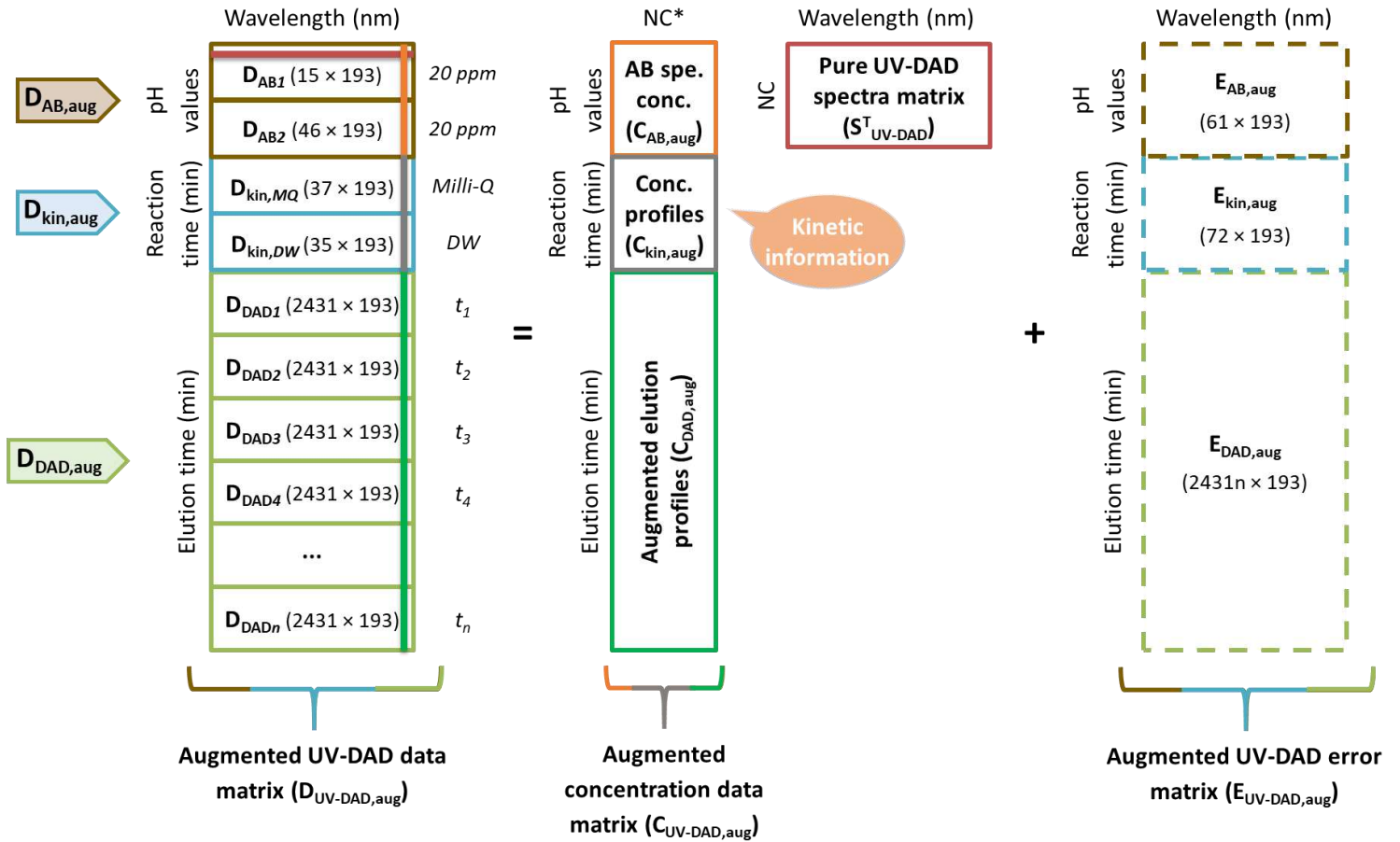
$$\text{or}$$

$$D_{MS, aug} = C_{MS, aug} S_{MS}^T + E_{MS, aug}$$

Figure S3. MCR bilinear decomposition models for the joint analysis (data fusion strategy) of the sample-augmented data matrix arrangements provided by single or multiple instrumental equipment (in this case, the UV-Visible spectrophotometer and LC-DAD) using the same detection technique (UV-DAD) for the acid-base titration and photodegradation studies of SMX ( $D_{AB-kin, aug}$  and  $D_{UV-DAD, aug}$ ). This model follows Equation 3 described in the main manuscript. \*NC: Number of Components (# of resolved MCR components).

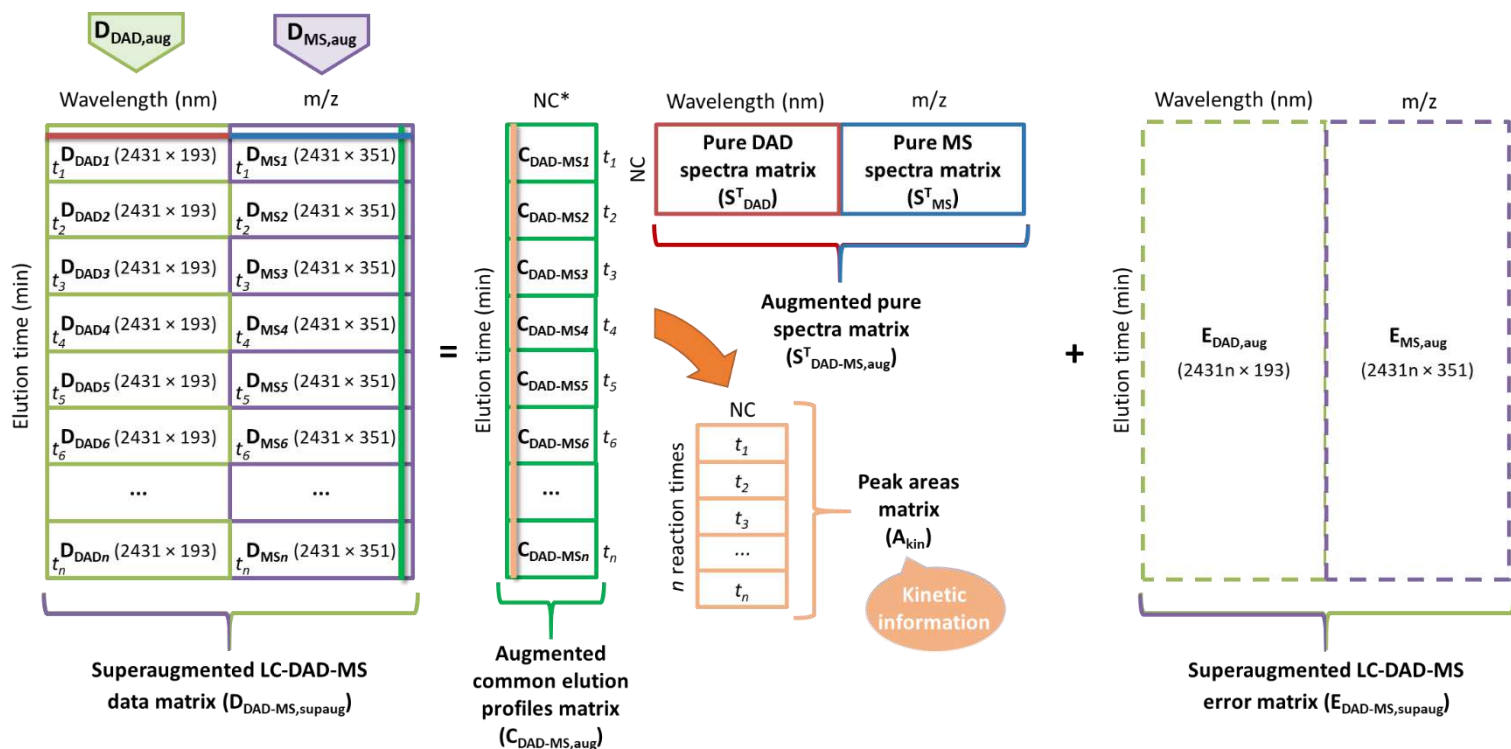


$$\text{Bilinear Model: } D_{AB-kin, aug} = [D_{AB, aug}; D_{kin, aug}] = [C_{AB, aug}; C_{kin, aug}] S_{UV}^T + [E_{AB, aug}; E_{kin, aug}] = C_{AB-kin, aug} S_{UV}^T + E_{AB-kin, aug}$$



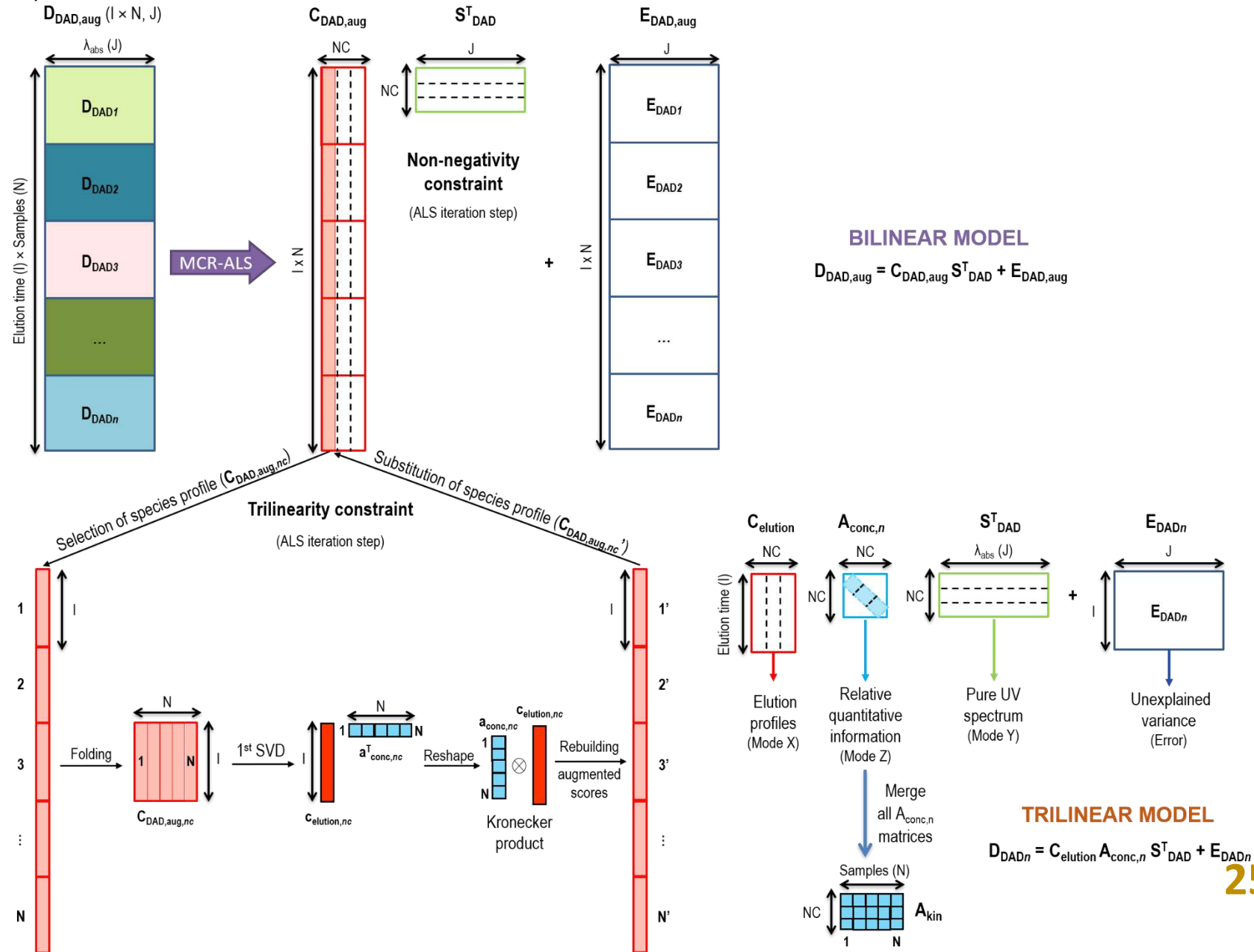
$$\begin{aligned}
 \text{Bilinear Model: } D_{UV-DAD, aug} &= [D_{AB, aug}; D_{kin, aug}; D_{DAD, aug}] = [C_{AB, aug}; C_{kin, aug}; C_{DAD, aug}] S^T_{UV-DAD} + [E_{AB, aug}; E_{kin, aug}; E_{DAD, aug}] \\
 &= C_{UV-DAD, aug} S^T_{UV-DAD} + E_{UV-DAD, aug}
 \end{aligned}$$

**Figure S4.** MCR bilinear decomposition model built for the simultaneous analysis (data fusion strategy) of the sample-augmented data matrix arrangements provided by single instrumental equipment (in this case, the LC-DAD-MS) using different combined detection systems (UV-DAD and MS) for the photodegradation study of SMX ( $D_{DAD-MS,supaug}$  matrix). This model follows **Equation 4** referred in the main manuscript. \*NC: Number of Components (# of resolved MCR components).



$$\begin{aligned}
 \text{Bilinear Model: } D_{DAD-MS,supaug} &= [D_{DAD,aug}, D_{MS,aug}] = C_{DAD-MS,aug} [S_{DAD}^T, S_{MS}^T] + [E_{DAD,aug}, E_{MS,aug}] \\
 &= C_{DAD-MS,aug} S_{DAD-MS,aug}^T + E_{DAD-MS,supaug}
 \end{aligned}$$

Figure S5. Implementation of the *Trilinearity* constraint in the MCR-ALS algorithm (see also MCR bilinear decomposition of  $D_{DAD,aug}$  matrix in Figure S2).





## BLOC 2: CARACTERITZACIÓ DE LA MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA DEL RIU LLOBREGAT

En aquesta secció, es proposa el mètode quimiomètric MCR-ALS per extreure informació sobre els canvis compostius de les fraccions de la CDOM i la seva distribució al llarg dels diferents emplaçaments de mostreig d'aigua de la conca del riu Llobregat (situada al nord-oest de la Península Ibèrica) durant tres campanyes de seguiment diferents realitzades durant els anys 2017–2019. L'enfocament proposat, combina un procediment de seguiment de la qualitat de l'aigua en diferents moments de l'any (estacions climàtiques diferents) i en diversos llocs de presa de mostres d'aigua del riu per mitjà de mesures de fluorescència i la seva modelització quimiomètrica emprant el mètode MCR-ALS. Aquest enfocament ha permès extreure informació valuosa sobre els canvis compostius de la CDOM i sobre la seva distribució al llarg del curs del riu, des del seu origen fins a la seva desembocadura. En aquest estudi, s'han resolt diverses possibles fonts de CDOM diferents i es discuteixen els canvis en la seva distribució al llarg de la conca hidrogràfica i entre les campanyes de seguiment realitzades.

### 5.4. ESTRUCTURA DE LES DADES MESURADES

Els conjunts de dades obtinguts a partir de les caracteritzacions d'absorbància UV-Vis i de fluorescència multidimensional (matrius d'excitació-emissió, EEM) de les mostres d'aigua de riu de tots els llocs de presa de mostra i durant les diferents campanyes de seguiment realitzades es van organitzar en diferents matrius de dades, que es descriuen a continuació. Addicionalment la **Figura 62**, situada al final de la secció, ofereix els detalls de les estructures d'aquestes matrius de dades.

#### 5.4.1. DADES ESPECTROFOTOMÈTRIQVES UV-VISIBLE

La matriu de dades  $D_{UV,l}$  fa referència a l'anàlisi espectrofotomètrica UV-Visible de les 10 mostres d'aigua recollides en alguna de les tres campanyes de seguiment ( $l = I, II, III$ , per a octubre de 2017, octubre de 2018 i maig de 2019, respectivament). Tots els espectres UV-Vis estan situats a les diferents files de la matriu de dades, i es van adquirir a 161 longituds d'ona entre 190 i 350 nm. La localització dels 10 llocs de

mostreig de les tres campanyes es mostra a la **Figura 25**, des de la capçalera del Llobregat (**Punt B**) fins al seu estuari (prop del **Punt P**). Addicionalment, es va realitzar un primer estudi comparatiu de l'abundància de la CDOM entre les diferents campanyes mitjançant l'anàlisi simultània de les diferents matrius de dades  $D_{UV,l}$ . Aquesta anàlisi va ser possible a través de la construcció de la matriu de dades augmentada en la direcció de les columnes  $D_{UV,aug}$  (veure **Figura 62**). L'anàlisi quimiomètrica d'aquesta matriu de dades espectrofotomètriques permet la comparació ràpida dels patrons d'abundància de la CDOM dels diferents punts de mostreig en les tres campanyes de seguiment realitzades. En aquesta disposició de les dades, les columnes de les tres matrius de dades concatenades són iguals i tenen el mateix significat: 161 valors de longitud d'ona (190 – 350 nm) (Tauler & de Juan, 2015).

#### 5.4.2. DADES FLUORIMÈTRIQVES MULTIDIMENSIONALS (EEM)

En les matrius de dades fluorimètriques d'EEM,  $D_{EEM,l,k}$ , la  $l$  fa referència a les tres campanyes de seguiment diferents (I, II o III) i la  $k$  a les 10 estacions de mostreig que integren cadascuna d'aquestes campanyes (punts de mostreig de B a P en la **Figura 25**). Les files d'aquestes matrius tenen els espectres d'emissió (101 longituds d'ona d'emissió en el rang 300 – 500 nm) a les diferents longituds d'ona d'excitació (61 longituds d'ona d'excitació entre 220 i 340 nm), tal com es mostra a la **Figura 62**. Per cada campanya, doncs, es van obtenir 10 matrius de dades d'excitació-emissió  $D_{EEM,l,k}$  diferents.

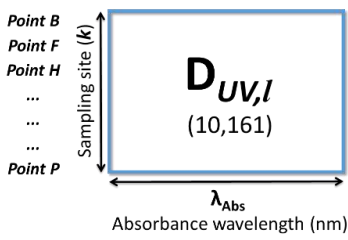
Aquestes matrius de dades fluorimètriques d'EEM, on cadascuna individualment es refereixen a una única mostra, es poden analitzar simultàniament per caracteritzar la CDOM present a l'aigua del riu i conèixer la seva distribució i abundància en tots els punts de presa de mostres per a cada campanya considerada. Aquesta anàlisi, els resultats de la qual es mostren més endavant, és va poder realitzar tot considerant que el conjunt de dades d'EEM resultant té una estructura de dades tridimensional (*three-way data*) i, per tant, es pot organitzar en un cub de dades  $\underline{D}_{EEM,l}$ , on 10 matrius de dades diferents  $D_{EEM,l,k}$  ( $k = 1, \dots, 10$ ) de cadascun dels llocs de presa de mostres de la **Figura 25**, defineixen la tercera via, direcció o mode del cub de dades (mode 3). Les files i columnes de les matrius de dades individuals, tal com s'ha

mencionat anteriorment, descriuen els espectres d'emissió (101 longituds d'ona) i d'excitació (61 longituds d'ona) i constitueixen, respectivament, els modes 1 i 2 del cub de dades EEM (M. C. G. Antunes & Esteves da Silva, 2005; Tauler, Maeder, et al., 2020). A més, si es consideren simultàniament les tres campanyes de seguiment, es pot disposar d'un nou hipercub de dades augmentat o paral·lelepípede  $\underline{\mathbf{D}}_{\text{EEM, aug}}$ . Aquesta estructura de dades està formada, tal com es mostra a la **Figura 62**, per l'acoblament simultani dels tres cubs de dades diferents  $\underline{\mathbf{D}}_{\text{EEM, } l}$  de les campanyes de seguiment realitzades ( $3 \times 10$  matrius  $\mathbf{D}_{\text{EEM, } l, k}$  van ser simultàniament annexades). Seria de fet una estructura de dades en 4 vies, direccions o modes, on el 4t mode seria les diferents campanyes.

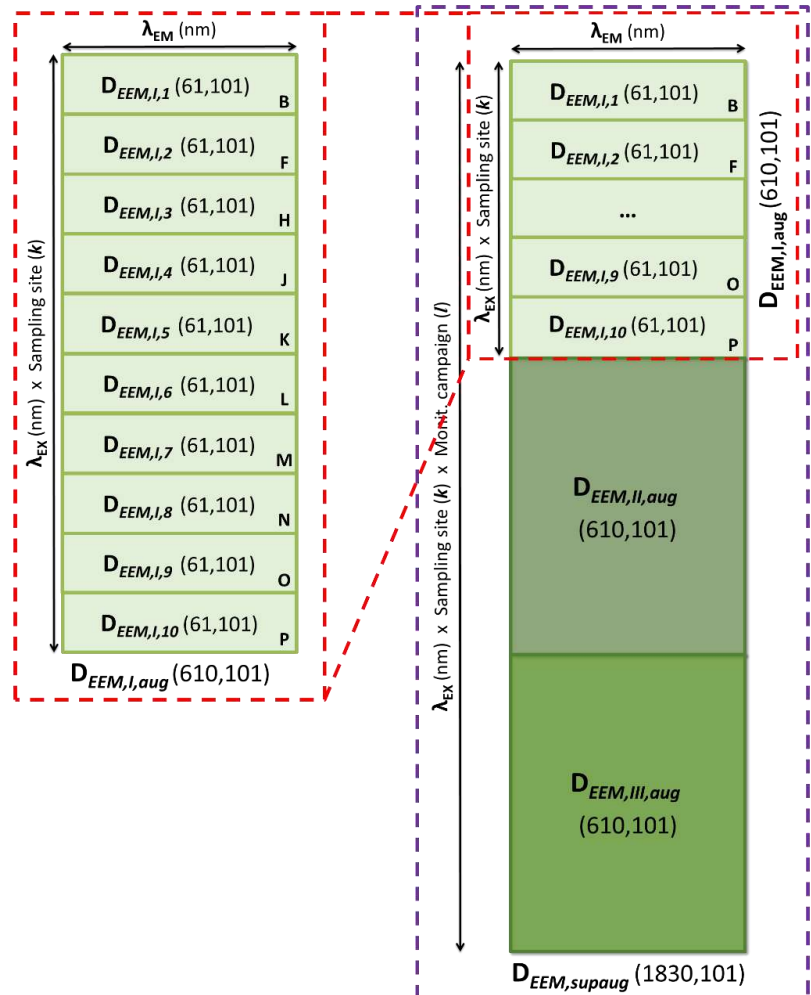
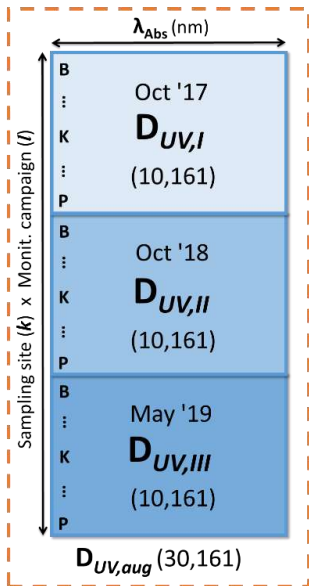
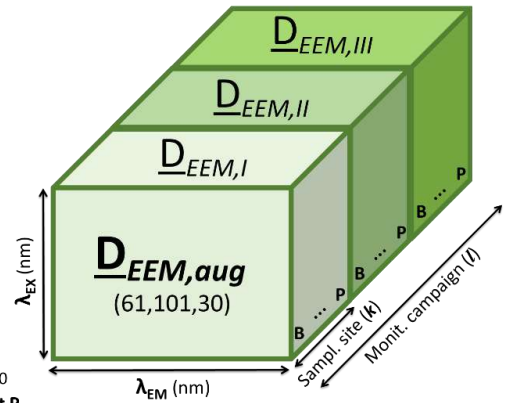
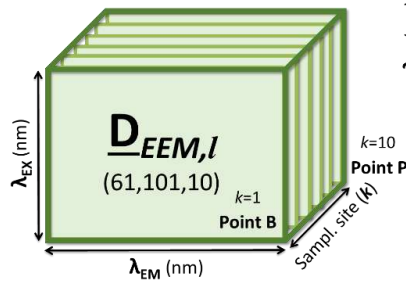
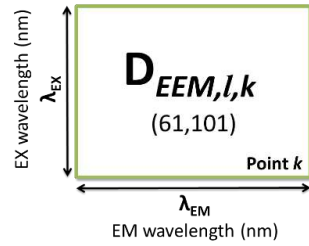
Per poder aplicar el mètode MCR-ALS proposat, el cub de dades EEM que inclou tots els llocs de presa de mostres es va desplegar, en primer lloc, en la matriu de dades augmentades en la direcció de les columnes,  $\mathbf{D}_{\text{EEM, } l, \text{aug}}$ , per a una de les campanyes de seguiment seleccionades, que inclou totes les matrius  $\mathbf{D}_{\text{EEM, } l, k}$  concatenades per columnes, una sobre l'altra, mantenint en comú les mateixes longituds d'ona d'emissió (101 valors de  $\lambda_{\text{EM}}$ ) a les columnes (veure la **Figura 62**). Les files d'aquesta matriu, per la seva banda, representen els diferents espectres d'emissió obtinguts a les diferents longituds d'ona d'excitació (61 valors de  $\lambda_{\text{EX}}$ ) multiplicats tantes vegades com el nombre de llocs de presa de mostra simultàniament analitzats, posat que cadascun d'ells va proporcionar una matriu de dades d'EEM amb les mateixes dimensions (es van annexar 10 matrius EEM). Addicionalment, quan es van analitzar simultàniament les tres campanyes de seguiment, es va obtenir una nova matriu de dades superaugmentada  $\mathbf{D}_{\text{EEM, supaug}}$ , que inclou les 10 matrius  $\mathbf{D}_{\text{EEM, } l, k}$  individuals de cadascuna de les tres campanyes de seguiment realitzades (disposades prèviament en 3 matrius  $\mathbf{D}_{\text{EEM, } l, \text{aug}}$  diferents, mantenint en comú les longituds d'ona d'emissió (101 valors de  $\lambda_{\text{EM}}$ )). Les files d'aquesta matriu, en aquest cas, representen els diferents espectres d'emissió obtinguts a les diferents longituds d'ona d'excitació (61 valors de  $\lambda_{\text{EX}}$ ) multiplicat pel nombre de llocs de presa de mostra i pel nombre de campanyes de seguiment o monitoratge realitzades, cadascun d'ells proporcionant una matriu de dades EEM. És a dir que en total es van adjuntar  $3 \times 10 = 30$  matrius de dades EEM (veure **Figura 62**).



UV-Vis. spectrophotometric data matrix



EEM spectrofluorometric data matrix



**Figura 62.** Disposició matricial dels diferents conjunts de dades obtinguts en la caracterització de les mostres d'aigua superficial del riu Llobregat mitjançant espectroscòpies d'absorbància UV-Visible i de fluorescència d'excitació-emissió, analitzats posteriorment per MCR-ALS. Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE III.

### 5.5. MÈTODE QUIMIOMÈTRIC PROPOSAT (MCR-ALS)

Com s'ha descrit amb anterioritat en el Capítol 4, el mètode MCR-ALS utilitza un model bilineal per descompondre la matriu de dades experimentals,  $\mathbf{D}$ , en el producte de dues matrius de factors. En el cas de les dades espectrofotomètriques d'UV-Visible (matrius  $\mathbf{D}_{UV,l}$  i  $\mathbf{D}_{UV,aug}$ ), la descomposició bilineal produeix una matriu de factors amb els espectres UV-Vis dels components MCR resolts (matriu  $\mathbf{S}_{UV}^T$ ) i una altra matriu que conté els perfils de concentració (és a dir, les contribucions o concentracions relatives dels components en cada mostra analitzada) d'aquests mateixos components (matriu  $\mathbf{C}$ ).

$$\mathbf{D}_{UV} = \mathbf{C}\mathbf{S}_{UV}^T + \mathbf{E}_{UV}. \quad (42)$$

Aquesta equació és, de fet, l'extensió de la llei de Beer-Lambert a l'anàlisi de diverses longituds d'ona i múltiples mostres (Rutan, de Juan, et al., 2020). Així, aquest model suposa que les respostes espectrofotomètriques analítiques dels múltiples components presents a les mostres (en aquest estudi, identificats com a  $N$ ) estan barrejades i poden ser explicades segons l'Equació (42) anterior. Tanmateix, en l'estudi realitzat, les dades d'absorbància només es van emprar per tenir una primera estimació de la presència de la CDOM a les diferents mostres i es van obtenir principalment per realitzar un Anàlisi de Components Principals que permetés detectar les possibles similituds entre les mostres d'aigua de riu dels diferents punts i campanyes de presa de mostra efectuades.

En el cas de les mesures de fluorescència d'excitació-emissió d'una sola mostra (matriu  $\mathbf{D}_{EEM,l,k}$ ), el modelatge bilineal MCR-ALS de les dades experimentals es pot descriure amb una equació força similar a l'anteriorment descrita:

$$\mathbf{D}_{EEM} = \mathbf{S}_{ex}\mathbf{S}_{em}^T + \mathbf{E}_{EEM}. \quad (43)$$

En aquest cas, la descomposició de les dades de fluorescència crea la matriu  $\mathbf{S}_{ex}$ , que conté els perfils espectrals d'excitació dels components que formen la mescla, i la matriu  $\mathbf{S}_{em}^T$ , que té els respectius perfils espectrals d'emissió purs d'aquests mateixos constituents. D'altra banda, també s'obté la matriu  $\mathbf{E}_{EEM}$ , que té la variància residual no explicada pel model MCR,  $\mathbf{S}_{ex}\mathbf{S}_{em}^T$ . L'Equació (43) resumeix, doncs, el

conjunt d'equacions lineals que defineixen les contribucions espectrals de fluorescència de cada component a la mostra analitzada (X. Zhang, Marcé, et al., 2014).

L'aplicació del model bilineal MCR-ALS a les diferents matrius de dades fluorimètriques obtingudes en aquest estudi es mostra a la **Figura 63** i es detalla a continuació.

Per a les matrius de dades  $\mathbf{D}_{EEM,l,k}$  on les files de la matriu representen els espectres d'emissió recollits a les diferents longituds d'ona d'excitació estudiades i les columnes són els espectres d'excitació registrats a les longituds d'ona d'emissió seleccionades (veure **Figura 62**), el model de descomposició bilineal aplicat es defineix amb l'Equació (43) i es troba representat gràficament a la **Figura 63a**. Així doncs, les matrius  $\mathbf{S}_{ex}$  i  $\mathbf{S}_{em}^T$  donen, respectivament, els perfils dels espectres d'excitació i emissió dels  $N$  components resolts en la mostra d'aigua analitzada. En aquest cas, però, els diferents components resolts no s'associen a un compost orgànic específic, sinó que venen a descriure una composició determinada de CDOM diferent de cada mostra.

Quan l'anàlisi MCR-ALS s'aplica simultàniament a les matrius de dades fluorimètriques multidimensionals (matrius EEM) adquirides corresponents a una única campanya de monitorització (és a dir, a la matriu de dades augmentada  $\mathbf{D}_{EEM,l,aug}$ , veure gràficament a la **Figura 63b**), l'equació del model bilineal s'amplia ara a:

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_{EEM,l,aug} &= [\mathbf{D}_{EEM,l,1}; \mathbf{D}_{EEM,l,2}; \dots; \mathbf{D}_{EEM,l,k}] \\ &= [\mathbf{S}_{ex,l,1}; \mathbf{S}_{ex,l,2}; \dots; \mathbf{S}_{ex,l,k}] \mathbf{S}_{em}^T \\ &\quad + [\mathbf{E}_{EEM,l,1}; \mathbf{E}_{EEM,l,2}; \dots; \mathbf{E}_{EEM,l,k}] = \mathbf{S}_{ex,l,aug} \mathbf{S}_{em}^T + \mathbf{E}_{EEM,l,aug} \end{aligned} \quad (44)$$

o escrit d'una altra manera:

$$\mathbf{D}_{EEM,l,aug} = \begin{bmatrix} \mathbf{D}_{EEM,l,1} \\ \mathbf{D}_{EEM,l,2} \\ \dots \\ \mathbf{D}_{EEM,l,k} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{S}_{ex,l,1} \\ \mathbf{S}_{ex,l,2} \\ \dots \\ \mathbf{S}_{ex,l,k} \end{bmatrix} \mathbf{S}_{em}^T + \begin{bmatrix} \mathbf{E}_{EEM,l,1} \\ \mathbf{E}_{EEM,l,2} \\ \dots \\ \mathbf{E}_{EEM,l,k} \end{bmatrix} = \mathbf{S}_{ex,l,aug} \mathbf{S}_{em}^T + \mathbf{E}_{EEM,l,aug} \quad (45)$$

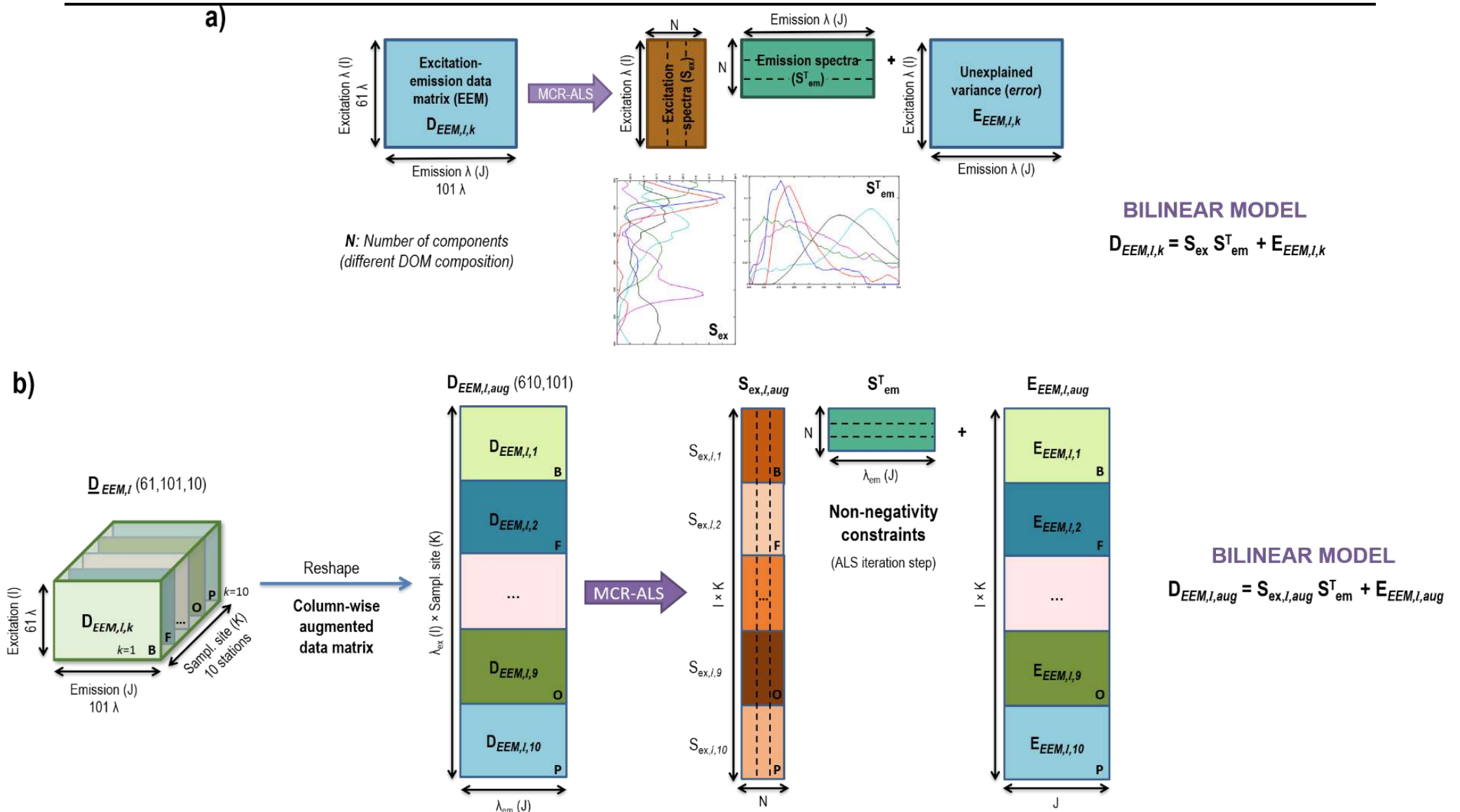
En aquest cas, la matriu  $\mathbf{S}_{\text{ex},l,\text{aug}}$  resultant és una matriu augmentada per columnes  $\mathbf{S}_{\text{ex},l,\text{aug}} = [\mathbf{S}_{\text{ex},l,1}; \mathbf{S}_{\text{ex},l,2}; \dots; \mathbf{S}_{\text{ex},l,k}]$  que està formada per les diferents submatrius  $\mathbf{S}_{\text{ex},l,k}$  que contenen els espectres d'excitació (EX) dels  $N$  components individuals resolts (és a dir, les distintes fonts de CDOM) que es troben a cada estació de presa de mostra ( $k = 1, \dots, 10$ ) de la campanya de seguiment ( $l$ ) considerada, a les seves respectives concentracions relatives. La matriu  $\mathbf{S}_{\text{em}}^T$ , que també es crea en la descomposició, té els espectres d'emissió (EM) d'aquests components, comuns a tots els punts o estacions de presa de mostres estudiats (de Juan & Tauler, 2019).

D'altra banda, quan s'analitzen simultàniament les diferents campanyes de seguiment realitzades, el model MCR-ALS ampliat s'aplica ara a la matriu superaugmentada per columnes  $\mathbf{D}_{EEM,\text{supaug}}$ , descrita anteriorment, utilitzant l'Equació (46) que es mostra gràficament a la **Figura 64c**.

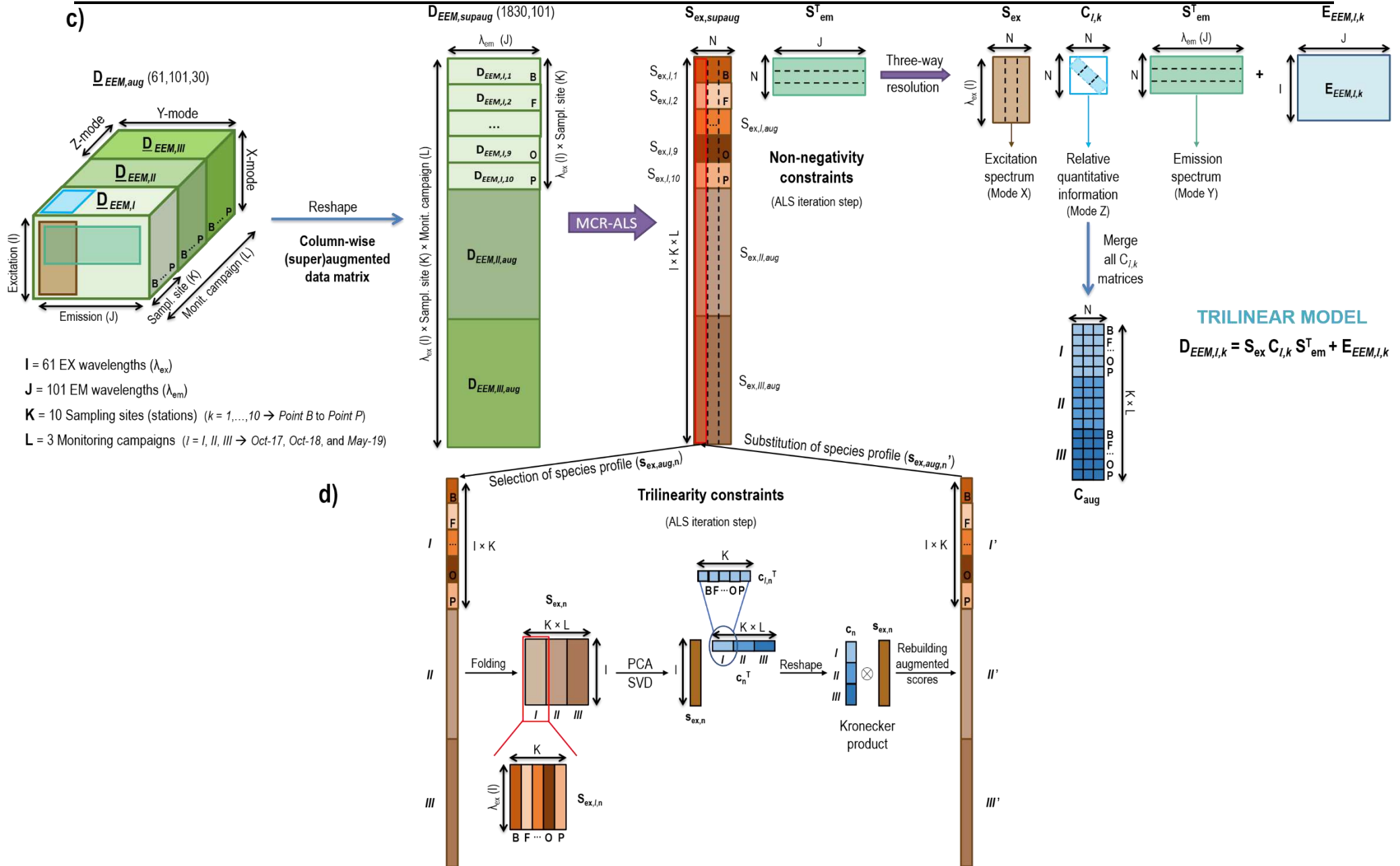
$$\begin{aligned} \mathbf{D}_{EEM,\text{supaug}} &= [\mathbf{D}_{EEM,I,\text{aug}}; \mathbf{D}_{EEM,II,\text{aug}}; \dots; \mathbf{D}_{EEM,l,\text{aug}}] \\ &= \left[ [\mathbf{S}_{\text{ex},I,1}; \mathbf{S}_{\text{ex},I,2}; \dots; \mathbf{S}_{\text{ex},I,k}]; [\mathbf{S}_{\text{ex},II,1}; \mathbf{S}_{\text{ex},II,2}; \dots; \mathbf{S}_{\text{ex},II,k}]; \dots; [\mathbf{S}_{\text{ex},l,1}; \mathbf{S}_{\text{ex},l,2}; \dots; \mathbf{S}_{\text{ex},l,k}] \right] \mathbf{S}_{\text{em}}^T \quad (46) \\ &+ [\mathbf{E}_{EEM,I,\text{aug}}; \mathbf{E}_{EEM,II,\text{aug}}; \dots; \mathbf{E}_{EEM,l,\text{aug}}] \\ &= [\mathbf{S}_{\text{ex},I,\text{aug}}; \mathbf{S}_{\text{ex},II,\text{aug}}; \dots; \mathbf{S}_{\text{ex},l,\text{aug}}] \mathbf{S}_{\text{em}}^T + \mathbf{E}_{EEM,\text{supaug}} = \mathbf{S}_{\text{ex},\text{supaug}} \mathbf{S}_{\text{em}}^T + \mathbf{E}_{EEM,\text{supaug}}. \end{aligned}$$

Aquesta Equació (46) també pot escriure's com:

$$\begin{aligned}
 \mathbf{D}_{EEM,l,aug} &= \begin{bmatrix} \mathbf{D}_{EEM,I,aug} \\ \mathbf{D}_{EEM,II,aug} \\ \dots \\ \mathbf{D}_{EEM,l,aug} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{S}_{ex,I,1} \\ \mathbf{S}_{ex,I,2} \\ \dots \\ \mathbf{S}_{ex,I,k} \end{bmatrix} \\ \begin{bmatrix} \mathbf{S}_{ex,II,1} \\ \mathbf{S}_{ex,II,2} \\ \dots \\ \mathbf{S}_{ex,II,k} \end{bmatrix} \\ \dots \\ \begin{bmatrix} \mathbf{S}_{ex,l,1} \\ \mathbf{S}_{ex,l,2} \\ \dots \\ \mathbf{S}_{ex,l,k} \end{bmatrix} \end{bmatrix} \mathbf{S}_{em}^T + \begin{bmatrix} \mathbf{E}_{EEM,I,aug} \\ \mathbf{E}_{EEM,II,aug} \\ \dots \\ \mathbf{E}_{EEM,l,aug} \end{bmatrix} \\
 &= \begin{bmatrix} \mathbf{S}_{ex,I,aug} \\ \mathbf{S}_{ex,II,aug} \\ \dots \\ \mathbf{S}_{ex,l,aug} \end{bmatrix} \mathbf{S}_{em}^T + \mathbf{E}_{EEM,supaug} \\
 &= \mathbf{S}_{ex,supaug} \mathbf{S}_{em}^T + \mathbf{E}_{EEM,supaug}
 \end{aligned} \tag{47}$$



**Figura 63.** Models MCR-ALS dels diferents conjunts de dades obtinguts en l'anàlisi de l'espectroscòpia de fluorescència d'EX-EM (EEM) de les mostres d'aigua superficial del riu Llobregat: **a)** Model bilinear de la matriu de dades d'EEM adquirida a partir d'una única mostra d'aigua en un punt i campanya de mostreig fluvial específics (matriu  $D_{EEM,I,k}$ ), **b)** Ampliació del model bilinear a l'anàlisi simultània del conjunt de matrius de dades d'EEM obtingudes als diferents emplaçaments fluvials (punts de mostreigs) en una única campanya de seguiment (matriu augmentada  $D_{EEM,I,aug}$ ). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE III.



**Figura 64.** c) Extensió del model bilineal MCR a l'anàlisi simultània del conjunt de matrius de dades d'EEM obtingudes als diferents llocs fluvials en múltiples campanyes de seguiment (matriu de dades superaugmentada  $D_{EEM, supaug}$ ), i d) Implementació de la restricció de model trilineal durant l'optimització del model de descomposició bilineal del conjunt de dades de c), mostrant com s'obtenen les matrius de factors  $S_{ex}$  (espectres d'excitació) i  $C_{I,k}$  (concentració relativa) a cada iteració ALS.

En aquest cas, la matriu  $\mathbf{S}_{\text{ex,supaug}}$  resultant és una matriu superaugmentada formada per diferents submatrius  $\mathbf{S}_{\text{ex},l,\text{aug}}$  que contenen els perfils espectrals d'excitació dels  $N$  components individuals resolts (diferents fonts de CDOM), trobats en cadascuna de les estacions de presa de mostra en les diferents campanyes de seguiment ( $l = \text{I, II i III}$ ) realitzades, escalats per les seves respectives concentracions relatives. S'obté, en canvi, una única matriu  $\mathbf{S}_{\text{em}}^T$ , comuna per a tot el conjunt de dades, que conté els espectres d'emissió dels diferents components resolts (associats a les diferents fonts de CDOM).

En els exemples de dades EEM descrits anteriorment, quan s'analitza simultàniament més d'una matriu  $\mathbf{D}_{EEM,l,k}$  pel mètode MCR-ALS, es pot implementar la restricció de model trilineal durant l'optimització ALS prèviament ja descrita (veure secció 4.3.1.1). Certament, aquest tipus de model trilineal es compleix amb les dades de fluorescència multidimensional, ja que els espectres d'emissió tenen la mateixa forma (només canvien en les seves intensitats relatives) sigui quina sigui la longitud d'ona d'excitació on són mesurats i, a més els espectres d'excitació tenen també la mateixa forma (només canvien en les seves intensitats relatives) sigui quina sigui la longitud d'ona d'emissió seleccionada (Tauler, Marqués, et al., 1998; X. Zhang, Marcé, et al., 2014). L'única diferència entre les mostres considerades estaria, per tant, en l'aportació o quantitat (concentració, abundància) en què un determinat component (font CDOM) està present en les diferents mostres analitzades. Aquesta important propietat de les dades d'excitació-emissió implica el compliment del model trilineal, un fet que és molt avantatjós des del punt de vista de la resolució multivariant de les dades, ja que dona solucions úniques i elimina les ambigüitats rotacionals (Tauler, Smilde, et al., 1995; Tauler & Maeder, 2020a) associades a les descomposicions bilineals. La **Figura 64d** i l'Equació (48) descriuen la implementació del model trilineal per a les matrius EEM analitzades.

$$\mathbf{D}_{EEM,l,k} = \mathbf{S}_{\text{ex}} \mathbf{C}_{l,k} \mathbf{S}_{\text{em}}^T + \mathbf{E}_{EEM,l,k} \quad (48)$$

En aquesta descomposició, les matrius  $\mathbf{S}_{\text{ex}}$  i  $\mathbf{S}_{\text{em}}^T$  tenen, respectivament, els espectres purs d'EX i EM comuns dels  $N$  components individuals (diferents fonts de CDOM), i la  $\mathbf{C}_{l,k}$  és una matriu diagonal de dimensions iguals al nombre de components resolts ( $N,N$ ) i que té la contribució/concentració relativa de cada component individual (font



de CDOM resolta) en cada estació de presa de mostra ( $k$ ) i campanya ( $l$ ) considerades.

Com s'ha esmentat anteriorment en els exemples de descomposició de dades d'excitació-emissió, els perfils d'excitació ( $\mathbf{S}_{ex}$ ) i els de concentració ( $\mathbf{C}_{l,k}$ ) es troben barrejats en la matriu augmentada  $\mathbf{S}_{ex,l,aug}$  obtinguda per la descomposició del model bilineal MCR-ALS. La **Figura 64d** mostra com es poden obtenir aquestes dues matrius de factors per separat mitjançant la implementació de la restricció trilineal durant l'algorisme d'optimització de mínims quadrats alternats (ALS). És necessari remarcar que, donada la flexibilitat del mètode MCR-ALS, aquesta implementació de la restricció del model trilineal es pot realitzar component a component i matriu per matriu dins de l'estructura augmentada de dades a tractar. Segons aquesta figura, quan s'aplica la restricció de trilinealitat durant l'optimització ALS, el perfil augmentat  $\mathbf{s}_{ex,l,aug}$  de cada component  $n$  ( $\mathbf{s}_{ex,l,aug,n}$ ) es plega adequadament formant la matriu  $\mathbf{S}_{ex,n}$ , amb un nombre de files igual al nombre de longituds d'ona d'excitació (61 valors  $\lambda_{EX}$ ,  $\mathbf{I}$ ) i el nombre de columnes igual al nombre de mostres analitzades simultàniament (totes les estacions de mostreig ( $\mathbf{K}$ ) i campanyes de seguiment ( $\mathbf{L}$ ), en aquest cas). El procediment que s'utilitza en l'aplicació d'aquesta restricció de model trilineal ha estat ja descrita en la secció 5.3.2 per a les elucions del SMX. La matriu d'espectres d'excitació, es descomposa mitjançant la Descomposició de Valors Singulats (SVD) (Golub & Van Loan, 2013) i, com a resultat, s'obtenen dos vectors: d'una banda, el primer vector singular dels *scores* resolts en aquesta descomposició dóna l'espectre comú per a aquest component, és a dir, el seu espectre d'excitació (vector  $\mathbf{s}_{ex,n}$ ); i per altra banda, el primer vector dels *loadings* dóna la concentració relativa d'aquest component en les diferents mostres analitzades (vector  $\mathbf{c}_n^T$ ) (X. Zhang, Marcé, et al., 2014). Després d'aquesta descomposició, el perfil augmentat complet  $\mathbf{s}_{ex,l,aug}$  per a cada component  $n$  es reconstrueix i s'actualitza per a la següent iteració ALS ( $\mathbf{s}_{ex,l,aug,n}'$ ). Per tant, a part de forçar la forma de l'espectre d'excitació del component considerat a ser igual per a totes les mostres, aquest procediment captura les concentracions relatives d'aquest component en cadascuna de les diferents mostres analitzades, en les matrius  $\mathbf{C}_{l,k}$  resoltes (veure **Figura 64d** i Equació

(48)), que posteriorment s'emmagatzemen al vector columna corresponent de la matriu de concentració augmentada,  $\mathbf{C}_{\text{aug}}$ .

Com hem vist al Capítol 4, en el mètode MCR-ALS, el model bilineal es resol mitjançant un procediment d'optimització de mínims quadrats alternats sota les restriccions seleccionades. Aquesta optimització s'executa fins que el model  $\mathbf{C}\mathbf{S}_{\text{UV}}^{\text{T}}$  (per a dades espectrofotomètriques UV-Visible) o  $\mathbf{S}_{\text{ex}}\mathbf{S}_{\text{em}}^{\text{T}}$  (per a mesures de fluorescència d'excitació-emissió) minimitzi al màxim els errors residuals en la reproducció dels conjunts de dades originals,  $\mathbf{D}_{\text{UV}}$  o  $\mathbf{D}_{\text{EEM}}$ , respectivament. L'algorisme MCR-ALS requereix la postulació inicial del nombre de components ( $N$ ) a resoldre, que es pot estimar a partir dels resultats de la SVD de la matriu de dades original. Tanmateix, en el cas dels estudis de caracterització de l'aigua de riu amb mesures d'UV-Vis i de fluorescència multidimensional, això pot ser difícil a causa de les dependències lineals en els perfils de concentració i espectres (en les matrius  $\mathbf{C}$ ,  $\mathbf{S}_{\text{UV}}^{\text{T}}$ ,  $\mathbf{S}_{\text{ex}}$ , i  $\mathbf{S}_{\text{em}}^{\text{T}}$ , respectivament).

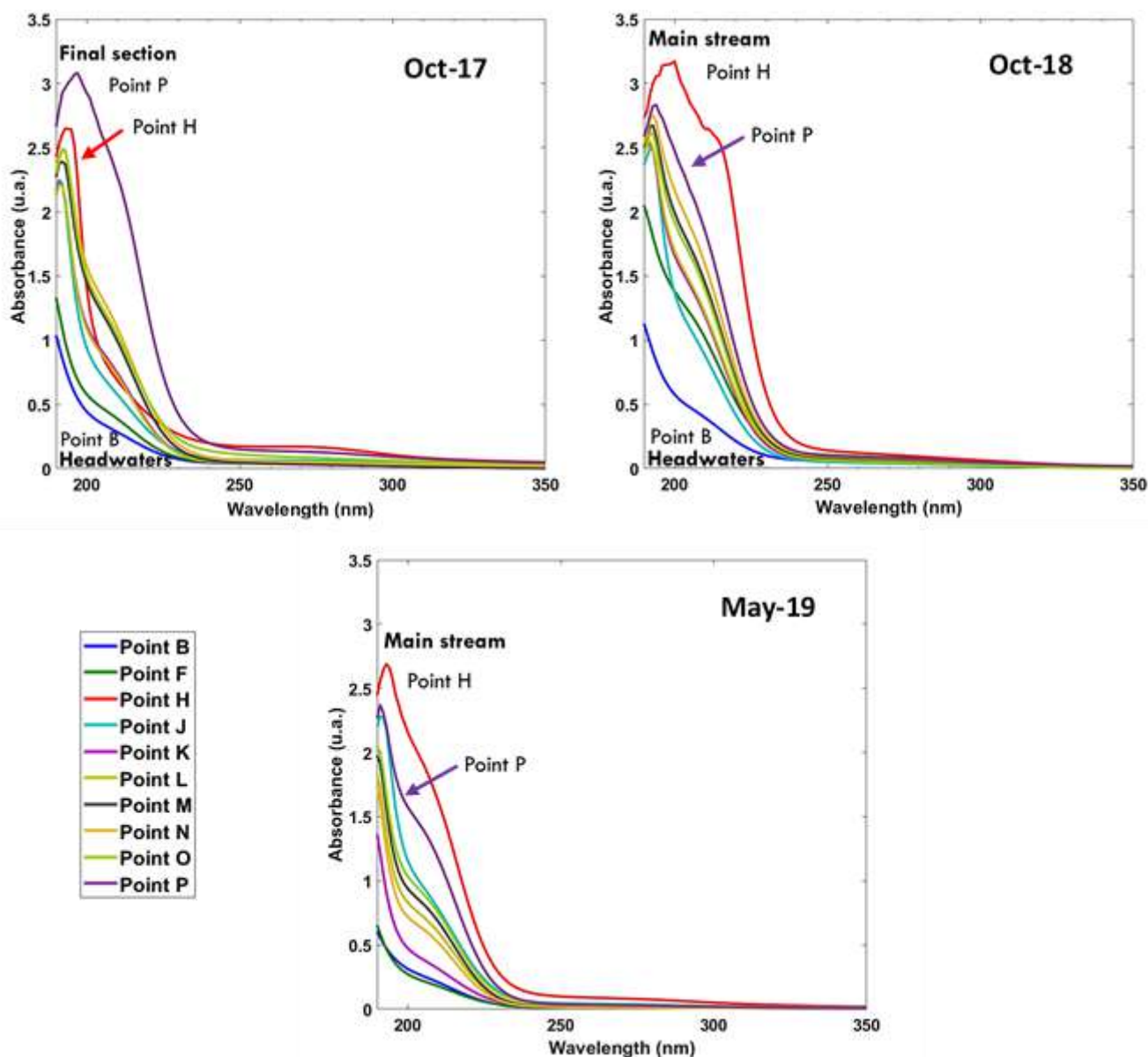
A més, es necessiten estimacions inicials, ja sigui de les matrius de concentració o dels espectres ( $\mathbf{C}/\mathbf{S}_{\text{ex}}$  o  $\mathbf{S}_{\text{UV}}^{\text{T}}/\mathbf{S}_{\text{em}}^{\text{T}}$  per a l'espectrofotometria UV-Visible i la fluorescència d'excitació-emissió, respectivament), per iniciar l'optimització iterativa de l'ALS. En aquest estudi, es van obtenir les estimacions inicials dels espectres purs dels  $N$  components seleccionats del sistema a partir dels espectres UV i EM més diferents o purs d'entre els mesurats (és a dir, entre les files més diferents de les matrius  $\mathbf{D}_{\text{UV}}$  i  $\mathbf{D}_{\text{EEM}}$ , respectivament). Durant l'optimització ALS, es van aplicar les restriccions de no-negativitat i trilinealitat. Finalment, els perfils espectrals resolts a la matriu  $\mathbf{S}_{\text{UV}}^{\text{T}}/\mathbf{S}_{\text{em}}^{\text{T}}$  també es van normalitzar durant l'optimització ALS (normalització euclidiana).

## 5.6. Discussió dels resultats obtinguts en l'estudi de caracterització de la CDOM realitzat

### ➤ *Espectres UV-Visible*

La **Figura 65** mostra els espectres UV-Vis adquirits per a cadascuna de les mostres d'aigua del riu Llobregat recollides als diferents punts de presa de mostres (estacions) de cada campanya de seguiment efectuada. Els gràfics d'aquestes tres matrius de

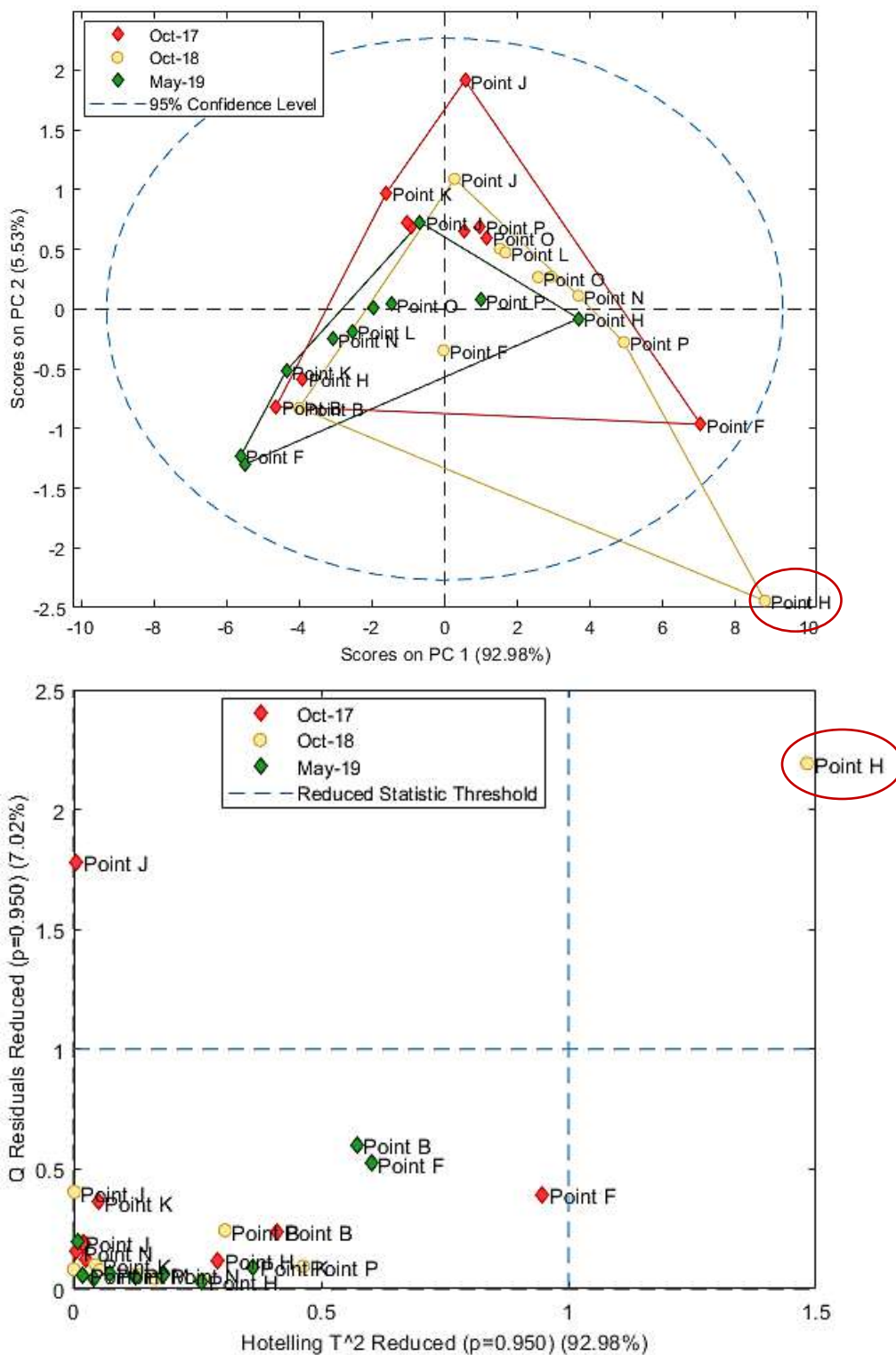
dades ( $D_{UV,I}$ , per a l'octubre de 2017,  $D_{UV,II}$ , per a l'octubre de 2018 i  $D_{UV,III}$  per al maig de 2019) ofereixen una primera visió general dels canvis de la CDOM al llarg del riu Llobregat. S'observa un augment de l'absorbància de les mostres d'aigua recollides a mesura que ens movem aigües avall en les tres campanyes, indicant una presència molt més gran de CDOM al curs final del riu (**Punt P**, línia **violeta**) que a la capçalera del riu (**Punt B**, línia **blava**). No obstant això, es pot observar que en un dels punts de mostreig, a la riera Gavarresa (**Punt H**, línia **vermella**), els valors d'absorbància de la CDOM són superiors als esperats. Aquesta estació de presa de mostra, doncs, té la presència més alta de CDOM a la segona i tercera campanya (Oct-18 i May-19, respectivament), i és el segon punt de mostreig amb més CDOM a la primera campanya (Oct-17).



**Figura 65.** Espectres UV-Vis de mostres d'aigua del riu Llobregat recollides als diferents punts de presa de mostra (veure **Figura 25**) en les tres campanyes de seguiment realitzades. Figura reproduïda de l'ARTICLE III.

També es possible destacar que les absorbàncies de les mostres d'aigua de riu obtingudes a la campanya de maig de 2019 van ser lleugerament inferiors a les obtingudes en les campanyes realitzades a la tardor (Oct-17 i -18). Aquest canvi en l'absorbància UV observada entre les diferents campanyes i, per tant, en l'abundància de CDOM present en el riu en aquestes, pot ser degut a un fenomen estacional. Això explica que la quantitat de CDOM present al riu Llobregat vagi canviant durant els diferents mesos de l'any. No obstant això, aquesta hipòtesi no es pot confirmar totalment perquè només es van analitzar mostres d'una campanya per any. En conseqüència, seria necessari realitzar una presa de mostres més recurrent en totes les estacions de l'any per confirmar aquesta hipòtesi. Aquest procediment es contempla realitzar-lo en treballs futurs.

Addicionalment, PCA (Jolliffe, 2002) es va aplicar inicialment a la matriu  $D_{UV, aug}$  centrada en la mitjana (*mean-centered*) per tal de buscar possibles similituds entre les mostres d'aigua de riu dels diferents llocs i campanyes de mostreig. El model PCA amb dos components principals ja explicava el 98,52% de la variància de les dades d'absorbància UV. La **Figura 66** mostra el diagrama de *scores* de les diferents mostres d'aigua de les campanyes de seguiment: Oct-17 (**vermell**), Oct-18 (**groc**) i May-19 (**verd**). Cal assenyalar que totes les mostres d'aigua de les tres campanyes de seguiment estan ben explicades, amb aquests mateixos dos components principals, cosa que indica que les fonts de variància de les tres campanyes de seguiment no difereixen significativament. Com s'ha esmentat anteriorment, la mostra d'aigua de riu de la riera Gavarresa (**Punt H** del mapa de la **Figura 25**) mostra una posició diferent en la gràfica de *scores* (fora del nivell de confiança) i uns valors de Q residual i Hotelling  $T^2$  més alts a la campanya d'octubre 2018, com es pot comprovar a la **Figura 56**, que indicaria que es tracta d'una mostra d'aigua amb un comportament molt diferent (*outlying*) respecte a la resta de les mostres. L'anàlisi quimiomètrica de les mesures de fluorescència proporcionarà un coneixement més profund de les diferents mostres d'aigua i confirmarà el comportament erràtic (diferencial) de la mostra recollida al **Punt H** durant la campanya d'octubre de 2018.



**Figura 66.** Gràfics de scores (superior) i de Q residuals vs. Hotelling  $T^2$  (a sota) dels resultats PCA obtinguts a partir de les dades espectrofotomètriques UV-Visible adquirides en l'anàlisi de les mostres d'aigua del riu Llobregat als diferents punts de presa de mostra i campanyes de seguiment (matriu  $D_{UV,aug}$ ). La mostra d'aigua de la riera Gavarresa (**Punt H**) de la campanya d'octubre 2018 (**groc**) presenta un comportament diferent de la resta de mostres d'aigua recollides. Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE III.

➤ *Fluorescència multidimensional d'excitació-emissió (EEM)*

Segons Paula Coble, una de les investigadores referents en l'estudi de la DOM del medi aquàtic natural, la matèria orgànica dissolta fluorescent (FDOM) és de color (mostra absorció de radiació), però no tota la CDOM és fluorescent (P. G. Coble, 2007). Això s'evidencia pel fet que normalment els espectres d'absorció de la FDOM mostren un augment sense trets d'intensitat característics amb longituds d'ona decreixents, generalment entre 190 i 300 nm, mentre que els seus espectres d'excitació mostren un o més pics discrets diferenciats, normalment al voltant de 250 i 350 nm. L'espectroscòpia de fluorescència d'excitació-emissió proporciona, doncs, informació sobre els canvis en la CDOM resultants de la barreja, la degradació biològica, la producció biològica i el fotoblanqueig (que és com es coneix al procediment de destrucció fotoquímica d'un fluoròfor) de la DOM que es produeixen al medi ambient (P. G. Coble, 1996). La barreja natural de diferents masses d'aigua té com a efecte principal la dilució, però addicionalment també es produiran canvis en els màxims d'excitació i emissió quan es barregen aquestes masses d'aigua amb diferents composicions de CDOM (P. G. Coble, Spencer, et al., 2014).

En aquest darrer treball d'aquesta Tesi, l'anàlisi MCR-ALS es va aplicar al conjunt de dades obtingut a partir de les mesures de fluorescència de les 10 mostres d'aigua del riu Llobregat recol·lectades durant les tres campanyes de seguiment realitzades (30 matrius de dades EEM diferents disposades en la matriu de dades superaugmentada  $D_{EEM,supaug}$ ). La Figura 3 de l'**ARTICLE III** mostra el diagrama 2D dels espectres de fluorescència d'excitació-emissió resolts de tots els components MCR-ALS trobats, així com el gràfic de barres de la seva contribució relativa corresponent a cada estació de mostreig i campanya. A les figures mostrades a continuació, en canvi, es presenten els resultats d'una altra manera i es comenten per separat els diagrames 1D individuals dels espectres de fluorescència d'excitació i emissió (matrius  $S_{ex}$  i  $S_{em}^T$ ) dels diferents components purs resolts per MCR-ALS. Tal com es mostra en aquesta figura i es resumeix a la **Taula 5**, reproduïda de l'**ARTICLE III**, es van resoldre 8 components fluorescents diferents. Aquest nombre de components MCR-ALS es va seleccionar tenint en compte les variacions explicades de cadascun d'ells, així com la seva possible interpretació química, és a dir, cada component resolt pot descriure una font diferent de DOM, amb diferents espectres d'excitació i emissió i diferent

distribució geogràfica i perfils de contribució lloc/campanya. Així doncs, es van detectar i resoldre vuit fonts de CDOM actives fluorescents.

Els components que es comenten a continuació es presenten tot considerant la quantitat de variància explicada per cadascun d'ells per separat. La quantitat total de variància de les dades explicada pels vuit components MCR-ALS quan es consideren simultàniament ( $R^2$ , a l'Equació (13)) és del 98,9%, en canvi, la suma de les variàncies individuals explicades per cada component MCR-ALS per separat és del 160,2%. Aquesta gran diferència del 61,3% de la variància indica la gran quantitat de superposició de variància entre els perfils espectrals dels vuit components. Com s'ha esmentat amb anterioritat, en el mètode MCR-ALS els components resolts no són ortogonals (com en el cas del PCA) i, per tant, hi ha una part de la variància que és comuna entre ells, en concordança amb les fonts naturals de variància, que també es superposen.

**Taula 5.** Resum de les variàncies explicades (en %), els màxims de banda EX-EM (en nm) i l'assignació del tipus de CDOM dels components MCR-ALS resolts obtinguts en l'anàlisi de la matriu de dades superaug.  $D_{EEM, supraug}$ .

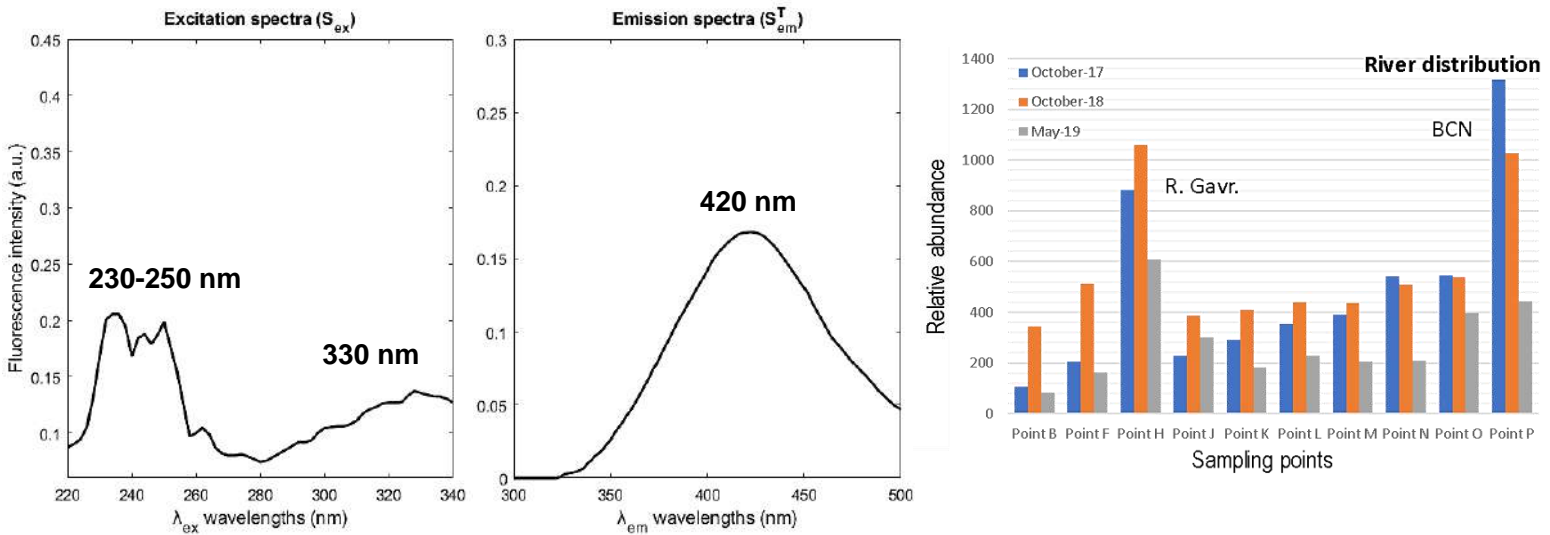
Components	1	2	3	4	5	6	7	8
Expl. Variance <sup>1</sup>	54.0%	22.7%	22.4%	15.8%	13.7%	12.1%	11.8%	7.7%
$\lambda_{max} Ex$	230-250/330 nm	240/260 nm	235 nm	250 nm	225/265-285 nm	230 nm	240/300 nm	235/275 nm
$\lambda_{max} Em$	420 nm	440-480 nm	350 nm	460 nm	305/340 nm	330-340 nm	360-370 nm	320 nm
DOM type assignment	Humic-like (A, C)	Humic-like (A)	Aromatic protein II	Fulvic-like	Protein-like (Tyr, B)	Aromatic protein I	Microbial by-product	Protein-like (Trp, T)

<sup>1</sup> MCR-ALS explained variance ( $R^2$ ) considering all eight components is 98.9% and lack of fit (LOF) is 10.2% (see **Equation 6** and **7**).

Així, el primer component MCR-ALS resolt (**C1**) explica el 54,0% de la variància total de les dades i mostra tres màxims d'excitació diferents a 230, 250 i 330 nm, amb un màxim de banda d'emissió comuna a 420 nm (veure **Figura 67**). Aquests màxims de bandes, segons la literatura (W. Chen, Westerhoff, et al., 2003), es poden relacionar amb els observats per a la tipologia de CDOM de tipus **àcid húmnic (pics A i C)**. Aquest tipus de DOM s'ha observat en totes les campanyes de seguiment realitzades i, segons el diagrama de barres de distribució fluvial (veure **Figura 67**), presenta una abundància molt superior a la tardor (octubre de 2017 i 2018, barres blaves i taronges, respectivament) que a la primavera (maig 2019, barres grises). També es pot observar una presència creixent d'aquest tipus de CDOM a mesura que avancem aigües avall del riu, com es destaca al lloc de presa de mostra **H** (riera Gavarresa) i

al lloc de presa de mostra **P** (a prop de la desembocadura del riu) que, de fet, són les estacions amb més abundància de DOM.

**Component 1 (54,0%) Humic-like (A, C)**

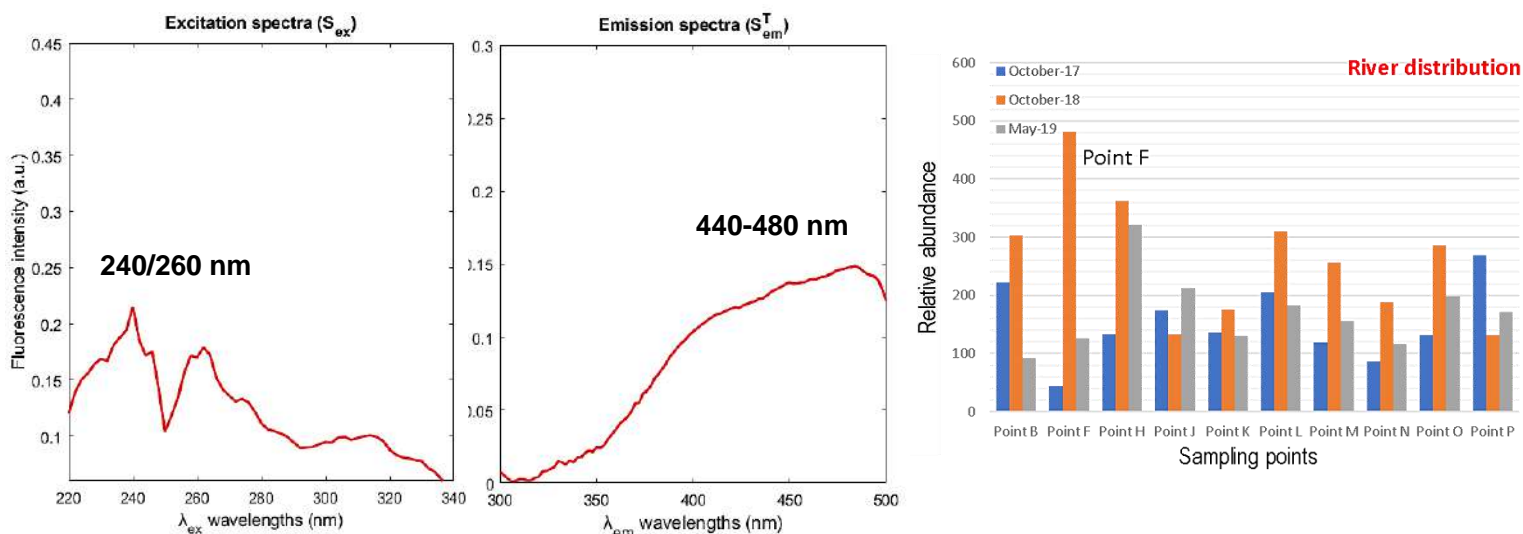


**Figura 67.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 1 (C1).

El segon component (**C2**) explica el 22,7% de la variància de les dades i mostra dos màxims de bandes d'excitació diferents a 240 i 260 nm, respectivament, i una àmplia banda d'emissió entre 440 i 480 nm (**Figura 68**). Aquestes bandes també s'assignen a un tipus de CDOM semblant a un tipus d'**àcid hùmic (pic A)** diferent a l'anterior (W. Chen, Westerhoff, et al., 2003; P. G. Coble, Spencer, et al., 2014). Aquest tipus de DOM està present en tots els punts de presa de mostra i campanyes realitzades, però no segueix cap patró regular d'abundància entre les diferents estacions. Segons el gràfic de distribució fluvial (també en la **Figura 68**), les barres taronges, que corresponen a la campanya de seguiment realitzada l'octubre de 2018, van presentar una aportació més gran d'aquest component respecte a la resta de campanyes, llevat del darrer punt de presa de mostra a la desembocadura del riu, el **Punt P**. En aquesta estació final, el component **C2** va ser més abundant l'octubre de 2017 (barres blaves). A la campanya de seguiment de l'octubre de 2018, en canvi, el **Punt F** destaca com el lloc de presa de mostra amb més presència d'aquest tipus de CDOM.



**Component 2 (22,7%) Humic-like (A)**



**Figura 68.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 2 (C2).

D'igual manera, el tercer component resultat (C3) explica aproximadament la mateixa variància que l'anterior (22,4%) i mostra un únic màxim d'excitació i emissió en els seus espectres, a 235 i 350 nm, respectivament (veure **Figura 69**). Segons la literatura (W. Chen, Westerhoff, et al., 2003; P. G. Coble, Spencer, et al., 2014), les longituds d'ona d'aquests màxims, corresponen al senyal de fluorescència de la CDOM que és similar al produït per **proteïnes aromàtiques de tipus II**. Si s'observa el perfil de distribució de l'aportació d'aquest component al llarg dels emplaçaments del curs fluvial mostrejats i al llarg de les diferents campanyes de seguiment realitzades (veure **Figura 69**), es troba que a l'octubre de 2017 (primera campanya, barres blaves) la presència d'aquest tipus de CDOM va ser superior en comparació amb la resta de campanyes efectuades. En relació als diferents llocs o estacions, es pot apreciar que hi ha una important aportació d'aquest component C3 al curs baix del riu, concretament, des del **Punt M** fins a l'estuari (**Punt P**). Als cursos alt i mitjà del riu Llobregat, en canvi, l'aportació d'aquest component és baixa, llevat de la riera Gavarresa (**Punt H**), on la seva aportació també torna a ser molt elevada.

Component 3 (22.4%) *Arom. Protein II*

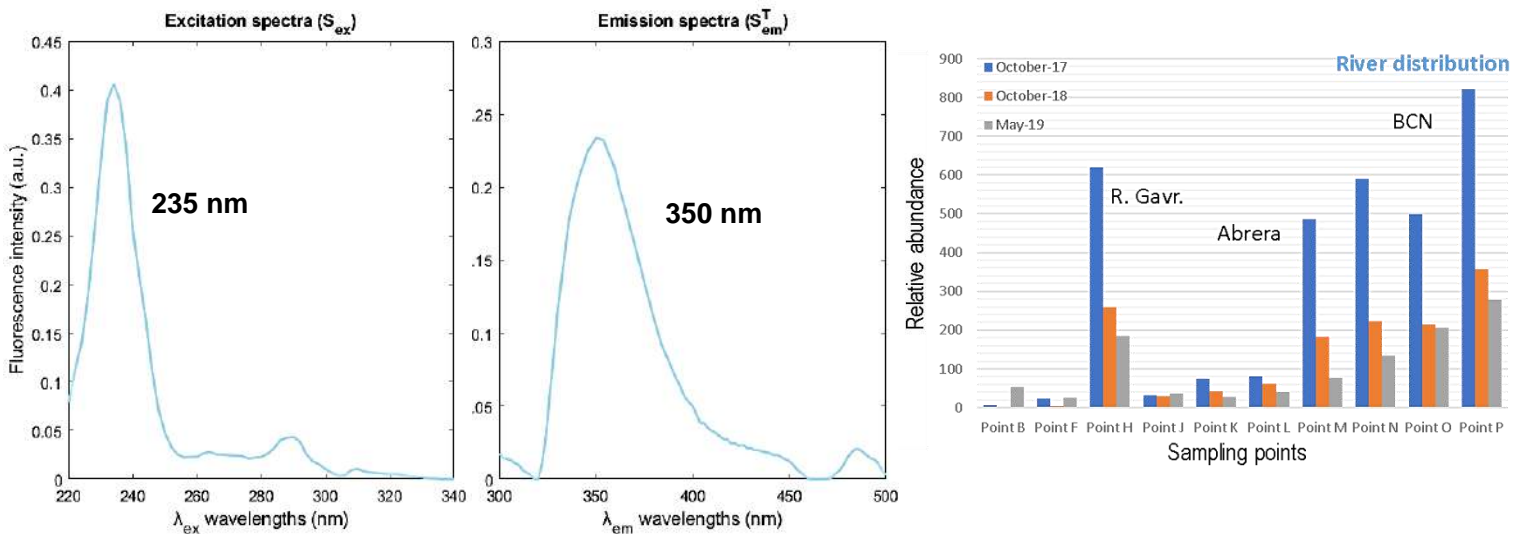


Figura 69. Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 3 (C3).

Adicionalment, el quart component resultat (C4) explica el 15,8% de la variància de les dades i mostra un màxim d'EX-EM únic, a 250 i 460 nm, respectivament (veure Figura 70). Segons estudis anteriors (W. Chen, Westerhoff, et al., 2003; P. G. Coble, Spencer, et al., 2014), aquests màxims de bandes d'excitació i emissió estan relacionats amb un tipus de CDOM semblant als àcids fúlvics (CDOM més soluble en aigua). Aquest tipus de CDOM es va observar en totes les campanyes de seguiment i, com passa amb el C1, va tenir una aportació més elevada a la tardor (octubre de 2017 i 2018, barres blaves i taronges en el gràfic de distribució, respectivament) que a la primavera (maig de 2019, gràfica en gris) (veure la Figura 70). A l'octubre de 2018, la contribució de C4 va ser més alta que a l'octubre de 2017. Els nivells més alts d'aquesta contribució de CDOM de tipus fúlvic es tornen a trobar als llocs de presa de mostra propers al curs final del riu. El maig (primavera) del 2019, però, no es va observar cap distribució tendencial al llarg del riu d'aquest component, i la seva contribució es va mantenir en nivells molt baixos a totes les estacions.

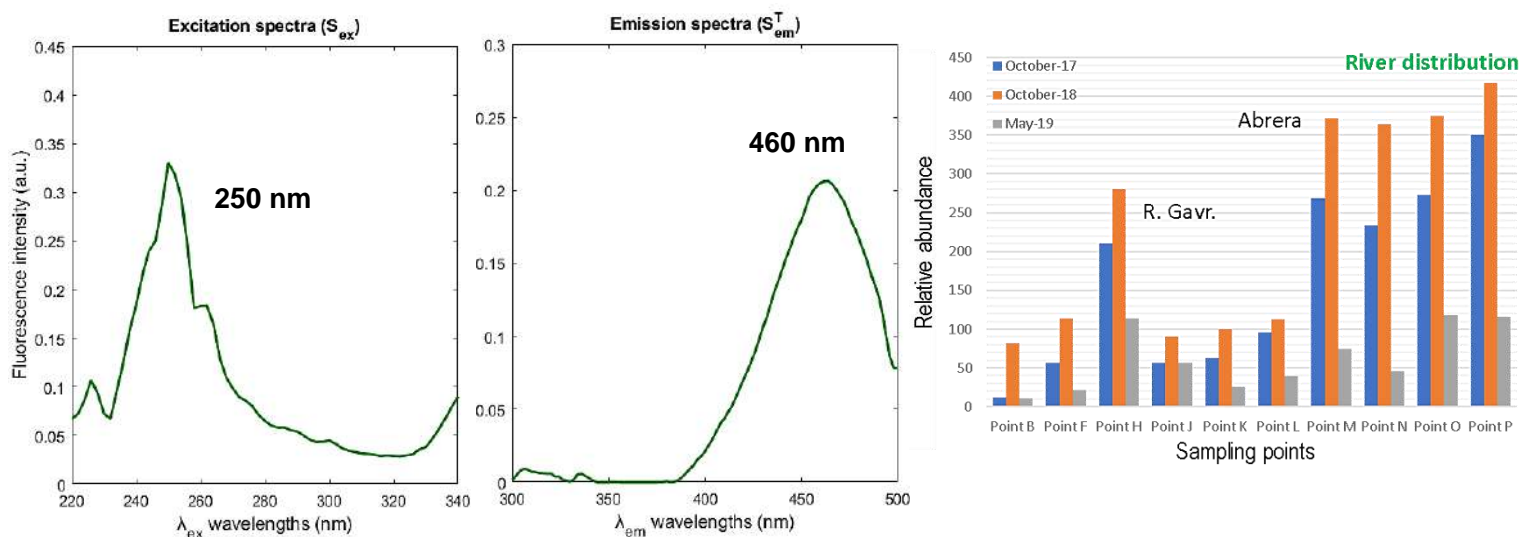
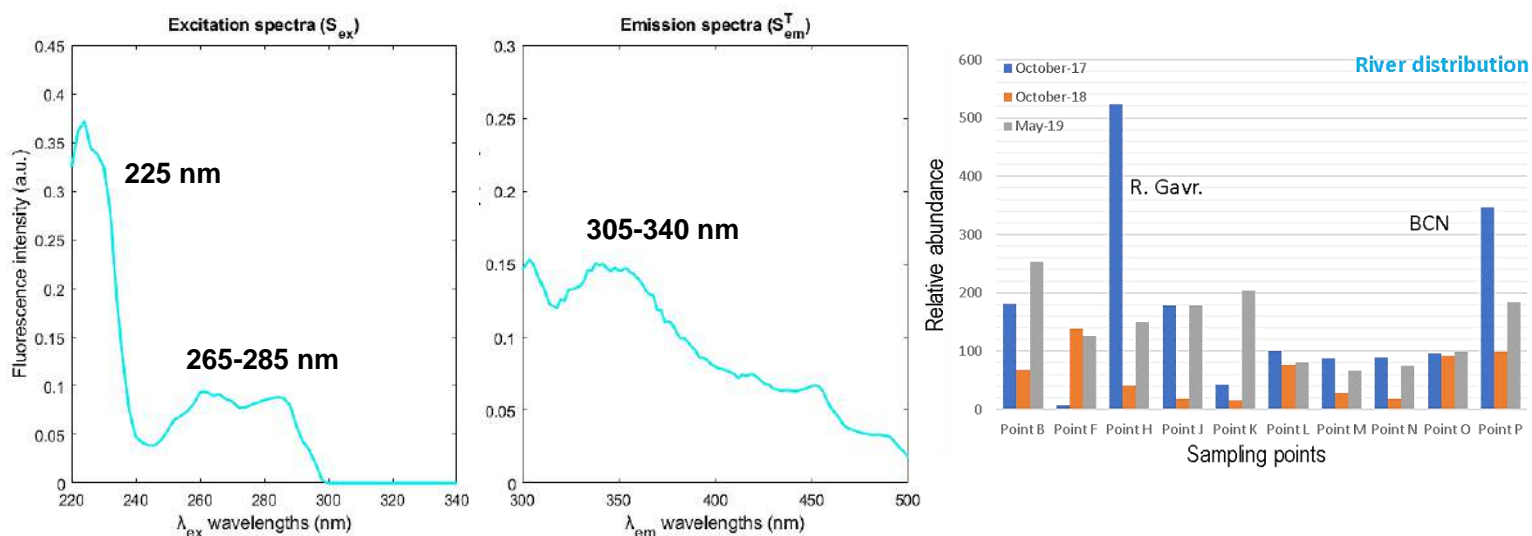
Component 4 (15.8%) *Fulvic-like*

Figura 70. Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 4 (C4).

Per altra part, el cinquè component (C5) explica el 13,7% de la variància de les dades i presenta múltiples bandes d'EX-EM: tres màxims d'excitació, a 225, 265 i 285 nm, i dos màxims d'emissió, a 305 i al voltant de 340 nm (veure Figura 71). Aquesta disposició de longituds d'ona es pot correlacionar amb el senyal de fluorescència produït pel tipus de CDOM semblant a les **proteïnes** (W. Chen, Westerhoff, et al., 2003; P. G. Coble, Spencer, et al., 2014), en particular, amb la fluorescència produïda per grups d'aminoàcids de tipus **tirosina (Tyr)**. Aquesta fracció acostuma a identificar-se com a **pic B**. Aquest tipus de CDOM va estar contribuïnt de manera irregular a les diferents campanyes de seguiment, presentant nivells més elevats a l'octubre de 2017 i maig de 2019 (barres blaves i grises, respectivament). Els llocs de presa de mostra **H** (riera Gavarresa) i **P** (desembocadura) van ser les estacions fluvial amb més aportació d'aquesta fracció de CDOM (en la campanya d'octubre de 2017) (veure Figura 71).

Component 5 (13.7%) *Protein-like (Tyr, B)*


**Figura 71.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 5 (C5).

El sisè component (C6) explica el 12,1% de la variància de les dades i mostra un únic màxim d'EX-EM, amb la seva banda d'excitació màxima a 230 nm i la seva banda d'emissió màxima entre 330 i 340 nm (veure **Figura 72**). Aquests màxims de banda es troben, en part, de manera similar als observats per al component anterior C5. Segons la literatura (W. Chen, Westerhoff, et al., 2003; P. G. Coble, Spencer, et al., 2014), aquestes bandes es poden relacionar amb el senyal de fluorescència de la CDOM que és similar al produït per **proteïnes aromàtiques de tipus I**. Observant la distribució d'aquest component al llarg del curs fluvial (veure **Figura 72**), es va detectar que aquesta aportació era més elevada a la tardor (octubre de 2017 i 2018, barres blaves i taronges, respectivament) que a la primavera (maig de 2019, barres grises). Es pot destacar que en la segona campanya de seguiment, aquesta aportació de CDOM no estava present a la capçalera del riu (aportació molt baixa) i la seva presència només es va observar a l'estació de presa de mostra **H** (riera Gavarresa), augmentant després aigües avall i fent-se més pronunciada, des de l'estació **M** fins a la desembocadura del riu (**Punt P**). L'estació de la riera Gavarresa és l'estació de presa de mostra fluvial amb més aportació d'aquest tipus de DOM (a la campanya d'octubre de 2017).

Component 6 (12.1%) Arom. Protein I

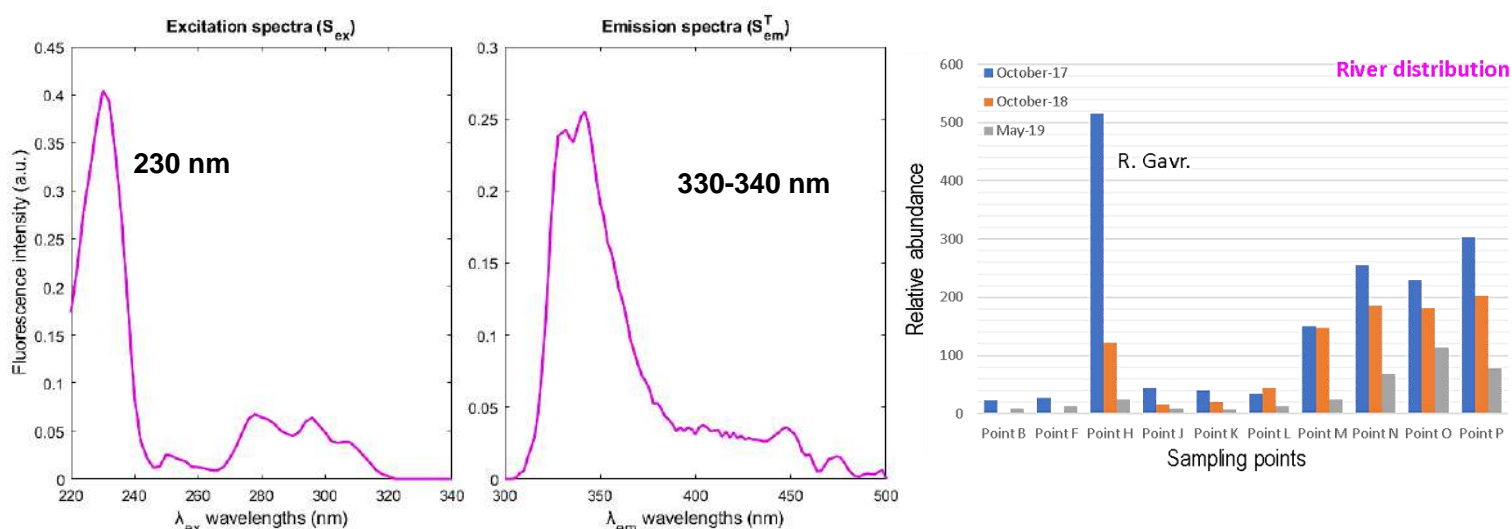
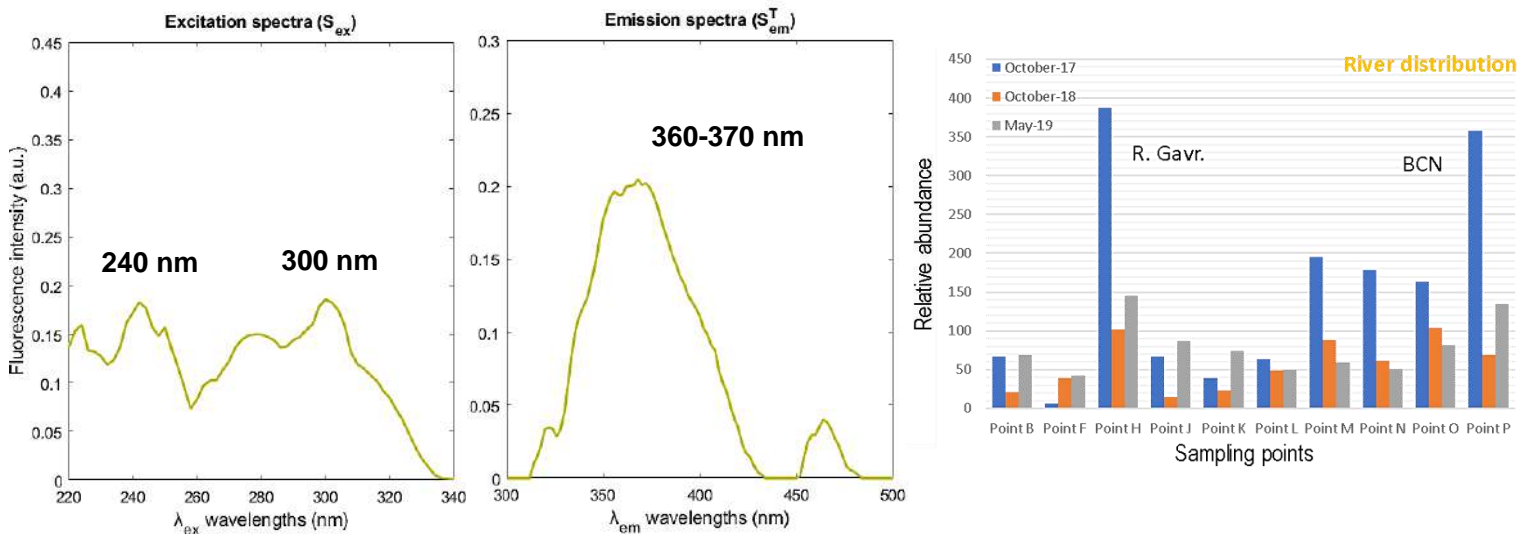


Figura 72. Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 6 (C6).

El setè component resultat (C7), mostrat a la Figura 73, explica l'11,8% de la variància de les dades i presenta dos màxims d'excitació diferents, a 240 i 300 nm, respectivament, i una única emissió màxima, entre 360 i 370 nm. Segons la literatura (W. Chen, Westerhoff, et al., 2003; P. G. Coble, Spencer, et al., 2014), aquest component pot estar relacionat amb la fluorescència produïda per subproductes microbians solubles. Aquest tipus de CDOM es va observar de manera irregular en les campanyes de seguiment realitzades, presentant la seva aportació més alta en la primera campanya l'octubre de 2017 (barres blaves). Es torna a observar que les estacions de presa de mostres H (riera Gavarresa) i P (prop de l'estuari) són els llocs amb major aportació d'aquest tipus de CDOM i que des de l'estació M (després de l'EDAR d'Abrera) aigües avall, s'observa un augment significatiu d'aquesta contribució (sobretot a la campanya d'octubre de 2017).

**Component 7 (11.8%) Microbial by-product**



**Figura 73.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 7 (C7).

Finalment, el vuitè component (C8) explica només el 7,7% de la variància de les dades i mostra dos màxims d'excitació diferents i un màxim d'emissió. Les longituds d'ona respectives d'aquestes bandes màximes són 235, 275 i 320 nm (veure **Figura 74**). Segons la literatura (W. Chen, Westerhoff, et al., 2003; P. G. Coble, Spencer, et al., 2014), aquestes bandes són similars a les observades en el denominat **pic T**, que es pot correlacionar amb el senyal de fluorescència produït per la CDOM de tipus **proteic**, especialment la que prové dels grups d'aminoàcids com el **triptòfan (Trp)**. Aquesta varietat de CDOM es va observar de manera irregular en les diferents campanyes de seguiment analitzades, presentant majors aportacions a la temporada de tardor (octubre de 2017 i 2018, barres blaves i grises, respectivament). Observant les diferents estacions de presa de mostra, també es pot destacar que, de la mateixa manera que per a **C7**, les estacions **H** (riera Gavarresa) i **P** (desembocadura) predominen com els llocs amb més abundància d'aquest tipus de CDOM en totes les campanyes realitzades. A l'octubre de 2017, a més, s'observa un canvi important en la contribució d'aquest component des de l'estació **M** aigües avall.

## Component 8 (7.7%) Protein-like (Trp, T)

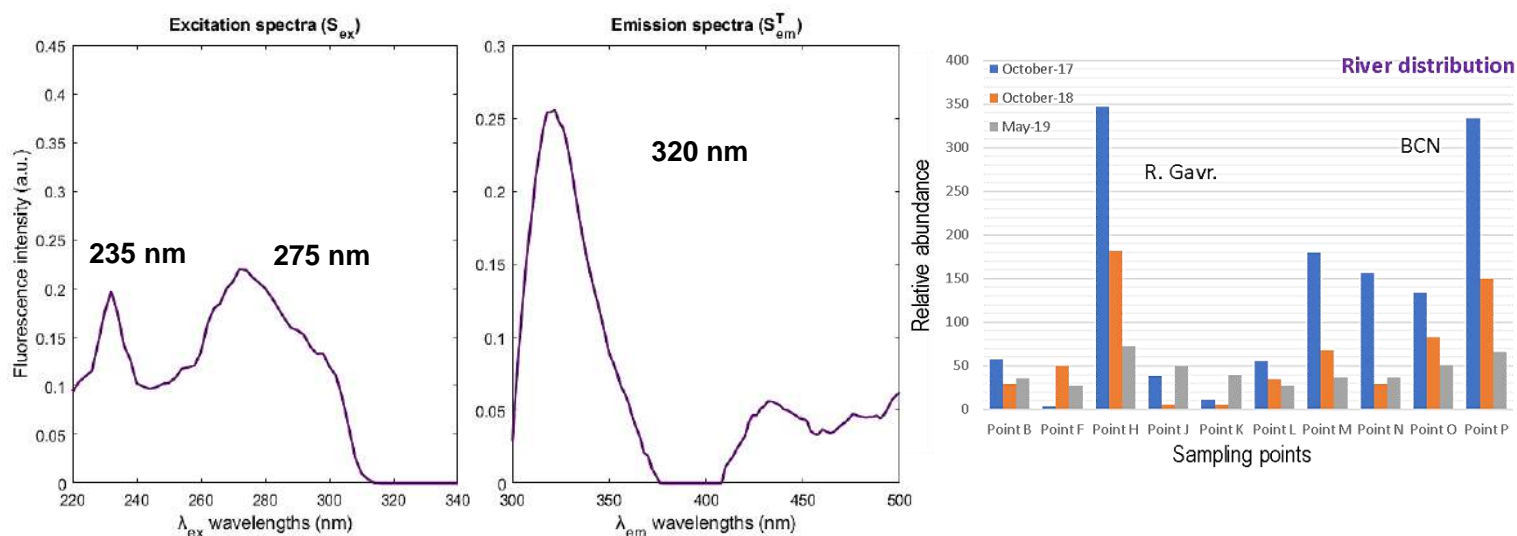


Figura 74. Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 8 (C8).

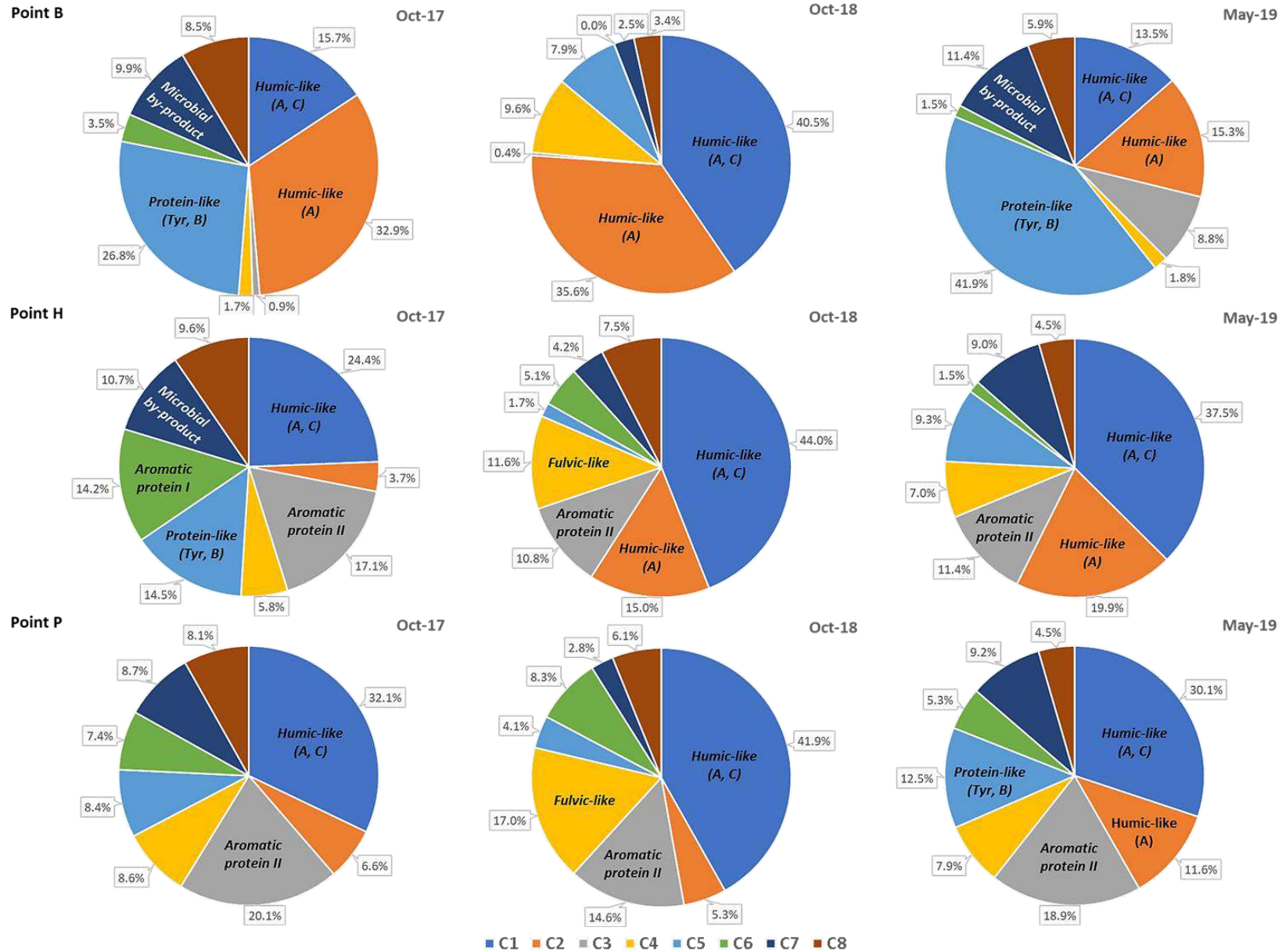
Adicionalment, amb les dades obtingudes, es pot realitzar un estudi comparatiu centrat en investigar els canvis de la composició de la CDOM present a cada punt de mostreig i entre les tres campanyes de seguiment realitzades. Els gràfics circulars de la **Figura 75** mostren la composició de CDOM de les estacions del riu Llobregat corresponents a la capçalera (**Punt B**), la riera Gavarresa (**Punt H**) i l'estuari (**Punt P**) entre les campanyes de seguiment de l'octubre de 2017, 2018 i el maig de 2019. Al material suplementari que acompanya l'**ARTICLE III**, es mostren els gràfics per sectors dels altres llocs de presa de mostra del Llobregat investigats en aquest treball. A grans trets, els canvis més importants en la composició de CDOM observats entre les campanyes de seguiment es troben en les fraccions húmiques, fúlviques i les similars a les proteïnes.

L'estació **B**, situada prop de la capçalera del riu Llobregat, mostra un canvi significatiu dels nivells de contribució de la fracció CDOM de tipus **húmic** i **proteic (Tyr)** entre les tres campanyes de seguiment diferents (veure **Figura 75**). La composició de tipus húmic (tipus **A/C** i **A**, respectivament) mostra un augment entre les campanyes d'octubre de 2017 i 2018 (del 15,7 i el 32,9% al 40,5 i el 35,6%, respectivament), però disminueix a la campanya de maig de 2019 (un 13,5 i un 15,3%) a causa de l'augment de la fracció CDOM similar a les **proteïnes (Tyr, B)** en aquesta darrera campanya de seguiment (41,9%). Aquesta fracció és la segona font de CDOM més abundant en aquest punt l'octubre de 2017 (26,8%), però no ho és tant l'octubre següent (7,9%). La fracció CDOM referent als **subproductes microbians** també està present en

aquest punt de presa de mostra a les campanyes d'octubre de 2017 i de maig del 2019 (9,9 i 11,4%, respectivament).

L'estació de la riera Gavarresa (**Punt H**) es troba al curs mitjà del riu Llobregat i mostra un canvi significatiu de les aportacions de la fracció de CDOM **húmica**, **fúlvica**, **microbiana** i **proteínica aromàtica II** entre les tres campanyes de seguiment diferents (veure **Figura 75**). Aquesta és l'estació de presa de mostra on la composició de la CDOM ha variat més entre les diferents campanyes realitzades. La mostra d'aigua recollida en aquest punt durant la campanya d'octubre de 2017 mostra una composició de CDOM molt diferent en comparació amb les obtingudes a les altres dues campanyes. Aquesta és la raó per la qual aquesta mostra d'aigua es va comportar com una mostra atípica en l'anàlisi PCA realitzada anteriorment. L'aportació de tipus **húmics (A, C)** canvia entre les campanyes d'octubre 2017 i 2018 (del 24,4% al 44,0%) i torna a disminuir el maig de 2019 (37,5%). En canvi, l'aportació de la CDOM de tipus **húmics (A)** augmenta en aquesta darrera campanya (19,9%), en comparació amb les aportacions més baixes d'aquesta fracció en les altres dues campanyes anteriors (3,7 i 15% en octubre 2017 i 2018 respectivament). La fracció CDOM associada a les **proteïnes aromàtiques II** va estar sempre present significativament a les tres campanyes de seguiment, mostrant contribucions relativament elevades en totes elles (17,1, 10,8 i 11,4%, respectivament). La menor contribució d'aquesta fracció de CDOM només es va observar a la campanya d'octubre de 2018, probablement a causa de l'aportació simultània de la fracció CDOM de tipus **fúlvic** (11,6%), que, en canvi, disminueix considerablement a la campanya de maig de 2019 (7,0%). Aquesta disminució ve causada per l'augment de la contribució de CDOM similar a **proteïnes (Tyr, B)** (9,3%). Les contribucions de la CDOM dels **subproductes microbians** i les **proteïnes aromàtiques I** també van estar presents en aquesta estació de presa de mostra, amb contribucions generalment més elevades de la **microbiana**, tot i que la contribució de les **proteïnes aromàtiques I** també va ser significativament elevada a la campanya realitzada l'octubre de 2017 (14,2%).





**Figura 75.** Gràfics circulars que mostren les diferents aportacions de les fraccions de CDOM a la capçalera fluvial (**Punt B**), la riera Gavarresa (**Punt H**) i la desembocadura (**Punt P**) del riu Llobregat en les tres campanyes de monitoratge realitzades (oct-2017, oct-2018 i maig-2019). Figura reproduïda de l'ARTICLE III.

Finalment, l'estació **P**, que es troba a prop de la desembocadura del riu Llobregat, mostra un canvi significatiu dels nivells de contribució de la fracció de CDOM **húmica**, **fúlvica** i similar a les **proteïnes** entre les tres campanyes de seguiment diferents (veure **Figura 75**). Aquesta estació mostra patrons de canvis d'abundància entre les diferents campanyes molt semblants als observats per a l'estació descrita anteriorment.

La informació donada en aquest apartat és una descripció resumida dels resultats obtinguts, destacant l'augment/disminució observat de l'aportació dels diferents tipus de CDOM durant les campanyes de seguiment realitzades en aquest estudi. Per a la correcta interpretació dels canvis observats en la distribució de les diferents fonts de CDOM al llarg del riu Llobregat, és necessari tenir un coneixement geogràfic detallat de cada punt de presa de mostra, de les activitats de l'entorn pròxim (per exemple, presència agrícola o industrial), així com de les condicions meteorològiques (com les pluges) presents durant les campanyes de seguiment realitzades. D'aquesta manera, es poden valorar millor les possibles aportacions de la CDOM degudes a fonts antropogèniques com per exemple l'abocament de purins o l'ús de fertilitzants, així com la investigació de si aquestes aportacions canvien o no al llarg de les diferents estacions de l'any. És possible, per tant, plantejar una investigació més exhaustiva que tingui en compte aquestes possibles fonts de matèria orgànica en el riu i incloure més campanyes de presa de mostra (és a dir, més recurrència al llarg de l'any) en futurs estudis.

Tanmateix, seria interessant des d'un punt de vista analític i quimiomètric realitzar un estudi de degradació d'un dels fàrmacs estudiats amb presència de matèria orgànica; on hi hagués, per exemple, els àcids fúlvics detectats en les aigües natural formant part de la matriu de mostra. Com s'ha esmentat en la introducció, la matèria orgànica dissolta intervé en els processos de fotodegradació indirecta, actuant com a intermedis reactius de transferència d'energia (veure secció 2.6). D'aquesta manera es podria estudiar com afecta la presència d'aquests compostos en la fotodegradació dels compostos orgànics, en especial, els fàrmacs. Aquest estudi es plantejarà al grup de recerca on s'ha realitzat la Tesi, ja que degut a la falta de temps i els problemes derivats de la pandèmia de COVID-19, no ha estat possible incloure'l en la present memòria.



### **ARTICLE III: MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA (DOM)**

Marín-García, M.; Tauler, R. (2020). Chemometrics characterization of The Llobregat river dissolved organic matter.

*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 201, 104018.

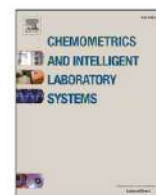
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104018>





Contents lists available at ScienceDirect

## Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemometrics](http://www.elsevier.com/locate/chemometrics)

## Chemometrics characterization of The Llobregat river dissolved organic matter

Marc Marín-García, Romà Tauler\*

Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDEA-CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Catalonia, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

River water  
Dissolved organic matter (DOM)  
UV spectrophotometry  
Excitation-emission matrix (EEM)  
Molecular fluorescence spectroscopy  
Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS)

## ABSTRACT

The potential use of multivariate chemometric methods for the investigation of the dissolved organic matter (DOM) sources in surface river waters monitored by UV absorbance and excitation-emission fluorescence spectroscopy is shown. The Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) method is applied to the analysis of the excitation-emission multidimensional data matrices acquired at ten different river sampling sites along the basin of the Llobregat river (located at the north-west of the Iberian Peninsula), from its origin to its mouth, during three different monitoring campaigns. The results obtained by MCR-ALS provided information about the compositional changes of the different DOM sources (i.e. *humic*-, *fulvic*- or *protein-like* sources) present in the investigated river samples, about their site distribution along the river basin and about their changes in three different monitoring campaigns. Eight different MCR-ALS components were resolved describing several types of DOM, with different excitation and emission spectra and with distinct distribution profiles along the river sampling sites. A comparative study of each single sampling site describing the changes in their DOM composition during the three monitoring campaigns was also performed.

## 1. Introduction

Water is an essential resource for life that requires the best quality conditions for its consumption. Very often, its natural availability and viability are affected by the environmental impact of human activities. For this reason, water treatment plants are very useful to remove harmful substances transported by water that can cause health and environmental undesired effects. Dissolved organic matter (DOM), present in both surface and groundwater, has a significant effect on the biochemical processes of aquatic systems (e.g. light attenuation, availability of nutrients, transportation of pollutants and metals). Likewise, this organic matter acts many times as a quality indicator of the salubrity level of the water. Therefore, when optimizing water purification processes in both drinking water (DWTP) and wastewater treatment plants (WWTP), it is very important to know the concentration and characteristics of the DOM present in this kind of waters and apply the suitable treatment procedures [1].

Dissolved organic matter can be analyzed and characterized by UV absorbance and excitation-emission matrix (EEM) molecular fluorescence spectroscopies. Fluorescence techniques are more sensitive than absorption spectroscopy and both excitation and emission spectra show

greater detail and provide more selective information about the nature of DOM than do absorbance spectra [2]. The collection of EEM fluorescence data has been shown to provide an enormous benefit over the collection of individual spectra [2]. EEM spectroscopy involves the collection of multiple emission spectra at a range of different excitation wavelengths. The use of this technique permits the discrimination of colored dissolved organic matter (CDOM) sources based on the analyzed sample fluorophores and on their relative concentrations [3]. Eight general types of fluorescence bands have been identified in natural waters [4]. These bands include *humic-like*-, *fulvic-like*-, *protein-like*-, and *pigment-like* fluorescence bands [4–7]. Terrestrial humic-like materials display excitation and emission maxima at longer wavelengths than do marine ones, as would be predicted from their more aromatic chemical nature and presumed higher molecular weights [2]. EEM spectroscopy is a powerful multidimensional spectral tool, but the identification of bands and their quantification is difficult [2].

Different multivariate data analysis and chemometric techniques have been proposed to extract information about marine and river water CDOM from its 2D and 3D spectrofluorometric data [8–11]. For instance, principal component analysis (PCA) [12] and partial least-squares regression (PLS) [13] have been used to distinguish among different

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [marcmaring@gmail.com](mailto:marcmaring@gmail.com) (M. Marín-García), [Roma.Tauler@idaea.csic.es](mailto:Roma.Tauler@idaea.csic.es) (R. Tauler).<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104018>

Received 19 December 2019; Received in revised form 31 March 2020; Accepted 3 April 2020

Available online 14 April 2020

0169-7439/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

water masses from the Baltic Sea [9]. A more powerful approach which takes advantage of the internal three-way data structure of multiple sample EEM measurements is parallel factor analysis (PARAFAC) [14], which is based on the strict fulfillment of a trilinear model and it has the capability to resolve EEMs into individual fluorescent groups and provides estimates of relative concentrations of each component [15,16]. This chemometric method is widely used nowadays [17–20]. Besides, the Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) approach [21] has also been proposed as a powerful data processing technique for the analysis of multiway experimental data sets and EEM data from DOM samples [22–24]. Indeed, acquired EEM fluorescence data may show some distortions from the pure trilinear model due to inner filter effects (IFE), experimental noise and a high spectral collinearity degree, which implies that a strict multilinear model is not totally followed [22]. MCR-ALS works similarly to PARAFAC [25,26] and, when it is applied with the trilinearity constraint (see Method section), similar results could be obtained from both techniques [10,27–29].

In this work, the MCR-ALS chemometric method is proposed to extract information about the compositional changes of the fractions of the CDOM and their distribution along the different water sample sites of the basin of the Llobregat river (located at the north-west of the Iberian Peninsula) during three different monitoring campaigns in the years 2017–2019. The proposed approach combines a monitoring procedure of the water quality at different times and sampling sites of the river course together with the EEM fluorescence measurements of the river water samples and their chemometrics modeling using the MCR-ALS method. This approach allows the extraction of rich information about the CDOM compositional changes and about their sample distribution along the river course, from its origin to its mouth. Several sources of CDOM have been resolved and the changes in their distribution along the river and among monitoring campaigns are discussed.

## 2. Materials and procedures

### 2.1. River sampling sites description

The Llobregat river is one of the major resources of water for the Barcelona metropolitan area (AMB). It supplies around 40% of the total water demand [30]. Three dams (cyan marks, see Fig. 1) are situated in the upper part of the river and several smaller rivers contribute to the main streamflow along the Llobregat river basin, among which Cardener river, Anoia river, and the Gavarresa stream stand out. In the upper and middle parts of the Llobregat river basin, the mineral composition of water is strongly affected by sedimentary rocks resulting in a very high level of mineralization [31]. The heavy industrialization growth along the river basin, the financial and technological constraints and, in some cases, the scarce public laws compliance, led to the Llobregat river water pollution [31,32]. Frequently, the river water quality is affected by accidental sewage discharges, industries spills and pollution from agricultural and mainly from urban and industrial run-off. In addition, the Llobregat river water quality is strongly affected by the potash mining industry (located in the middle part of the river) which can affect river salinity during raining episodes [33]. To aggravate the case, the Mediterranean climatic conditions are also not favorable from the point of view of DWTP and WWTP management [34]. Scarce snowfalls and long dry periods provoke long and severe droughts; flushing spring/summer rainfalls provoke floods also with a serious impact on the water quality [33] and, therefore, in the DOM present in the Llobregat river.

The studied water samples were collected by the Catalan Water Agency (ACA) during the respective monitoring campaigns (October 2017, October 2018 and May 2019) at 10 different stations all along the Llobregat river main system. Fig. 1 shows the location of the sampling sites/points used (blue and red marks) together with the reservoirs (cyan

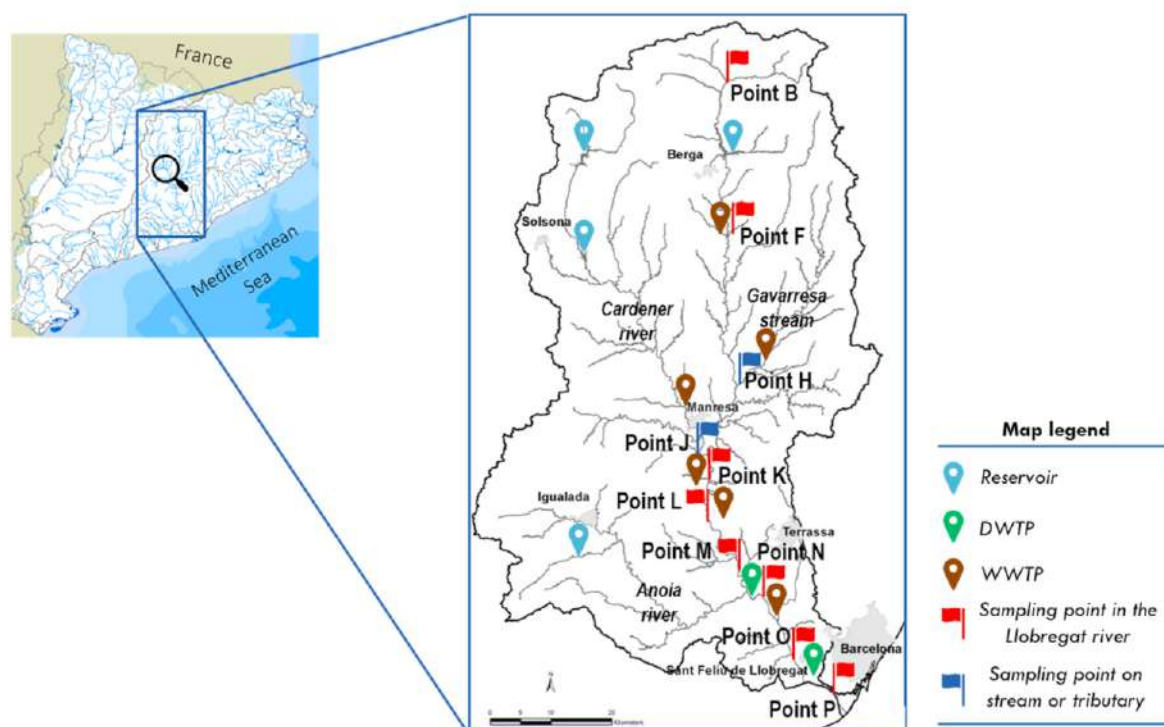


Fig. 1. Map of the Llobregat river basin showing the location of the sampling sites (blue and red marks) together with the reservoirs (cyan marks) and major drinking water (DWTP) and wastewater treatment plants (WWTP) (green and brown marks, respectively) along the river basin. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

marks) and major DWTP and WWTPs (green and brown marks, respectively) present in the Llobregat river basin. The first station was located at a straight-line distance of 8 km downstream the spring of the Llobregat river (Point B;  $42^{\circ} 14' 10''$  N,  $1^{\circ} 53' 41''$  E). The second one (Point F;  $41^{\circ} 55' 26''$  N,  $1^{\circ} 53' 8''$  E), was placed about 20 km downstream after the main reservoir of the basin, La Baells, which can store up to  $109 \text{ m}^3$  of water. Next, there are the only two sampling stations that were not located in the main system of the Llobregat river, but were placed in the confluence of two of its main tributaries, the Gavarresa stream (Point H;  $41^{\circ} 48' 46''$  N,  $1^{\circ} 57' 16''$  E), a stream with small irrigated lands around it and that has a flow with marked seasonal component, and the Cardener river (Point J;  $41^{\circ} 40' 59''$  N,  $1^{\circ} 50' 52''$  E), respectively. This last point is located 4 km after the WWTP of Manresa, the main city of the central region of Catalonia. Further down, the other sampling stations of the middle course of the river were located: Point K ( $41^{\circ} 39' 21''$  N,  $1^{\circ} 51' 38''$  E), Point L ( $41^{\circ} 33' 45''$  N,  $1^{\circ} 52' 50''$  E) and Point M ( $41^{\circ} 30' 12''$  N,  $1^{\circ} 55' 13''$  E). Point M is situated at 1 km straight-line distance downstream Abrera's DWTP. Finally, on the final course of the river, it is where the last three stations were placed: Point N ( $41^{\circ} 28' 28''$  N,  $1^{\circ} 57' 59''$  E), which is located 3 km downstream the main tributary, the Anoia river; Point O ( $41^{\circ} 21' 12''$  N,  $2^{\circ} 02' 51''$  E), which is placed in a very industrial and densely populated area a few meters upstream the Sant Joan d'Espí DWTP; and finally Point P ( $41^{\circ} 19' 44''$  N,  $2^{\circ} 06' 47''$  E), situated 5 km upstream from the estuary, very close to the Barcelona Airport.

## 2.2. Sample preparation

All water samples from the same sampling campaign were collected on the same day and stored in high density polyethylene (HDPE) pots (storage containers) at low temperature ( $3\text{--}5^{\circ}\text{C}$ ) until its analysis. Because DOM samples can easily decompose over time, only a few days (less than 2 weeks in all cases) elapsed between the sampling procedure and the corresponding spectroscopic analysis. To verify if DOM samples had been degraded/decomposed during storage, a control water sample was analyzed after a few months (5–6 months), obtaining absorbance and fluorescence intensities similar to those previously measured. All water samples, previously to be analyzed, were filtered using a polytetrafluoroethylene (PTFE)  $0.5 \mu\text{m}$  filter and stabilized at room temperature ( $20^{\circ}\text{C}$ ). Milli-Q water (with less than 8 ppb of total organic carbon (TOC)) was also used as blank samples.

## 2.3. Instruments

UV-VIS spectra were recorded using an UV-Visible molecular absorption spectrophotometer HP-Agilent 8453 (Agilent Technologies, CA, USA) with a diode array detector (DAD). UV-VIS spectra were recorded at the following conditions: wavelength range  $190\text{--}400 \text{ nm}$ , scan rate  $1 \text{ nm/s}$ , time response 1 s, and spectral band  $1 \text{ nm}$ . The spectra were acquired at room temperature ( $20^{\circ}\text{C}$ ).

Fluorescence spectra were recorded using a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, CA, USA) with high sensitivity photomultiplier tubes (PMT) as a detector. Fluorescence spectra were recorded at the following conditions: excitation range  $220\text{--}340 \text{ nm}$ , emission range  $300\text{--}500 \text{ nm}$ , wavelength increment  $2 \text{ nm}$ , spectral slits  $5 \text{ nm}$ , automatic (EX) and open (EM) filter positions, scan rate  $1200 \text{ nm/min}$ , and PMT voltage  $600 \text{ V}$ .

## 2.4. Software

UV Spectrophotometer ChemStation B.02.01 and Cary WinFLR v1.2 software, from the UV-Visible and fluorescence spectrophotometers, respectively, were used for control, data acquisition and initial data preprocessing. All the data generated were directly exported to .csv files and imported to MATLAB®. All the chemometric analyses were performed under MATLAB® computer environment. MCR-ALS method (2.0 GUI version [35] from "<http://www.mcrals.info/>") was implemented

under MATLAB® computer and visualization environment [36]. A scattering correction algorithm [37] was also applied (see Section 4.1).

## 3. Data structure

Data sets obtained from the UV-VIS and EEM fluorescence characterizations of the river water samples from all the sampling sites and different monitoring campaigns of this study were arranged in different data matrices. Fig. S1 in Supplementary Material gives the details of these data matrices.

### 3.1. Spectrophotometric data

Data matrix  $\mathbf{D}_{UV,i}$  of size  $(10,161)$  refers to the UV spectrophotometric analysis of the 10 water samples collected in one of the three monitoring campaigns ( $i = \text{I, II and III}$ , for October 2017, October 2018 and May 2019, respectively). All UV spectra were acquired at 161 wavelengths, between 190 and 350 nm. The location of the 10 sampling sites (stations) of the three campaigns is described in Section 2.1 and shown in Fig. 1, from Llobregat headwater's (Point B) to its estuary (near Point P).

An initial comparative study of the DOM's abundance between the different campaigns was performed by the simultaneous analysis of the different  $\mathbf{D}_{UV,i}$  data matrices, through the analysis of the column-wise augmented matrix  $\mathbf{D}_{UV,avg}$  of size  $(3 \times 10,161)$  or  $(30,161)$  (see Fig. S1). The chemometric analysis of this augmented UV spectrophotometric data matrix allows the fast comparison of the DOM patterns of the different sampling sites and of the three monitoring campaigns. In this augmented matrix data arrangement, the columns of the three merged data matrices were the same: 161 wavelength values ( $190\text{--}350 \text{ nm}$ ) [38].

### 3.2. Fluorometric data

In EEM fluorometric data matrices  $\mathbf{D}_{EEM,i,k}$  of size  $(61,101)$ ,  $i$  refers to the three different monitoring campaigns (I, II or III) and  $k$  to the 10 different sampling stations present in each of these campaigns (from B to P sampling points in Fig. 1). The rows of these matrices have the emission spectra (101 emission wavelengths in the range  $300\text{--}500 \text{ nm}$ ) at the different excitation wavelengths (61 excitation wavelengths between  $220$  and  $340 \text{ nm}$ ) [24,39], as shown in Fig. S1.

These single sample EEM data matrices can be simultaneously analyzed to characterize the DOM present in the river water and its distribution and abundance in all the sampling sites for a considered campaign. This analysis is shown later in Method Section. The resulting EEM three-way data set can be arranged in a data cube  $\mathbf{D}_{EEM,i}$  ( $61,101,10$ ), where 10 different data slices or matrices  $\mathbf{D}_{EEM,i,k}$  ( $k = 1, \dots, 10$ ), from each one of the sampling sites in Fig. 1, define the third way or direction of the data cube (3<sup>rd</sup> mode). The rows and columns of the individual data matrices describe the emission (101 wavelengths) and excitation (61 wavelengths) spectra, which constitute the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> modes of the EEM data cube [24,39]. In addition, when the three monitoring campaigns were simultaneously considered, a new augmented  $\mathbf{D}_{EEM,avg}$  data cube of size  $(61,101,10 \times 3)$  or  $(61,101,30)$  can be arranged. This data structure is formed, as shown in Fig. S1, by the simultaneous coupling in the 3<sup>rd</sup> mode of the three different data cubes  $\mathbf{D}_{EEM,i}$  of the monitoring campaigns carried out ( $3 \times 10$  data slices or matrices  $\mathbf{D}_{EEM,i,k}$  were appended).

In order to apply the MCR-ALS method (see below), the EEM data cube including all sampling sites was first unfolded in the column-wise augmented data matrix,  $\mathbf{D}_{EEM,i,avg}$  of size  $(61 \times 10,101)$  or  $(610,101)$  for one of the selected monitoring campaigns, which includes all the individual  $\mathbf{D}_{EEM,i,k}$  matrices column-wise appended, one on top of each other, keeping in common the same emission wavelengths (101  $\lambda_{EM}$  values) in the columns (see Fig. S1 in Supplementary Material). The rows represent the different emission spectra obtained at the different



excitation wavelengths (61  $\lambda_{EX}$  values) times the number of sampling sites, each one giving an EEM data matrix (10 matrices were appended). In addition, when the three monitoring campaigns were simultaneously analyzed, a new (super)augmented data matrix  $D_{EEM, \text{supaug}}$  with dimensions (61  $\times$  10  $\times$  3,101) or (1830,101) was obtained, including the 10  $D_{EEM, i, k}$  individual matrices of each of the three monitoring campaigns performed (previously arranged as 3 different  $D_{EEM, i, \text{aug}}$  matrices, keeping in common the emission wavelengths (101  $\lambda_{EM}$  values)). The rows represent the different emission spectra obtained at the different excitation wavelengths (61  $\lambda_{EX}$  values) times the number of sampling sites and the number of monitoring campaigns, each one giving an EEM data matrix (in total 3  $\times$  10 matrices were appended) (see Fig. S1).

#### 4. Data pretreatment and analysis

##### 4.1. Data preprocessing (scattering correction)

Light dispersion and scattering were considered and corrected before chemometric analysis due to their undesirable non-linear effects. Two types of light scattering can potentially interfere with the fluorescence measurements: Rayleigh and Raman scattering. In order to eliminate these scattering interferences, the method described in Ref. [37] was used. This algorithm removes scatter peaks directly from the EEM data matrix and fill the missing (removed) regions using a polynomial interpolation from the surrounding data points. As a result, scattering contributions were practically totally removed and EEM data matrices with a good signal quality were recovered (see Fig. S2 in Supplementary Material). As no high optical density nor turbidity was observed in the collected water samples, no further correction of the inner filter effect (IFE) was necessary in this case.

##### 4.2. MCR-ALS method

The MCR-ALS method uses a bilinear model to decompose the experimental data matrix,  $D$ , into the product of two factor matrices [21, 40]:

$$D_{UV} = CS_{UV}^T + E_{UV}. \quad (1)$$

In the case of UV spectrophotometric data (data matrices  $D_{UV, i}$  and  $D_{UV, \text{aug}}$ ), the bilinear decomposition produces one factor matrix with the UV spectra of the MCR resolved components ( $S_{UV}^T$  matrix) and the other factor matrix has the concentration profiles (relative contributions or concentrations of the components in every analyzed sample) of these MCR resolved components (C matrix) [41]. This equation is, in fact, the extension of Beer-Lambert's law to multi-wavelength and multi-sample analyses [40]. It assumes that the analytical spectrophotometric responses of the multiple components ( $N$ ) present in the samples are mixed and can be explained according to Equation (1).

In the case of EEM fluorescence measurements of one single sample (data matrix  $D_{EEM, i, k}$ ), the MCR bilinear modeling of the experimental data can be written with a similar equation [10]:

$$D_{EEM} = S_{ex} S_{em}^T + E_{EEM}. \quad (2)$$

In this data decomposition,  $S_{ex}$  is a matrix with the excitation spectral profiles of the mixture constituents,  $S_{em}^T$  matrix has its pure emission spectra profiles, and  $E_{EEM}$  has the residual variance not explained by the MCR model,  $S_{ex} S_{em}^T$ . Equation (2) summarizes the set of linear equations defining the fluorescence spectral contributions of each component in the analyzed sample [10].

The application of the MCR bilinear model to the different UV and EEM data matrices obtained in this study are shown in Fig. S3 in Supplementary Material.

The characterization of multiple water samples from the Llobregat river by spectrofluorometry provided the data matrices  $D_{EEM, i, k}$  (see

Section 3.2), whose rows are the emission spectra collected at the different studied excitation wavelengths and the columns are the excitation spectra recorded at the selected emission wavelengths. The MCR bilinear model applied to these EEM matrices is defined by Equation (2) and is shown graphically in Fig. S3a.  $S_{ex}$  and  $S_{em}^T$  matrices give, respectively, the EX and EM spectra profiles of the  $N$  components (different DOM composition) resolved in the analyzed water sample.

When the MCR analysis is simultaneously applied to all the acquired EEM data matrices obtained in a single monitoring campaign (i.e. to the  $D_{EEM, i, \text{aug}}$  augmented data matrix, see Fig. S1), the bilinear model equation is now extended as:

$$D_{EEM, i, \text{aug}} = [D_{EEM, i, 1}; D_{EEM, i, 2}; \dots; D_{EEM, i, k}] = [S_{ex, i, 1}; S_{ex, i, 2}; \dots; S_{ex, i, k}] S_{em}^T + [E_{EEM, i, 1}; E_{EEM, i, 2}; \dots; E_{EEM, i, k}] = S_{ex, i, \text{aug}} S_{em}^T + E_{EEM, i, \text{aug}}. \quad (3)$$

In this case, the resulting  $S_{ex, i}$  matrix is a column-wise augmented matrix  $S_{ex, i, \text{aug}} = [S_{ex, i, 1}; S_{ex, i, 2}; \dots; S_{ex, i, k}]$ , which is formed by all the  $S_{ex, i, k}$  submatrices containing the EX spectra profiles of the  $N$  individual components (different DOM sources) found at each sampling station ( $k = 1, \dots, 10$ ) of the considered monitoring campaign ( $i$ ) at their respective different concentrations, and  $S_{em}^T$  matrix, which has the common EM spectra at all the studied sampling sites or stations [22,42]. Equation (3) is shown graphically in Fig. S3b.

When the different monitoring campaigns are analyzed simultaneously, the MCR extended model is now applied to the column-wise (super)augmented matrix  $D_{EEM, \text{supaug}}$ , previously described in Section 3.2, using Equation (4), which is shown graphically in Fig. S3c [43].

$$D_{EEM, \text{supaug}} = [D_{EEM, I, \text{aug}}; D_{EEM, II, \text{aug}}; \dots; D_{EEM, J, \text{aug}}] = [[S_{ex, I, 1}; S_{ex, I, 2}; \dots; S_{ex, I, k}]; [S_{ex, II, 1}; S_{ex, II, 2}; \dots; S_{ex, II, k}]; \dots; [S_{ex, J, 1}; S_{ex, J, 2}; \dots; S_{ex, J, k}]] S_{em}^T + [E_{EEM, I, \text{aug}}; E_{EEM, II, \text{aug}}; \dots; E_{EEM, J, \text{aug}}] = [S_{ex, I, \text{aug}}; S_{ex, II, \text{aug}}; \dots; S_{ex, J, \text{aug}}] S_{em}^T + E_{EEM, \text{supaug}} = S_{ex, \text{supaug}} S_{em}^T + E_{EEM, \text{supaug}}. \quad (4)$$

In this case, the resulting  $S_{ex, \text{supaug}}$  matrix is a column-wise (super) augmented matrix formed by different  $S_{ex, i, \text{aug}}$  submatrices that contain the EX spectra profiles of the  $N$  individual components (different DOM sources) found simultaneously at all the sampling stations at the different monitoring campaigns ( $I = I, II$  and  $III$ ), scaled by their respective relative concentrations. A single  $S_{em}^T$  matrix, common for all the data set, containing the EM spectra of the resolved components (DOM sources), is also obtained.

In the EEM data examples described above, when more than one EEM matrix ( $D_{EEM, i, k}$ ) is analyzed simultaneously by the MCR-ALS method, a new constraint related to the application of the trilinear model can be applied. The trilinear model is indeed fulfilled by EEM fluorescence data since the emission spectra have the same shape (only changing in their relative intensities) whatever is the excitation wavelength and, conversely, the excitation spectra have the same shape (only changing in their relative intensities) whatever is the emission wavelength [10,28, 29]. The only difference among the considered samples would be, therefore, in the contribution or amount (concentration, abundance) in which a particular component (DOM source) is present in the different analyzed samples. This important property of EEM data implies the fulfillment of the trilinear model, which is very advantageous since it gives unique solutions and eliminates the rotational ambiguities [43–45] associated to the bilinear model decomposition of the simultaneously analyzed  $D_{EEM, i, k}$  matrices according to Equation (3) or (4). Fig. S3d and Equation (5) below describe the implementation of the trilinear model to the analyzed EEM matrices [43]:

$$D_{EEM, i, k} = S_{ex} C_{i, k} S_{em}^T + E_{EEM, i, k}. \quad (5)$$

In this decomposition,  $S_{ex}$  and  $S_{em}^T$  matrices have respectively the common EX and EM pure spectra profiles of the  $N$  individual components

(different DOM sources), and  $C_{i,k}$  is a diagonal matrix with the same dimensions as the number of resolved components ( $N,N$ ) which has the relative contribution/concentration of each individual component (DOM source) resolved at the considered sampling station ( $k$ ) and campaign ( $t$ ).

As mentioned above in the EEM data decomposition examples, the excitation ( $S_{ex}$ ) and concentration ( $C_{i,k}$ ) profiles are mixed in the augmented  $S_{ex,l,aug}$  matrix obtained by the MCR-ALS bilinear model decomposition. Fig. S3d shows how these two factor matrices can be obtained using the implementation of the trilinear constraint in the Alternating Least Squares (ALS) optimization algorithm. According to this figure, when trilinearity constraint is applied during the ALS optimization, the  $s_{ex,l,aug}$  augmented profile of each component  $n$  ( $s_{ex,l,aug,n}$ ) is appropriately folded in the matrix  $S_{ex,n}$ , with a number of rows equal to the number of excitation wavelengths ( $61 \lambda_{EX}$  values,  $I$ ) and the number of columns equal to the number of samples simultaneously analyzed (all the sampling stations ( $K$ ) and monitoring campaigns ( $L$ ), in this case). This excitation spectra matrix is decomposed by Singular Value Decomposition (SVD) [46] and the first singular scores vector obtained in this decomposition gives the common spectrum for this component, i.e. the shape of its excitation spectrum ( $s_{ex,n}$  vector), and the first loadings vector gives the relative concentration of this component at the different samples ( $c_n^T$  vector) [10,28,29]. After this decomposition, the full  $s_{ex,l,aug}$  augmented profile for each component  $n$  is rebuilt and updated for the next ALS iteration ( $s_{ex,l,aug,n}^*$ ). Therefore, apart from forcing the shape of the excitation spectrum of the considered component to be the same for all the different samples, this procedure captures the relative concentrations of this component in each of the analyzed samples, in the resolved  $C_{i,k}$  matrices (see Fig. S3d and Equation (5)), which are stored in the corresponding column vector of the augmented concentration matrix,  $C_{aug}$ .

In the MCR-ALS method, the bilinear model described by Equations (1)-(4) is solved using an ALS optimization procedure under the selected constraints [47]. This optimization runs until the model  $CS_{UV}^T$  (for UV spectrophotometric data) or  $S_{ex}S_{em}^T$  (for EEM fluorescence measures) minimizes as much as possible the residual errors in the reproduction of the original data sets,  $D_{UV}$  or  $D_{EEM}$ , respectively [43]. MCR-ALS algorithm requires the postulation of the number of components ( $N$ ) to be resolved, which can be initially estimated from the results of the SVD of the original data matrix. In the case of the UV-VIS and EEM fluorescence river water characterization studies, however, this may be difficult due to linear dependences in the concentration and spectra profiles (in  $C$ ,  $S_{UV}^T$ ,  $S_{ex}$ , and  $S_{em}^T$  matrices, respectively) [47].

Initial estimates, either of the concentration or spectra matrices ( $C/S_{ex}$  or  $S_{UV}^T/S_{em}^T$ , for UV spectrophotometry/EEM fluorescence respectively, see Equations (1) and (2)), are needed to start the iterative ALS optimization [48]. They can be obtained from the purest (more different) experimental UV/EM spectra (rows) or from the purest (more different) concentration/EX spectra (columns), using a similar procedure to the one used in the SIMPLISMA method [49]. In this work, initial estimates of the pure spectra of the selected  $N$  components of the system were obtained, respectively from the purest UV and EM spectra among the measured ones ( $S_{UV}^T/S_{em}^T$  matrix). In addition, during the ALS optimization [47], the non-negativity and trilinearity constraints were applied. Resolved spectra profiles in  $S_{UV}^T/S_{em}^T$  matrix were also normalized during the ALS optimization.

The quality of the results achieved by the application of MCR-ALS method was evaluated using two different parameters: the percentage of lack of fit (% LOF) and the percentage of total explained variance ( $R^2$ ), according to the following equations:

$$\% LOF = 100 \cdot \sqrt{\frac{\sum_{ij} (d_{ij} - d_{ij}^*)^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad (6)$$

and

$$R^2 = 100 \cdot \frac{\sum_{ij} d_{ij}^2 - \sum_{ij} (d_{ij} - d_{ij}^*)^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}, \quad (7)$$

where  $d_{ij}$  is the matrix element in the row  $i$  and column  $j$  from the original data matrix ( $D$ ) and  $d_{ij}^*$  is the same element obtained with the MCR-ALS model [39,45]. Unlike in PCA, where resolved principal components are orthogonal by definition [12], in the MCR-ALS method they are not [40]. Therefore, there will be a part of the individual variance explained by every MCR components which is most probably shared with the others (overlapped spectra and concentration profiles) (see Section 5.2).

## 5. Results and discussion

### 5.1. UV-VIS spectra

Fig. 2 shows the UV-VIS spectra acquired for each of the Llobregat river water samples collected at the different sampling sites (stations) of each monitoring campaign. The plots of these three data matrices ( $D_{UV,I}$  for October 2017,  $D_{UV,II}$  for October 2018 and  $D_{UV,III}$  for May 2019) provides an initial overview of the changes on CDOM along the Llobregat river. An increase in the absorbance of the collected water samples is observed as we move downstream in all three campaigns, indicating a much greater presence of DOM in the final course of the river (Point P, violet line) than in the headwaters of the river (Point B, blue line). Nevertheless, it can be observed that in one of the sampling sites, in the Gavarresa stream (Point H, red line), DOM absorbance values are higher than expected. This sampling station H has the highest presence of DOM in the second and third campaigns (Oct-18 and May-19, respectively), and it is the second sampling site with more DOM in the first campaign (Oct-17). It is also possible to highlight that the obtained river water absorbances in May 2019 campaign were slightly lower than those obtained in the campaigns performed in autumn (Oct-17 and -18). This change in the observed UV absorbance among the different campaigns and, therefore, in the abundance of CDOM present therein, may be due to seasonal changes. This explains why the amount of CDOM present in the Llobregat river is changing during the different months of the year. However, this hypothesis cannot be totally confirmed because samples from only one sampling campaign per year were analyzed. Consequently, a recurrent sampling at all seasons of the year would confirm this hypothesis (future work).

Principal Component Analysis [12] was applied to the mean-centered  $D_{UV,aug}$  matrix to look for the similarities among river water samples from the different sampling sites and campaigns. The PCA model with two principal components already explained 98.52% of the UV absorbance data variance. Fig. S4 in Supplementary Material shows the *scores* plot of the different water samples according to their monitoring campaign: Oct-17 (red), Oct-18 (yellow) and May-19 (green). It should be noted that all water samples from the three monitoring campaigns were well explained, with the same two principal components, indicating that the variance sources of the three different monitoring campaigns did not differ significantly. However, as it was mentioned above, the river water sample from the Gavarresa stream (Point H in map of Fig. 1), shows a different position in the *scores* plot (outside of the confidence level) and a higher Q residual and Hotelling  $T^2$  values (see Supplementary Material, Fig. S4) in the Oct-18 campaign, which would indicate that this is an outlying influential water sample. The analysis of the fluorescence measurements will provide a deeper analysis of the different water samples and confirm the outlying behavior of the sample at Point H.

### 5.2. Fluorescence

According to Coble [2], fluorescent DOM (FDOM) is colored, but not all CDOM is fluorescent. This is evidenced by the fact that normally

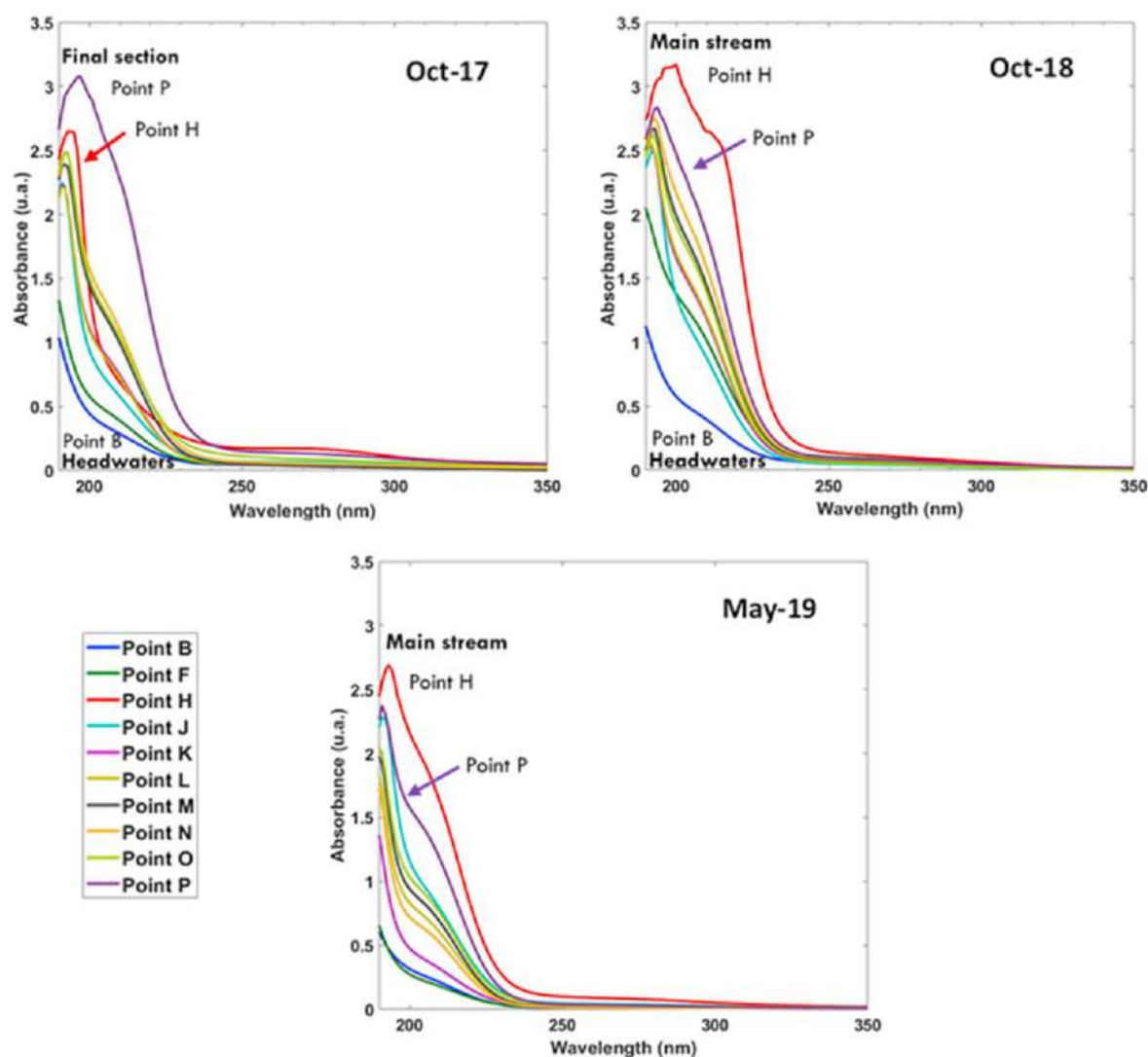


Fig. 2. UV-VIS spectra of Llobregat river water samples collected at the different sampling sites (see Fig. 1) at the three monitoring campaigns performed.

FDOM absorption spectra shows a featureless increase in intensity with decreasing wavelengths, usually between 200 and 700 nm, whereas its excitation spectra shows one or more discrete peaks, most commonly around 250 and 350 nm. EEM fluorescence spectroscopy provides information about the changes in CDOM resulting from mixing, biological degradation, biological production, and photobleaching of DOM that occur in the environment [2]. Mixing of water masses has the primary effect of dilution but it also shifts the excitation and emission maxima of the water masses with different CDOM compositions [50].

In this work, the MCR-ALS analysis was applied to the data set obtained from the fluorescence measurements of the 10 water samples during the three different monitoring campaigns (30 EEM data matrices arranged in the (super)augmented data matrix  $D_{EEM, supaug}$ ). Similar results can be obtained by the application of PARAFAC [14] to the same data set (results not shown for brevity) [10]. Fig. 3 shows the 2D plot of the resolved excitation-emission fluorescence spectra of each one of the resolved MCR-ALS components (see Method section) as well as the bar chart of their corresponding relative contribution at each sampling station and campaign. Separated individual pure component 1D plots of the excitation and emission fluorescence spectra of the different MCR-ALS resolved components,  $S_{ex}$  and  $S_{em}^T$  matrices, are shown in Fig. S5 of the Supplementary Material and discussed separately below. As is shown in Fig. 3 and summarized in Table 1, eight different components were

resolved by the MCR-ALS analysis of the (super)augmented data matrix  $D_{EEM, supaug}$ . This number of MCR-ALS components was selected considering the explained variances of each of them as well as their possible chemical interpretation, i.e. each resolved component should describe a different source of DOM, with different excitation and emission spectra and distinct geographical distribution and site/campaign contribution profiles. Accordingly, eight fluorescent active DOM sources were detected and resolved.

The components discussed below are presented following the amount of variance explained by each of them separately. The total amount of data variance explained by the eight MCR-ALS components when they were considered simultaneously ( $R^2$ , in Equation (7)) was 98.9%, and the sum of the individual variances explained by each MCR-ALS component separately was 160.2%. This large difference of 61.3% of variance indicates the amount of variance overlap between the profiles of the eight components. In MCR-ALS, the resolved components are not orthogonal (like in PCA) and, therefore, there is a part of the variance which is common among them, as the natural sources of variance do overlap indeed.

The first MCR-ALS component (C1) explains the 54.0% of the total data variance and shows three different excitation maximums at 230, 250 and 330 nm, with a common emission band maximum at 420 nm (Figs. 3 and S5). These band maxima, according to the literature [51], can be

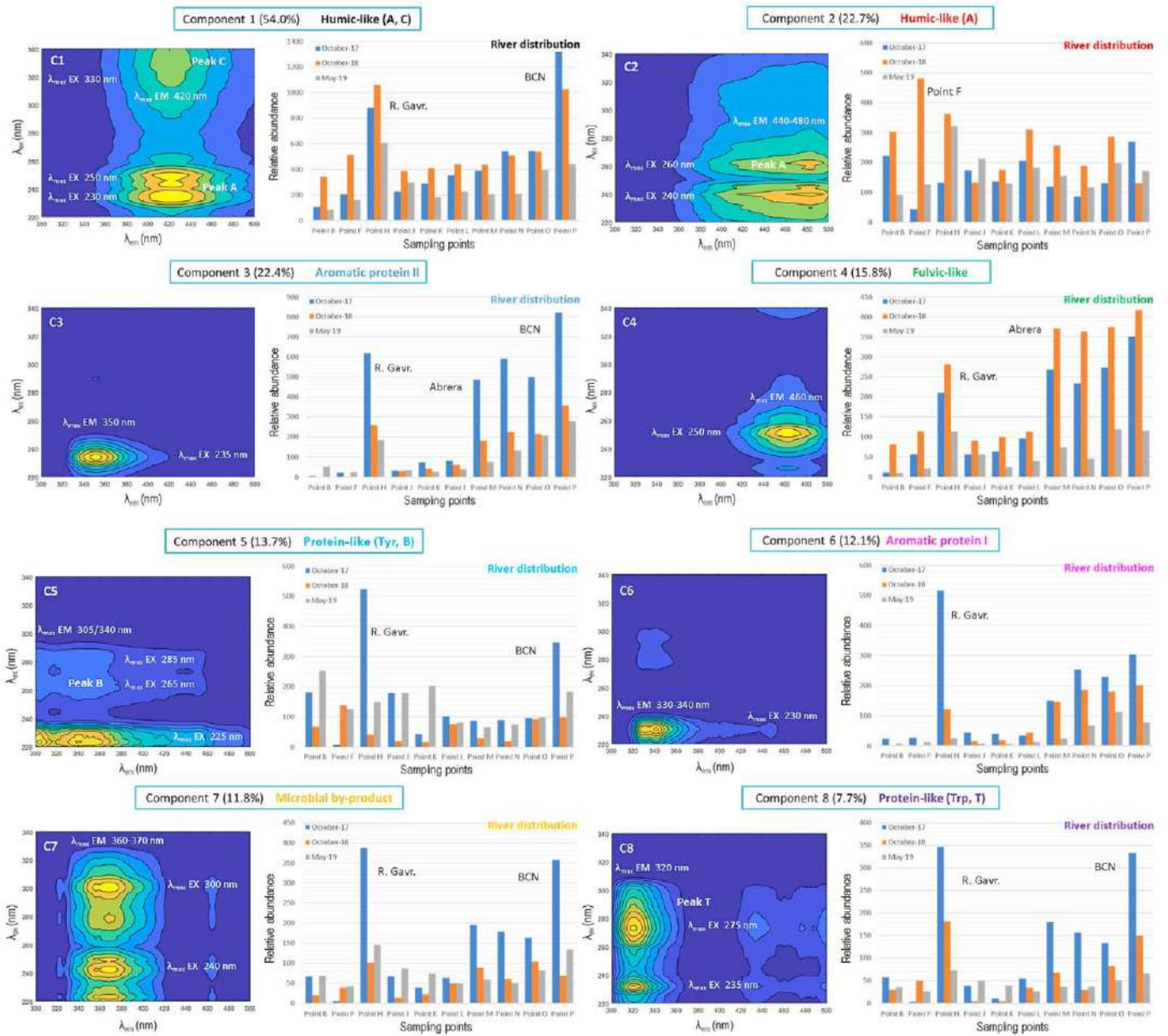


Fig. 3. 2D plot of the MCR-ALS resolved excitation-emission fluorescence spectra of each one of the resolved components (DOM sources) together with the bar chart of their corresponding relative contribution at each sampling station. Blue, orange and grey bars refer to the Oct-17, Oct-18, and May-19 monitoring campaigns, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1

Summary of the explained variances (in %), EX-EM band maxima (in nm) and DOM type assignment of the resolved MCR-ALS components obtained in the analysis of the (super)augmented data matrix  $D_{EEM, supaug}$ .

Components	1	2	3	4	5	6	7	8
Expl. Variance <sup>1</sup>	54.0%	22.7%	22.4%	15.8%	13.7%	12.1%	11.8%	7.7%
$\lambda_{max} Ex$	230-250/330 nm	240/260 nm	235 nm	250 nm	225/265-285 nm	230 nm	240/300 nm	235/275 nm
$\lambda_{max} Em$	420 nm	440-480 nm	350 nm	460 nm	305/340 nm	330-340 nm	360-370 nm	320 nm
DOM type assignment	Humic-like (A, C)	Humic-like (A)	Aromatic protein II	Fulvic-like	Protein-like (Tyr, B)	Aromatic protein I	Microbial by-product	Protein-like (Trp, T)

<sup>1</sup> MCR-ALS explained variance ( $R^2$ ) considering all eight components is 98.9% and lack of fit (LOF) is 10.2% (see Equation 6 and 7).

related to those observed for the *humic-like* type of DOM (A and C peaks). This kind of DOM was observed in all the monitoring campaigns carried out and, according to the river distribution bar chart (see Fig. 3), has a much higher abundance in the autumn season (October 2017 and 2018, blue and orange bars, respectively) than in the spring season (May 2019, grey ones). An increasing presence of this type of DOM can also be observed downstream waters, as highlighted at sampling site H (Gavarresa stream) and at sampling site P (close to the river mouth) which are the stations with the highest DOM abundance.

The second component (C2) explains the 22.7% of the data variance and shows two different excitation band maxima at 240 and 260 nm, respectively, and a wide emission band between 440 and 480 nm (Figs. 3 and S5). These bands are also assigned to a *humic-like* type of DOM (A peak) [50,51]. This kind of DOM is present in all the sampling sites and campaigns carried out, but it does not follow any regular pattern of abundance between the different seasons. According to the river distribution chart (see Fig. 3), orange bars, which correspond to the monitoring campaign carried out in October 2018, showed a greater contribution of this component compared to the other campaigns, except for the last sampling site at the river mouth, Point P. In this final sampling station, component C2 was more abundant in October 2017 (blue bars). In October 2018 monitoring campaign, Point F stands out as the sampling site with the greatest presence of this type of DOM.

The third component (C3) explains approximately the same variance as the previous one (22.4%) and shows a single excitation and emission maximum in its 2D plot, at 235 and 350 nm, respectively (Figs. 3 and S5). According to the literature [50,51], the wavelengths of these sharp excitation and emission band maxima, correspond to DOM whose fluorescence signal is similar to that produced by *type II aromatic proteins*. Looking at the distribution profile of the contribution of this component along the river course sites and over the different monitoring campaigns, it can be seen that in October 2017 (first campaign, blue bars) the presence of this type of DOM was higher in comparison with the other campaigns carried out. In relation to the different river sampling sites or stations, it can be appreciated that there was an important contribution of this C3 component in the lower course of the river, from Point M to the estuary (Point P). In the upper and middle courses of the Llobregat river, the contribution of this component was low, except for the Gavarresa stream (Point H), where its contribution is also again very high.

Fourth component (C4) explains the 15.8% of the data variance and shows a single EX-EM maximum, at 250 and 460 nm, respectively (Figs. 3 and S5). According to previous works [50,51], these excitation and emission band maxima are related to a *fulvic-like* type of DOM. This kind of DOM was observed in all the monitoring campaigns and, as it happens with C1, it had a higher contribution in autumn (October 2017 and 2018, blue and orange bars, respectively) than in spring (May 2019, grey one) (see Fig. 3). In October 2018, C4 contribution was higher than in October 2017. The highest levels of this *fulvic-like* DOM contribution are found again at sampling sites close to the final course of the river. In May (spring) of 2019, however, no trend was observed along the river for this component, and its contribution remained at very low levels in all stations.

Fifth component (C5) explains the 13.7% of the data variance and presents multiple EX-EM bands, three excitation maxima, at 225, 265 and 285 nm, and two emission maxima, at 305 and around 340 nm (Figs. 3 and S5). This wavelength arrangement can be correlated with the fluorescence signal produced by the *protein-like* type of DOM [50,51], in particular with the fluorescence produced by tyrosine (Tyr) type of amino acid groups. This type of DOM was contributing irregularly to the different monitoring campaigns, presenting higher levels in October 2017 and May 2019 (blue and grey bars, respectively). Sampling sites H (Gavarresa stream) and P (river mouth) were the river sampling stations with the greatest contribution of this type of DOM (in the October 2017 campaign).

Sixth component (C6) explains the 12.1% of the data variance and shows a single EX-EM maximum, with its excitation band maximum at

230 and its emission band maximum between 330 and 340 nm (Figs. 3 and S5). These band maxima are partly located similarly to those observed for the previous component C5. According to the literature [50, 51], these bands can be related to DOM whose fluorescence signal is similar to that produced by *type I aromatic proteins*. Looking at the distribution of this component along the river course (see Fig. 3), it was detected that this contribution was higher in autumn (October 2017 and 2018, blue and orange bars, respectively) than in spring (May 2019, grey ones). It is possible to highlight that in the second monitoring campaign, this DOM contribution was not present in the headwaters of the river (very low contribution) and its presence was only observed at sampling station H (Gavarresa stream), increasing afterward downstream and becoming more pronounced, from station M to the mouth of the river. Gavarresa stream station is the river sampling station with the greatest contribution of this type of DOM (in the October 2017 campaign).

Seventh component (C7) explains the 11.8% of the data variance and presents two different excitation maxima, at 240 and 300 nm, respectively, and a single emission maximum, between 360 and 370 nm. According to the literature [50,51], this component can be related to the fluorescence produced by soluble *microbial by-products*. This kind of DOM was observed irregularly in the monitoring campaigns, presenting its highest contribution in the first campaign performed in October 2017 (blue bars). It can again be observed that sampling stations H (Gavarresa stream) and P (river mouth) are the sampling sites with the greatest contribution of this type of DOM and that from the station M (after Abrera's DWTP) downstream, a significant increase of this contribution is observed (especially in the October 2017 campaign).

Finally, the eighth component (C8) explains only the 7.7% of the data variance and shows two different excitation maxima and a single emission maximum. The respective wavelengths of these band maxima are 235, 275 and 320 nm (see Fig. 3). According to the literature [50,51], these bands are similar to those observed in the denominated T peak, which can be correlated with the fluorescence signal produced by the *protein-like* type of DOM, especially that coming from tryptophan (Trp) type of amino acid groups. This variety of DOM was observed irregularly in the different monitoring campaigns analyzed, presenting higher contributions in the autumn season (October 2017 and 2018, blue and grey bars, respectively). Looking at the different sampling stations, it is also possible to highlight that, in the same way as for C7, the sampling stations H (Gavarresa stream) and P (river mouth) stand out as the sampling sites with the greatest abundance of this type of DOM in all the campaigns done. An important change in the contribution of this component is observed in October 2017 from sampling station M downstream.

A comparative study focused on the changes of the DOM composition at every sampling site and between the three monitoring campaigns can be performed. Pie charts in Fig. 4 show the DOM composition for the headwaters (Point B), the Gavarresa stream (Point H) and the river mouth (Point P) sampling sites of the Llobregat river between Oct-17, Oct-18, and May-19 monitoring campaigns. In Fig. S6 of the Supplementary Material, the pie charts for the other river sampling sites investigated in this work are shown. The most important changes in the DOM composition observed between the monitoring campaigns are found in the *humic*-, *fulvic*- and *protein-like* DOM fractions.

Sampling site B is located near the headwaters of the Llobregat river and shows a significant change of the *humic*- and *protein-like* (Tyr) DOM fraction contribution levels among the three different monitoring campaigns (see Fig. 4). *Humic-like* composition (A/C and A types, respectively) shows an increase between Oct-17 and Oct-18 campaigns (from 15.7 to 32.9% to 40.5 and 35.6%, respectively), but decreases in May-19 campaign (13.5 and 15.3%) due to the increase of the *protein-like* (Tyr, B) DOM composition in this monitoring campaign (41.9%). This is the second DOM source most abundant in Oct-17 (26.8%), but not so much in Oct-18 (7.9%). *Microbial by-product* DOM composition was also present in this sampling site in Oct-17 and May-19 campaigns (9.9 and 11.4%, respectively).

Gavarresa stream sampling site (Point H) is located in the middle course of the Llobregat river and shows a significant change of the *humic*-

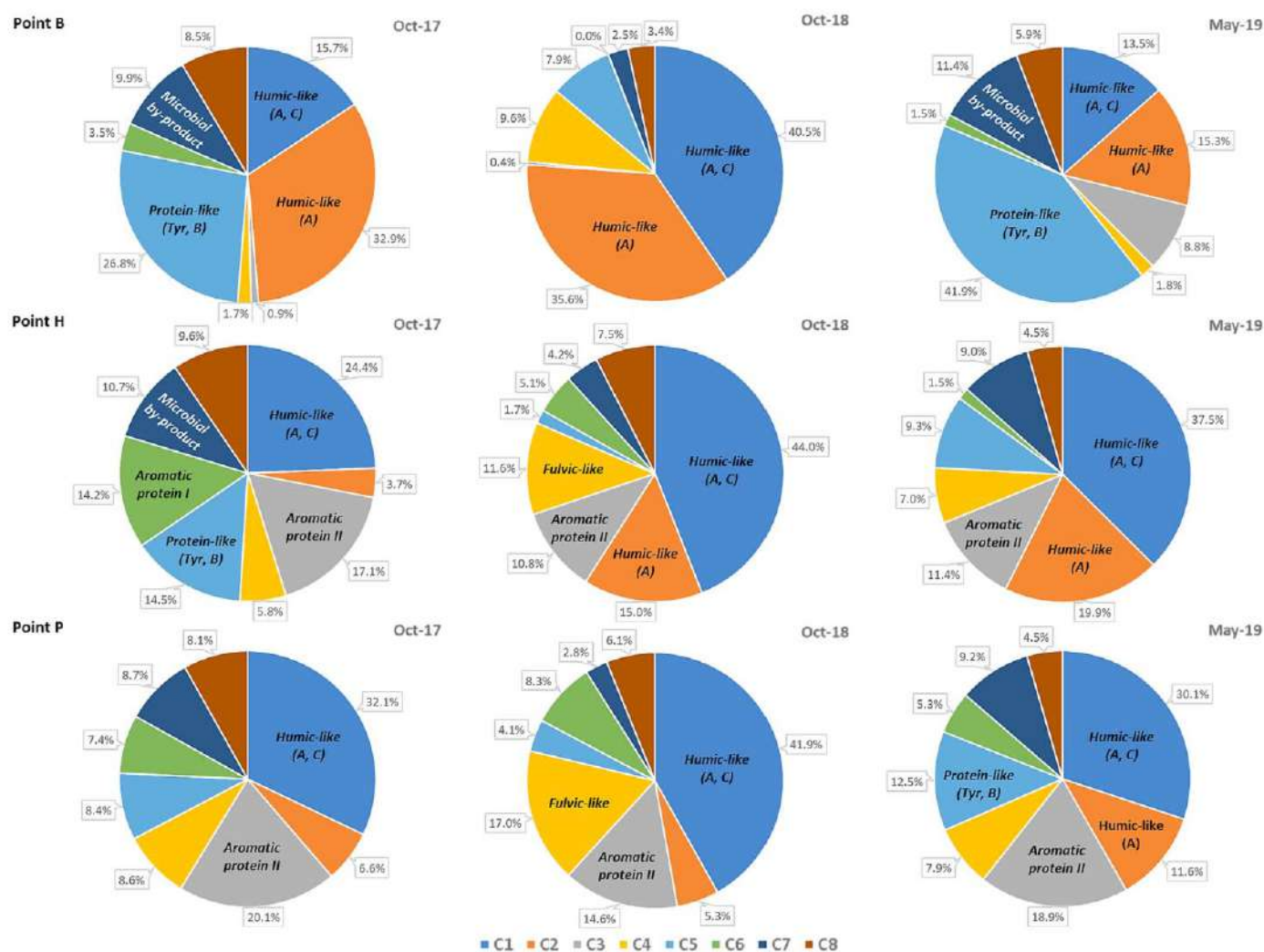


Fig. 4. Pie charts showing the different DOM contributions in river headwaters (Fig. 1, Point B), Gavarresa stream (Fig. 1, Point H) and river mouth (Fig. 1, Point P) sampling sites along the Llobregat river in the three monitoring campaigns (Oct-17, Oct-18, and May-19).

*fulvic-, microbial by-product and protein-like* DOM fraction contributions among the three different monitoring campaigns (Fig. 4). This is the sampling station where the DOM composition has varied more among the different campaigns performed. The water sample collected in this site during Oct-17 campaign shows a very different DOM composition compared to those obtained in the other campaigns. This is the reason why this water sample behaved like an outlier sample in the PCA analysis performed above. The *humic-like (A, C)* contribution changes between Oct-17 and Oct-18 campaigns (from 24.4% to 44.0%) and decreases again in May-19 (37.5%). In contrast, the *humic-like (A)* DOM contribution increases in this last campaign (19.9%), compared to the lower contributions of this fraction in the other two previous campaigns (3.7 and 15% in Oct-17 and Oct-18, respectively). *Aromatic protein II* DOM fraction was always significantly present in the three monitoring campaigns, showing relatively high contributions in all of them (17.1, 10.8 and 11.4%, respectively). Lower contribution of this DOM fraction was only observed in Oct-18 campaign, probably due to the simultaneous contribution of the *fulvic-like* DOM fraction (11.6%), which, on the other hand, decreases in May-19 campaign (7.0%) owing to the increase of the *protein-like (Tyr, B)* DOM contribution (9.3%). *Microbial by-product* and *aromatic protein I* DOM contributions were also present in this sampling site, with higher contributions of the microbial one, although the contribution of the *I aromatic proteins* DOM was also significantly high in the Oct-17 campaign (14.2%).

Sampling site P is located near the river mouth and shows a significant change of the *humic-, fulvic- and protein-like* DOM fraction contribution levels among the three different monitoring campaigns (Fig. 4). This sampling site shows patterns of abundance changes between the different campaigns very similar to those observed for the previously described station.

The information given above is a summarized description of the obtained results, emphasizing the observed increase/decrease of the contribution of the different types of DOM during the monitoring campaigns of this study. A detailed geographical knowledge of every sampling site, of the activities of the surrounding area (e.g. farming or industrial presence), as well as of the meteorological conditions (like rainfall) during the monitoring campaigns, are necessary for the correct interpretation of the observed changes in the distribution of the DOM sources along the Llobregat river. In this way, the possible contributions of DOM from anthropogenic sources such as the discharge of slurries or the use of fertilizers can be assessed, as well as the investigation of whether these contributions change or not over the different seasons of the year. A deeper investigation considering this information as well as including more sampling campaigns is pursued for future studies.

6. Conclusions

In this paper, the potential use of the MCR-ALS method to the analysis

of excitation-emission fluorescence data obtained in the investigation of the river water DOM sources is presented. Eight fluorescent active DOM sources have been detected and resolved, together with their geographical distribution in the basin of the Llobregat river for different monitoring campaigns. Among them, the *humic*- and *protein-like* types of DOM sources predominate. A significant increase of the DOM was observed as we move from the head to the mouth along the Llobregat river. Outstandingly, the Gavarresa stream site (Point H, in the middle course) and the final section of the river (Point P) were the sampling sites where the different types of DOM sources were at higher contributions. Significant differences in the DOM sources contributions were also observed during the three monitoring campaigns performed. An additional interest of this work has been the confirmation of the application of the trilinearity constraint in MCR-ALS chemometric analysis of fluorescence data from surface river water samples to characterize DOM sources.

Finally, the investigation presented in this work about the different types of DOM sources present in the Llobregat river has provided a general method to assess the quality of surface waters of a river basin which can be proposed and implemented as a regular monitoring tool in river water quality assessment studies performed by environmental and water agencies.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

The authors thank the Catalan Water Agency (ACA), and especially to Antoni Munné, for providing the samples for this study. Research grants from the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities (MICIU) and from the Catalan Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR) for projects CTQ2015-66254-C2-1-P and 2017-SGR-753, respectively, are acknowledged by the authors as financial support. M. Marín-García also acknowledges the predoctoral scholarship BES-2016-076678 from MICIU training of doctors grant program.

#### Appendix A. Supplementary Material

Supplementary Material to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104018>.

#### References

- M. Vera, S. Cruz, M.R. Boleda, J. Mesa, J. Martín-Alonso, S. Casas, O. Gibert, J.L. Cortina, Fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis as a dissolved organic monitoring tool to assess treatment performance in drinking water trains, *Sci. Total Environ.* 584 585 (2017) 1212 1220.
- P.G. Coble, Marine optical Biogeochemistry: the chemistry of ocean color, *Chem. Rev.* 107 (2007) 402 418.
- P. Kowalczyk, J. Stoń-Egier, W.J. Cooper, R.F. Whitehead, M.J. Durako, Characterization of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Baltic Sea by excitation emission matrix fluorescence spectroscopy, *Mar. Chem.* 96 (2005) 273 292.
- P.G. Coble, C.E. Del Castillo, B. Avril, Distribution and optical properties of CDOM in the arbian Sea during the 1995 southwest monsoon, *deep Sea Research Part II, Top. Stud. Oceanogr.* 45 (1998) 2195 2223.
- P.G. Coble, C.A. Schultz, K. Mopper, Fluorescence contouring analysis of DOC intercalibration experiment samples: a comparison of techniques, *Mar. Chem.* 41 (1993) 173 178.
- K. Mopper, C.A. Schultz, Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components, *Mar. Chem.* 41 (1993) 229 238.
- P.G. Coble, Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy, *Mar. Chem.* 51 (1996) 325 346.
- A.A.S.C. Machado, J.C.G. Esteves da Silva, Factor analysis of molecular fluorescence data of marine and soil fulvic acids, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 19 (1993) 155 167.
- T. Persson, M. Wedborg, Multivariate evaluation of the fluorescence of aquatic organic matter, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 179 192.
- X. Zhang, R. Marcé, J. Armengol, R. Tauler, Distribution of dissolved organic matter in freshwaters using excitation emission fluorescence and Multivariate Curve Resolution, *Chemosphere* 111 (2014) 120 128.
- M. Bieroza, A. Baker, J. Bridgeman, Classification and calibration of organic matter fluorescence data with multiway analysis methods and artificial neural networks: an operational tool for improved drinking water treatment, *Environmetrics* 22 (2011) 256 270.
- S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Principal component analysis, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37 52.
- P. Geladi, B.R. Kowalski, Partial least-squares regression: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1 17.
- R. Bro, PARAFAC. Tutorial and applications, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149 171.
- K.R. Murphy, C.A. Stedmon, D. Graeber, R. Bro, Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques, PARAFAC, *Anal. Methods* 5 (2013) 6557 6566.
- C. Stedmon, R. Bro, Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial, *Limnol. Oceanogr.* 6 (2008) 572 579.
- C.M. Andersen, R. Bro, Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data, *J. Chemometr.* 17 (2003) 200 215.
- K.R. Murphy, R. Bro, C.A. Stedmon, Chemometric analysis of organic matter fluorescence, in: A. Baker, D.M. Reynolds, J. Lead, P.G. Coble, R.G.M. Spencer (Eds.), *Aquatic Organic Matter Fluorescence*, Cambridge University Press, Cambridge, 2014, pp. 339 375.
- C.A. Stedmon, S. Markager, R. Bro, Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy, *Mar. Chem.* 82 (2003) 239 254.
- Y. Yamashita, R. Jaffé, N. Malé, E. Tanoue, Assessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in coastal environments by excitation emission matrix fluorescence and parallel factor analysis (EEM-PARAFAC), *Limnol. Oceanogr.* 53 (2008) 1900 1908.
- R. Tauler, Multivariate curve resolution applied to second order data, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133 146.
- M.C.G. Antunes, J.C.G. Esteves da Silva, Multivariate curve resolution analysis excitation-emission matrices of fluorescence of humic substances, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 52 59.
- M.C.G. Antunes, C.C.C. Pereira, J.C.G. Esteves da Silva, MCR of the quenching of the EEM of fluorescence of dissolved organic matter by metal ions, *Anal. Chim. Acta* 595 (2007) 9 18.
- J.C.G. Esteves da Silva, M.J.C.G. Tavares, R. Tauler, Multivariate curve resolution of multidimensional excitation-emission quenching matrices of a Laurentian soil fulvic acid, *Chemosphere* 64 (2006) 1939 1948.
- A. de Juan, S.C. Rutan, R. Tauler, D.L. Massart, Comparison between the direct trilinear decomposition and the multivariate curve resolution-alternating least squares methods for the resolution of three-way data sets, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 40 (1998) 19 32.
- A. de Juan, R. Tauler, Comparison of three-way resolution methods for non-trilinear chemical data sets, *J. Chemometr.* 15 (2001) 749 771.
- A.G. García-Reiriz, Parallel factor analysis and multivariate curve resolution as data fusion tools to supervise a stream, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 137 (2014) 120 127.
- M. Alier, M. Felipe, I. Hernández, R. Tauler, Trilinearity and component interaction constraints in the multivariate curve resolution investigation of NO and OS pollution in Barcelona, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2015 2029.
- R. Tauler, I. Marqués, E. Casassas, Multivariate curve resolution applied to three-way trilinear data: study of a spectrofluorimetric acid base titration of salicylic acid at three excitation wavelengths, *J. Chemometr.* 12 (1998) 55 75.
- J. Martín-Alonso, R. Devesa, A. Bernal, I. Matia, Managing an odour episode in Barcelona's water supply: strategies adopted, the causative agent (diacetyl) and determination of its organoleptic properties, *Water Sci. Technol.* 55 (2007) 209 216.
- R. Marcé, J. Honey-Rosés, A. Manzano, L. Moragas, B. Catllar, S. Sabater, The Llobregat river basin: a paradigm of impaired rivers under climate change threats, in: S. Sabater, A. Ginebreda, D. Barceló (Eds.), *The Llobregat: the Story of a Polluted Mediterranean River*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012, pp. 1 26.
- S. Platikanov, D. Baquero, S. González, J. Martín-Alonso, M. Paraira, J.L. Cortina, R. Tauler, Chemometric analysis for river water quality assessment at the intake of drinking water treatment plants, *Sci. Total Environ.* 667 (2019) 552 562.
- A. Ginebreda, C. Barata, D. Barceló, Risk assessment of pollutants in the Llobregat river basin, in: S. Sabater, A. Ginebreda, D. Barceló (Eds.), *The Llobregat: the Story of a Polluted Mediterranean River*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012, pp. 263 295.
- J. Martín-Alonso, Managing resources in an European semi-arid environment: combined use of surface and groundwater for drinking water production in the Barcelona metropolitan area, in: S.A. Hubbs (Ed.), *Riverbank Filtration Hydrology*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2006, pp. 281 298.
- J. Jaumot, A. de Juan, R. Tauler, MCR-ALS GUI 2.0: new features and applications, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 140 (2015) 1 12.
- MATLAB® R2018a Update 6, The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA, 2018.
- R.G. Zepp, W.M. Sheldon, M.A. Moran, Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation emission matrices, *Mar. Chem.* 89 (2004) 15 36.
- R. Tauler, A. de Juan, Chapter 5 - multivariate curve resolution for quantitative analysis, in: A.M. de la Peña, H.C. Goicoechea, G.M. Escandar, A.C. Olivieri (Eds.),

- Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration, Elsevier, 2015, pp. 247–292.
- [39] R. Tauler, M. Maeder, A. de Juan, 2.24 - multiset data analysis: extended multivariate curve resolution, in: T.R.S. Brown, R. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 473–505.
- [40] S.C. Rutan, A. de Juan, R. Tauler, 2.15 - Introduction to Multivariate Curve Resolution, *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 249–259.
- [41] M. Marín-García, G. Ioelle, H. Franquet-Griell, S. Lacorte, G. Ragno, R. Tauler, Investigation of the photodegradation profile of tamoxifen using spectroscopic and chromatographic analysis and multivariate curve resolution, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 174 (2018) 128–141.
- [42] A. de Juan, R. Tauler, Chapter 8 - data fusion by multivariate curve resolution, in: M. Cocchi (Ed.), *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier, 2019, pp. 205–233.
- [43] R. Tauler, A. de Juan, *Multivariate Curve Resolution for Quantitative Analysis, Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration*, 2015, pp. 247–292.
- [44] R. Tauler, A. Smilde, B. Kowalski, Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution, *J. Chemometr.* 9 (1995) 31–58.
- [45] R. Tauler, M. Maeder, 2.20 - two-way data analysis: multivariate curve resolution error in curve resolution, in: T.R.S. Brown, R. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 345–363.
- [46] G.H. Golub, C.F. Van Loan, *Matrix Computations*, second ed., The John Hopkins University Press, London, 1989.
- [47] A. de Juan, S.C. Rutan, R. Tauler, 2.19 - two-way data analysis: multivariate curve resolution - iterative resolution methods, in: T.R.S. Brown, R. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 325–344.
- [48] A. de Juan, R. Tauler, Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 195–210.
- [49] W. Windig, S. Markel, Simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis of FTIR microscopy data, *J. Mol. Struct.* 292 (1993) 161–170.
- [50] P.G. Coble, R.G.M. Spencer, A. Baker, D.M. Reynolds, Aquatic organic matter fluorescence, in: A. Baker, D.M. Reynolds, J. Lead, P.G. Coble, R.G.M. Spencer (Eds.), *Aquatic Organic Matter Fluorescence*, Cambridge University Press, Cambridge, 2014, pp. 75–122.
- [51] W. Chen, P. Westerhoff, J.A. Leenheer, K. Booksh, Fluorescence Excitation–Emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 5701–5710.





**MATERIAL SUPLEMENTARI ARTICLE III: MATÈRIA ORGÀNICA DISSOLTA (DOM)**

Marín-García, M.; Tauler, R. (2020). Chemometrics characterization of The Llobregat river dissolved organic matter.

*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 201, 104018.

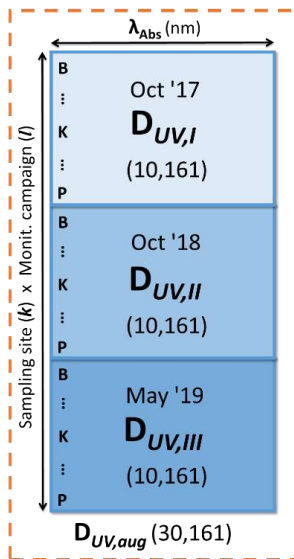
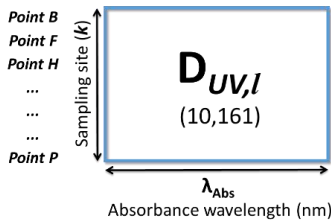
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104018>



**Figure S1**

Matrix arrangement of the different data sets obtained in the characterization of the Llobregat river surface water samples by UV absorbance and excitation-emission fluorescence spectroscopies and analyzed by MCR-ALS afterward.

**UV-Vis. spectrophotometric data matrix**



**EEM spectrofluorometric data matrix**

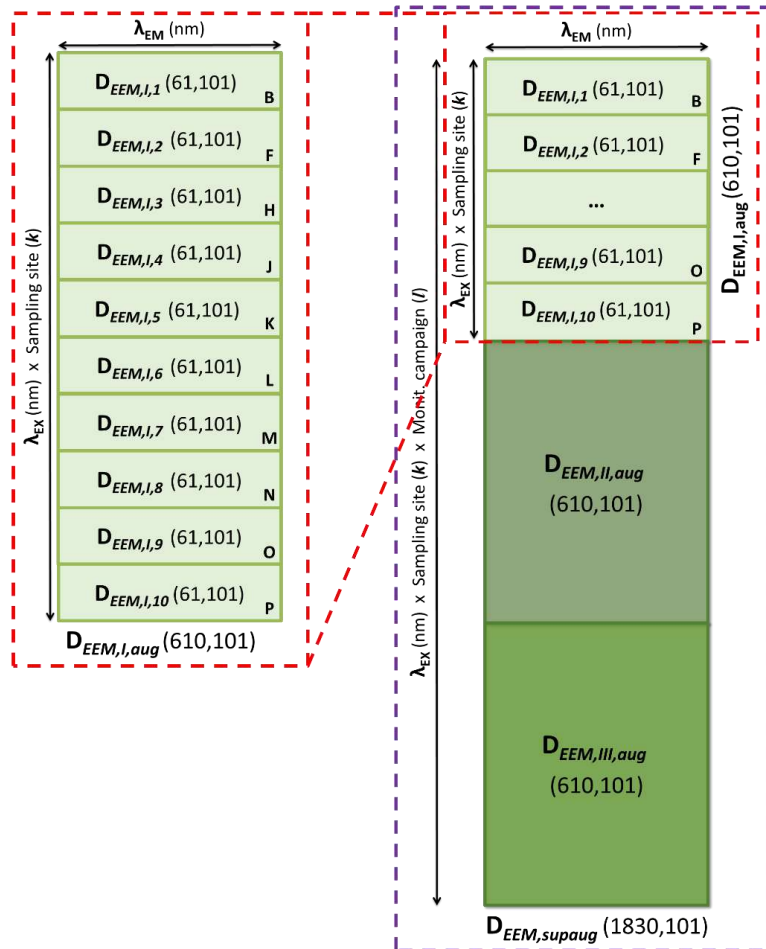
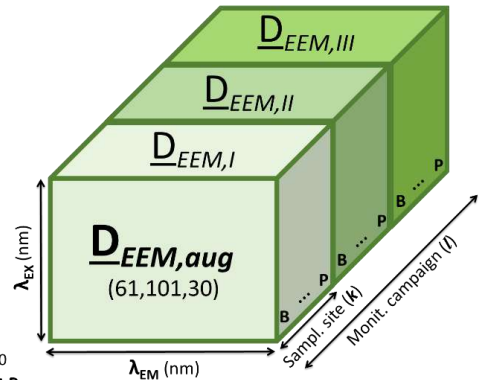
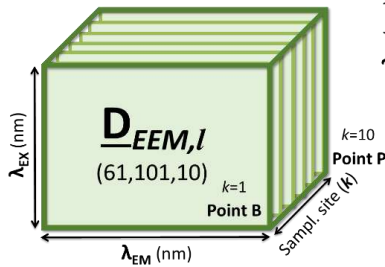
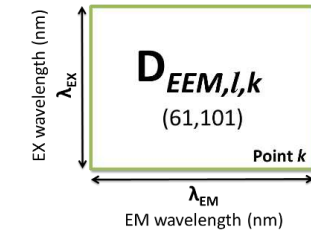


Figure S2

Example of the fluorescence scattering correction. Rayleigh and Raman scattering peaks were eliminated using the method described in Ref. [37] to improve the quality of the EEM spectral data.

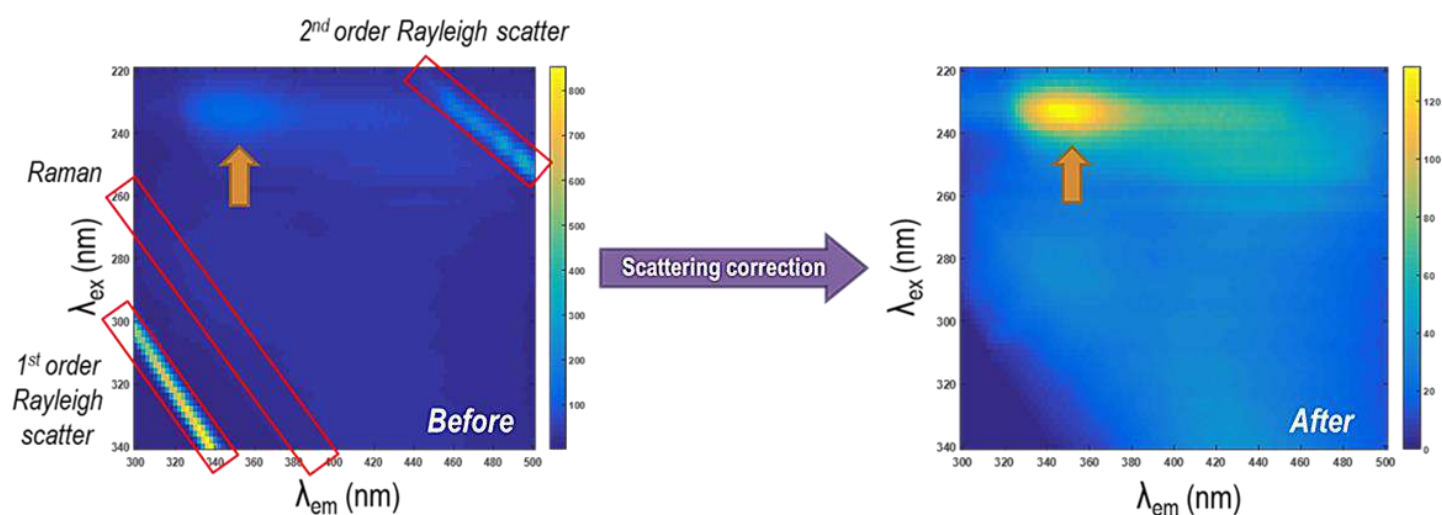


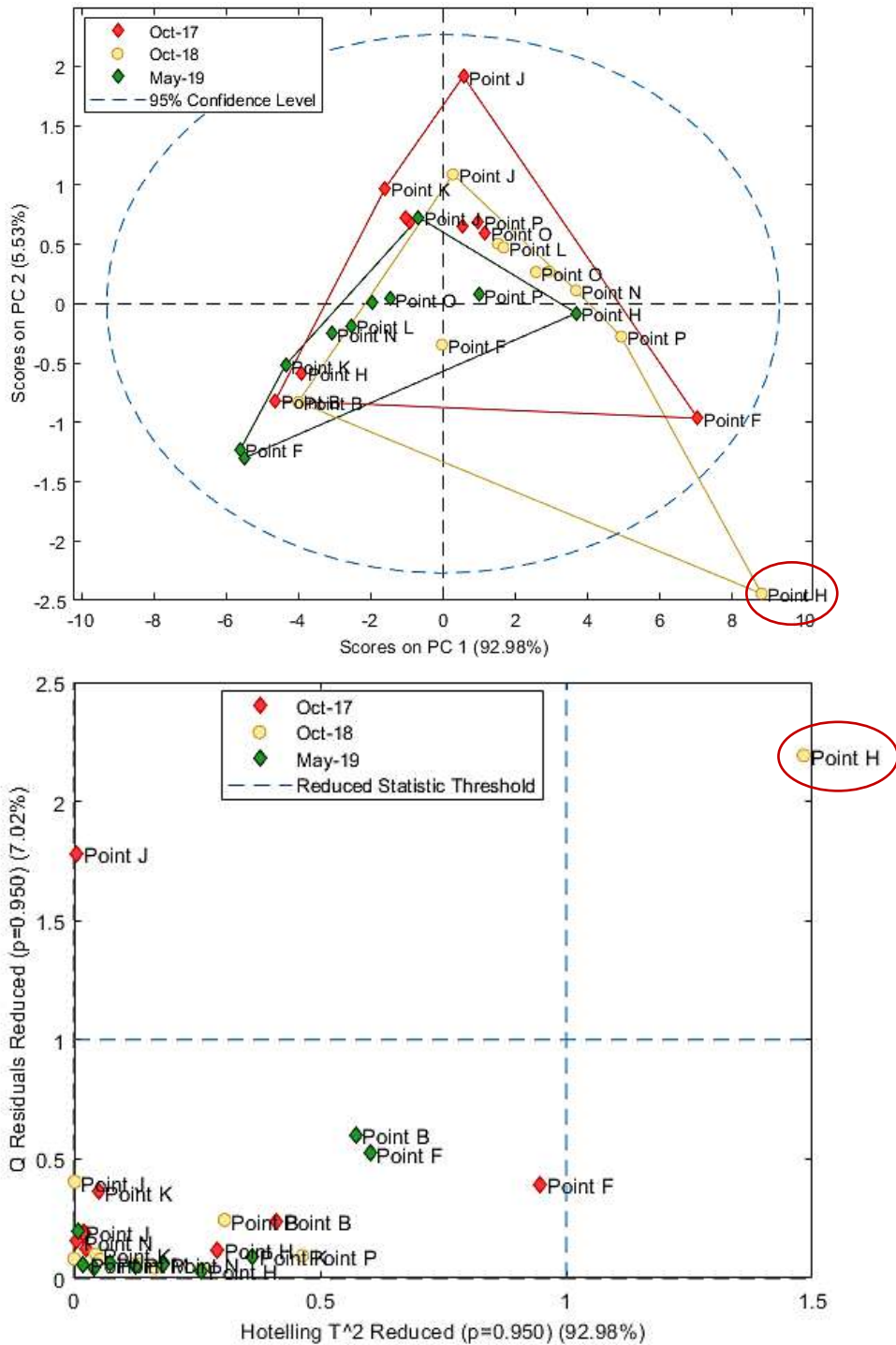
Figure S3

MCR models for the analysis of the different data sets obtained in the EEM analysis of the Llobregat river surface water samples: **a)** MCR bilinear model of the EEM data matrix acquired from one single water sample in a specific river sampling site and campaign ( $\mathbf{D}_{EEM,l,k}$  data matrix), **b)** Extension of the MCR bilinear model to the simultaneous analysis of the set of EEM data matrices obtained in the different river sites in a single monitoring campaign ( $\mathbf{D}_{EEM,l,aug}$  augmented data matrix), **c)** Extension of the MCR bilinear model to the simultaneous analysis of the set of EEM data matrices obtained in the different river sites at multiple monitoring campaigns ( $\mathbf{D}_{EEM,supaug}$  (super)augmented data matrix), and **d)** Implementation of the trilinear constraint during the MCR bilinear decomposition model of the data set in c), showing how  $\mathbf{S}_{ex}$  (excitation spectra) and  $\mathbf{C}_{l,k}$  (relative concentration) factor matrices are obtained at each ALS iteration (see section 3.2).



Figure S4

Scores (upper) and Q residuals vs. Hotelling  $T^2$  (below) plots of the PCA results obtained from the UV spectrophotometric data acquired in the analysis of the Llobregat river water samples at the different sampling sites and monitoring campaigns ( $D_{UV,aug}$  matrix). The Gavarresa stream (Point H) water sample belonging to the Oct-18 campaign (yellow) shows a different behavior from the rest of the water samples collected.



**Figure S5**

Excitation and emission fluorescence spectra of the different MCR-ALS resolved components ( $S_{ex}$  and  $S_{em}^T$  matrices). Individual explained variances (in %), wavelengths at excitation and emission band maxima and the assigned type of DOM source are also given for each of them.

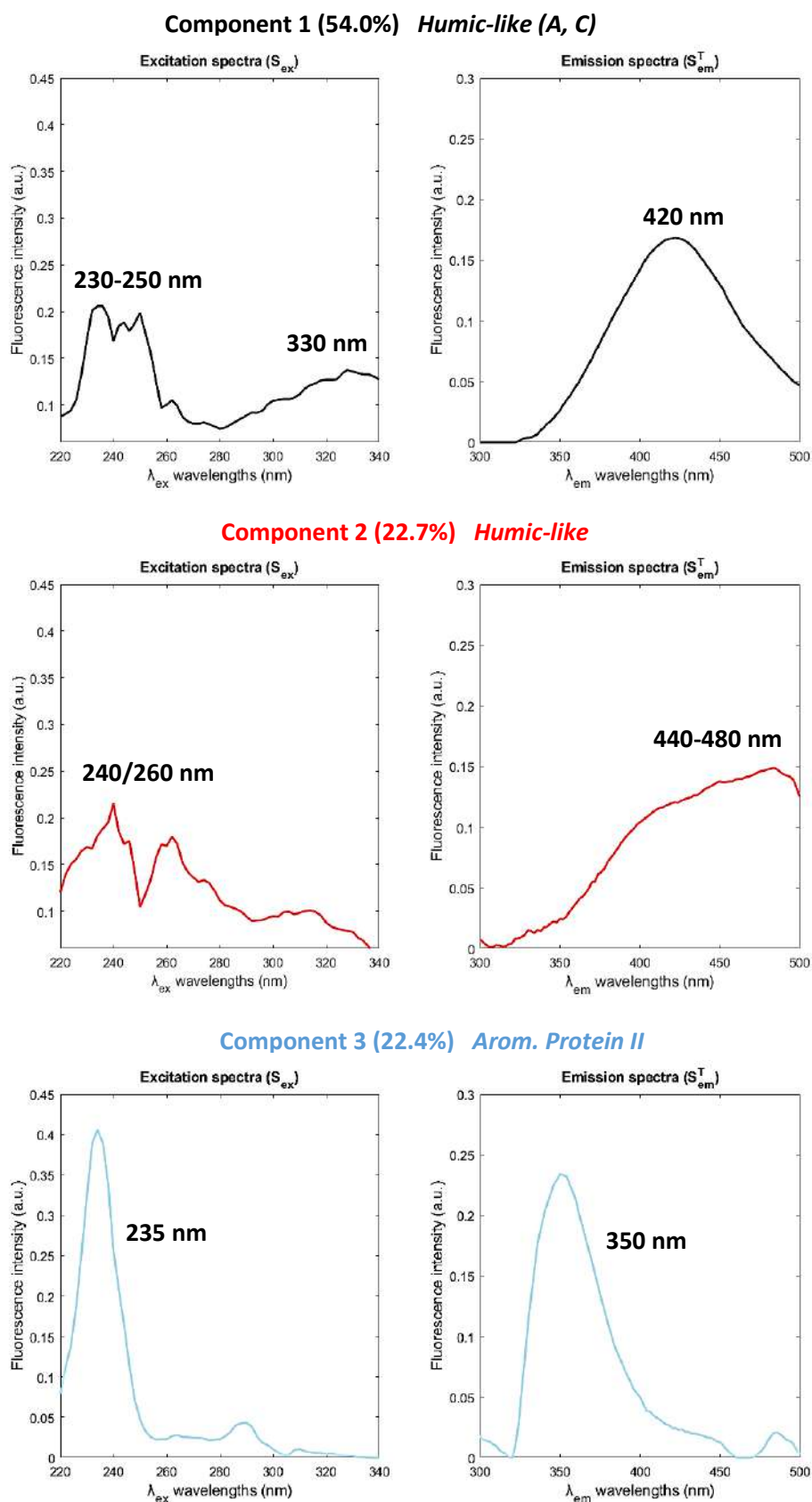
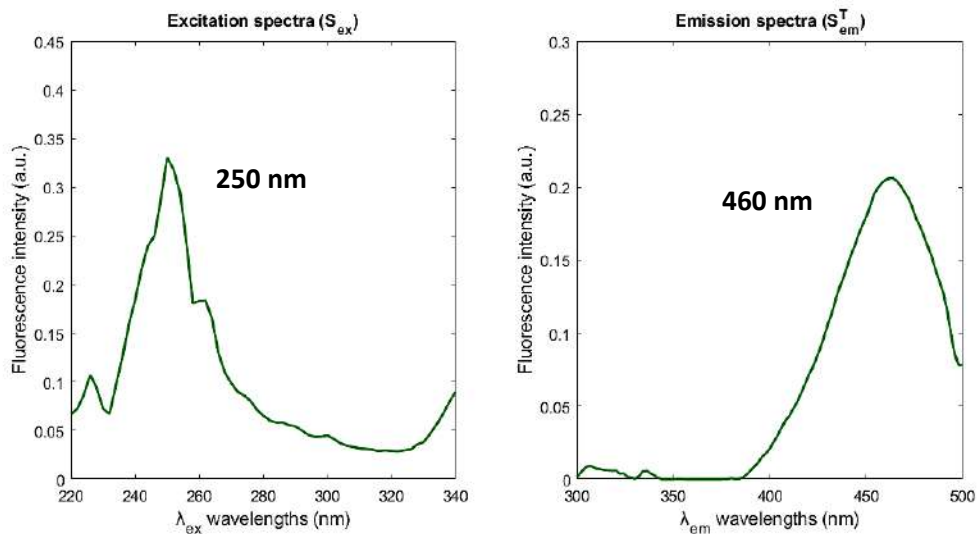


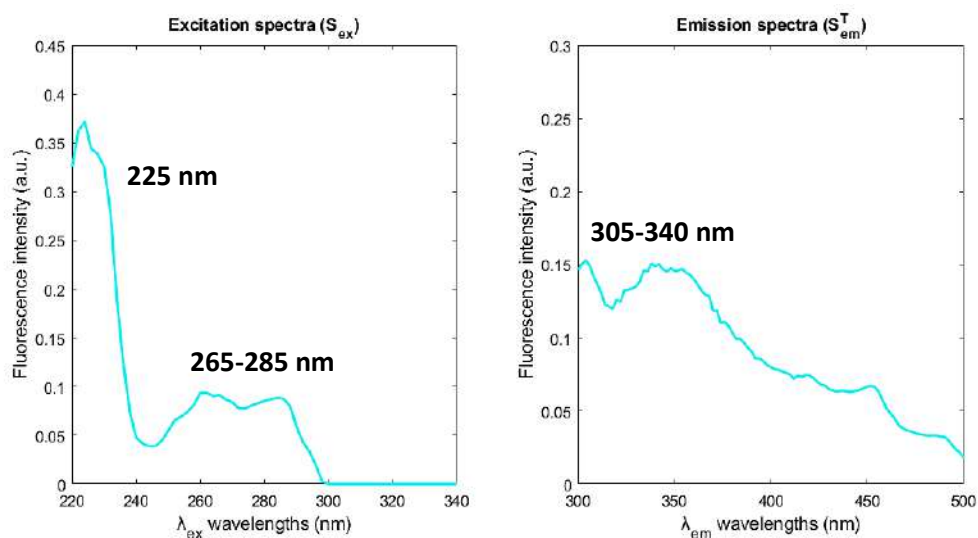


Figure S5 (cont.)

**Component 4 (15.8%) Fulvic-like**



**Component 5 (13.7%) Protein-like (Tyr, B)**



**Component 6 (12.1%) Arom. Protein I**

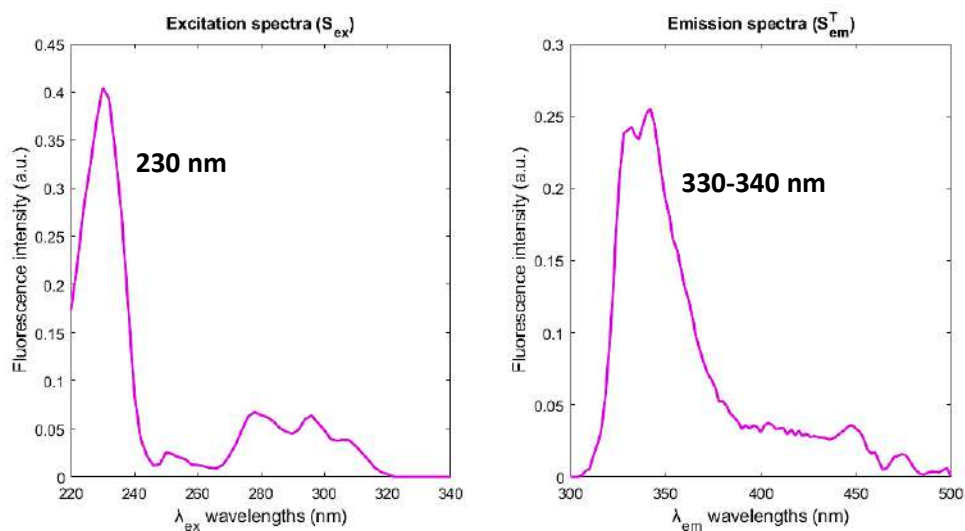
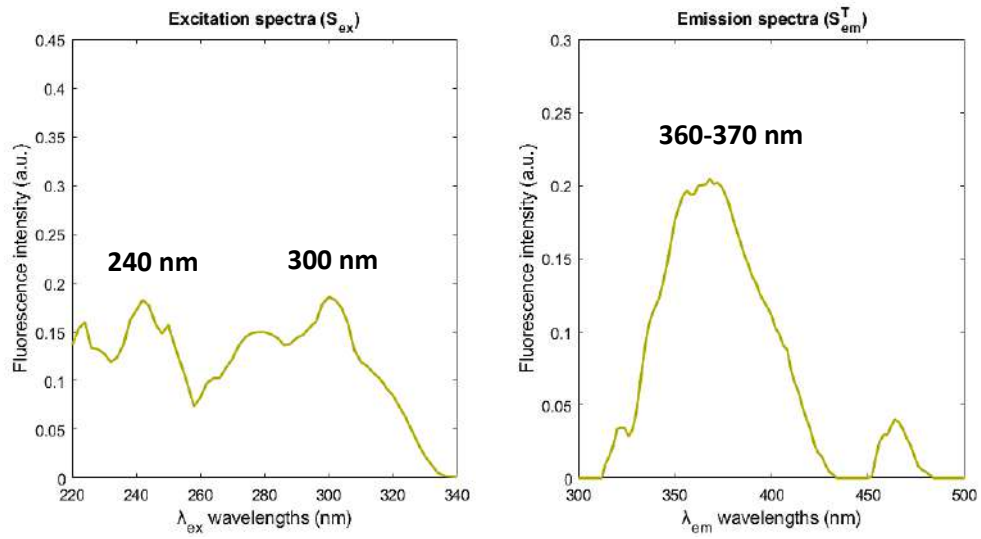


Figure S5 (cont.)

**Component 7 (11.8%) *Microbial by-product***



**Component 8 (7.7%) *Protein-like (Trp, T)***

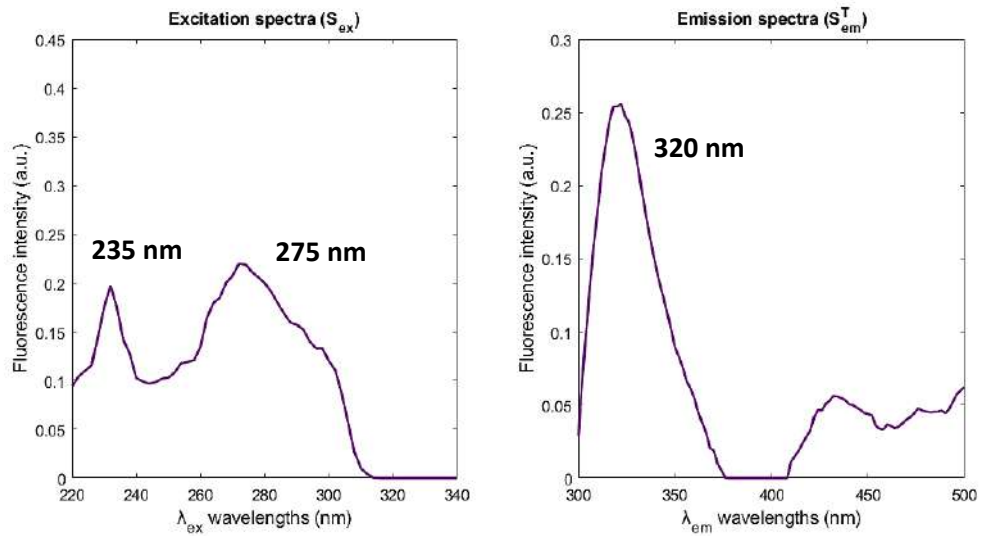


Figure S6

Pie chart plots showing the different DOM contribution sources during the three monitoring campaigns (Oct-17, Oct-18 and May-19) for different sampling sites of the Llobregat river analyzed in this work, except for the headwaters (Point B), the Gavarresa stream (Point H) and the river mouth (Point P) stations, which are given separately in Fig. 4 of the manuscript.

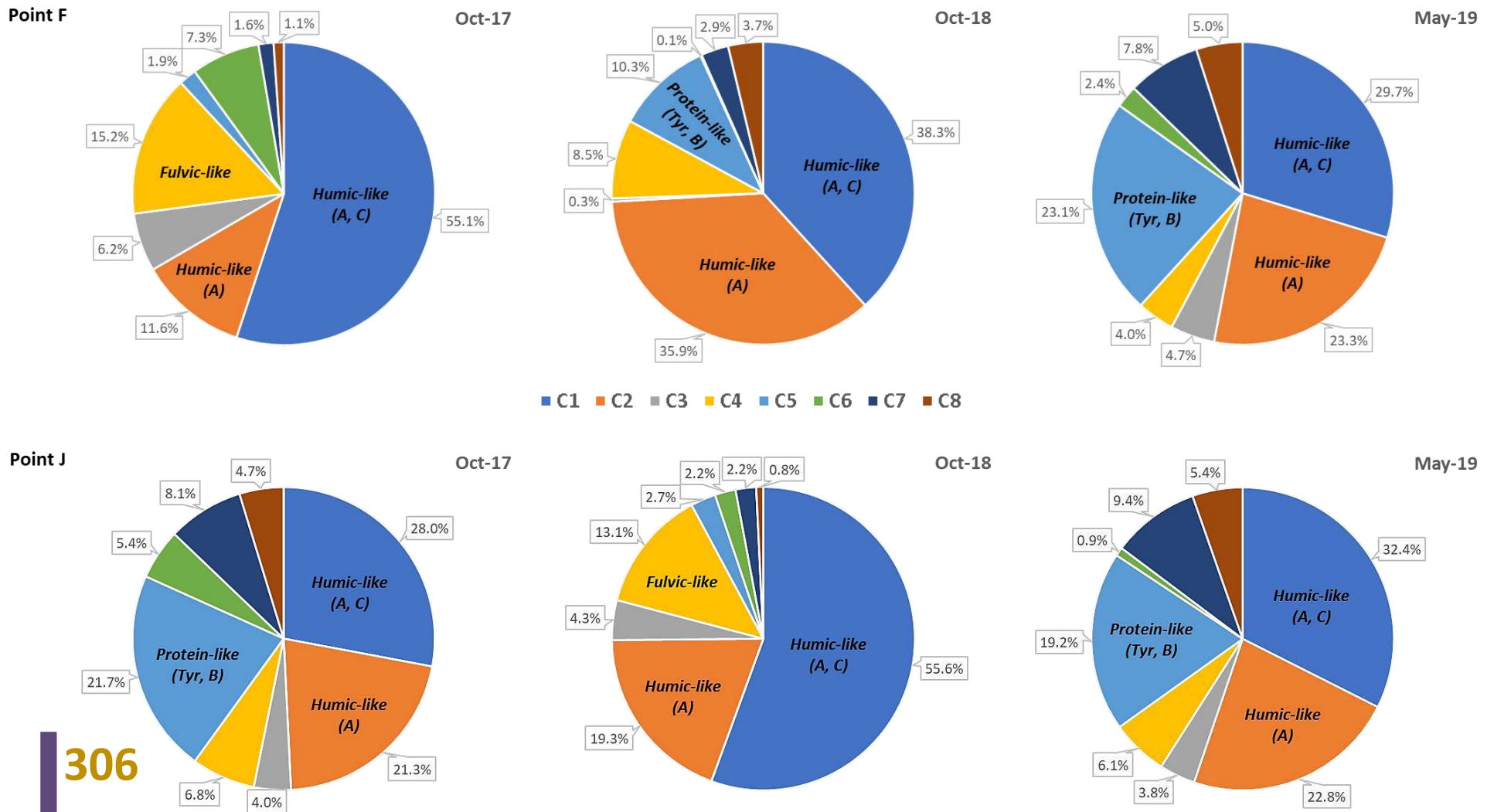


Figure S6 (cont.)

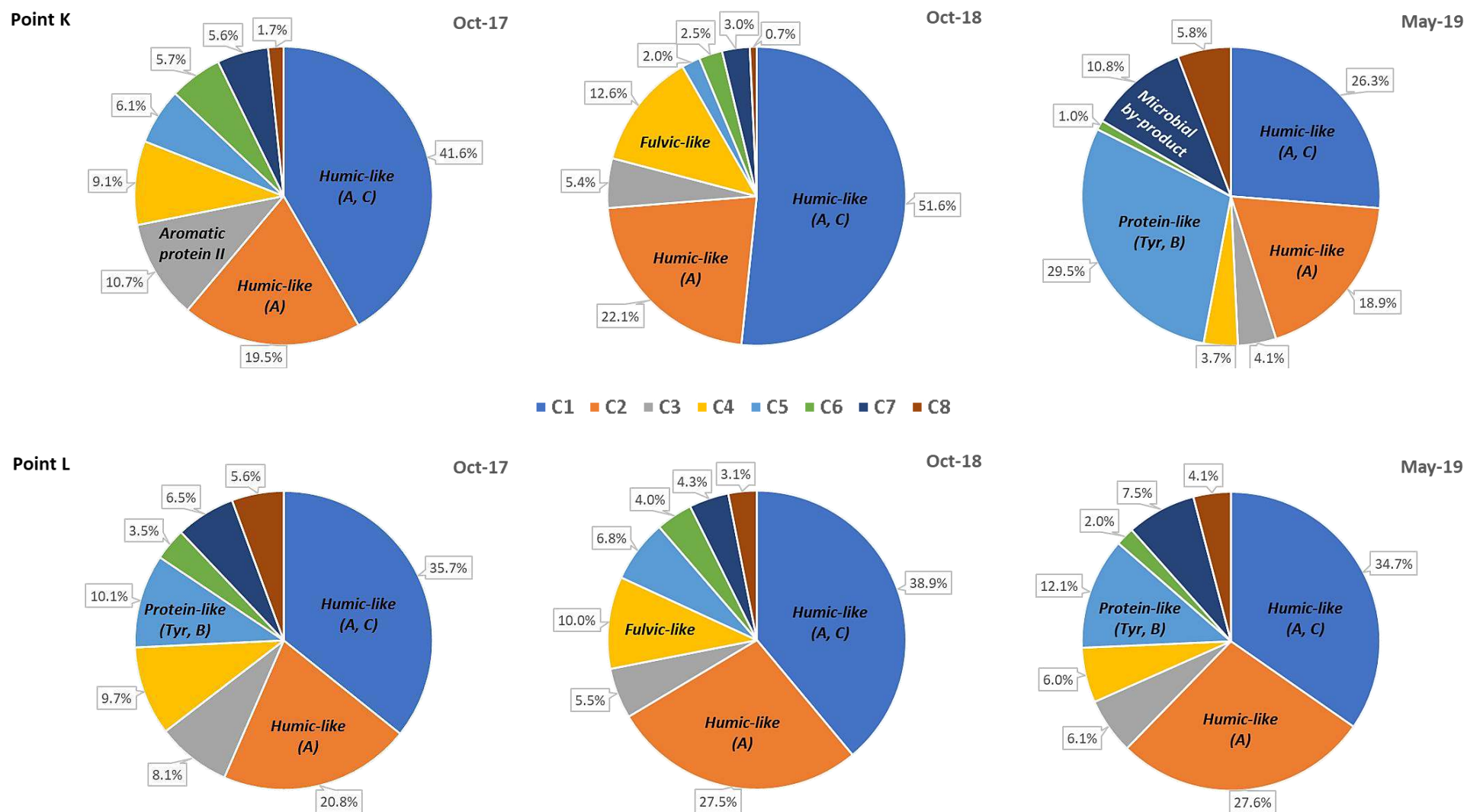


Figure S6 (cont.)

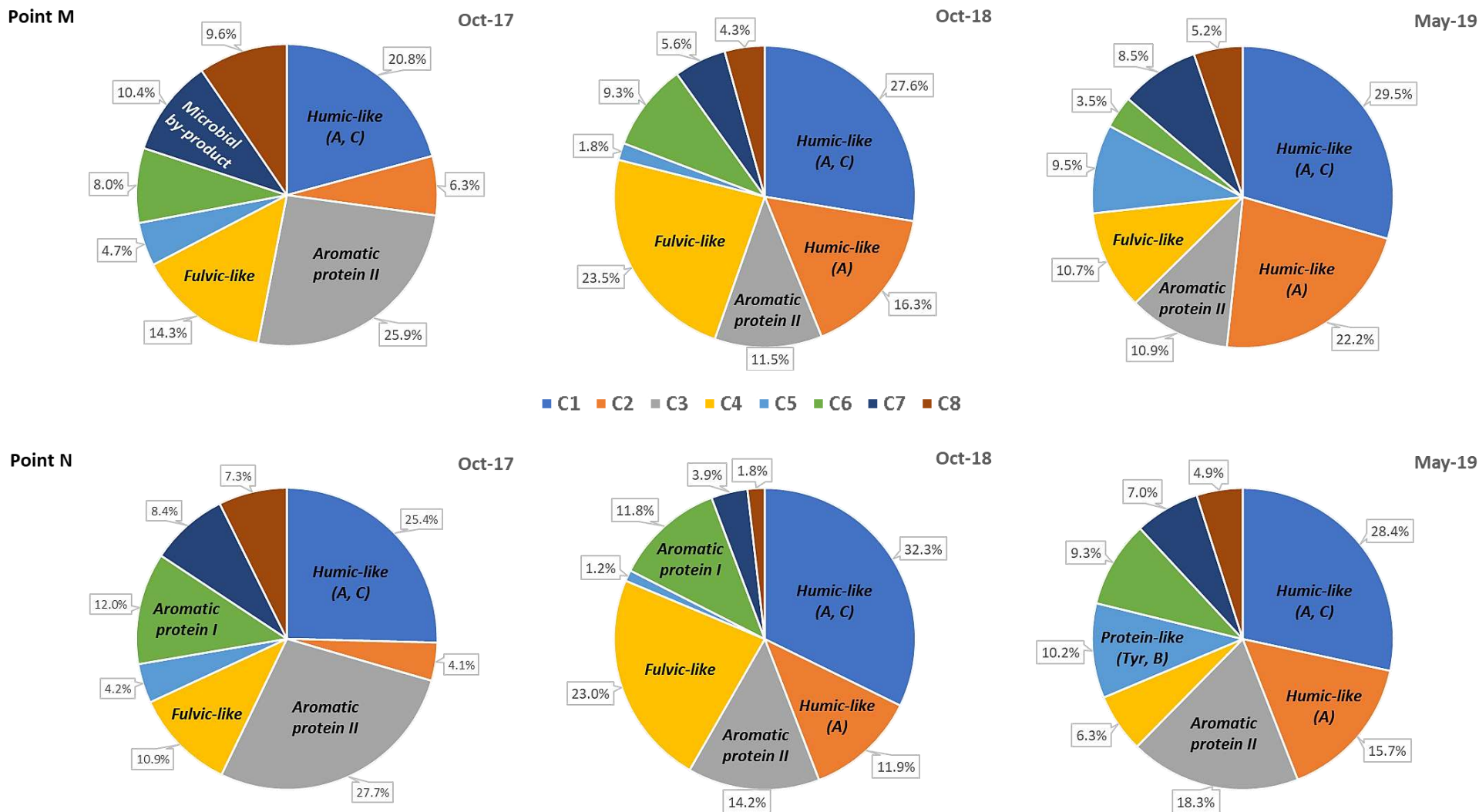
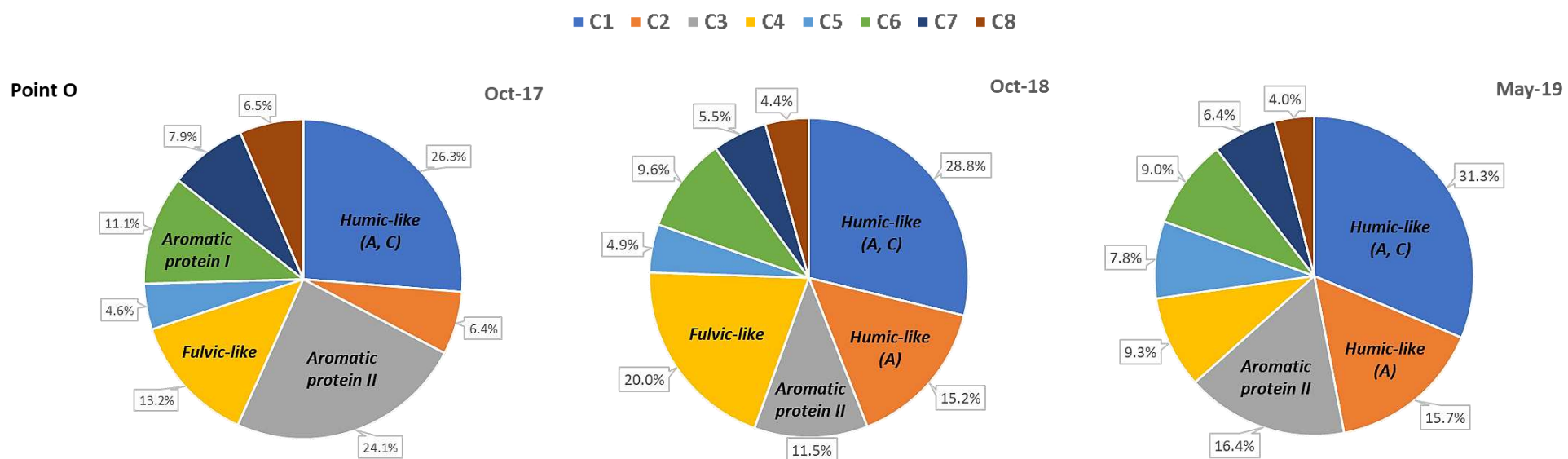


Figure S6 (cont.)







---

# CAPÍTOL 6

# CONCLUSIONS

---





To summarize the work done in this Thesis, a series of conclusions can be drawn for each of the studies carried out, which are detailed below. As a general conclusion, it can be stated that the proposed methodology of experimental monitoring and data processing based on the application of the MCR-ALS chemometric method has made possible the investigation of the studied systems with good results. Thus, on the one hand, the proposed methodology has allowed to estimate the concentration profiles and the pure spectra of the different transformation products formed during the photodegradation processes of the studied drugs, enabling their further identification. On the other hand, the proposed methodology has also permitted the evaluation of the change in the quality of the surface waters of the Llobregat river depending on the variation in the composition of organic matter present along the river basin during different environmental sampling campaigns. In this latter case, the different DOM fractions causing this variation were also identified.

## 6.1 PHOTODEGRADATION OF TAMOXIFEN (TMX)

This study has been divided into three main parts. Each one has its own conclusions, which are shown below. As a general conclusion it can be said that tamoxifen (TAM) photodegrades quickly in water with UV light irradiation (at irradiation power 400 and 850 W·m<sup>-2</sup>) and involves five different photoproducts with different kinetic profiles. Identification of the photoproducts could be performed in agreement with previous results from the literature.

- 1) Firstly, regarding the UV-Visible spectroscopic monitoring experiment of the photodegradation of TAM under UV-light the following conclusions can be drawn:
  - An overview of the kinetic process was obtained by MCR-ALS analysis of the collected data. The obtained results provided an accurate description of the chemical system, with the contribution of 4 different chemicals species (**blue**, **green**, **red**, and **cyan**, as shown in **Figura 50**). For every resolved component, its pure UV absorption spectrum and its kinetic profile was obtained.
  - The **blue component** is the initial tamoxifen. The **green component** is a first degradation photoproduct that is formed very quickly. Finally, the **red** and **cyan** components are two isomeric degradation photoproducts simultaneously formed.

- The results of this experiment showed that the observed chemical transformations take place mostly during the first 80 minutes of the degradation process (either using 400 or 850 W·m<sup>-2</sup> irradiation power condition). MCR-ALS resolved kinetic profiles have shown what reaction times would be appropriate to remove sample aliquots to be analyzed by HPLC-DAD-MS.
  - The results of the experiment show how much time was needed to completely degrade tamoxifen and its isomer, approximately 100 min.
  - Kinetic monitoring of the photodegradation process of tamoxifen by UV-Visible spectroscopy gives a rough description of the evolution of the reaction system. Photoproducts kinetically evolving similarly (same kinetic profile) could not be distinguished from each other only by UV-Visible spectroscopy, and they appeared to be a single contribution, like in **red** and **cyan** components contributions. This situation is related to MCR rank deficiency and ambiguity problems, common in kinetic studies (linear dependencies of kinetic profiles), which can be resolved with proper analysis of data matrix augmentation arrangements.
- 2) Secondly, the main conclusions from the liquid chromatography (HPLC-DAD) analysis of sample aliquots removed from the photoreaction vessel are:
- Data analysis using the MCR-ALS method gave a model with a total number of 5 species that includes the initial product tamoxifen ((*Z*)-isomer, **blue**), its isomer ((*E*)-TAM, **green**) and three photoproducts (**red**, **magenta**, and **yellow**) formed from the two isomers of tamoxifen. Pure spectra and elution profiles of all these components were obtained.
  - LC-DAD analysis provided more accurate results than direct spectrophotometry about the chemical speciation and identification of the photoproducts formed during the degradation of tamoxifen, due to their chromatographic separation. LC-DAD allows for a better resolution of the involved compounds, even if they give similar kinetic or spectra profiles. This allowed distinguishing between the **magenta** and **yellow** compounds (**red** and **cyan** components contributions in the previous UV-Visible spectroscopic monitoring experiments).
  - Time ranges of chemical transformation agree with results obtained in UV-absorption spectroscopic experiments. Hence, TAM degrades approximately at 80 min of light irradiation and photoproducts emerge and decay during this time.

- MCR-ALS analysis of HPLC-DAD results gave information about the kinetic evolution of each photoproduct during the degradation process through the plot of the evolution of the peak areas of the resolved elution profiles as a function of the process time. According to hard-modelling curve fitting approximations of these profiles, the system showed a typical kinetic evolution of parallel and consecutive reactions.
  - The photodegradation pathway proposed describing the photodegradation of tamoxifen was compared with the results obtained in previous literature. The photoproducts identified in both cases did agree with these previous literature results.
  - Simultaneous analysis of multiset data (column-wise augmented matrix  $\mathbf{D}_{1-k, \text{aug}}$ ), when the data from the kinetic monitoring of the photodegradation process by UV-Visible spectroscopy were simultaneously analyzed with the HPLC-DAD data, provided a better resolution of the species formed during the photodegradation process and of its concentration/kinetic profiles.
- 3) Thirdly, from the identification by mass spectrometry (MS) of the photoproducts of TAM:
- LC-DAD coupled with QqQ-MS in tandem allowed the analysis of the photoproducts by mass spectroscopy. MCR-ALS analyses have been performed using a row- and column-wise augmented matrix ( $\mathbf{D}_{1-k, \text{supaug}}$ ) for each irradiation power condition.
  - A model with a total number of 5 species has been achieved because of these MCR-ALS analyses. The species formed are the original drug tamoxifen ((Z)-isomer, **blue**), its isomer ((E)-TAM, **green**), phenanthrene I (**magenta**) and phenanthrene II (**yellow**), and a benzophenone derivate (**red**).
  - Partial fragmentation of the different products using high cone voltage confirmed the proposed structures. Also, wavelengths of the absorption band peak maxima were assigned to the different photoproducts. A final table with the summary of these results is given below.
- 4) Finally, from the study of the drug degradation process using fluorescence spectroscopy as an additional monitoring methodology, it can be concluded that:

- The proposed degradation pathway is confirmed as in this new study performed; the evolution of the species detected was very similar to the previously described above.
- As complementary information, in the analysis of the LC-DAD-FLD data, the emission spectra for the different components detected were obtained. Their emission bands are summarized in the results table below. The fluorescence response of Phenanthrene I (**magenta**) is up to three times greater than that of Phenanthrene II (**yellow**). These results are consistent with those obtained in previous studies.

In conclusion, the photodegradation pathway of TAM showed a first photoisomerization of the drug followed by a photocyclization reaction of both isomers. An additional photoproduct can be formed when the isomers are excited by UV-light in presence of oxygen through a photooxygenation reaction. No evidence of a different photodegradation pathway was observed when a higher irradiation power was selected, only an increase in the degradation rate was detected. In fact, the longer the exposure to UV radiation of (**Z**-TAM, the more **Phenanthrene II** is found in the reaction mixture. This indicates that one of the degradation pathways of the drug (the (**Z**-TAM → (**E**-TAM → **Phenanthrene II** pathway) is more favored than the other ((**Z**-TAM → **Phenanthrene I** pathway).

MCR-ALS method was able to resolve the mixture of products formed during the photodegradation reaction despite their incomplete chromatographic separation at isocratic conditions. The simultaneous analysis of fused DAD-MS and of DAD-FLD data using these two different instrumental techniques provided a better resolution of the species formed during the photodegradation process than using a single technique. Due to slightly shifted chromatographic elution times, to the minor differences in UV-VIS spectra, and to the different m/z fragmentation ratio patterns and fluorescence band maxima, isomeric compounds ((**Z**-TAM and (**E**-TAM, and **Phenanthrene I** and **II**, respectively) could be finally correctly separated and identified.

Photoproduct Name	Absorbance band (nm)	Fluorescence band (nm)	ESI (+) (m/z)
(Z)-TAM	238, 277 with tail over 310 nm	385 nm	[M+H] <sup>+</sup> 372
(E)-TAM	277 nm without tail over 310 nm	372 nm	Frag. 72
<i>Benzophenone derivate</i>	220 and 280 nm	368 nm	[M+H] <sup>+</sup> 270 Frag. 213, 105 and 72
Phenanthrene I	255, 280 and over 300	380 nm	[M+H] <sup>+</sup> 370 Frag. 356, 72 and 58
Phenanthrene II	255, 300 and atypical form around 230	370 nm	[M+H] <sup>+</sup> 370 Frag. 72

## 6.2 PHOTODEGRADATION OF SULFAMETHOXAZOLE (SMX)

In this case, the study of the photodegradation of SMX was divided into four main parts. Each one, as in the case of TAM, has its own conclusions, which are detailed below. As a general conclusion it can be said that sulfamethoxazole (SMX) photodegrades rather quickly in water with UV light irradiation (in approximately 30-40 min) but that the pH of the sample solution plays an important role in its photodegradation reaction rate. This photodegradation involves five different photoproducts with different kinetic profiles. Identification of the photoproducts could be performed in agreement with previous results from the literature.

1) Firstly, regarding the UV spectroscopic monitoring of the acid-base titration:

- An overview of the acid-base titration process was obtained by MCR-ALS analysis of the data collected. The obtained results provided the description of the chemical system, with the contribution of 3 different acid-base species (**blue**, **green**, **red**). For every resolved component, its pure UV absorption spectrum and its acid-base distribution profile was obtained. Last two acid-base species were the relevant from an environmental point of view, as SMX will be present in surface and river waters in these forms, according to the usual pH of these media.
- **Blue** component was assigned to the **cationic form** of SMX ( $[\text{SMX}]^+$ ), **green** one to the **non-charged species**, and **red** one to the **anionic form** of SMX ( $[\text{SMX}]^-$ ). For each component, UV absorption maxima and pH range of presence was summarized in the table below.

- Curve fitting by hard-modelling approaches of the distribution profiles according to dipròtic acid equilibrium equations, allowed to obtain an estimation of  $pK_a$  values, which resulted to be very similar to those previously tabulate for this drug.
  - Thus, it was found that depending on the initial pH of the sample solution, the initial SMX species were different and, therefore, in the photodegradation experiments where two different types of water have been used as solvent (MilliQ and DW, which have a different pH each), degradation begins with two different acid-base forms of SMX: non-charged (**green**) and anionic (**red**) ones.
- 2) Secondly, regarding the UV spectroscopic monitoring experiment of the photodegradation of SMX under UV-light:
- Apart from the two initial SMX species, the SMX (**green**) i  $[SMX]^-$  (**red**) components, respectively, five different photoproducts were detected. The resolved UV-Vis spectral bands of all these species are fully described in the summary table below.
  - The kinetic profiles solved by MCR-ALS were adjusted by curve fitting to partially follow a model of sequential and/or parallel reactions of pseudo-first order, a model like the postulated in previous studies for this drug, giving good fitting results. This kinetic model, however, could not be described by a specific reaction mechanism for all the species involved in the photodegradation process.
  - The rate of the photodegradation reaction is quite different depending on the initial pH of the sample solutions used. The more acidic solution degraded faster than the solution where the basic species was predominant. These results agree with those previously found in other studies. In both cases, however, the SMX species had disappeared within 30 minutes of irradiation.
  - Kinetic monitoring of the photodegradation process of SMX by UV-Visible spectroscopy gave a rough description of the evolution of the reaction system. However, photoproducts kinetically evolving similarly (same kinetic profile) could not be distinguished only by UV-Visible spectroscopy from each other, due to the total overlap (lack of selectivity) of these profiles, and appeared to be a single contribution, due to rank deficiency problems.

3) Thirdly, the main conclusions from the liquid chromatography (HPLC-DAD) analysis of the different sample aliquots of SMX-MQ removed from the photoreaction vessel are:

- Data analysis using the MCR-ALS method gave a model with a total number of 7 species, of which 6 have chemical significance: SMX (**green**), conformational isomer (**blue**), and four photoproducts (**magenta**, **black**, **light green**, and **orange**). Pure UV spectra and elution profiles of these components were obtained.
- LC-DAD analysis provided more accurate results about the chemical speciation and identification of the photoproducts formed than the direct spectrophotometric monitoring, due to the chromatographic separation. LC-DAD allows for a better resolution of the involved compounds, even if they have similar kinetic or spectra profiles.
- Trilinearity/equal shape MCR-ALS constraints, which were applied during ALS optimization, allowed to directly get the information about the relative concentrations of 4 of the 6 resolved components: **SMX**, **isomer**, **magenta** and **light green**. It could not be applied to the other 2 species, because they had poorly reproducible elution profiles. The application of this constraint reduces and even eliminates the existing ambiguities in the MCR-ALS resolutions obtained.
- Plotting of the evolution of these concentration profiles as a function of the process time gave information about the kinetics of each photoproduct during the degradation process.

4) Finally, from the identification of the different transformation products by mass spectrometry (MS):

- A good model with a total number of 6 species was obtained from this MCR-ALS analysis.
- Simultaneous analysis of fused data DAD-MS provided an improved characterization and identification of the species formed during the photodegradation process, which are summarized in the table below.



## CAPÍTOL 6

MCR-ALS Component	Explained variance (%) <sup>a</sup>	Identified compound	pH/Exp. Reaction time range (min)	Exp. retention time ( $t_R$ , min)	Exp. $\lambda_{max}$ (nm)	Exp. m/z	Molecular formula
1 ( <b>AB1</b> )	<1	[SMX] <sup>+</sup>	From pH 1 to pH 4	–	266	–	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
2 ( <b>AB2</b> )	49.1	SMX	From pH 1 to pH 8	8.47	268	92, 99, 108, 147, 156, 161, 254 [M+H] <sup>+</sup> , 276 [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
3 ( <b>AB3</b> )	11.8	[SMX] <sup>-</sup>	From pH 4 to pH 11	–	257	–	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
4 ( <b>Isomer</b> )	5.6	Conformational isomer	<i>Kin</i> : 1 – 30 min <i>LC</i> : 1 – 46 min	2.70	242, 254	92, 99, 108, 147, 156, 254 [M+H] <sup>+</sup> , 276 [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
5 ( <b>TP1</b> )	3.6	3A5M	<i>Kin</i> : 1 – 150 min <i>LC</i> : 1 – 68 min	2.19	210	56, 72, 99 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O
6 ( <b>TP2</b> )	<1	Acetyl-SMX	<i>Kin</i> : 40 – 150 min <i>LC</i> : 1 – 20 min	7.04	210, 257, 273	72, 92, 99, 108, 147, 172, 221, 238, 296 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S
7 ( <b>TP3</b> )	1.5	Unknown	<i>Kin</i> : 1 – 150 min <i>LC</i> : 1 – 68 min	4.47	210, 265, 375	No MS spectrum in ESI <sup>+</sup>	–
8 ( <b>TP4</b> )	17.8	4APS structure (SA)	<i>Kin</i> : 1 – 150 min <i>LC</i> : 3 – 68 min	1.86	260	92, 108, 140, 156 [M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 174 [M+H] <sup>+</sup>	[C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> S] <sup>+</sup> (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S)

<sup>a</sup> MCR-ALS explained data variance ( $R^2$ ) considering all eight components simultaneously is 97.8%, and the lack of fit (lof) is 14.9% (see **Equations 6** and **7**).

**SMX**: sulfamethoxazole; **3A5M**: 3-amino-5-methylisoxazole; **Acetyl-SMX**: N<sup>4</sup>-acetyl-sulfamethoxazole; **4APS**: 4-Aminophenylsulfonyl structure; **SA**: sulfanilamide.

AB<sub>n</sub> refers to the SMX acid-base species, n=1, 2, or 3; TP<sub>n</sub> denotes the SMX transformation products; *Kin* and *LC* refer to the time range of occurrence according to the kinetic study and the chromatographic analysis, respectively.

### 6.3 CHARACTERIZATION OF DISSOLVED ORGANIC MATTER (DOM) FROM THE LLOBREGAT RIVER

In this latter section of the Thesis, the proposed MCR-ALS chemometric methodology allowed the extraction of valuable information on the compositional changes of the fractions of the CDOM, and of their distribution along the different water sampling sites in the Llobregat river basin, during three different monitoring campaigns. Thus, the chemometric analysis of excitation-emission fluorescence data (excitation-emission matrix, EEM) obtained in this investigation has proved the potential use of the MCR-ALS method, especially when the trilinearity constraint was applied to these data. Additionally, PCA analysis performed to the spectrophotometric UV-Visible data revealed the similarities and differences among river water samples from the different sampling sites and campaigns. Accordingly, from these analyses the following conclusions can be drawn:

- Eight fluorescent active DOM sources have been detected and characterized, together with their geographical distribution in the basin of the Llobregat river for the different monitoring campaigns. Among them, the *humic*- and *protein-like* types of DOM sources did predominate (see summarized table below).
- A significant increase of the DOM was observed as we move from the head (**Point B**) to the mouth along the Llobregat river. Outstandingly, the Gavarresa stream site (**Point H**, in the middle course) and the final section of the river (**Point P**) are the sampling sites where the different types of DOM sources were at higher contributions.
- Significant differences in the DOM sources contributions were also observed during the three monitoring campaigns performed. The sampling sites mentioned above are the ones that underwent the most substantial change in the DOM fractions between them.
- PCA results showed that variance sources of the three performed monitoring campaigns did not differ significantly, which suggested a similar behavior between river water samples from the different sampling sites and campaigns, except for the Gavarresa stream sampling site (**Point H**), which was considered an outlying influential water sample. This behavior was confirmed with the

fluorescence results, which showed the dissimilarity of this monitoring point over the others.

Consequently, the investigation presented in this work about the different types of DOM sources present in the Llobregat river has provided also a general straightforward procedure to assess the quality of surface waters of a river basin in relation to its organic matter content and it can be proposed and implemented as a simple regular monitoring tool in river water quality assessment and management policies by environmental and governmental water agencies.

Components	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Expl. Variance</i> <sup>1</sup>	54.0%	22.7%	22.4%	15.8%	13.7%	12.1%	11.8%	7.7%
$\lambda_{max}$ <i>Ex</i>	230-250/330 nm	240/260 nm	235 nm	250 nm	225/265-285 nm	230 nm	240/300 nm	235/275 nm
$\lambda_{max}$ <i>Em</i>	420 nm	440-480 nm	350 nm	460 nm	305/340 nm	330-340 nm	360-370 nm	320 nm
<i>DOM type assignment</i>	<b>Humic-like (A, C)</b>	<b>Humic-like (A)</b>	<b>Aromatic protein II</b>	<b>Fulvic-like</b>	<b>Protein-like (Tyr, B)</b>	<b>Aromatic protein I</b>	<b>Microbial by-product</b>	<b>Protein-like (Trp, T)</b>

<sup>1</sup> MCR-ALS explained variance ( $R^2$ ) considering all eight components is 98.9% and lack of fit (LOF) is 10.2% (see **Equation 6** and **7**).



# CAPÍTOL 7

# REFERÈNCIES

---



- Abdollahi, H., Tauler, R. (2011). Uniqueness and rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 108(2), 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.05.009>
- Aceña i Sánchez, J. (2017). Transformació i metabolisme de fàrmacs al medi aquàtic mitjançant l'espectrometria de masses d'alta resolució [Universitat de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tesisenred.net/handle/10803/462804>
- Aceña, J., Pérez, S., Gardinali, P., Abad, J. L., Eichhorn, P., Heuett, N., Barceló, D. (2014). Structure elucidation of phototransformation products of unapproved analogs of the erectile dysfunction drug sildenafil in artificial freshwater with UPLC-Q Exactive-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(12), 1279–1289. <https://doi.org/10.1002/jms.3461>
- Agüera, A., Perez Estrada, L. A., Ferrer, I., Thurman, E. M., Malato, S., Fernandez-Alba, A. R. (2005). Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(7), 908–915. <https://doi.org/10.1002/jms.867>
- Ahel, M., Jeličić, I. (2001). Phenazone analgesics in soil and groundwater below a municipal solid waste landfill. *ACS Symposium Series*, 791, 100–115. <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0791.ch006>
- Albini, A., Fasani, E. (2004). Rationalizing the Photochemistry of Drugs. In H. Hjorth Tonnesen (Ed.), *Photostability of Drugs and Drug Formulations* (2nd ed., pp. 67–110). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420023596.ch4>
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and bioremediation* (2nd ed.). Academic Press.
- Alier, M., Felipe-Sotelo, M., Hernández, I., Tauler, R. (2009). Variation patterns of nitric oxide in Catalonia during the period from 2001 to 2006 using multivariate data analysis methods. *Analytica Chimica Acta*, 642(1–2), 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.064>
- Alier, M., Felipe, M., Hernández, I., Tauler, R. (2011). Trilinearity and component interaction constraints in the multivariate curve resolution investigation of NO and O<sub>3</sub> pollution in Barcelona. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(6), 2015–2029. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4458-1>
- Alier, M., Tauler, R. (2013). Multivariate Curve Resolution of incomplete data multisets. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 127, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.05.006>
- Alier Pedemonte, M. (2014). Desenvolupament i aplicació de metodologies analítiques i quimiomètriques per a l'estudi de la contaminació atmosfèrica [Universitat de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/277181>
- Amigo, J. M., Cruz, J., Bautista, M., MasPOCH, S., Coello, J., Blanco, M. (2008). Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(8), 696–713. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.010>
- Amon, R. M. W., Benner, R. (1996). Bacterial utilization of different size classes of

- dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 41(1), 41–51. <https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.1.0041>
- Amrhein, M., Srinivasan, B., Bonvin, D., Schumacher, M. M. (1996). On the rank deficiency and rank augmentation of the spectral measurement matrix. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 33(1), 17–33. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)00086-0](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00086-0)
- Andreozzi, R., Marotta, R., Paxéus, N. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), 1319–1330. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00769-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00769-5)
- Antunes, M. C. G., Esteves da Silva, J. C. G. (2005). Multivariate curve resolution analysis excitation-emission matrices of fluorescence of humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 546(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.05.003>
- Antunes, M. C. G., Pereira, C. C. C., Esteves da Silva, J. C. G. (2007). MCR of the quenching of the EEM of fluorescence of dissolved organic matter by metal ions. *Analytica Chimica Acta*, 595(1-2 SPEC. ISS.), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.12.017>
- Antunes, M. C., J. Simão, J. E., Duarte, A. C., Tauler, R. (2002). Multivariate curve resolution of overlapping voltammetric peaks: Quantitative analysis of binary and quaternary metal mixtures. *Analyst*, 127(6), 809–817. <https://doi.org/10.1039/b200243b>
- Araya, H., Tomita, M., Hayashi, M. (2005). The novel formulation design of O/W microemulsion for improving the gastrointestinal absorption of poorly water soluble compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 305(1–2), 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.08.022>
- Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K. V. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, 333(1–3), 167–184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.062>
- Avery, H. E., Shaw, D. J. (2009). *Cinética química básica y mecanismos de reacción* (1st ed.). Editorial Reverté.
- Ávila, C., García, J. (2015). Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in the Environment and Their Removal from Wastewater through Constructed Wetlands. In E. Y. Zeng (Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry* (1st ed., Vol. 67, pp. 195–244). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63299-9.00006-5>
- Azzouz, T., Tauler, R. (2008). Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples. *Talanta*, 74(5), 1201–1210. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.024>
- Barceló, D., López, M. J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. *Panel Científico Técnico de Seguimiento de La Política Del Agua. Jornada de Presentación de Resultados*, 1–27. <http://www.unizar.es/fnca/index3.php?id=1&pag=24>
- Baumgarten, S., Schröder, H. F., Charwath, C., Lange, M., Beier, S., Pinnekamp, J. (2007). Evaluation of advanced treatment technologies for the elimination of

- pharmaceutical compounds. *Water Science and Technology*, 56(5), 1–8. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.550>
- Bayat, M., Marín-García, M., Ghasemi, J. B., Tauler, R. (2020). Application of the area correlation constraint in the MCR-ALS quantitative analysis of complex mixture samples. *Analytica Chimica Acta*, 1113, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.057>
- Bedia, C., Tauler, R., Jaumot, J. (2017). Analysis of multiple mass spectrometry images from different *Phaseolus vulgaris* samples by multivariate curve resolution. *Talanta*, 175, 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.087>
- Bedner, M., MacCrehan, W. A. (2006). Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1,4-benzoquinone and N-acetyl-p-benzoquinone imine. *Environmental Science and Technology*, 40(2), 516–522. <https://doi.org/10.1021/es0509073>
- Benner, R., Amon, R. M. W. (2015). The Size-Reactivity Continuum of Major Bioelements in the Ocean. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 185–205. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135126>
- Bergheim, M., Gieré, R., Kümmerer, K. (2012). Biodegradability and ecotoxicity of tramadol, ranitidine, and their photoderivatives in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(1), 72–85. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0536-y>
- Besse, J. P., Latour, J. F., Garric, J. (2012). Anticancer drugs in surface waters. What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environment International*, 39(1), 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.10.002>
- Bezbaruah, A. N., Zhang, T. C. (2003). Performance of a constructed wetland with a sulfur/limestone denitrification section for wastewater nitrogen removal. *Environmental Science and Technology*, 37(8), 1690–1697. <https://doi.org/10.1021/es020912w>
- Bieroza, M., Baker, A., Bridgeman, J. (2011). Classification and calibration of organic matter fluorescence data with multiway analysis methods and artificial neural networks: an operational tool for improved drinking water treatment. *Environmetrics*, 22(3), 256–270. <https://doi.org/10.1002/env.1045>
- Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, 189 Boletín Oficial del Estado 25123 (1985). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1985-16661>
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano., Boletín Oficial del Estado 7228 (2003). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-3596>
- Bonvin, F., Omlin, J., Rutler, R., Schweizer, W. B., Alaimo, P. J., Strathmann, T. J., McNeill, K., Kohn, T. (2013). Direct photolysis of human metabolites of the antibiotic sulfamethoxazole: Evidence for abiotic back-transformation. *Environmental Science and Technology*, 47(13), 6746–6755. <https://doi.org/10.1021/es303777k>
- Boreen, A. L., Arnold, W. A., McNeill, K. (2003). Photodegradation of pharmaceuticals



- in the aquatic environment: A review. *Aquatic Sciences*, 65(4), 320–341. <https://doi.org/10.1007/s00027-003-0672-7>
- Boreen, A. L., Arnold, W. A., McNeill, K. (2004). Photochemical Fate of Sulfa Drugs in the Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups. *Environmental Science & Technology*, 38(14), 3933–3940. <https://doi.org/10.1021/es0353053>
- Bottoni, P., Caroli, S., Caracciolo, A. B. (2010). Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92(3), 549–565. <https://doi.org/10.1080/02772241003614320>
- Bound, J. P., Voulvoulis, N. (2005). Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives*, 113(12), 1705–1711. <https://doi.org/10.1289/ehp.8315>
- Boyd, G. R., Palmeri, J. M., Zhang, S., Grimm, D. A. (2004). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Science of the Total Environment*, 333(1–3), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.03.018>
- Bratchell, N. (1989). Cluster analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 6(2), 105–125. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80054-0](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80054-0)
- Bro, R. (1997). PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38(2), 149–171. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00032-4](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00032-4)
- Bro, R., De Jong, S. (1997). A fast non-negativity-constrained least squares algorithm. *Journal of Chemometrics*, 11(5), 393–401. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-128X\(199709/10\)11:5<393::AID-CEM483>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-128X(199709/10)11:5<393::AID-CEM483>3.0.CO;2-L)
- Bro, R., Sidiropoulos, N. D. (1998). Least squares algorithms under unimodality and non-negativity constraints. *Journal of Chemometrics*, 12(4), 223–247. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-128X\(199807/08\)12:4<223::AID-CEM511>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-128X(199807/08)12:4<223::AID-CEM511>3.0.CO;2-2)
- Buser, H. R., Müller, M. D., Theobald, N. (1998). Occurrence of the pharmaceutical drug clofibrac acid and the herbicide mecoprop in various Swiss Lakes and in the North Sea. *Environmental Science and Technology*, 32(1), 188–192. <https://doi.org/10.1021/es9705811>
- Capellos, C., Bielski, B. H. J. (1972). *Kinetic Systems: Mathematical Description of Chemical Kinetics in Solution* (1st ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Carson, R. (2016). *La Primavera Silenciosa*. Drakontos, Editorial Crítica.
- Chan, Y. J., Chong, M. F., Law, C. L., Hassell, D. G. (2009). A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 155(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.06.041>
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A., Booksh, K. (2003). Fluorescence Excitation-Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter. *Environmental Science and Technology*, 37(24), 5701–5710. <https://doi.org/10.1021/es034354c>

- Chen, Z., Park, G., Herckes, P., Westerhoff, P. (2008). Physicochemical treatment of three chemotherap tamoxifen, and cyclophosphamide. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 11(2), 254–260.
- Chiaia-Hernandez, A. C., Schymanski, E. L., Kumar, P., Singer, H. P., Hollender, J. (2014). Suspect and nontarget screening approaches to identify organic contaminant records in lake sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(28), 7323–7335. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8166-0>
- Clemons, M., Danson, S., Howell, A. (2002). Tamoxifen ('Nolvadex'): A review. *Cancer Treatment Reviews*, 28(4), 165–180. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(02\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(02)00036-1)
- Coble, P. G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51(4), 325–346. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00062-3](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00062-3)
- Coble, P. G. (2007). Marine optical biogeochemistry: The chemistry of ocean color. *Chemical Reviews*, 107(2), 402–418. <https://doi.org/10.1021/cr050350+>
- Coble, P. G., Del Castillo, C. E., Avril, B. (1998). Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 45(10–11), 2195–2223. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(98\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(98)00068-X)
- Coble, P. G., Spencer, R. G. M., Baker, A., Reynolds, D. M. (2014). Aquatic Organic Matter Fluorescence. In A. Baker, D. M. Reynolds, J. Lead, P. G. Coble, & R. G. M. Spencer (Eds.), *Aquatic Organic Matter Fluorescence* (pp. 75–122). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9781139045452.006>
- Committee on Drugs. (1994). The Transfer of Drugs and Other Chemicals Into Human Milk. *Pediatrics*, 93(1), 137–150. <https://doi.org/10.1542/peds.93.1.137>
- Cook, D. W., Rutan, S. C. (2017). Analysis of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Data with an Elastic Net Multivariate Curve Resolution Strategy for Sparse Spectral Recovery. *Analytical Chemistry*, 89(16), 8405–8412. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01832>
- Côté, P., Buisson, H., Pound, C., Arakaki, G. (1997). Immersed membrane activated sludge for the reuse of municipal wastewater. *Desalination*, 113(2–3), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(97\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(97)00128-8)
- Cuesta Sánchez, F., van den Bogaert, B., Rutan, S. C., Massart, D. L. (1996). Multivariate peak purity approaches. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 34(2), 139–171. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(96\)00020-2](https://doi.org/10.1016/0169-7439(96)00020-2)
- Dabrowska, D., Kot-Wasik, A., Namieśnik, J. (2005). Pathways and analytical tools in degradation studies of organic pollutants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 35(2), 155–176. <https://doi.org/10.1080/10408340500207565>
- Dąbrowska, D., Kot-Wasik, A., Namieśnik, J. (2004). The Importance of Degradation in the Fate of Selected Organic Compounds in the Environment. Part II. Photodegradation and Biodegradation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13(6), 617–626. <http://www.pjoes.com/The-Importance-of-Degradation-in-the-Fate-of-Selected-Organic-Compounds-in-the-Environment,87706,0,2.html>

- Danzer, K., Currie, L. A. (1998). Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). In *Pure and Applied Chemistry* (Vol. 70, Issue 4). De Gruyter. <https://doi.org/10.1351/pac199870040993>
- Daughton, C. G., Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 107(SUPPL. 6), 907–938. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s6907>
- de Juan, A., Casassas, E., Tauler, R. (2000). Soft Modeling of Analytical Data. In R. A. Meyers & S. D. Brown (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5208>
- De Juan, A., Jaumot, J., Tauler, R. (2014). Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Analytical Methods*, 6(14), 4964–4976. <https://doi.org/10.1039/c4ay00571f>
- de Juan, A., Maeder, M., Martínez, M., Tauler, R. (2001). Application of a novel resolution approach combining soft- and hard-modelling features to investigate temperature-dependent kinetic processes. *Analytica Chimica Acta*, 442(2), 337–350. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01181-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01181-3)
- De Juan, A., Maeder, M., Martínez, M., Tauler, R. (2000). Combining hard- and soft-modelling to solve kinetic problems. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 54(2), 123–141. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(00\)00112-X](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(00)00112-X)
- de Juan, A., Rutan, S. C., Tauler, R. (2019). Two-Way Data Analysis: Multivariate Curve Resolution, Iterative Methods. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 2, pp. 153–171). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14752-3>
- de Juan, A., Rutan, S. C., Tauler, R., Massart, D. L. (1998). Comparison between the direct trilinear decomposition and the multivariate curve resolution-alternating least squares methods for the resolution of three-way data sets. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 40(1), 19–32. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00003-3)
- de Juan, A., Tauler, R. (2001). Comparison of three-way resolution methods for non-trilinear chemical data sets. *Journal of Chemometrics*, 15(10), 749–771. <https://doi.org/10.1002/cem.662>
- de Juan, A., Tauler, R. (2006). Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in concepts and applications. In *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (Vol. 36, Issues 3–4, pp. 163–176). Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1080/10408340600970005>
- de Juan, A., Tauler, R. (2016). Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares for Spectroscopic Data. In C. Ruckebusch (Ed.), *Resolving Spectral Mixtures* (1st ed., Vol. 30, pp. 5–51). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63638-6.00002-4>
- de Juan, A., Tauler, R. (2019). Data Fusion by Multivariate Curve Resolution. In M. Cocchi (Ed.), *Data Fusion Methodology and Applications* (1st ed., Vol. 31, pp. 205–233). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63984-4.00008-9>

- de Juan, A., Tauler, R. (2021). Multivariate Curve Resolution: 50 years addressing the mixture analysis problem – A review. *Analytica Chimica Acta*, 1145, 59–78. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.10.051>
- De Juan, A., Tauler, R. (2003). Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Analytica Chimica Acta*, 500(1–2), 195–210. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00724-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00724-4)
- De Juan, A., Tauler, R., Dyson, R., Marcolli, C., Rault, M., Maeder, M. (2004). Spectroscopic imaging and chemometrics: A powerful combination for global and local sample analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(1), 70–79. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00101-3)
- De Luca, M., Ioele, G., Grande, F., Platikanov, S., Tauler, R., Ragno, G. (2020). Photostability study of multicomponent drug formulations via MCR-ALS: The case of the hydrochlorothiazide-amiloride mixture. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 186, 113332. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113332>
- De Luca, M., Ioele, G., Mas, S., Tauler, R., Ragno, G. (2012). A study of pH-dependent photodegradation of amiloride by a multivariate curve resolution approach to combined kinetic and acid-base titration UV data. *Analyst*, 137(22), 5428–5435. <https://doi.org/10.1039/c2an35799b>
- De Luca, M., Ragno, G., Ioele, G., Tauler, R. (2014). Multivariate curve resolution of incomplete fused multiset data from chromatographic and spectrophotometric analyses for drug photostability studies. *Analytica Chimica Acta*, 837, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.056>
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>
- Deborde, M., von Gunten, U. (2008). Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Research*, 42(1–2), 13–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.025>
- DellaGreca, M., Iesce, M. R., Isidori, M., Nardelli, A., Previtera, L., Rubino, M. (2007). Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water. Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. *Chemosphere*, 67(10), 1933–1939. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.001>
- Deo, R. P. (2014). Pharmaceuticals in the Surface Water of the USA: A Review. *Current Environmental Health Reports*, 1(2), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0015-y>
- Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (Eds.). (2015). *Personal Care Products in the Aquatic Environment* (1st ed., Vol. 36). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-18809-6>
- Díaz, R., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Hernández, F. (2012). Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food, environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS.

- Analytical Methods*, 4(1), 196–209. <https://doi.org/10.1039/c1ay05385j>
- Dietrich, D. R., Webb, S. F., Petry, T. (2002). Hot spot pollutants: Pharmaceuticals in the environment. In *Toxicology Letters* (Vol. 131, Issues 1–2, pp. 1–3). Toxicol Lett. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00062-0)
- Doll, T. E., Frimmel, F. H. (2003). Fate of pharmaceuticals - Photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere*, 52(10), 1757–1769. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00446-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00446-6)
- Doménech, X. (2000). *Química Ambiental: El impacto ambiental de los residuos*. Miraguano Ediciones.
- Doménech, X. (1999). *Química de la Contaminación* (1st ed.). Miraguano Ediciones.
- Drillia, P., Dokianakis, S. N., Fountoulakis, M. S., Kornaros, M., Stamatelatou, K., Lyberatos, G. (2005). On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.009>
- Du, B., Haddad, S. P., Luek, A., Scott, W. C., Saari, G. N., Kristofco, L. A., Connors, K. A., Rash, C., Rasmussen, J. B., Chambliss, C. K., Brooks, B. W. (2014). Bioaccumulation and trophic dilution of human pharmaceuticals across trophic positions of an effluent-dependent wadeable stream. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0058>
- ECHA. (2012). Guidance on information requirements and chemical safety assessment: Occupational exposure estimation. In *European Chemicals Agency* (Issue November). <https://echa.europa.eu/guidance-documents/guidance-on-information-requirements-and-chemical-safety-assessment>
- Eckel, W. P., Ross, B., Isensee, R. K. (1993). Pentobarbital Found in Ground Water. *Groundwater*, 31(5), 801–804. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1993.tb00853.x>
- EFPIA. (2016). The Pharmaceutical Industry in Figures 2016. In *The Pharmaceutical Industry in Figures*. [www.efpia.eu](http://www.efpia.eu)
- Eichhorn, P., Pérez, S., Aceña, J., Gardinali, P., Abad, J. L., Barceló, D. (2012). Identification of phototransformation products of sildenafil (Viagra) and its N-demethylated human metabolite under simulated sunlight. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(6), 701–711. <https://doi.org/10.1002/jms.2998>
- Eigenvector Research Inc. (2014). *Poissonscale - Eigenvector Research Documentation Wiki*. <https://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Poissonscale>
- Eigenvector Research Inc. (2020). *PLS\_Toolbox* (8.3).
- Eilers, P. H. C. (2004). Parametric Time Warping. *Analytical Chemistry*, 76(2), 404–411. <https://doi.org/10.1021/ac034800e>
- Eilers, P. H. C., Boelens, H. F. M. (2005). *Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing*. [http://www.science.uva.nl/~hboelens/publications/draftpub/Eilers\\_2005.pdf](http://www.science.uva.nl/~hboelens/publications/draftpub/Eilers_2005.pdf)

- El Seoud, O. A., Baader, W. J., Bastos, E. L. (2016). Practical Chemical Kinetics in Solution. In Z. Wang, U. Wille, & E. Juaristi (Eds.), *Encyclopedia of Physical Organic Chemistry* (1st ed., Vol. 1, pp. 1–68). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118468586.epoc1012>
- EMA. (1998). *ICH Q1B Photostability testing of new active substances and medicinal products*.
- EMA. (2006). *Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use*.
- Emmanuel, E., Keck, G., Blanchard, J. M., Vermande, P., Perrodin, Y. (2004). Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environment International*, 30(7), 891–900. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.004>
- Escandar, G. M., Olivieri, A. C., Faber, N. (Klaas) M., Goicoechea, H. C., Muñoz de la Peña, A., Poppi, R. J. (2007). Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(7), 752–765. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.04.006>
- Espejo, A. (2016). Procesos de ozonación fotocatalítica para eliminar contaminantes emergentes de aguas residuales urbanas [Universidad de Extremadura]. In *DEHESA. Repositorio institucional Universidad de Extremadura*. <http://dehesa.unex.es/handle/10662/4140>
- Esplugas, S., Bila, D. M., Krause, L. G. T., Dezotti, M. (2007). Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3), 631–642. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.073>
- Esteban, M., Ariño, C., Díaz-Cruz, J. M., Díaz-Cruz, M. S., Tauler, R. (2000). Multivariate curve resolution with alternating least squares optimisation: A soft-modelling approach to metal complexation studies by voltammetric techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 19(1), 49–61. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00184-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00184-3)
- Esteves da Silva, J. C. G., Tavares, M. J. C. G., Tauler, R. (2006). Multivariate curve resolution of multidimensional excitation–emission quenching matrices of a Laurentian soil fulvic acid. *Chemosphere*, 64(11), 1939–1948. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.027>
- European Commission. (2018). Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards (Guidance Document No. 27). In *European Communities* (Vols. 11–12, Issue 27). European Commission. <https://doi.org/doi/10.2875/018826>
- Council Directive 76/464/EEC of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community, Official Journal of the European Union (1976).
- Council Directive 78/659/EEC of 18 July 1978 on the Quality of Fresh Waters Needing Protection or Improvement in Order to Support Fish Life, 78/659/EEC Official Journal of the European Communities L 222/1 (1978).

Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, Official Journal of the European Union (1998).

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, L327 Official Journal of the European Parliament 1 (2000).

European Council. (2006a). European Council Decision 2006/507/CE, concerning the conclusion, on behalf of the European Community, of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. In *Official Journal of the European Union*.

Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/4, Official Journal of the European Union (2006).

Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use, L311 Official Journal of the European Communities 67 (2001).

Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration, 19 Official Journal of the European Union 19 (2006).

Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 348 Official Journal of the European Union 84 (2008).  
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0105&rid=3>

Regulation (EC) No 689/2008 of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 concerning the export and import of dangerous chemicals, Official Journal of the European Union (2008).

Regulation (EU) No 649/2012 of the European Parliament and of the Council of 4 July 2012 concerning the export and import of hazardous chemicals. Text with EEA relevance, 123 Official Journal of the European Union 237 (2017).

Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption, Official Journal of the European Communities (2020).

Fatta-Kassinou, D., Hapeshi, E., Malato, S., Mantzavinos, D., Rizzo, L., Xekoukoulotakis, N. P. (2010). Removal of Xenobiotic Compounds from Water and Wastewater by Advanced Oxidation Processes. In D. Fatta-Kassinou, K. Bester, & K. Kümmerer (Eds.), *Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies* (pp. 387–412). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3509-7\\_21](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3509-7_21)

Fatta-Kassinou, D., Vasquez, M. I., Kümmerer, K. (2011). Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*, 85(5), 693–709. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.082>

- Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. In *Aquatic Toxicology* (Vol. 76, Issue 2, pp. 122–159). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Ferrando-Climent, L., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2015). Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater. *Chemosphere*, 136, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.051>
- Ferrando-Climent, L., Gonzalez-Olmos, R., Anfruns, A., Aymerich, I., Corominas, L., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S. (2017). Elimination study of the chemotherapy drug tamoxifen by different advanced oxidation processes: Transformation products and toxicity assessment. *Chemosphere*, 168, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.057>
- Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2014). Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment. *Environmental Pollution*, 193, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.002>
- Ferron, S., Brackin, J., Bao, M. (2012). HIPOX™ OZONE-PEROXIDE ADVANCED OXIDATION WATER TREATMENT SYSTEM FOR THE DISINFECTION OF WASTEWATER AT A LOS ANGELES COUNTY SANITATION DISTRICT JOINT WATER POLLUTION CONTROL PLANT. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2005(7), 7765–7775. <https://doi.org/10.2175/193864705783813782>
- Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Barata, C., Riva, M. C. (2004). Endocrine-Disrupting Compounds in Wastewater, Sludge-Treatment Processes, and Receiving Waters: Overview. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 8(1), 39–56. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)1090-025X\(2004\)8:1\(39\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-025X(2004)8:1(39))
- Findlay, S. E. G., & Sinsabaugh, R. L. (Eds.). (2003). *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter* (1st ed.). Academic Press, Elsevier Science. <https://books.google.cat/books?id=D6TpP0uQOfwC>
- Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. (2013). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of organic UV filters and their transformation products in the aquatic environment. *Anal. Methods*, 5(2), 355–366. <https://doi.org/10.1039/C2AY26115D>
- Gampp, H., Maeder, M., J. Meyer, C., D. Zuberbuehler, A. (1987). Quantification of a known component in an unknown mixture. *Analytica Chimica Acta*, 193(C), 287–293. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)86160-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86160-7)
- Garbisu, C., Amézaga, I., Alkorta, I. (2003). Biorremediación y Ecología. *Ecosistemas*, 11(3). <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/591>
- García-Reiriz, A. G. (2014). Parallel factor analysis and multivariate curve resolution as data fusion tools to supervise a stream. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 137, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.06.016>



- García Gómez, C., Gortáres Moroyoqui, P., Drogui, P. (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. *Revista Química Viva*, 10(2), 96–105. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86319141004>
- Gargallo, R., Tauler, R., Cuesta-Sánchez, F., Massart, D. L. (1996). Validation of alternating least-squares multivariate curve resolution for chromatographic resolution and quantitation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 15(7), 279–286. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(96\)00048-9](https://doi.org/10.1016/0165-9936(96)00048-9)
- Garrison, A. W., Pope, J. D., Allen, F. R. (1976). GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In L. H. Keith & Chemical Congress of the North American Continent (Eds.), *Ann Arbor Science Publishers* (pp. 517–556). Ann Arbor Science Publishers. <https://books.google.es/books?id=YBJSAAAAMAAJ>
- Geladi, P., Kowalski, B. R. (1986). Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 185(C), 1–17. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(86\)80028-9](https://doi.org/10.1016/0003-2670(86)80028-9)
- Gemperline, P. J. (1986). Target Transformation Factor Analysis with Linear Inequality Constraints Applied to Spectroscopic—Chromatographic Data. *Analytical Chemistry*, 58(13), 2656–2663. <https://doi.org/10.1021/ac00126a018>
- Gibson, G. G., Skett, P. (2001). Introduction to Drug Metabolism. In *Introduction to Drug Metabolism* (3rd ed.). Cengage Learning. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3188-7>
- Gimeno Melià, V. P. (2019). Environmental and socio-economical assessment of measures to reduce pharmaceuticals in rivers [Universitat de Girona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/667011>
- Ginebreda, A., Barata, C., Barceló, D. (2012). Risk Assessment of Pollutants in the Llobregat River Basin. In S. Sabater, A. Ginebreda, & D. Barceló (Eds.), *The Llobregat: The story of a Polluted Mediterranean River* (Vol. 21, pp. 263–295). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/698\\_2012\\_142](https://doi.org/10.1007/698_2012_142)
- Gmurek, M., Horn, H., Majewsky, M. (2015). Phototransformation of sulfamethoxazole under simulated sunlight: Transformation products and their antibacterial activity toward *Vibrio fischeri*. *Science of The Total Environment*, 538, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.014>
- Gogate, P. R., Pandit, A. B. (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment II: Hybrid methods. *Advances in Environmental Research*, 8(3–4), 553–597. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(03)00031-5)
- Golshan, A., Abdollahi, H., Maeder, M. (2012). The reduction of rotational ambiguity in soft-modeling by introducing hard models. *Analytica Chimica Acta*, 709, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.10.057>
- Golub, G. H., Van Loan, C. F. (2013). 2.4 The Singular Value Decomposition. In *Matrix Computations* (4th ed., p. 780). The John Hopkins University Press.
- Gómez-Canela, C., Bolivar-Subirats, G., Tauler, R., Lacorte, S. (2017). Powerful combination of analytical and chemometric methods for the photodegradation of 5-Fluorouracil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 137, 33–41.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.019>

- Gómez-Canela, C., Cortés-Francisco, N., Ventura, F., Caixach, J., Lacorte, S. (2013). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry as analytical tools to characterize multi-class cytostatic compounds. *Journal of Chromatography A*, 1276, 78–94. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.031>
- Gómez-Canela, C., Ventura, F., Caixach, J., Lacorte, S. (2014). Occurrence of cytostatic compounds in hospital effluents and wastewaters, determined by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(16), 3801–3814. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7805-9>
- Gonçalves, C., Pérez, S., Osorio, V., Petrovic, M., Alpendurada, M. F., Barceló, D. (2011). Photofate of oseltamivir (Tamiflu) and oseltamivir carboxylate under natural and simulated solar irradiation: Kinetics, identification of the transformation products, and environmental occurrence. *Environmental Science and Technology*, 45(10), 4307–4314. <https://doi.org/10.1021/es1032629>
- Gong, H., Chu, W. (2015). Photodegradation of Sulfamethoxazole with a Recyclable Catalyst. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 54(51), 12763–12769. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b03849>
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 82, pp. 425–442). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Tauler, R. (2019). ROIMCR: a powerful analysis strategy for LC-MS metabolomic datasets. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 256. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2848-8>
- Gros, M., Petrović, M., Barceló, D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, 70(4), 678–690. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.024>
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2013). Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1292, 173–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>
- Gros, M., Williams, M., Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Kookana, R. S. (2015). Photolysis of the antidepressants amisulpride and desipramine in wastewaters: Identification of transformation products formed and their fate. *Science of the Total Environment*, 530–531, 434–444. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.135>
- Gross, B., Montgomery-Brown, J., Naumann, A., Reinhard, M. (2004). Occurrence and fate of pharmaceuticals and alkylphenol ethoxylate metabolites in an effluent-

- dominated river and wetland. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(9), 2074–2083. <https://doi.org/10.1897/03-606>
- Gross, J. H. (2017). Electrospray Ionization. In *Mass Spectrometry* (3rd ed., pp. 721–778). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7_12)
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*, 36(2), 357–393. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8)
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Tjørnelund, J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(3), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s00244-001-0017-2>
- Hanrahan, G. (2008). Environmental Chemometrics. In *Environmental Chemometrics: Principles and Modern Applications* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420067972>
- Heberer, T. (2002a). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131(1–2), 5–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3)
- Heberer, T. (2002b). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266(3–4), 175–189. [https://doi.org/10.1016/S0022-1694\(02\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00165-8)
- Hernández-Ruiz, G. M., Álvarez-Orozco, N. A., Ríos-Osorio, L. A. (2017). Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: Revisión sistemática. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(1), 139–159. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num1\\_art:564](https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:564)
- Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T., Mattioli, L. (2012). Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(5), 1251–1264. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5844-7>
- Hignite, C., Azarnoff, D. L. (1977). Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sciences*, 20(2), 337–341. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(77\)90329-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(77)90329-0)
- Hirte, K., Seiwert, B., Schüürmann, G., Reemtsma, T. (2016). New hydrolysis products of the beta-lactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater. *Water Research*, 88, 880–888. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.028>
- Hopfgartner, G., Tonoli, D., Varesio, E. (2012). High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(8), 2587–2596. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5641-8>
- Hopke, P. K. (2009). Environmental Chemometrics. In S. Brown, R. Tauler, & B.

- Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (1st ed., Vol. 4, pp. 55–74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00008-9>
- Hopke, P. K. (2020). Environmental Chemometrics. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 4, pp. 69–85). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14704-3>
- Howard, P. H., Muir, D. C. G. (2010). Identifying new persistent and bioaccumulative organics among chemicals in commerce. *Environmental Science and Technology*, *44*(7), 2277–2285. <https://doi.org/10.1021/es903383a>
- Howard, P. H., Muir, D. C. G. (2011). Identifying new persistent and bioaccumulative organics among chemicals in commerce II: Pharmaceuticals. *Environmental Science and Technology*, *45*(16), 6938–6946. [https://doi.org/10.1021/ES201196X/SUPPL\\_FILE/ES201196X\\_SI\\_003.PDF](https://doi.org/10.1021/ES201196X/SUPPL_FILE/ES201196X_SI_003.PDF)
- Hudson, N., Baker, A., Reynolds, D. (2007). Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters - A review. *River Research and Applications*, *23*(6), 631–649. <https://doi.org/10.1002/rra.1005>
- Hug, C., Ulrich, N., Schulze, T., Brack, W., Krauss, M. (2014). Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environmental Pollution*, *184*, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.048>
- Hugelier, S., Piqueras, S., Bedia, C., de Juan, A., Ruckebusch, C. (2018). Application of a sparseness constraint in Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares. *Analytica Chimica Acta*, *1000*, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.08.021>
- Hutzinger, O. (Ed.). (1980). *The Handbook of Environmental Chemistry* (Vol. 2). Springer-Verlag. <https://www.paperbackswap.com/Handbook-Environmental-Chemistry-Volume-2/book/3540096892/>
- Izquierdo-Ridorsa, A., Saurina, J., Hernández-Cassou, S., Tauler, R. (1997). Second-order multivariate curve resolution applied to rank-deficient data obtained from acid-base spectrophotometric titrations of mixtures of nucleic bases. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *38*(2), 183–196. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00034-8)
- Jacobsen, P., Berglind, L. (1988). Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*, *70*(4), 365–370. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90120-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90120-2)
- Jaumot, J., de Juan, A., Tauler, R. (2015). MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *140*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.10.003>
- Jaumot, J., Igne, B., Anderson, C. A., Drennen, J. K., De Juan, A. (2013). Blending process modeling and control by multivariate curve resolution. *Talanta*, *117*, 492–504. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.037>
- Jaumot, J., Marchán, V., Gargallo, R., Grandas, A., Tauler, R. (2004). Multivariate Curve Resolution Applied to the Analysis and Resolution of Two-Dimensional [1H, 15N] NMR Reaction Spectra. *Analytical Chemistry*, *76*(23), 7094–7101.

<https://doi.org/10.1021/ac049509t>

- Jayaraman, A., Mas, S., Tauler, R., de Juan, A. (2012). Study of the photodegradation of 2-bromophenol under UV and sunlight by spectroscopic, chromatographic and chemometric techniques. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 910, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.038>
- Jean, J., Perrodin, Y., Pivot, C., Trepo, D., Perraud, M., Droguet, J., Tissot-Guerraz, F., Locher, F. (2012). Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*, 103, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.005>
- Jelić, A., Petrović, M., Barceló, D. (2012). Pharmaceuticals in Drinking Water. In D. Barceló (Ed.), *Emerging Organic Contaminants and Human Health* (Vol. 20, pp. 47–70). Springer. [https://doi.org/10.1007/698\\_2011\\_133](https://doi.org/10.1007/698_2011_133)
- Jelić, A., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Gutierrez, O. (2015). Impact of in-sewer transformation on 43 pharmaceuticals in a pressurized sewer under anaerobic conditions. *Water Research*, 68, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.033>
- John Wiley & Sons Inc. (n.d.). *SpectraBase™*. Retrieved July 8, 2021, from <https://spectrabase.com/>
- Jolliffe, I. T. (2002). *Principal Component Analysis* (2nd ed.). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/b98835>
- Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N. (2001). Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment a Review. *Environmental Technology*, 22(12), 1383–1394. <https://doi.org/10.1080/09593332208618186>
- Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, 36(20), 5013–5022. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00227-0)
- Jordan, V. C. (1992). The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer. *Current Problems in Cancer*, 16(3), 134–176. [https://doi.org/10.1016/0147-0272\(92\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0147-0272(92)90002-6)
- Jordan, V. C. (2006). Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *British Journal of Pharmacology*, 147(SUPPL. 1), S269-76. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706399>
- Jorgensen, S. E., Halling-Sorensen, B. (2000). Editorial: Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40(7), 691–699. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00438-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00438-5)
- Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C. S., Ternes, T. A., Thomsen, A., Siegrist, H. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research*, 40(8), 1686–1696. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.02.014>
- Kagle, J., Porter, A. W., Murdoch, R. W., Rivera-Cancel, G., Hay, A. G. (2009). Chapter 3 Biodegradation of Pharmaceutical and Personal Care Products. In A. I. Laskin, S. Sariaslani, & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*

- (Vol. 67, Issue C, pp. 65–108). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)01003-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)01003-4)
- Kari, F. G., Huger, S., Canonica, S. (1995). Determination of the Reaction Quantum Yield for the Photochemical Degradation of Fe(III)-EDTA: Implications for the Environmental Fate of EDTA in Surface Waters. *Environmental Science and Technology*, 29(4), 1008–1017. <https://doi.org/10.1021/es00004a022>
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J. (2008). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*, 42(13), 3498–3518. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.026>
- Keenan, M. R., Kotula, P. G. (2004). Accounting for Poisson noise in the multivariate analysis of ToF-SIMS spectrum images. *Surface and Interface Analysis*, 36(3), 203–212. <https://doi.org/10.1002/sia.1657>
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Kim, H. Y., Kim, T. H., Cha, S. M., Yu, S. (2017). Degradation of sulfamethoxazole by ionizing radiation: Identification and characterization of radiolytic products. *Chemical Engineering Journal*, 313, 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.080>
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., Kassinos, D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*, 35(2), 402–417. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.009>
- Kojima, T., Onoue, S., Katoh, F., Teraoka, R., Matsuda, Y., Kitagawa, S., Tshako, M. (2007). Effect of spectroscopic properties on photostability of tamoxifen citrate polymorphs. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(2), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.025>
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36(6), 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>
- Kosjek, T., Heath, E., Petrović, M., Barceló, D. (2007). Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1076–1085. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.10.005>
- Kovalova, L. (2009). *Cytostatics in the aquatic environment : analysis, occurrence, and possibilities for removal* (Issue August). <https://www.semanticscholar.org/paper/Cytostatics-in-the-aquatic-environment-%3A-analysis%2C-Kovalova-Hollender/5b43da7e547a0291671f3a97e546518d4e1f25d7>
- Kowalczyk, P., Stoń-Egiert, J., Cooper, W. J., Whitehead, R. F., Durako, M. J. (2005). Characterization of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Baltic Sea by excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*,

- 96(3–4), 273–292. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2005.03.002>
- Krasner, S. W., Mitch, W. A., McCurry, D. L., Hanigan, D., Westerhoff, P. (2013). Formation, precursors, control, and occurrence of nitrosamines in drinking water: A review. *Water Research*, 47(13), 4433–4450. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.050>
- Krauss, M., Singer, H., Hollender, J. (2010). LC-high resolution MS in environmental analysis: From target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 943–951. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3608-9>
- Kumar Panigrahi, S., Kumar Mishra, A. (2019). Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 41, 100318. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.100318>
- Kuspis, D. A., Krenzelok, E. P. (1996). What happens to expired medications? A survey of community medication disposal. *Veterinary and Human Toxicology*, 38(1), 48–49.
- Kvalheim, O. M., Liang, Y. Z. (1992). Heuristic Evolving Latent Projections: Resolving Two-Way Multicomponent Data. 1. Selectivity, Latent-Projective Graph, Datascope, Local Rank, And Unique Resolution. *Analytical Chemistry*, 64(8), 936–946. <https://doi.org/10.1021/ac00032a019>
- Lam, M. W., Mabury, S. A. (2005). Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences*, 67(2), 177–188. <https://doi.org/10.1007/s00027-004-0768-8>
- Lam, M. W., Young, C. J., Mabury, S. A. (2005). Aqueous photochemical reaction kinetics and transformations of fluoxetine. *Environmental Science and Technology*, 39(2), 513–522. <https://doi.org/10.1021/es0494757>
- Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E., Ward, R. S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, 287–303. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>
- Larson, R. A., Smykowski, K., Hunt, L. L. (1981). Occurrence and determination of organic oxidants in rivers and wastewaters. *Chemosphere*, 10(11–12), 1335–1338. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(81\)90052-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(81)90052-7)
- Lavine, B. K. (2000). Chemometrics. *Analytical Chemistry*, 72(12), 91–98. <https://doi.org/10.1021/a1000016x>
- Lavine, B. K., Rayens, W. S. (2009). Statistical Discriminant Analysis. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (1st ed., Vol. 3, pp. 517–540). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00024-7>
- Lee, J. L. S., Gilmore, I. S., Seah, M. P. (2008). Quantification and methodology issues in multivariate analysis of ToF-SIMS data for mixed organic systems. *Surface and Interface Analysis*, 40(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/sia.2713>
- Li, W., Nanaboina, V., Chen, F., Korshin, G. V. (2016). Removal of polycyclic synthetic

- musks and antineoplastic drugs in ozonated wastewater: Quantitation based on the data of differential spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials*, 304, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.035>
- Libecco, J. A., Powell, K. R. (2004). Trimethoprim/Sulfamethoxazole. *Pediatrics In Review*, 25(11), 375–380. <https://doi.org/10.1542/pir.25.11.375>
- Lin, A. Y. C., Reinhard, M. (2005). Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(6), 1303–1309. <https://doi.org/10.1897/04-236R.1>
- Lin, C.-H., Liu, S.-C. (1978). A New Numerical Method for Automated Spectral Isolation of Component Substances in a Set of Mixtures. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 25(4), 167–177. <https://doi.org/10.1002/jccs.197800029>
- Lobos, C. (2020). BIOTRANSFORMACIÓN Y / O DEGRADACIÓN DE DICLOFENACO POR HONGOS CON ACTIVIDAD [Universidad de Concepción]. In *Universidad de Concepción*. <http://repositorio.udec.cl/xmlui/handle/11594/6602>
- Machado, A. A. S. C., Esteves da Silva, J. C. G. (1993). Factor analysis of molecular fluorescence data of marine and soil fulvic acids. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 19(2), 155–167. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(93\)80099-4](https://doi.org/10.1016/0169-7439(93)80099-4)
- Maeder, M. (1987). Evolving Factor Analysis for the Resolution of Overlapping Chromatographic Peaks. *Analytical Chemistry*, 59(3), 527–530. <https://doi.org/10.1021/ac00130a035>
- Maeder, M., de Juan, A. (2020). Two-Way Data Analysis: Evolving Factor Analysis. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 2, pp. 95–106). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14751-1>
- Maeder, M., McCann, N., Clifford, S., Puxty, G. (2020). Model-Based Data Fitting. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 3, pp. 477–495). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14884-x>
- Maeder, M., Neuhold, Y.-M. (2007). 3 Physical/chemical models. In S. C. Rutan & B. Walczak (Eds.), *Practical Data Analysis in Chemistry* (1st ed., Vol. 26, pp. 29–100). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0922-3487\(07\)80006-2](https://doi.org/10.1016/S0922-3487(07)80006-2)
- Majewsky, M., Wagner, D., Delay, M., Bräse, S., Yargeau, V., Horn, H. (2014). Antibacterial Activity of Sulfamethoxazole Transformation Products (TPs): General Relevance for Sulfonamide TPs Modified at the para Position. *Chemical Research in Toxicology*, 27(10), 1821–1828. <https://doi.org/10.1021/tx500267x>
- Malik, A., Tauler, R. (2013). Extension and application of multivariate curve resolution-alternating least squares to four-way quadrilinear data-obtained in the investigation of pollution patterns on Yamuna River, India-A case study. *Analytica Chimica Acta*, 794, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.047>
- Malinowski, E. R. (1982). Obtaining the key set of typical vectors by factor analysis and subsequent isolation of component spectra. *Analytica Chimica Acta*, 134(C),



- 129–137. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)84184-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)84184-2)
- Malinowski, E. R. (1992). Window factor analysis: Theoretical derivation and application to flow injection analysis data. *Journal of Chemometrics*, 6(1), 29–40. <https://doi.org/10.1002/cem.1180060104>
- Mallory, F. B., Mallory, C. W. (1984). Photocyclization of Stilbenes and Related Molecules. In W. G. et al. Dauben (Ed.), *Organic Reactions* (Vol. 30, pp. 1–456). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471264180.or030.01>
- Manne, R. (1995). On the resolution problem in hyphenated chromatography. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 27(1), 89–94. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)80009-X](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)80009-X)
- Manne, R., Shen, H., Liang, Y. (1999). Subwindow factor analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 45(1–2), 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00101-4)
- Mantzavinos, D., Psillakis, E. (2004). Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(5), 431–454. <https://doi.org/10.1002/jctb.1020>
- Marcé, R., Honey-Rosés, J., Manzano, A., Moragas, L., Catllar, B., Sabater, S. (2012). The Llobregat River Basin: A Paradigm of Impaired Rivers Under Climate Change Threats. In S. Sabater, A. Ginebreda, & D. Barceló (Eds.), *Handbook of Environmental Chemistry* (Vol. 21, pp. 1–26). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/698\\_2012\\_152](https://doi.org/10.1007/698_2012_152)
- Marini, F. (2020). Non-linear Modeling: Neural Networks. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 3, pp. 519–541). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14893-0>
- Martín-Alonso, J. (2006). Managing Resources in an European Semi-Arid Environment: Combined use of Surface and Groundwater for Drinking Water Production in the Barcelona Metropolitan Area. In S. A. Hubbs (Ed.), *Riverbank Filtration Hydrology* (pp. 281–298). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3938-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3938-6_13)
- Martín-Alonso, J., Devesa, R., Bernal, A., Matia, L. (2007). Managing an odour episode in Barcelona's water supply: strategies adopted, the causative agent (diacetyl) and determination of its organoleptic properties. *Water Science and Technology*, 55(5), 209–216. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.181>
- Mas Garcia, S. (2012). Seguiment i interpretació de la degradació de contaminants bromats mitjançant tècniques cromatogràfiques, espectroscòpiques i quimiomètriques [Universitat de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/119725>
- Mas, S., Tauler, R., de Juan, A. (2011). Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes. *Journal of Chromatography A*, 1218(51), 9260–9268. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.035>
- Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Buydens, L. M. S., De jong, S., Lewi, P. J., & Smeyers-Verbeke, J. (Eds.). (1997). *Handbook of Chemometrics and*

- Qualimetrics: Part A* (1st ed., Vol. 20, Issue A). Elsevier Science Ltd.
- Mater, N., Geret, F., Castillo, L., Faucet-Marquis, V., Albasi, C., Pfohl-Leszkowicz, A. (2014). In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water. *Environment International*, 63, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.011>
- MathWorks. (2020). *1-D data interpolation (table lookup) - MATLAB interp1*. <https://www.mathworks.com/help/matlab/ref/interp1.html>
- McDonald, S., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., Robards, K. (2004). Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 527(2), 105–124. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.011>
- Meakins, N. C., Bubb, J. M., Lester, J. N. (1994). The behaviour of the s-triazine herbicides, atrazine and simazine, during primary and secondary biological waste water treatment. *Chemosphere*, 28(9), 1611–1622. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90420-0](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90420-0)
- Meyer, M., Ferrell, G., Bumgarner, J. E., Cole, D., Hutchins, S., Krapac, I., Johnson, K., Verstraeten, I., Kolpin, D. W. (2004). Occurrence of antibiotic residues in waste storage facilities at swine animal feeding operation. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 227, U53–U53.
- Mogollon, N. G. S., Ribeiro, F. A. de L., Lopez, M. M., Hantao, L. W., Poppi, R. J., Augusto, F. (2013). Quantitative analysis of biodiesel in blends of biodiesel and conventional diesel by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta*, 796, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.071>
- Moore, D. E., Zhou, W. (1994). Photodegradation of Sulfamethoxazole: A Chemical System Capable of Monitoring Seasonal Changes in UVB Intensity. *Photochemistry and Photobiology*, 59(5), 497–502. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb02974.x>
- Murphy, K. R., Bro, R., Stedmon, C. A. (2014). Chemometric Analysis of Organic Matter Fluorescence. In P. Coble, J. Lead, A. Baker, D. M. Reynolds, & R. G. M. Spencer (Eds.), *Aquatic Organic Matter Fluorescence* (pp. 339–375). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9781139045452.016>
- Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Graeber, D., Bro, R. (2013). Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. *Analytical Methods*, 5(23), 6557–6566. <https://doi.org/10.1039/c3ay41160e>
- Navarro-Ortega, A. (2009). Distribució i comportament de contaminants orgànics prioritaris a la conca hidrogràfica del riu Ebre [Universitat de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tesisenred.net/handle/10803/2740>
- Negreira, N., de Alda, M. L., Barceló, D. (2014). Cytostatic drugs and metabolites in municipal and hospital wastewaters in Spain: Filtration, occurrence, and environmental risk. *Science of the Total Environment*, 497–498, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.101>
- Negreira, N., Regueiro, J., López de Alda, M., Barceló, D. (2015). Transformation of

- tamoxifen and its major metabolites during water chlorination: Identification and in silico toxicity assessment of their disinfection byproducts. *Water Research*, 85, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.036>
- Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1225–1234. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1035-8>
- Noblet, J. A., Smith, L. A., Suffet, I. H. (1996). Influence of Natural Dissolved Organic Matter, Temperature, and Mixing on the Abiotic Hydrolysis of Triazine and Organophosphate Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3685–3693. <https://doi.org/10.1021/jf960315r>
- OECD-Test-Nº111. (2004). OECD guidelines for the testing of chemicals. 111. Hydrolysis as a function of pH. In *OECD Publishing* (Issue April).
- OECD. (2021). *Health at a Glance 2021: OECD Indicators*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/ae3016b9-en>
- Ortelli, D., Edder, P., Corvi, C. (2004). Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 520(1–2), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.037>
- Osorio Osorio, B. (2018). Determinación de la cinética de degradación fotolítica y tiempo de vida media de la ranitidina en medio acuoso por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) [Universidad Autónoma del Estado de México]. In *Universidad Autónoma del Estado de México*. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/95041>
- Osorio Torrens, V. (2015). Fate, modeling, and risk of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and Iberian rivers [Universitat de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tesisenred.net/handle/10803/345227>
- Osorio, V., Imbert-Bouchard, M., Zonja, B., Abad, J. L., Pérez, S., Barceló, D. (2014). Simultaneous determination of diclofenac, its human metabolites and microbial nitration/nitrosation transformation products in wastewaters by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1347, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.058>
- Osorio, V., Larrañaga, A., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D. (2016). Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Science of The Total Environment*, 540, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.143>
- Pandey, R. K., Wakharkar, R. D., Kumar, P. (2005). Wittig-Horner approach for the synthesis of tamoxifen. *Synthetic Communications*, 35(21), 2795–2800. <https://doi.org/10.1080/00397910500290516>
- Peñate, I. Q., Javier, U., Haza, J., Wilhelm, A., Delmas, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos . Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 40(3), 173–180. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181221662005>
- Pérez-Cova, M., Tauler, R., Jaumot, J. (2020). Chemometrics in comprehensive two-

- dimensional liquid chromatography: A study of the data structure and its multilinear behavior. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 201, 104009. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104009>
- Perez-Lopez, C., Ginebreda, A., Carrascal, M., Barcelò, D., Abian, J., Tauler, R. (2021). Non-target protein analysis of samples from wastewater treatment plants using the regions of interest-multivariate curve resolution (ROIMCR) chemometrics method. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105752. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105752>
- Pérez-Parada, A., Agüera, A., Del Mar Gómez-Ramos, M., García-Reyes, J. F., Heinzen, H., Fernández-Alba, A. R. (2011). Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: Identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(6), 731–742. <https://doi.org/10.1002/rcm.4902>
- Pérez, S., Eichhorn, P., Aga, D. S. (2005). Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(6), 1361–1367. <https://doi.org/10.1897/04-211R.1>
- Persson, T., Wedborg, M. (2001). Multivariate evaluation of the fluorescence of aquatic organic matter. *Analytica Chimica Acta*, 434(2), 179–192. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00812-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00812-1)
- Petrović, M., Barceló, D. (2007). LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.010>
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 685–696. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01105-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01105-1)
- Petrović, M., Hernando, M. D., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. (2005). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A review. *Journal of Chromatography A*, 1067(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.110>
- Picó, Y., Blasco, C., Font, G. (2004). Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. *Mass Spectrometry Reviews*, 23(1), 45–85. <https://doi.org/10.1002/mas.10071>
- Piqueras, S., Duponchel, L., Tauler, R., de Juan, A. (2011). Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares. *Analytica Chimica Acta*, 705(1–2), 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.020>
- Platikanov, S., Baquero, D., González, S., Martín-Alonso, J., Paraira, M., Cortina, J. L., Tauler, R. (2019). Chemometric analysis for river water quality assessment at the intake of drinking water treatment plants. *Science of the Total Environment*, 667, 552–562. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.423>
- Poirier-Larabie, S., Segura, P. A., Gagnon, C. (2016). Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation

- products under controlled environmental conditions. *Science of the Total Environment*, 557–558, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.057>
- Postigo, C., Richardson, S. D. (2014). Transformation of pharmaceuticals during oxidation/disinfection processes in drinking water treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 461–475. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.029>
- PubChem. (2021). *Sulfamethoxazole* | C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5329>
- Puig-Castellví, F., Alfonso, I., Piña, B., Tauler, R. (2016). 1H NMR metabolomic study of auxotrophic starvation in yeast using Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares for Pathway Analysis. *Scientific Reports*, 6(1), 30982. <https://doi.org/10.1038/srep30982>
- Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*, 43(3), 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.043>
- Radke, M., Lauwigi, C., Heinkele, G., Múrdter, T. E., Letzel, M. (2009). Fate of the antibiotic sulfamethoxazole and its two major human metabolites in a water sediment test. *Environmental Science and Technology*, 43(9), 3135–3141. <https://doi.org/10.1021/es900300u>
- Radke, M., Maier, M. P. (2014). Lessons learned from water/sediment-testing of pharmaceuticals. *Water Research*, 55, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.012>
- Raloff, J. (1998). Drugged waters: Does it matter that pharmaceuticals are turning up in water supplies? *Science News*, 153(12), 187–189. <https://doi.org/10.2307/4010314>
- Ramalho, R. S. (1996). *Tratamiento de aguas residuales* (1st ed.). Editorial Reverté.
- Rastogi, T., Leder, C., Kümmerer, K. (2015). Re-Designing of Existing Pharmaceuticals for Environmental Biodegradability: A Tiered Approach with  $\beta$ -Blocker Propranolol as an Example. *Environmental Science and Technology*, 49(19), 11756–11763. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03051>
- Reyes, N. J. D. G., Geronimo, F. K. F., Yano, K. A. V., Guerra, H. B., Kim, L. H. (2021). Pharmaceutical and personal care products in different matrices: Occurrence, pathways, and treatment processes. In *Water (Switzerland)* (Vol. 13, Issue 9, p. 1159). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/w13091159>
- Ribera Fuentes, M. (2010). Desenvolupament d'una eina per a l'avaluació del comportament ambiental de contaminants químics. Visió química i visió documental. [Universitat Autònoma de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/32124>
- Richardson, M. L., Bowron, J. M. (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 37(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1985.tb04922.x>

- Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R., DeMarini, D. M. (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 636(1–3), 178–242. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.09.001>
- Richardson, S. D., Ternes, T. A. (2014). Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 86(6), 2813–2848. <https://doi.org/10.1021/ac500508t>
- Rigos, G., Nengas, I., Alexis, M., Troisi, G. M. (2004). Potential drug (oxytetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farms. *Aquatic Toxicology*, 69(3), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.05.009>
- Roberts, P. H., Thomas, K. V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, 356(1–3), 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.04.031>
- Robertson, D. W., Katzenellenbogen, J. A. (1982). Synthesis of the E and Z Isomers of the Antiestrogen Tamoxifen and Its Metabolite, Hydroxytamoxifen, in Tritium-Labeled Form. *Journal of Organic Chemistry*, 47(12), 2387–2393. <https://doi.org/10.1021/jo00133a030>
- Rodriguez-Aller, M., Gurny, R., Veuthey, J.-L., Guilleme, D. (2013). Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. *Journal of Chromatography A*, 1292, 2–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.061>
- Rodríguez, C. E. R. (2012). Degradation of pharmaceuticals in sewage sludge by *Trametes versicolor* [Universitat Autònoma de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)* (Issue July). <https://ddd.uab.cat/record/113110>
- Roig Bondia, J. (2013). Eliminación de contaminantes emergentes mediante humedales artificiales como sistema alternativo o complementario a un tratamiento de aguas convencional [Universitat Politècnica de València]. In *RiuNet - Repositorio Institucional de la Universitat Politècnica de València*. <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/44470>
- Rosenfeldt, E. J., Linden, K. G., Canonica, S., von Gunten, U. (2006). Comparison of the efficiency of  $\cdot\text{OH}$  radical formation during ozonation and the advanced oxidation processes  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ . *Water Research*, 40(20), 3695–3704. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.008>
- Rostad, C. E., Martin, B. S., Barber, L. B., Leenheer, J. A., Daniel, S. R. (2000). Effect of a constructed wetland on disinfection byproducts: Removal processes and production of precursors. *Environmental Science and Technology*, 34(13), 2703–2710. <https://doi.org/10.1021/es9900407>
- Rotterdam Convention. (2019). *Rotterdam Convention*. <http://www.pic.int>
- Ruckebusch, C., Duponchel, L., Sombret, B., Huvenne, J. P., Saurina, J. (2003). Time-Resolved Step-Scan FT-IR Spectroscopy: Focus on Multivariate Curve Resolution. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 43(6), 1966–1973. <https://doi.org/10.1021/ci034094i>

- Rutan, S. C., de Juan, A., Tauler, R. (2020). Introduction to Multivariate Curve Resolution. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 2, pp. 85–94). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14890-5>
- Sabater, S., Ginebreda, A., & Barceló, D. (Eds.). (2012). *The Llobregat: The Story of a Polluted Mediterranean River* (1st ed., Vol. 21). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30939-7>
- Šalamoun, J., Macka, M., Nechvátal, M., Matoušek, M., Knesel, L. (1990). Identification of products formed during UV irradiation of tamoxifen and their use for fluorescence detection in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 514(C), 179–187. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)89389-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89389-4)
- Sanchez, E., Kowalski, B. R. (1990). Tensorial resolution: A direct trilinear decomposition. *Journal of Chemometrics*, 4(1), 29–45. <https://doi.org/10.1002/cem.1180040105>
- Sánchez, E., Kowalski, B. R. (1986). Generalized Rank Annihilation Factor Analysis. *Analytical Chemistry*, 58(2), 496–499. <https://doi.org/10.1021/ac00293a054>
- Şanlı, N., Şanlı, S., Özkan, G., Denizli, A. (2010). Determination of pKa values of some sulfonamides by LC and LC-PDA methods in acetonitrile-water binary mixtures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(10), 1952–1960. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010001000022>
- Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E. (2007). Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environment International*, 33(4), 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.09.014>
- Saurina, J., Hernández-Cassou, S., Tauler, R., Izquierdo-Ridorsa, A. (1998). Multivariate resolution of rank-deficient spectrophotometric data from first-order kinetic decomposition reactions. *Journal of Chemometrics*, 12(3), 183–203. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-128X\(199805/06\)12:3<183::AID-CEM506>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-128X(199805/06)12:3<183::AID-CEM506>3.0.CO;2-X)
- Savitzky, A., Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627–1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>
- Schostack, K. J., Malinowski, E. R. (1989). Preferred set selection by iterative key set factor analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 6(1), 21–29. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(89\)80062-0](https://doi.org/10.1016/0169-7439(89)80062-0)
- Schulz, R., Peall, S. K. C. (2001). Effectiveness of a constructed wetland for retention of nonpoint-source pesticide pollution in the Lourens River catchment, South Africa. *Environmental Science and Technology*, 35(2), 422–426. <https://doi.org/10.1021/es0001198>
- Seitz, W., Jiang, J. Q., Schulz, W., Weber, W. H., Maier, D., Maier, M. (2008). Formation of oxidation by-products of the iodinated X-ray contrast medium iomeprol during ozonation. *Chemosphere*, 70(7), 1238–1246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.07.081>

- Selim, M. I., Shawky, M., Wooten, A., Rushing, B. (2016). Comparison of LC – MS and GC – MS for the Analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Surface Water and Treated Wastewaters. *Current Trends in Mass Spectrometry*, 14(3), 8–14.
- Servos, M. R., Smith, M., McInnis, R., Burnison, B. K., Lee, B. H., Seto, P., Backus, S. (2007). The presence of selected pharmaceuticals and the antimicrobial triclosan in drinking water in Ontario, Canada. *Water Quality Research Journal of Canada*, 42(2), 130–137. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2007.016>
- Shao, B., Dong, D., Wu, Y., Hu, J., Meng, J., Tu, X., Xu, S. (2005). Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 546(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.05.007>
- Shore, L. S., Shemesh, M., Cohen, R. (1988). The role of oestradiol and oestrone in chicken manure silage in hyperoestrogenism in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 65(2), 68. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.1988.TB07360.X>
- Silva, B. F. da, Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A. A., Petrovic, M., Barceló, D. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere*, 85(8), 1331–1339. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.051>
- Skoumal Canals, M. (2009). Mètodes d'oxidació avançada aplicats a la mineralització del paracetamol, cloroxilenol, ibuprofè i diclofenac en medi aquós. [Universitat de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/2768>
- Space Physics Data Facility (SPDF). (n.d.). *CDF Home Page*. Retrieved April 13, 2022, from <https://cdf.gsfc.nasa.gov/>
- Sparling, D. W. (2016). Organochlorine Pesticides. *Ecotoxicology Essentials*, 69–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801947-4.00004-4>
- Stan, H. J., Heberer, T. (1997). Pharmaceuticals in the aquatic environment. *Analisis*, 25(7), M20–M23.
- Stan, H. J., Heberer, T., Linkerhägner, M. (1994). Vorkommen von Clofibrinsäure im aquatischen System - Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser?-. *Vom Wasser*, 83, 57–68.
- Stedmon, C. A., Bro, R. (2008). Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: A tutorial. *Limnology and Oceanography: Methods*, 6(11), 572–579. <https://doi.org/10.4319/lom.2008.6.572>
- Stedmon, C. A., Markager, S., Bro, R. (2003). Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*, 82(3–4), 239–254. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(03\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(03)00072-0)
- Stockholm Convention. (2019). *Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs)*. <http://chm.pops.int>
- Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R. D., Silvana Vianna Rodrigues, Baumann, W.



- (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment*, 225(1–2), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00339-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00339-8)
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Profumo, A., Pretali, L., Irastorza, E. A., Fasani, E., Albini, A. (2012). Photolytic and photocatalytic degradation of fluoroquinolones in untreated river water under natural sunlight. *Applied Catalysis B: Environmental*, 119–120, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2012.02.008>
- Su, T., Deng, H., Benskin, J. P., Radke, M. (2016). Biodegradation of sulfamethoxazole photo-transformation products in a water/sediment test. *Chemosphere*, 148, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.049>
- Suffet, I. H., MacCarthy, P. (1999). *Aquatic humic substances: influence on fate and treatment of pollutants*. American Chemical Society.
- Sunderland, J., Tobin, C., White, L., MacGowan, A., Hedges, A. (1999). Ofloxacin Photodegradation Products Possess Antimicrobial Activity. *Drugs*, 58(Supplement 2), 171–172. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958002-00048>
- Suykens, J. (2020). Kernel Methods. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 3, pp. 555–566). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64165-6.02021-8>
- Taewoo, Y., Willie, F. H., Tamara, F.-S. (2007). Chemical Processes during Biological Wastewater Treatment. In D. S. Aga (Ed.), *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems* (1st ed., pp. 363–382). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420052336>
- TANIZAKI, T., HASHIMOTO, A., MATSUOKA, Y., ISHIKAWA, S., HANADA, Y., KADOKAMI, K., SHINOHARA, R. (2005). Photodegradation of Organic Compounds in Tap Water using High Reactive Titanium Dioxide. *Journal of Environmental Chemistry*, 15(4), 847–853. <https://doi.org/10.5985/jec.15.847>
- Tauler, R. (1995). Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30(1), 133–146. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)00047-X](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00047-X)
- Tauler, R. (2021). Multivariate curve resolution of multiway data using the multilinearity constraint. *Journal of Chemometrics*, 35(2), 35. <https://doi.org/10.1002/cem.3279>
- Tauler, R., de Juan, A. (2015). Multivariate Curve Resolution for Quantitative Analysis. In A. M. de la Peña, H. C. Goicoechea, G. M. Escandar, & A. C. Olivieri (Eds.), *Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration* (1st ed., Vol. 29, pp. 247–292). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63527-3.00005-9>
- Tauler, R., Maeder, M. (2020a). 2.11 - Multivariate Curve Resolution—Error in Curve Resolution. In S. D. Brown, R. Walczak, & R. Tauler (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 2, pp. 173–197). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14729-8>
- Tauler, R., Maeder, M. (2020b). Multivariate Curve Resolution—Error in Curve

- Resolution. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 2, pp. 173–197). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14729-8>
- Tauler, R., Maeder, M., de Juan, A. (2020). Multiset Data Analysis: Extended Multivariate Curve Resolution. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 2, pp. 305–336). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14702-X>
- Tauler, R., Marqués, I., Casassas, E. (1998). Multivariate curve resolution applied to three-way trilinear data: Study of a spectrofluorimetric acid-base titration of salicylic acid at three excitation wavelengths. *Journal of Chemometrics*, 12(1), 55–75. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-128x\(199801/02\)12:1<55::aid-cem501>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-128x(199801/02)12:1<55::aid-cem501>3.0.co;2-%23)
- Tauler, R., Smilde, A., Kowalski, B. (1995). Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *Journal of Chemometrics*, 9(1), 31–58. <https://doi.org/10.1002/cem.1180090105>
- Ternes, T. A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32(11), 3245–3260. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2)
- Ternes, T. A., Joss, A., Kreuzinger, N., Miksch, K., Lema, J. M., Gunten, U. von, McArdell, C. S., Siegrist, H. (2005). REMOVAL OF PHARMACEUTICALS AND PERSONAL CARE PRODUCTS: RESULTS OF THE POSEIDON PROJECT. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2005(16), 227–243. <https://doi.org/10.2175/193864705783868115>
- Ternes, T. A., Stüber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B. (2003). Ozonation: A tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Research*, 37(8), 1976–1982. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00570-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00570-5)
- Terrado, M., Barceló, D., Tauler, R. (2009). Quality Assessment of the Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares Method for the Investigation of Environmental Pollution Patterns in Surface Water. *Environmental Science & Technology*, 43(14), 5321–5326. <https://doi.org/10.1021/es803333s>
- The MathWorks Inc. (2020a). *Curve Fitting Toolbox™* (3.5.12). The MathWorks, Inc. <https://www.mathworks.com/products/curvefitting.html>
- The MathWorks Inc. (2020b). *MATLAB® R2020b Update 7* (9.9.0.1857). The MathWorks, Inc.
- Thiruvengkatachari, R., Kwon, T. O., Moon, I. S. (2005). Application of slurry type photocatalytic oxidation-submerged hollow fiber microfiltration hybrid system for the degradation of bisphenol A (BPA). *Separation Science and Technology*, 40(14), 2871–2888. <https://doi.org/10.1080/01496390500333160>
- Tolls, J. (2001). Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environmental Science and Technology*, 35(17), 3397–3406. <https://doi.org/10.1021/ES0003021>
- Tong, L., Eichhorn, P., Pérez, S., Wang, Y., Barceló, D. (2011). Photodegradation of

- azithromycin in various aqueous systems under simulated and natural solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts. *Chemosphere*, 83(3), 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.025>
- Touraud, E., Roig, B. (2008). *Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental Waters (KNAPPE)*. [https://cordis.europa.eu/docs/results/36/36864/124584761-6\\_en.pdf](https://cordis.europa.eu/docs/results/36/36864/124584761-6_en.pdf)
- Trovó, A. G., Nogueira, R. F. P., Agüera, A., Fernandez-Alba, A. R., Sirtori, C., Malato, S. (2009). Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation. *Water Research*, 43(16), 3922–3931. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.006>
- Trovó, A. G., Nogueira, R. F. P., Agüera, A., Sirtori, C., Fernández-Alba, A. R. (2009). Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: Persistence, toxicity and photoproducts assessment. *Chemosphere*, 77(10), 1292–1298. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.065>
- Tucker, L. R. (1966). Some mathematical notes on three-mode factor analysis. *Psychometrika*, 31(3), 279–311. <https://doi.org/10.1007/BF02289464>
- Turgut, C., Gokbulut, C., Cutright, T. J. (2009). Contents and sources of DDT impurities in dicofol formulations in Turkey. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(2), 214–217. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0083-3>
- United Nations. (2004). The World at Six Billion. In *United Nations Publication*.
- Upton, R. A., Buskin, J. N., Williams, R. L., Holford, N. H. G., Riegelman, S. (1980). Negligible excretion of unchanged ketoprofen, naproxen, and probenecid in urine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(11), 1254–1257. <https://doi.org/10.1002/jps.2600691105>
- USEPA. (1975). *A review of scientific and economic aspects of the decision to ban its use as a pesticide. Committee on appropriations of the U.S. House of Representatives by EPA.*
- Van Der Aa, N. G. F. M., Kommer, G. J., Van Montfoort, J. E., Versteegh, J. F. M. (2011). Demographic projections of future pharmaceutical consumption in the Netherlands. *Water Science and Technology*, 63(4), 825–831. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.120>
- Vasiliadou, I. A., Sánchez-Vázquez, R., Molina, R., Martínez, F., Melero, J. A., Bautista, L. F., Iglesias, J., Morales, G. (2016). Biological removal of pharmaceutical compounds using white-rot fungi with concomitant FAME production of the residual biomass. *Journal of Environmental Management*, 180, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.035>
- Vera, M., Cruz, S., Boleda, M. R., Mesa, J., Martín-Alonso, J., Casas, S., Gibert, O., Cortina, J. L. (2017). Fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis as a dissolved organic monitoring tool to assess treatment performance in drinking water trains. *Science of the Total Environment*, 584–585(Supplement C), 1212–1220. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.184>
- Verhoeven, J. W. (1996). Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Reconunendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*, 68(12), 2223–2286.

<https://doi.org/10.1351/pac199668122223>

- Verstraeten, I. M., Heberer, T., Scheytt, T. (2003). Occurrence, Characteristics, Transport, and Fate of Pesticides, Pharmaceuticals, Industrial Products, and Personal Care Products at Riverbank Filtration Sites. In C. Ray, G. Melin, & R. B. Linsky (Eds.), *Riverbank Filtration: Improving Source-Water Quality* (Vol. 43, pp. 175–227). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/0-306-48154-5\\_10](https://doi.org/10.1007/0-306-48154-5_10)
- Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2006). Removal of pharmaceuticals in drinking water treatment: Effect of chemical coagulation. *Environmental Technology*, 27(2), 183–192. <https://doi.org/10.1080/09593332708618632>
- Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*, 41(5), 1001–1012. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.017>
- Vijaya Chamundeeswari, S. P., James Jebaseelan Samuel, E., Sundaraganesan, N. (2014). Molecular structure, vibrational spectra, NMR and UV spectral analysis of sulfamethoxazole. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.063>
- Voigt, M., Bartels, I., Nickisch-Hartfiel, A., Jaeger, M. (2017). Photoinduced degradation of sulfonamides, kinetic, and structural characterization of transformation products and assessment of environmental toxicity. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 99(9–10), 1304–1327. <https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1373777>
- Walczak, B. (Ed.). (2000). *Wavelets in chemistry* (1st ed.). Elsevier Science B.V.
- Wang, Z. (2010). Hock Rearrangement. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents* (1st ed., pp. 1438–1442). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470638859.conrr321>
- Warman, P. R., Thomas, R. L. (1981). CHLORTETRACYCLINE IN SOIL AMENDED WITH POULTRY MANURE. *Canadian Journal of Soil Science*, 61(1), 161–163. <https://doi.org/10.4141/cjss81-017>
- Weber, F.-A., Carius, A., Grüttner, G., Silke, H., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., Rose, J., Koch-Jugl, J., Stolzenberg, H.-C. (2014). Pharmaceuticals in the environment – The global perspective: Occurrence, effects, and potential cooperative action under SAICM. *Umwelt Bundesamt*, 12. [www.umweltbundesamt.de/umweltbundesamt.de/umweltbundesamt](http://www.umweltbundesamt.de/umweltbundesamt.de/umweltbundesamt)
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56(6), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.015>
- West, C. E., Rowland, S. J. (2012). Aqueous phototransformation of diazepam and related human metabolites under simulated sunlight. *Environmental Science and Technology*, 46(9), 4749–4756. <https://doi.org/10.1021/es203529z>
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E. (2005). Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking

- water treatment processes. *Environmental Science and Technology*, 39(17), 6649–6663. <https://doi.org/10.1021/es0484799>
- WHO. (2011). Annex 10 Procedure for prequalification of pharmaceutical. *WHO Technical Report Series*, 961, 1–14. [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/prequalification/trs961-annex10-who-procedure-prequalification.pdf?sfvrsn=85029f47\\_2](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/prequalification/trs961-annex10-who-procedure-prequalification.pdf?sfvrsn=85029f47_2)
- Windig, W., Bogomolov, A., Kucheryavskiy, S. (2020). Two-Way Data Analysis: Detection of Purest Variables. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 2, pp. 107–136). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14747-X>
- Windig, W., Gallagher, N. B., Shaver, J. M., Wise, B. M. (2005). A new approach for interactive self-modeling mixture analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 77(1-2 SPEC. ISS.), 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.06.009>
- Windig, W., Guilment, J. (1991). Interactive self-modeling mixture analysis. *Analytical Chemistry*, 63(14), 1425–1432. <https://doi.org/10.1021/ac00014a016>
- Xian, F., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G. (2012). High Resolution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 84(2), 708–719. <https://doi.org/10.1021/ac203191t>
- Xu, B., Mao, D., Luo, Y., Xu, L. (2011). Sulfamethoxazole biodegradation and biotransformation in the water-sediment system of a natural river. *Bioresource Technology*, 102(14), 7069–7076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.086>
- Yamashita, Y., Jaffé, R., Maie, N., Tanoue, E. (2008). Assessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in coastal environments by excitation emission matrix fluorescence and parallel factor analysis (EEM-PARAFAC). *Limnology and Oceanography*, 53(5), 1900–1908. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.5.1900>
- Yan, S., Song, W. (2014). Photo-transformation of pharmaceutically active compounds in the aqueous environment: A review. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 16(4), 697–720. <https://doi.org/10.1039/c3em00502j>
- Yang, Y., Lu, X., Jiang, J., Ma, J., Liu, G., Cao, Y., Liu, W., Li, J., Pang, S., Kong, X., Luo, C. (2017). Degradation of sulfamethoxazole by UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/persulfate (PDS): Formation of oxidation products and effect of bicarbonate. *Water Research*, 118, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.054>
- Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. A., Wert, E. C. (2006). Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. *Journal of Membrane Science*, 270(1–2), 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.06.045>
- Yost, R. A., Enke, C. G. (1978). Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer. *Journal of the American Chemical Society*, 100(7), 2274–2275. <https://doi.org/10.1021/ja00475a072>
- Zepp, R. G., Baughman, G. L., Schlotzhauer, P. F. (1981). Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water: I. Sunlight induced reactions of aquatic pollutants photosensitized by humic substances.

- Chemosphere*, 10(1), 109–117. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(81\)90174-0](https://doi.org/10.1016/0045-6535(81)90174-0)
- Zepp, R. G., Cline, D. M. (1977). Rates of Direct Photolysis in Aquatic Environment. *Environmental Science and Technology*, 11(4), 359–366. <https://doi.org/10.1021/es60127a013>
- Zepp, R. G., Schlotzhauer, P. F. (1983). Influence of Algae on Photolysis Rates of Chemicals in Water. *Environmental Science and Technology*, 17(8), 462–468. <https://doi.org/10.1021/es00114a005>
- Zepp, R. G., Schlotzhauer, P. F., Sink, R. M. (1985). Photosensitized Transformations Involving Electronic Energy Transfer in Natural Waters: Role of Humic Substances. *Environmental Science and Technology*, 19(1), 74–81. <https://doi.org/10.1021/es00131a008>
- Zepp, R. G., Sheldon, W. M., Moran, M. A. (2004). Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation–emission matrices. *Marine Chemistry*, 89(1–4), 15–36. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.02.006>
- Zhang, H., Xie, H., Chen, J., Zhang, S. (2015). Prediction of hydrolysis pathways and kinetics for antibiotics under environmental pH conditions: A quantum chemical study on cephadrine. *Environmental Science and Technology*, 49(3), 1552–1558. <https://doi.org/10.1021/es505383b>
- Zhang, J., Chang, V. W. C., Giannis, A., Wang, J. Y. (2013). Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment*, 445–446, 281–298. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.061>
- Zhang, X., Marcé, R., Armengol, J., Tauler, R. (2014). Distribution of dissolved organic matter in freshwaters using excitation emission fluorescence and Multivariate Curve Resolution. *Chemosphere*, 111, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.009>
- Zhang, Z., Ma, P., Lu, H. (2020). Two-Way Data Analysis: Multivariate Curve Resolution: Noniterative Resolution Methods. In S. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Vol. 2, pp. 137–152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14875-9>
- Zhu, B., Zonja, B., Gonzalez, O., Sans, C., Pérez, S., Barceló, D., Esplugas, S., Xu, K., Qiang, Z. (2015). Degradation kinetics and pathways of three calcium channel blockers under UV irradiation. *Water Research*, 86, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.028>
- Žonja, B. (2017). Identification and Fate of Known and Unknown Transformation Products of Pharmaceuticals in the Aquatic System [Universitat de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/401594>
- Zonja, B., Aceña, J., Jelic, A., Petrovic, M., Pérez Solsona, S., Barceló, D. (2014). Transformation Products of Emerging Contaminants: Analytical Challenges and Future Needs. In D. A. Lambropoulou & L. M. L. Nollet (Eds.), *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment* (pp. 303–324). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118339558.ch10>



---

## LLISTAT DE TAULES I FIGURES

**Taula 1.** *Regions de l'espectre de la radiació solar.*

**Taula 2.** *Propietats fisicoquímiques del tamoxifè.*

**Taula 3.** *Propietats fisicoquímiques del sulfametoxazol.*

**Taula 4.** *Principals característiques de les diferents metodologies de modelització del MCR-ALS: modelització rígida, flexible i híbrida rígida i flexible.*

**Taula 5.** *Resum de les variàncies explicades (en %), els màxims de banda EX-EM (en nm) i l'assignació del tipus de CDOM dels components MCR-ALS resolts obtinguts en l'anàlisi de la matriu de dades superaugmentada  $D_{EEM,supaug}$ .*

**Figura 1.** *Distribució del mercat farmacèutic mundial. Percentatge de vendes efectuades el 2020. Font: IQVIA (MIDAS), abril 2021 (EFPIA 2021).*

**Figura 2.** *Consum total de productes farmacèutics (Dosi Diària Definida (DDD)·1000 inh<sup>-1</sup>·dia<sup>-1</sup>) de 9 grups anatòmics diferents (A - Aparell digestiu i metabolisme, B - Sang i òrgans hematològics, C - Sistema cardiovascular, G - Sistema genito-urinari i hormones sexuals, H - Preparats hormonals sistèmics, excepte les hormones sexuals i les insulines, J - Antiinfecciosos per a ús sistèmic, M - Sistema musculoesquelètic, N - Sistema nerviós i R - Sistema respiratori) en 22 països de l'OCDE (Àustria, Bèlgica, República Txeca, Dinamarca, Estònia, Finlàndia, Alemanya, Grècia, Hongria, Islàndia, Itàlia, Letònia, Lituània, Luxemburg, Països Baixos, Noruega, Portugal, República Eslovaca, Eslovènia, Espanya, Suècia i Regne Unit) del 2000 al 2019 (OCDE Health Statistics, 2022).*

**Figura 3.** *Cronograma de la legislació sobre contaminants i fàrmacs en el medi ambient.*

**Figura 4.** *Cronograma de part de la legislació sobre contaminants en el medi aquàtic.*

**Figura 5.** *Nivells de concentració de diferents classes de fàrmacs al riu Llobregat l'any 2016. Reproduït de (Aceña i Sánchez, 2017).*

**Figura 6.** *Difusió d'un fàrmac dins del Cicle de l'Aigua. Figura adaptada de (Barceló & López, 2008).*

**Figura 7.** *Metabolisme dels fàrmacs al cos humà. Reproduïda de (Ribera i Fuentes, 2010).*

**Figura 8.** *Esquema de les etapes d'una EDAR convencional. Figura adaptada de (Espejo, 2016).*



---

**Figura 9.** Representació esquemàtica dels possibles tipus i llocs de transformació dels fàrmacs.

**Figura 10.** Classificació dels Processos d'Oxidació Avançada (AOPs).

**Figura 11.** Fraccions d'emissió de la radiació solar. Figura adaptada de (Espejo, 2016).

**Figura 12.** Esquema d'una reacció fotoquímica.

**Figura 13.** Mecanismes de reacció de la fotodegradació directa i indirecta.

**Figura 14.** Història de la espectrometria de masses. Figura reproduïda de (Aceña i Sánchez, 2017)

**Figura 15.** Tipus de fonts de ionització disponibles segons rang de masses i polaritat. Comparació amb GC-MS. Figura reproduïda de (J. H. Gross, 2017).

**Figura 16.** Alguns exemples de tipologia de dades segons la seva complexitat

**Figura 17.** Exemples de mètodes quimiomètrics en funció de la tipologia de dades a analitzar.

**Figura 18.** Metodologies per enfocar l'anàlisi per MCR.

**Figura 19.** Composició de la matèria orgànica dissolta (DOM).

**Figura 20.** Tècniques emprades per caracteritzar la Matèria Orgànica Dissolta (DOM) present al medi natural.

**Figura 21.** Estructura del (Z)-tamoxifè.

**Figura 22.** Estructura del sulfametoxazol.

**Figura 23.** (A) Simulador de llum solar SUNTEST<sup>®</sup>. En el seu interior hi ha les cubetes de quars emprades per exposar les mostres a la llum. (B) Espectres d'emissió solar i de la làmpada d'arc de xenó del simulador emprat. Figura adaptada de (García Gómez, 2017).

**Figura 24.** (A) Espectre UV-Visible del (Z)-tamoxifè ((Z)-TAM). (B) Sèrie d'espectres corresponents al seguiment d'un procés de fotodegradació del (Z)-TAM sota l'acció de la llum UV.

**Figura 25.** Mapa de la conca del riu Llobregat que mostra la ubicació dels llocs de mostreig (marques blaves i vermelles) juntament amb els embassaments (marques cian) i les principals

---

estacions d'aigua potable (ETAP) i plantes depuradores d'aigües residuals (EDAR) (marques verdes i marrons, respectivament) de la conca fluvial.

**Figura 26.** (a) Espectre i la seva representació en forma de vector. (b) Conjunt d'espectres recollits durant un procés i la seva representació en forma de matriu de dades senzilla (**D**). Figura adaptada de (Mas García, 2012).

**Figura 27.** Representació gràfica de l'ordenació de les dades experimentals en el cas del seguiment cinètic per espectroscòpia d'absorció molecular d'un procés de degradació. Les files representen els espectres UV-Vis enregistrats durant el procés i les columnes representen la variació del senyal en funció del temps a les diferents longituds d'ona mesurades. Figura adaptada de (Mas García, 2012).

**Figura 28.** Estructures de matrius augmentades en els processos químics. (a) Matriu augmentada en la direcció de les files, (b) Matriu augmentada en la direcció de les columnes i (c) Matriu augmentada en la direcció de les files i de les columnes. Les línies horitzontals i verticals representen la direcció (o direccions) de l'augmentació. Figura reproduïda de (Mas García, 2012).

**Figura 29.** Visualització esquemàtica de la correcció de sincronització de les dades cromatogràfiques (LC-DAD-MS).

**Figura 30.** Exemple de correcció de la dispersió de llum de la fluorescència. Els pics de la dispersió de Rayleigh i Raman es van eliminar mitjançant el mètode descrit a (Zepp, Sheldon, et al., 2004) per millorar la qualitat de les dades espectrals EEM mesurades. Figura adaptada del Material Suplementari de l'ARTICLE III.

**Figura 31.** Exemple de preprocessament d'una matriu de dades en la direcció cromatogràfica (temps d'elució) (**A** i **B**) i l'espectral (**C** i **D**) abans i després de la seva aplicació, respectivament.

**Figura 32.** Representació en forma matricial de les dades experimentals corresponents al seguiment cinètic per absorció molecular. Figura adaptada de (Mas García, 2012).

**Figura 33.** Representació en forma matricial de les dades experimentals corresponents al seguiment per cromatografia líquida amb detecció per díodes en sèrie (DAD).

**Figura 34.** Classificació segons el tipus de resolució (iterativa o no iterativa) dels mètodes de Resolució Multivariant de Corbes (MCR).

---

**Figura 35.** Diagrama de flux del procediment que segueix l'algorisme del mètode de Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (MCR-ALS). Figura reproduïda de l'ARTICLE II

**Figura 36.** Esquema general del mètode MCR-ALS.

**Figura 37.** Gràfic de descomposició de valors singulars per a una matriu corresponent a un seguiment cinètic de fotodegradació. En aquest cas, el nombre de components (a priori) químicament rellevants (és a dir, amb una variància més elevada que la del soroll) és 4. Figura reproduïda de (Mas Garcia, 2012).

**Figura 38.** Representació gràfica de l'obtenció de perfils de concentració ( $C$ ) o espectres ( $S^T$ ) segons el mètode SIMPLISMA. Figura reproduïda de (Mas Garcia, 2012).

**Figura 39.** Representació gràfica de l'acció de les restriccions en els perfils MCR. Perfils **negres**, perfils inicials sense restriccions. Perfils **vermells**, perfils restringits. Figura adaptada de (Mas Garcia, 2012; de Juan, Tauler, 2019).

**Figura 40.** Estructura de les matrius de dades individuals obtingudes per al fàrmac sulfametoxazol (SMX) en l'anàlisi de: **A)** les titulacions àcid-base espectromètriques UV-Visible ( $D_{ABn}$ ), **C)** les fotodegradacions cinètiques espectromètriques UV-Visible ( $D_{kin,MQ}$  i  $D_{kin,DW}$ ), i **F)** les injeccions cromatogràfiques LC-DAD ( $D_{DADn}$ ) i LC-MS ( $D_{MSn}$ ) de les alíquotes de mostra del SMX. Matrius de dades augmentades per columnes obtingudes en l'anàlisi simultània de: **B)** les titulacions àcid-base espectromètriques UV-Visible ( $D_{AB,aug}$ ), **D)** les fotodegradacions cinètiques espectromètriques UV-Visible ( $D_{kin,aug}$ ), **E)** les titulacions àcid-base i les fotodegradacions cinètiques espectromètriques UV-Visible ( $D_{AB-kin,aug}$ ) i **G)** les múltiples injeccions cromatogràfiques LC-DAD ( $D_{DAD,aug}$ ) i LC-MS ( $D_{MS,aug}$ ). Figura reproduïda de l'ARTICLE II.

**Figura 41.** Matrius de dades superaugmentades obtingudes en l'anàlisi simultània per fusió de dades de: **H)** el conjunt de dades resultant d'agrupar les titulacions àcid-base espectromètriques UV-Visible, les fotodegradacions cinètiques espectromètriques UV-Visible i les múltiples injeccions cromatogràfiques LC-DAD ( $D_{UV-DAD,aug}$ ) i **I)** el conjunt de dades resultant d'acoblar les múltiples injeccions cromatogràfiques LC-DAD i LC-MS ( $D_{DAD-MS,supaug}$ ) Figura reproduïda de l'ARTICLE II.

**Figura 42.** Estructura de dades incompleta ( $D_{incomp}$ ) formada en analitzar conjuntament totes les dades obtingudes en el procés de fotodegradació del sulfametoxazol (SMX). \*NaN: notació emprada per MATLAB® per indicar els valors absents.

---

**Figura 43.** Models de descomposició bilineal construïts a partir dels arranjaments de matrius de dades individuals proporcionats per un únic sistema de detecció instrumental (ja sigui UV o MS) per als estudis de valoració àcid-base, de fotodegradació cinètica i d'anàlisi cromatogràfica LC-DAD i LC-MS del fàrmac SMX (matrius  $D_{ABn}$ ,  $D_{kin,n}$  i  $D_{DADn}/D_{MSn}$ ). Aquests models segueixen l'Equació (6) referida a la secció 4.3.1.1 del Capítol 4. \*NC: Nombre de components (és a dir, nombre d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE II.

**Figura 44.** Models de descomposició bilineal construïts a partir de les disposicions de matrius de dades augmentades amb les diferents mostres proporcionades per un únic sistema de detecció instrumental (ja sigui UV o MS) per als estudis de valoració àcid-base, de fotodegradació cinètica i d'anàlisi cromatogràfica LC-DAD i LC-MS del fàrmac SMX (matrius  $D_{AB,aug}$ ,  $D_{kin,aug}$ , and  $D_{DAD,aug}/D_{MS,aug}$ ). Aquests models segueixen l'Equació (18) esmentada anteriorment. \*NC: Nombre de components (número de components MCR resolts). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE II.

**Figura 45.** Model de descomposició bilineal construït per a l'anàlisi conjunta (seguint una estratègia de fusió de dades) de les disposicions matricials augmentades multi-mostra proporcionades per un únic equip instrumental (en aquest cas, l'espectrofotòmetre UV-Visible), per als estudis de valoració àcid-base i de fotodegradació cinètica (matriu  $D_{AB-kin,aug}$ ). Aquest model segueix l'Equació (18) descrita anteriorment. \*NC: Nombre de components (número d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE II.

**Figura 46.** Model de descomposició bilineal construït per a l'anàlisi conjunta (seguint una estratègia de fusió de dades) de les disposicions matricials augmentades multi-mostra proporcionades per diversos equips instrumentals (en aquest cas, l'espectrofotòmetre UV-Visible i el LC-DAD), que utilitzen en ambdós casos la mateixa tècnica de detecció (UV-DAD), per als estudis de valoració àcid-base, de fotodegradació cinètica i de LC-DAD del fàrmac SMX (matriu  $D_{UV-DAD,aug}$ ). Aquest model segueix l'Equació (18) descrita anteriorment. \*NC: Nombre de components (número d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE II.

**Figura 47.** Model de descomposició bilineal construït per a l'anàlisi conjunta (seguint una estratègia de fusió de dades) de les disposicions matricials augmentades multi-mostra proporcionades per un únic equip instrumental (en aquest cas, el LC-DAD-MS), per a l'estudi de l'anàlisi cromatogràfica del fàrmac SMX (matriu  $D_{DAD-MS,supaug}$ ). Aquest model segueix

---

l'Equació (20) descrita anteriorment. \***NC**: Nombre de components (número d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS). Figura reproduïda del Material Supl. de l'ARTICLE II.

**Figura 48.** Model de descomposició bilineal construït per a l'anàlisi conjunta de totes les dades obtingudes en l'estudi del procés de fotodegradació del SMX: les dades àcid-base ( $D_{AB,aug}$ ), les dades del seguiment cinètic de la degradació ( $D_{kin,aug}$ ) i les dades de les anàlisis cromatogràfiques per LC-DAD ( $D_{DAD,aug}$ ) i LC-MS ( $D_{MS,aug}$ ). Aquest model segueix l'Equació (22) descrita anteriorment. \***NC**: Nombre de components (número d'espècies químiques resoltes per MCR-ALS), **NaN**: notació emprada per MATLAB<sup>®</sup> per indicar els valors absents.

**Figura 49.** Representació dels blocs compartits (submatrius de dades completes) en la descomposició bilineal de la matriu augmentada incompleta ( $D_{incomp}$ ). \***NaN**: notació emprada per MATLAB<sup>®</sup> per indicar els valors absents. Figura adaptada de (De Luca, Ragno et al., 2014).

**Figura 50.** Evolució espectral al llarg del temps per al seguiment espectrofotomètric UV-Visible dels experiments de fotodegradació del fàrmac tamoxifè (TAM) a 400 i 765  $W \cdot m^{-2}$  (matrius  $D_{d400sp}$  i  $D_{d765sp}$ ) i els seus perfils cinètics ( $C$ ) i els espectres UV-VIS purs ( $S^T$ ) resolts per MCR-ALS. Figura reproduïda de l'ARTICLE I.

**Figura 51.** Perfils d'elució ( $C_{aug}$ ) i espectres UV-Vis purs ( $S^T$ ) resolts mitjançant l'anàlisi MCR-ALS simultània de les dades LC-DAD de les 11 alíquotes de mostra de l'experiment de fotodegradació del TAM realitzat a 400  $W \cdot m^{-2}$  ( $D_{400DAD,aug}$ ). Figura reproduïda de l'ARTICLE I.

**Figura 52.** Evolució dels perfils de concentració ( $C$ , dreta) i de les àrees de pic cromatogràfiques LC-DAD ( $A_{kin}$ , esquerra) en funció del temps de reacció (irradiació UV) a partir de l'anàlisi MCR-ALS de les matrius  $D_{d400sp}$  i  $D_{400DAD,aug}$ , respectivament. Els punts de dades són els marcadors i les línies són les estimacions de l'ajustament de corbes dels respectius perfils cinètics. Figura adaptada de l'ARTICLE I.

**Figura 53.** Via de fotodegradació proposada pel fàrmac tamoxifè (TAM) en solució.

**Figura 54.** Identificació de fotoproductes a partir dels seus espectres MS purs (submatriu  $S_{MS}^T$ ) resolts mitjançant l'anàlisi MCR-ALS simultània de les dades fusionades HPLC-DAD-MS de l'experiment de fotodegradació del TAM realitzat a 400  $W \cdot m^{-2}$  (matriu  $D_{400DAD,400MS,supaug}$ ). Figura reproduïda de l'ARTICLE I.

---

**Figura 55.** Evolució de les àrees de pic LC-DAD-FLD ( $A_{kin}$ ) en funció del temps de reacció (irradiació UV). Els punts de dades són els marcadors i les línies són les estimacions de l'ajustament de corbes dels respectius perfils cinètics.

**Figura 56.** Espectres d'emissió purs resolts (submatriu  $S_{FLD}^T$ ) obtinguts en la resolució per MCR-ALS de les dades LC-DAD-FLD dels diferents fotoproductes presents en el procés de fotodegradació del TAM. La longitud d'ona d'excitació va ser fixada a 255 nm.

**Figura 57.** Descomposició bilineal del multi-conjunt de dades format per: les dades de seguiment fluorimètric i espectrofotomètric del procés de degradació del TAM, i les dades de l'anàlisi cromatogràfica LC-DAD-FLD. Aquesta distribució de dades està formada per dos blocs de dades incomplets.

**Figura 58.** Perfils de distribució de les espècies àcid-base ( $C_{AB,avg} = [C_{AB1}; C_{AB2}]$ ) i espectres UV-Vis purs ( $S^T$ ) resolts per a les dues valoracions espectrofotomètriques UV-Visible realitzades en l'estudi del procés de fotodegradació del sulfametoxazole (SMX). En els gràfics de distribució, les línies de punts representen les estimacions MCR-ALS obtingudes, i les línies sòlides fan referència als perfils d'ajustament de corbes calculats tenint en compte les equacions d'equilibri d'un àcid dipròtic. Estimació dels valors de les constants d'acidesa ( $pK_a$ ). Figura adaptada de la present en l'ARTICLE II.

**Figura 59.** Perfils de concentració/cinètics ( $C_{kin,avg} = [C_{kin,MQ}; C_{kin,DW}]$ ) i espectres UV-Vis purs ( $S_{UV-DAD}^T$ ) resolts per MCR-ALS dels experiments de fotodegradació del fàrmac SMX realitzats amb les solucions de mostra amb aigua Milli-Q (MQ) i aigua destil·lada (DW), respectivament. En els gràfics dels perfils cinètics, les línies de punts són les estimacions MCR-ALS resoltes, i les línies sòlides són els perfils d'ajustament de corbes calculats tenint en compte un model de reaccions seqüencials i paral·leles de pseudo-primer ordre. Es detalla la identificació de les espècies presents en els experiments de fotodegradació cinètica: **AB2** i **AB3** (espècies àcid-base del SMX), espècie **isòmer** del SMX i productes de transformació del SMX (**TP1-TP4**). Figura reproduïda de l'ARTICLE II.

**Figura 60.** Perfils de concentració ( $A_{kin}$ ) i espectres UV-Vis i MS purs (matriu  $S_{DAD-MS,avg}^T = [S_{DAD}^T, S_{MS}^T]$ ) resolts en l'anàlisi simultània MCR-ALS de les dades LC-DAD i LC-MS de les mostres recollides durant l'experiment de fotodegradació del SMX (matriu  $D_{DAD-MS,supavg}$ ). Figura adaptada de la present en l'ARTICLE II.

---

**Figura 61.** Perfils d'elució normalitzats (matriu  $C_{elution}$ ) obtinguts per als components MCR-ALS resolts amb significat químic (sis espècies diferents: SMX inicial, el seu isòmer conformacional i els quatre productes de transformació TP1-TP4) durant l'anàlisi simultània per MCR-ALS de les dades LC-DAD-MS del procés de fotodegradació del SMX, aplicant les restriccions de trilinealitat/igualtat de forma a les espècies **SMX**, **isòmer**, **3A5M** i **TP3**. Aquesta restricció no es va aplicar a les espècies TP2 (Acetil-SMX, en **negre**) i TP4 (4APS, en **taronja**), on es representen la seva elució bilineal MCR-ALS de les diferents alíquotes analitzades (línies de punts) i els seus hipotètics perfils trilineals calculats (línia sòlida).

**Figura 62.** Disposició matricial dels diferents conjunts de dades obtinguts en la caracterització de les mostres d'aigua superficial del riu Llobregat mitjançant espectroscòpies d'absorbància UV-Visible i de fluorescència d'excitació-emissió, analitzats posteriorment per MCR-ALS. Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE III.

**Figura 63.** Models MCR-ALS dels diferents conjunts de dades obtinguts en l'anàlisi de l'espectroscòpia de fluorescència d'EX-EM (EEM) de les mostres d'aigua superficial del riu Llobregat: **a)** Model bilineal de la matriu de dades d'EEM adquirida a partir d'una única mostra d'aigua en un punt i campanya de mostreig fluvial específics (matriu  $D_{EEM,l,k}$ ), **b)** Ampliació del model bilineal a l'anàlisi simultània del conjunt de matrius de dades d'EEM obtingudes als diferents emplaçaments fluvials (punts de mostreigs) en una única campanya de seguiment (matriu augmentada  $D_{EEM,l,aug}$ ). Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE III.

**Figura 64. c)** Extensió del model bilineal MCR a l'anàlisi simultània del conjunt de matrius de dades d'EEM obtingudes als diferents llocs fluvials en múltiples campanyes de seguiment (matriu de dades superaugmentada  $D_{EEM,supaug}$ ), i **d)** Implementació de la restricció de model trilineal durant l'optimització del model de descomposició bilineal del conjunt de dades de **c)**, mostrant com s'obtenen les matrius de factors  $S_{ex}$  (espectres d'excitació) i  $C_{l,k}$  (concentració relativa) a cada iteració ALS.

**Figura 65.** Espectres UV-Vis de mostres d'aigua del riu Llobregat recollides als diferents punts de presa de mostra (veure **Figura 25**) en les tres campanyes de seguiment realitzades. Figura reproduïda de l'ARTICLE III.

**Figura 66.** Gràfics de scores (superior) i de Q residuals vs. Hotelling  $T^2$  (a sota) dels resultats PCA obtinguts a partir de les dades espectrofotomètriques UV-Visible adquirides en l'anàlisi de les mostres d'aigua del riu Llobregat als diferents punts de presa de mostra i campanyes de seguiment (matriu  $D_{UV,aug}$ ). La mostra d'aigua de la riera Gavarresa (**Punt H**) de la campanya d'octubre 2018 (**groc**) presenta un comportament diferent de la resta de mostres d'aigua recollides. Figura reproduïda del Material Suplementari de l'ARTICLE III.

---

**Figura 67.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 1 (C1).

**Figura 68.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 2 (C2).

**Figura 69.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 3 (C3).

**Figura 70.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 4 (C4).

**Figura 71.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 5 (C5).

**Figura 72.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 6 (C6)

**Figura 73.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 7 (C7).

**Figura 74.** Espectres d'EX i EM i distribució geogràfica del Component 8 (C8).

**Figura 75.** Gràfics circulars que mostren les diferents aportacions de les fraccions de CDOM a la capçalera fluvial (**Punt B**), la riera Gavarresa (**Punt H**) i la desembocadura (**Punt P**) del riu Llobregat en les tres campanyes de monitoratge realitzades (oct-2017, oct-2018 i maig-2019). Figura reproduïda de l'Article III.





