

Trabajo Fin de Grado

Detección de principios activos de uso frecuente y sus metabolitos en aguas residuales

Grado en Farmacia

Tutores: Ana Isabel Jiménez Abizanda y M^a Idaira Pacheco
Fernández

Judith González González

Curso 2016/2017

La elaboración de este trabajo no sólo es producto del esfuerzo individual sino también del colectivo, y por ello:

Agradezco a la Dra. Ana Isabel Jiménez Abizanda y al Dr. José Manuel García Fraga por aumentar mi entendimiento analítico, por sus consejos, aportaciones y observaciones realizadas en este trabajo.

Agradezco a la futura Dra. M^a Idaira Pacheco Fernández su paciencia, dedicación, motivación, y criterio, y sobretodo le agradezco que haya compartido sus conocimientos haciendo fácil lo difícil.

Agradezco al Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de La Laguna (SEGAI), por la posibilidad de utilizar sus instalaciones, y al Servicio de Medio Ambiente de la Universidad de La Laguna (SEMALL) por la aportación de las muestras de aguas.

Agradezco a la Unidad Departamental de Química Analítica por proporcionarnos los materiales empleados en la realización de este trabajo.

Y por último agradecer a mis padres todo el apoyo que me han brindado día a día en el transcurso de estos cinco años de carrera.

Índice

Abstract	1
Resumen	3
1. Introducción	5
2. Objetivos.....	11
3. Procedimiento experimental.....	13
3.1. Materiales e instrumentación	13
3.2. Procedimientos	13
3.2.1. Toma de muestra y filtración.....	13
3.2.2. Procedimiento de extracción.....	14
3.2.3. Separación cromatográfica	15
4. Resultados	17
4.1. Selección de los compuestos	17
4.2. Evaluación de la eficacia extractiva del método	17
4.3. Análisis de muestras	26
4.3.1. Muestra con pretratamiento	26
4.3.2. Muestras tras un proceso de EDAR.....	28
5. Conclusiones.....	35
6. Referencias	37
7. Anexo: Glosario	41

Abstract

In recent years, the scientific community has become increasingly aware of the presence of “contaminants of emerging concern” or “emerging contaminants” (EC) that are commonly derived from municipal, agricultural, and industrial wastewater sources. Conventional water treatments do not achieve the complete elimination of such chemicals, causing environmental problems and health risks.

Therefore, it is important to develop new technologies for their elimination, as well as analytical techniques that allow their monitoring. The most of the ECs (personal care products, illicit drugs, antibiotics, pharmaceuticals products and others) are not included in the current legislation. However, they can be regulated in the future depending on the research on their effects on health and in the environment.

The purpose of this work is the study of the presence of drugs in wastewater, which provides information on the most consumed active principles, as well as the effectiveness of water treatment.

Samples collected at different stages of wastewater treatment were filtered and preconcentrated by solid-phase extraction. The extracts were analyzed by liquid chromatography in combination with mass spectrometry for the separation and identification of the analytes of interest.

To verify the efficiency and reproducibility of the preconcentration method, a sample of wastewater was spiked with some active substances and subjected to the process of extraction and analysis. In this way, high enrichment factors were obtained, as well as adequate values of precision. Following the same methodology, the rest of the collected samples were analyzed, and with the help of the software and the compound database, several compounds were identified.

In view of the results, it can be concluded that the treatment of a Wastewater Treatment Plant (WWTP) is more effective than a simple pretreatment because it partially eliminates some of the compounds present initially in the samples, while the latter does not eliminate any analyte.

Resumen

En los últimos años ha incrementado el interés de la comunidad científica por la presencia de contaminantes de interés emergentes, que proceden de aguas residuales municipales, agrícolas e industriales. Los tratamientos convencionales de agua no logran la eliminación completa de dichos contaminantes, causando contaminación ambiental y problemas de salud. Por ello, es importante el desarrollo de nuevas tecnologías para su eliminación, así como de técnicas analíticas que permitan su monitorización.

La finalidad de este trabajo es el estudio de la presencia de fármacos y drogas de abuso en aguas residuales, que aporta información sobre los principios activos más consumidos, así como de la eficacia del tratamiento del agua.

Las muestras tomadas en distintas fases del tratamiento del agua residual, fueron filtradas y sometidas a un tratamiento previo de extracción y preconcentración. A continuación, los extractos fueron analizados por cromatografía líquida en combinación con espectrometría de masas para la separación e identificación de los analitos de interés.

Para comprobar la eficacia y reproductibilidad del método de preconcentración, se enriqueció una muestra con una serie de analitos y fue sometida al proceso de extracción y análisis. De esta forma, se obtuvieron altos valores de factor de enriquecimiento, así como valores adecuados de precisión. Del mismo modo, se analizaron las muestras tomadas, y con la ayuda del software y la librería elaborada, se logró identificar una variedad de compuestos en las distintas muestras.

A la vista de los resultados se concluye que el tratamiento de una depuradora es más eficaz que un simple pretratamiento ya que consigue eliminar de forma parcial algunos de los compuestos presentes inicialmente en las muestras.

1. Introducción

Los “contaminantes de interés emergente” ⁽¹⁾ son compuestos de distinto origen y naturaleza química que han adquirido un especial interés en la contaminación del medio ambiente y en la salud de los seres vivos. Entre estas sustancias se encuentran los fármacos, aditivos industriales, productos para el cuidado personal, drogas de abuso, productos fitosanitarios, entre otros.

Recientemente, el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad ha alertado del uso irracional de los medicamentos derivados de la automedicación basándose en el Informe Anual del Sistema Nacional de Salud (SNS)⁽²⁾ (**Tabla 1**). En este informe se recogen los medicamentos más vendidos y señala un incremento del consumo de analgésicos como tramadol (14,8%) y metamizol sódico (14,6%), antibióticos como la amoxicilina (16,2%), ansiolíticos como el lorazepam (3,8%), e hipnosedantes como el lormetazepam (4,9%) en el año 2014 con respecto al 2013. No obstante, se observa una disminución en el consumo de ciertos principios activos como el ibuprofeno (3,8%), y el omeprazol (1,5%).

Por otro lado, el Observatorio Europeo de las drogas ⁽³⁾ sitúa a España como el país europeo donde existe un mayor consumo de cocaína y cannabis. Sin embargo, en los últimos años se observa una disminución o estabilización del consumo de dichas drogas. En la **Figura 1** se muestra una comparativa de las drogas ilícitas más consumidas entre los años 2009 y 2015 por la sociedad española ⁽⁴⁾.

Investigaciones recientes han demostrado que el tratamiento de aguas residuales que se lleva a cabo actualmente en las estaciones depuradoras resulta ineficaz para la eliminación de estos contaminantes orgánicos ⁽⁵⁻⁶⁾ convirtiéndose en un motivo de preocupación para la comunidad científica, y para las entidades ambientales reguladoras.

Tabla 1. Clasificación de los medicamentos más vendidos en España en el año 2015 según el Informe Anual del SNS del Ministerio de Sanidad ⁽²⁾

Principio activo	Mecanismo de acción	Clasificación ATC*	Nº de envases vendidos (millones)	% Δ envases 13/14
Omeprazol	Antiulceroso	A	53,6	-1,5
Paracetamol	Analgésico y antipirético	N	34,4	7,6
Simvastatina	Hipolipemiente	C	25,7	3,9
Ácido acetilsalicílico	Antiagregante	B	25,1	1,8
Atorvastatina	Hipolipemiente	C	19,0	5,1
Metamizol sódico	Analgésico, antiespasmódico y antipirético	N	17,9	14,6
Ibuprofeno	Analgésico, antiinflamatorio y antipirético	M	17,3	-3,8
Lorazepam	Ansiolíticos	N	16,4	3,8
Metformina	Hipoglucemiante	A	16,3	0,4
Enalapril	Antihipertensivo	C	13,9	2,8
Tramadol-combinaciones	Analgésico opioide	N	13,7	14,8
Alprazolam	Ansiolíticos	N	11,8	1,3
Furosemida	Diuréticos de asa	C	9,6	6,9
Lormetazepam	Hipnótico y sedante	N	9,3	4,9
Amoxicilina e inhibidores de la beta-lactamasa	Antibiótico	J	9,1	16,2

*Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química. (*Anatomical, Therapeutic, Chemical classification system*) A: Tracto alimentario y metabolismo; B: Sangre y órganos hematopoyéticos; C: Sistema cardiovascular; J: Antiinfecciosos para uso sistémico; M:Sistema musculoesquelético; N: Sistema nervioso.

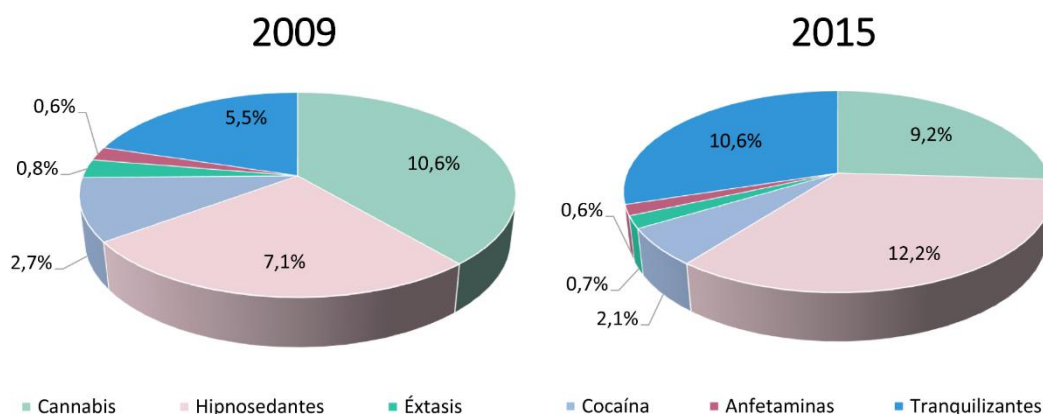


Figura 1. Drogas ilícitas más consumidas en España en los años 2009 y 2015 ⁽³⁾

Las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) sufren cuatro tipos diferentes de tratamiento:

- Pretratamiento: Proceso en el que se elimina los sólidos grandes, arenas y grasas.
- Tratamiento primario: Consiste en eliminar los sólidos en suspensión mediante un proceso físico-químico.
- Tratamiento secundario: Es un tratamiento biológico que produce la degradación de la materia orgánica.
- Tratamiento terciario: Se encarga de eliminar los contaminantes que no pueden ser eliminados en las fases anteriores.

Estos residuos difíciles de tratar llegan al agua a través de los desechos fisiológicos, mediante el enjuague de los envases para reutilización, del vertido directo en inodoros, fregaderos, etc. La gran mayoría de estos compuestos no están regulados por ninguna legislación, ya sea la española ⁽⁷⁾ o la europea ⁽⁸⁾. No obstante, la Comisión Europea informa que se encargará de estudiar los efectos negativos de los contaminantes emergentes en el ser humano y en el medioambiente, especialmente en el medio acuático.

La determinación de estos compuestos resulta muy complicada debido a las bajas concentraciones a las que se encuentran en las muestras. Por ello, es necesario realizar una etapa de preconcentración previa al análisis para poder alcanzar los límites de

sensibilidad requeridos ⁽⁹⁻¹²⁾. Las principales técnicas de preparación de muestras medioambientales ⁽¹³⁾ son:

- i) Extracción en fase sólida (SPE): se basa en el reparto de los analitos entre la muestra acuosa y un sorbente sólido que se encuentra contenido en un cartucho en la modalidad estática (SPE) o que es dispersado en la muestra en la modalidad dispersiva (d-SPE).
- ii) Microextracción en fase sólida (SPME): se basa en la retención de los analitos que se encuentran originalmente en la muestra acuosa por una fase sólida (sorbente) inmovilizada sobre una fibra de aproximadamente 1 cm de largo y con grosores de recubrimiento entre 7 y 100 μm .
- iii) Microextracción en fase líquida (LPME): se basa en la extracción de los analitos de interés haciendo uso de un disolvente (del orden de microlitros) inmiscible, que actúa como fase extractante.

La cromatografía líquida (LC) ⁽¹⁴⁾ es una de las técnicas analíticas más empleadas para la separación e identificación de un gran número de compuestos orgánicos. Esta técnica de separación se combina generalmente con la espectrometría de masas (MS) para llevar a cabo la detección de los compuestos. La espectrometría de masas es una técnica analítica en la que las moléculas de la muestra a analizar son ionizadas, los iones son separados en función de su relación masa/carga y posteriormente detectados y registrados. Debido a su elevada especificidad y sensibilidad, permite llevar a cabo determinaciones analíticas con una alta exactitud. Los componentes más importantes en un espectrómetro de masas son: la fuente de ionización que ioniza las moléculas de interés y el analizador de masas que separa los iones.

- La fuente de ionización utilizada en combinación con LC es la **ionización por electrospray** (ESI). En esta fuente, la fase móvil que contiene los analitos se hace pasar a través de un pequeño capilar al que se le aplica un potencial eléctrico. Así, la fase móvil se nebuliza formando un aerosol de pequeñas gotas cargadas, liberando los iones cargados.
- Uno de los analizadores de masas más comúnmente empleado en LC es el de **tiempo de vuelo** (TOF). En este analizador, los iones son impulsados con la misma

energía cinética a través de un campo eléctrico y se mide el tiempo que tardan los iones en alcanzar el detector, que depende directamente de la masa del ion.

La mayoría de los trabajos publicados emplean la SPE en combinación con LC-MS para la determinación de contaminantes de interés medioambiental ⁽¹⁵⁻²⁹⁾ en muestras de aguas, por lo que se ha seleccionado este método para llevar a cabo el estudio de la presencia de principios activos de uso frecuente y sus metabolitos en aguas residuales. La **Figura 2** incluye un esquema general de las etapas del procedimiento analítico.

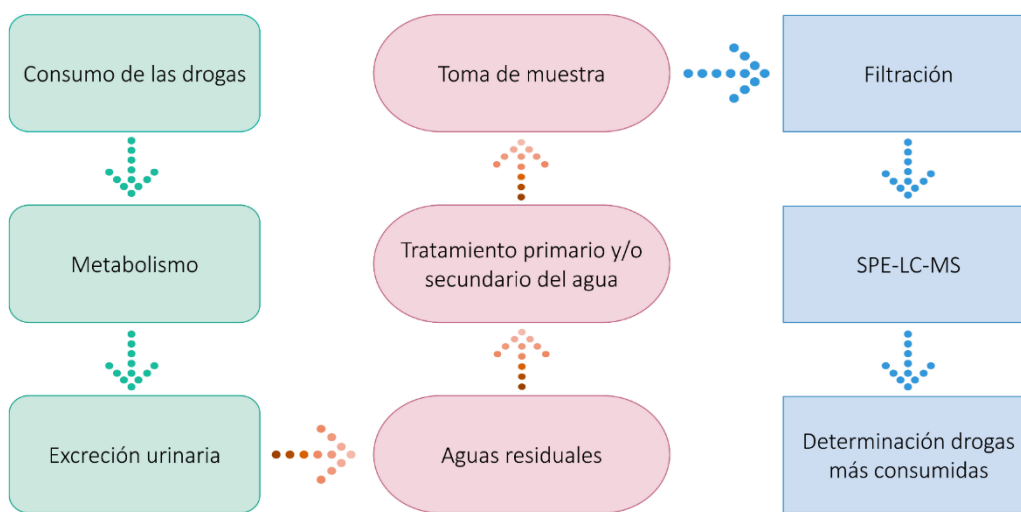


Figura 2. Esquema general del proceso analítico, desde el consumo del principio activo hasta la determinación analítica.

2. Objetivos

La finalidad de este trabajo es estudiar la presencia de fármacos y drogas de abuso en aguas residuales para:

- Valorar la eficacia del tratamiento para eliminar la carga contaminante.
- Detectar las drogas y fármacos más consumidos por la población teniendo en cuenta factores farmacocinéticos y metabólicos.

Además de este objetivo principal, el trabajo también lleva implícitas las siguientes metas particulares:

- La recopilación y el análisis de diversas investigaciones en relación a las sustancias presentes en las aguas de vertido.
- La selección de técnicas analíticas adecuadas para la detección de los contaminantes emergentes presentes en las aguas residuales.

3. Proceso experimental

3.1. Materiales e instrumentación

Se utilizaron disoluciones estándar de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (en acetonitrilo) de cafeína, carbamazepina y trimetoprim (European Pharmacopoeia, Francia) para enriquecer una de las muestras.

Para la filtración de las muestras se utilizaron filtros de microfibra de vidrio con un tamaño de partícula de $47 \mu\text{m}$ (Sartorius, Goettingen, Alemania), filtros de membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ (Whatmann, Maldstone, Inglaterra), y filtros de membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de $0,22 \mu\text{m}$ (Merck Millipore, Tullagreen, Irlanda).

Para la SPE se utilizaron los cartuchos Supel™-Select HLB (200 mg de sorbente/6 mL) (Sigma-Aldrich, Pensilvania, Estados Unidos). El metanol utilizado en el método de extracción también fue adquirido en Sigma-Aldrich.

Para la separación e identificación de los analitos se utilizó un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (Agilent Technologies 1290-Infinity), acoplado a un espectrómetro de masas-TOF (Agilent Technologies 6230-TOF-LC/MS). Se empleó la columna Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution-HD ($100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm} \times 1,8 \mu\text{m}$) de Agilent, precedida de la precolumna Acquity UPLC-BEH C18 VanGuard ($5 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm} \times 1,7 \mu\text{m}$) de Waters. El tratamiento de datos se llevó a cabo utilizando el software MassHunter (Agilent). Para las fases móviles se empleó agua ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$), obtenida con un sistema de purificación de agua Milli-Q A-10 (Millipore, Watford, Reino Unido), y acetonitrilo suministrado por Merck Millipore. El ácido fórmico empleado como aditivo de la fase móvil fue suministrado por Sigma-Aldrich.

3.2. Procedimientos

3.2.1. Toma de muestra y filtración

Las muestras fueron tomadas a la entrada (muestra A) y la salida (muestra B) de la estación de pretratamiento de aguas residuales de la Empresa Mixta de Aguas de Santa Cruz de Tenerife S.A. en Añaza. Las dos muestras de agua de depuradora (muestras C y

D) fueron suministradas por el Servicio de Medioambiente de la Universidad de La Laguna (SEMALL). Una vez recepcionadas, las muestras fueron filtradas a vacío siguiendo el esquema mostrado en la **Figura 3**. Se filtraron por triplicado variando el tamaño de partícula del filtro, permitiendo la separación de los sólidos en suspensión presentes en el agua. Tras la filtración, fueron almacenadas en la oscuridad a 4 °C hasta su análisis.

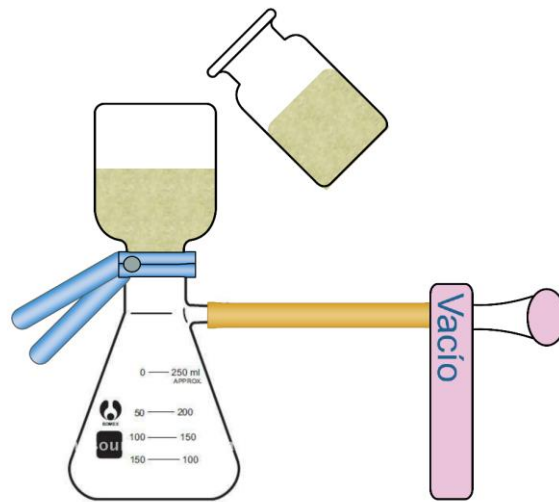


Figura 3. Esquema del proceso de filtración a vacío de las muestras residuales.

3.2.2. Procedimiento de extracción

Para la extracción se seleccionaron los cartuchos Supel™-Select HLB, ya que permiten extraer una amplia gama de compuestos ácidos, básicos y neutros. Estos cartuchos están constituidos por un polímero universal y están indicados para la determinación de moléculas pequeñas, especialmente fármacos. Las extracciones se llevan a cabo en un sistema de distribuidor de vacío de SPE de Supelco.

El procedimiento de SPE consta de cinco etapas, que se esquematizan en la **Figura 4**, y se resumen en:

- Primera etapa: Acondicionamiento. Se emplean 10 mL de metanol y 10 mL de agua Milli-Q para equilibrar y solvatar el cartucho.

- Segunda etapa: Carga de muestra. Se hacen pasar 50 mL de muestra a través del cartucho a un flujo de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, donde se retienen tanto los analitos como las sustancias interferentes.
- Tercera etapa: Lavado. Se eliminan las interferencias usando 8 mL de disolución acuosa de metanol al 5% (v/v), mientras que los analitos permanecen en el cartucho.
- Cuarta etapa: Elución. Se utilizan 6 mL de metanol a un flujo de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para extraer los analitos de interés que se encontraban retenidos en el cartucho.
- Quinta etapa: Reconstitución. Se evapora el metanol del extracto usando una corriente de nitrógeno. Las muestras son reconstituidas en $500 \mu\text{L}$ de disolución acuosa de acetonitrilo al 10% (v/v).

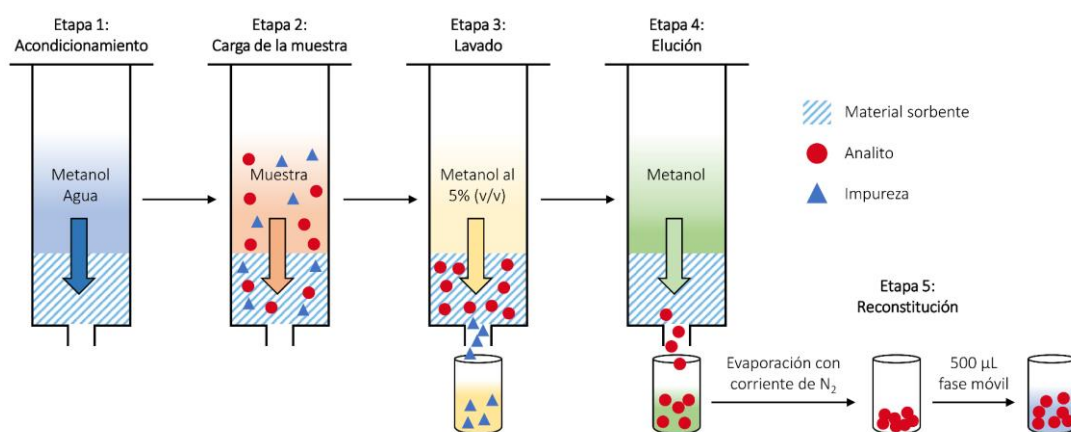


Figura 4. Esquema de las distintas etapas del método de SPE llevado a cabo en este trabajo.

3.2.3. Separación cromatográfica

El cromatógrafo líquido (**Figura 5**) dispone de una bomba que se encarga de introducir en el equipo la fase móvil a un flujo constante de $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La fase móvil consiste en agua Milli-Q (fase acuosa) y acetonitrilo (fase orgánica), ambas con un contenido de 0,1% (v/v) de ácido fórmico. El gradiente de elución empleado se muestra en la **Tabla 2**. La columna se mantuvo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el análisis.

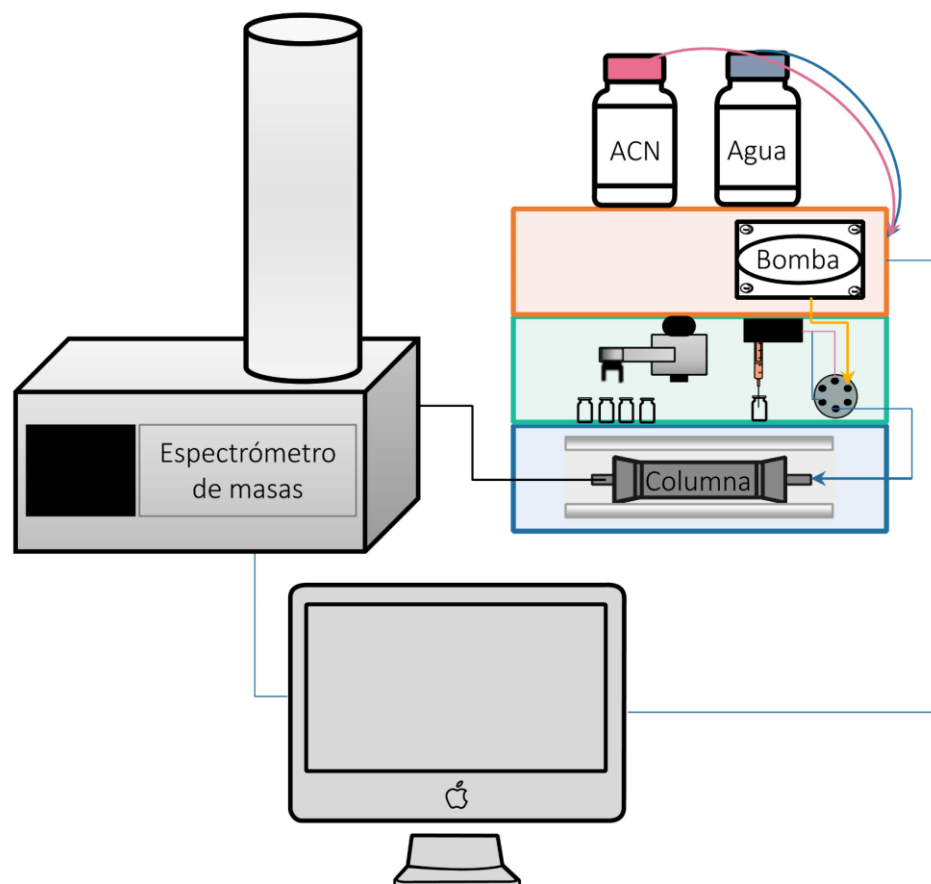


Figura 5. Esquema representativo del cromatógrafo de líquidos acoplado al espectrómetro de masas TOF utilizado en este trabajo.

La detección por MS se llevó a cabo por ionización en modo positivo. El resto de condiciones de ionización y adquisición fueron fijadas según las recomendaciones del fabricante, entre las que cabe destacar el voltaje del capilar (3500 V), la presión del nebulizador (45 psi) y la temperatura del gas (300 °C).

Tabla 2. Gradiente de elución empleado durante la separación cromatográfica basado en métodos previamente descritos en la bibliografía ⁽²⁴⁾.

Tiempo (minutos)	% (v/v) Fase acuosa	% (v/v) Fase orgánica
0	90	10
5	50	50
18	0	100
23	0	100
25	90	10

4. Resultados

4.1. Selección de los compuestos

Se elabora una lista (**Tabla 3**) con los principales fármacos y drogas que podrían estar presentes en aguas residuales en función de los principios activos más consumidos por la sociedad española citados en el Informe Anual del SNS ⁽²⁾ y el Informe español de drogas ilegales ⁽⁴⁾.

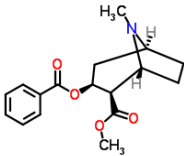
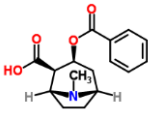
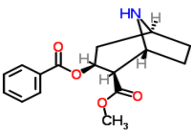
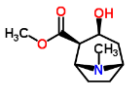
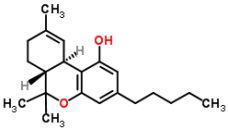
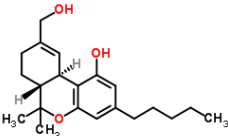
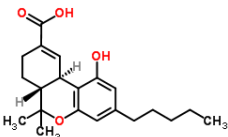
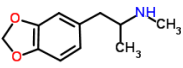
Para llevar a cabo la identificación de estos compuestos, se crea en el equipo cromatográfico una librería que incluye los nombres y la fórmula molecular de los analitos. De esta forma, el software determina los iones más abundantes que se formarán de cada uno de ellos y que se utilizarán para la detección de los mismos en las muestras. Cuando se trabaja con ionización en modo positivo, los iones más abundantes que se forman son los compuestos protonados $[M-H^+]$, aunque también es habitual la formación de los aductos de sodio $[M-Na^+]$ o de amonio $[M-NH_4^+]$ dependiendo de la composición de la fase móvil.

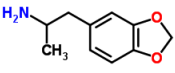
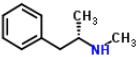
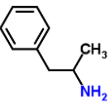
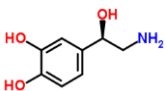
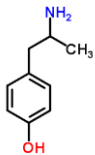
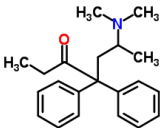
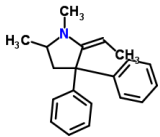

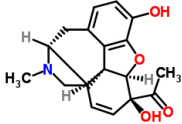
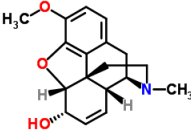
4.2. Evaluación de la eficacia extractiva del método

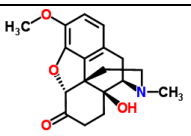
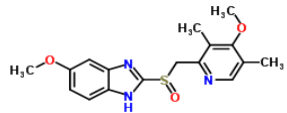
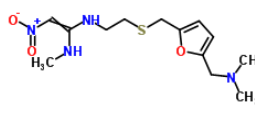
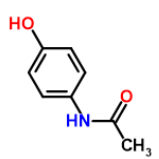
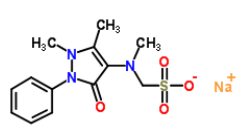
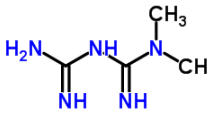
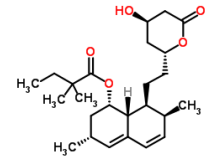
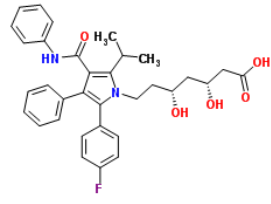
Para comprobar la eficacia y la reproducibilidad del método de extracción empleado (SPE), se enriqueció una de las muestras con disoluciones estándares de cafeína, carbamazepina, y trimetoprim a $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (muestra E). Esta muestra fue sometida al método de extracción e inyectada en el equipo LC-MS por cuadruplicado, siguiendo las condiciones descritas en la sección experimental. Además, para comparar los resultados se inyectó en el LC-MS una disolución estándar de los compuestos en acetonitrilo a $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

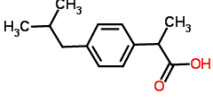
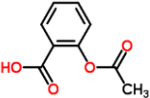
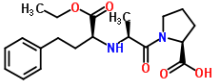
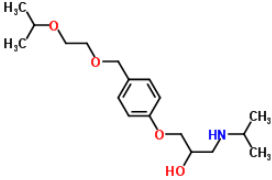
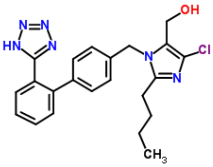
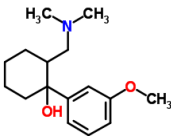
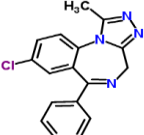

Con ayuda del software y la librería elaborada, se obtienen los cromatogramas de iones extraídos (EICs) a partir del cromatograma total (TIC). Los EICs se obtienen tras filtrar los iones más abundantes que se forman para cada uno de los compuestos. En la **Figura 6** se muestran los cromatogramas EIC de la cafeína, carbamazepina y trimetoprim, mientras que la **Figura 7** incluye los espectros de masas obtenidos para cada uno de estos analitos.


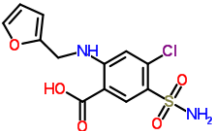
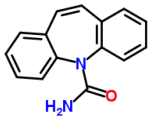

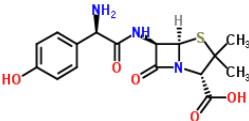
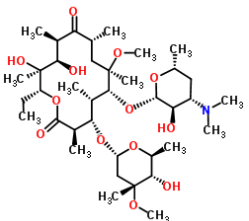
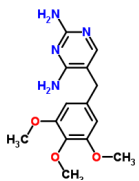
Tabla 3. Principales fármacos y drogas estudiados en este trabajo, incluyendo sus metabolitos, estructura química y fórmula molecular.

Analito	Estructura molecular	Fórmula molecular	Masa molecular (Da)
<i>Cocaína y sus metabolitos</i>			
Cocaína		$C_{17}H_{21}NO_4$	303.353
Benzoilecgonina		$C_{16}H_{19}NO_4$	289.326
Norcocaína		$C_{16}H_{19}NO_4$	289.326
Ecgonina metil éster		$C_{10}H_{17}NO_3$	199.247
<i>Cannabinoides</i>			
THC (Delta-9- tetrahydrocannabinol)		$C_{21}H_{30}O_2$	314.462
11-OH-THC (11-hidroxi-delta-9-tetrahidrocannabinol)		$C_{21}H_{30}O_3$	330.461
11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahidrocannabinol		$C_{21}H_{28}O_4$	344.445
<i>Anfetaminas y derivados</i>			
MDMA (3,4.metilenedioxi metanfetamina)		$C_{11}H_{15}NO_2$	193.242

Analito	Estructura molecular	Fórmula molecular	Masa molecular (Da)
MDA (3,4.metilendioxi anfetamina)		$C_{10}H_{13}NO_2$	179.216
Metanfetamina		$C_{10}H_{15}N$	149.233
Anfetamina		$C_9H_{13}N$	135.206
Norepinefrina		$C_8H_{11}NO_3$	169.178
p-hidroxianfetamina		$C_9H_{13}NO$	151.206
<i>Opiáceos, opioides y sus metabolitos</i>			
Metadona		$C_{21}H_{27}NO$	309.445
EDDP (2-etilidin-1, 5-dimetil-3, 3-difenilpirrolidina)		$C_{20}H_{23}N$	277.403
Morfina		$C_{17}H_{19}NO_3$	285.338
6-monoacetilmorfin		$C_{19}H_{21}NO_4$	327.374
Codeína		$C_{18}H_{21}NO_3$	299.364

Analito	Estructura molecular	Fórmula molecular	Masa molecular (Da)
Oxicodona		$C_{18}H_{21}NO_4$	315.364
<i>Antiulcerosos</i>			
Omeprazol		$C_{17}H_{19}N_3O_3S$	345.416
Ranitidina		$C_{13}H_{22}N_4O_3S$	314.404
<i>Analgésico y antipiréticos</i>			
Paracetamol		$C_8H_9NO_2$	151.163
Metamizol sódico		$C_{13}H_{16}N_3NaO_4$ S	333.339
<i>Hipoglucemiantes</i>			
Metformina		$C_4H_{11}N_5$	129.164
<i>Hipolipemiantes</i>			
Simvastatina		$C_{25}H_{38}O_5$	418.566
Atorvastatina		$C_{33}H_{35}FN_2O_5$	558.640

Analito	Estructura molecular	Fórmula molecular	Masa molecular (Da)
<i>Antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos</i>			
Ibuprofeno		$C_{13}H_{18}O_2$	206.281
Ácido salicílico		$C_9H_8O_4$	180.157
<i>Antihipertensivos</i>			
Enalapril		$C_{20}H_{28}N_2O_5$	376.447
Bisoprolol		$C_{18}H_{31}NO_4$	325.443
Losartán		$C_{22}H_{23}ClN_6O$	422.911
<i>Analgésicos opiodes</i>			
Tramadol		$C_{16}H_{25}NO_2$	263.375
<i>Ansiolíticos</i>			
Alprazolam		$C_{17}H_{13}ClN_4$	308.765
<i>Hipnóticos</i>			
Lormetazepam		$C_{16}H_{12}Cl_2N_2O_2$	335.185

Analito	Estructura molecular	Fórmula molecular	Masa molecular (Da)
<i>Hipnóticos y ansiolíticos</i>			
Lorazepam		$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$	321.158
<i>Diuréticos</i>			
Furosemida		$C_{12}H_{11}ClN_2O_5$ S	330.744
<i>Anticonvulsivantes</i>			
Carbamazepina		$C_{15}H_{12}N_2O$	236.269
<i>Estimulantes del sistema nervioso central</i>			
Cafeína		$C_8H_{10}N_4O_2$	194.19
<i>Antibióticos</i>			
Amoxicilina		$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	365.404
Claritromicina		$C_{38}H_{69}NO_{13}$	747.953
Trimetoprim		$C_{14}H_{18}N_4O$	290.31

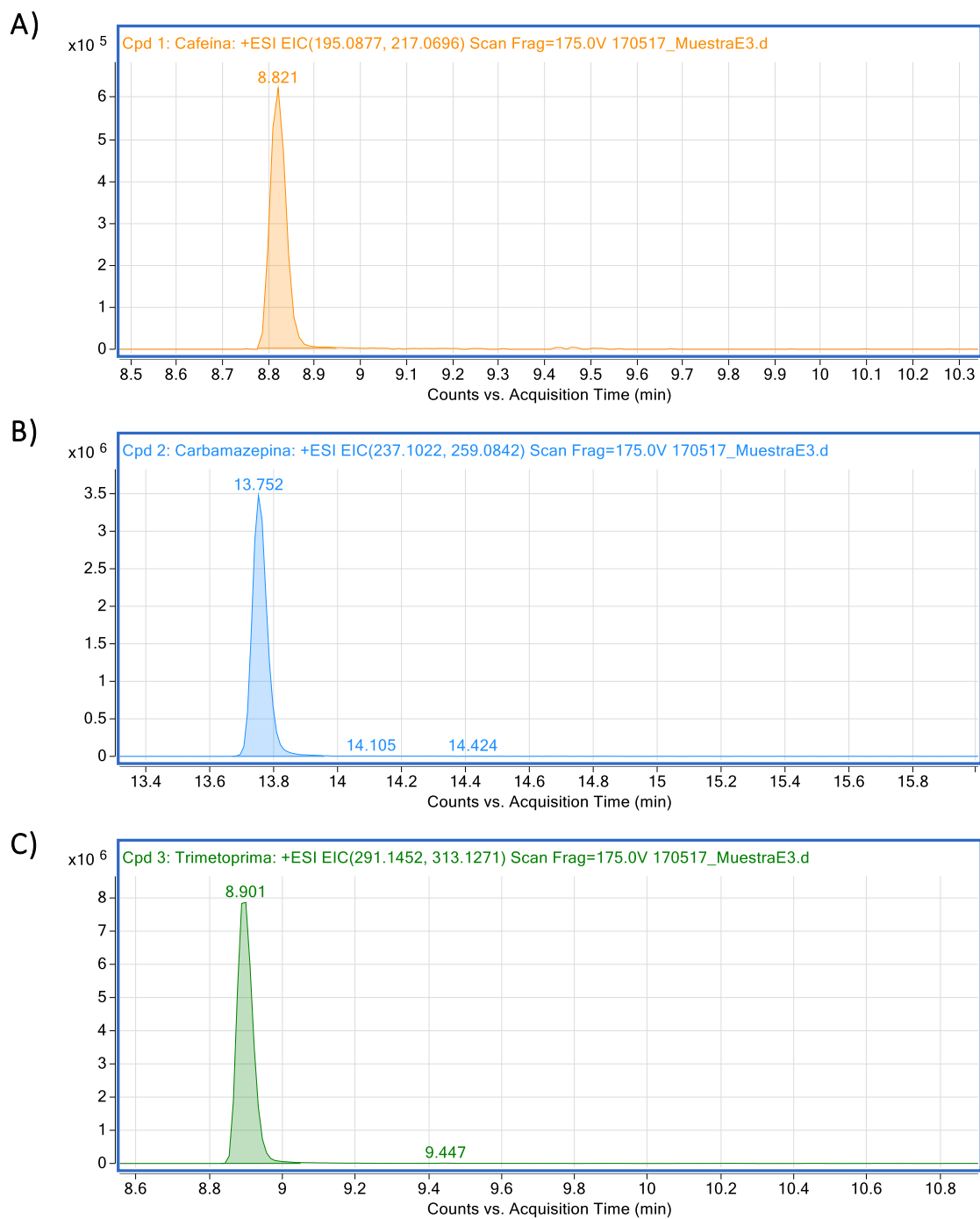


Figura 6. Cromatogramas EIC de **A)** cafeína, **B)** carbamazepina y **C)** trimetoprim obtenidos para el agua residual enriquecida con los compuestos (muestra E).

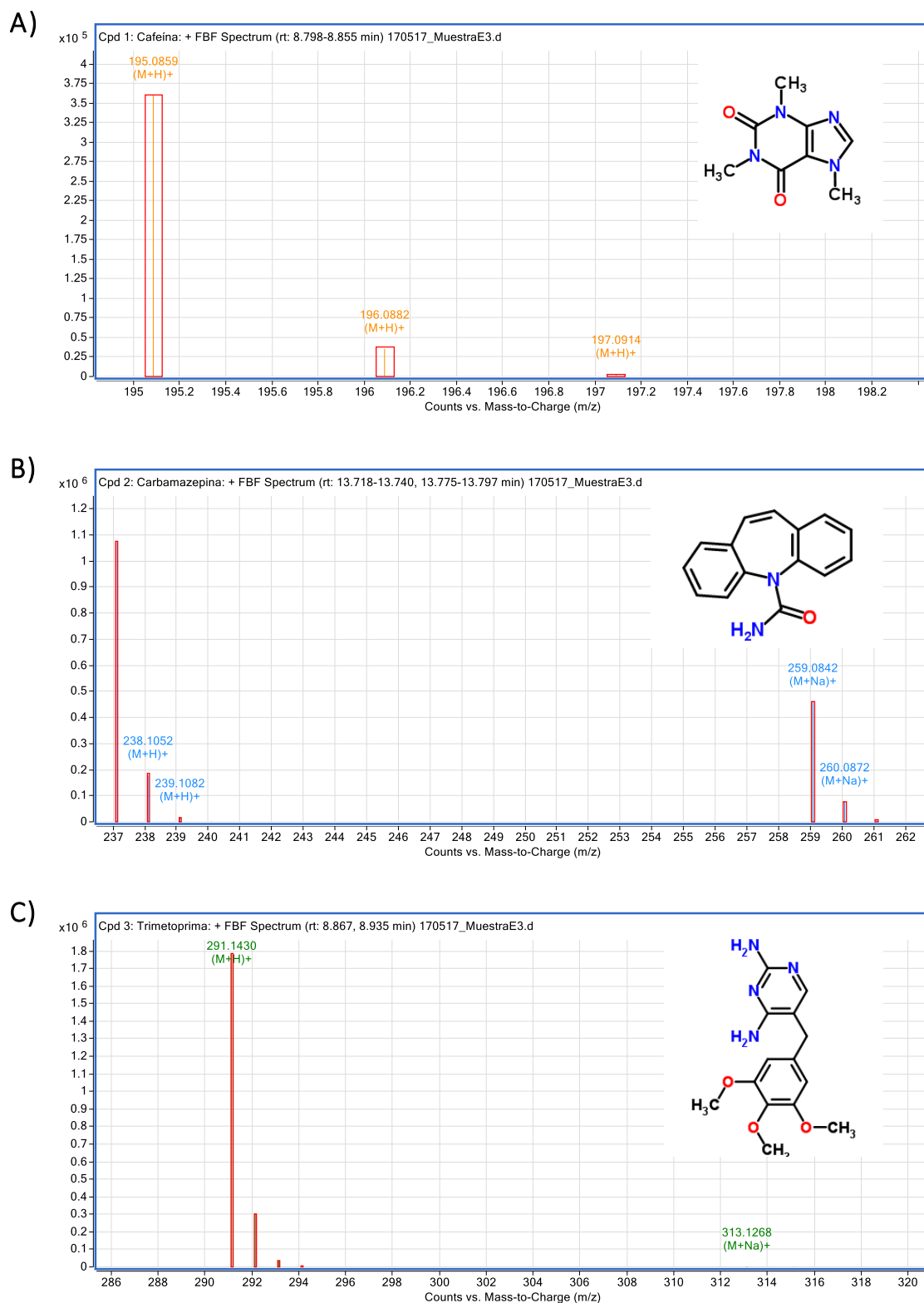


Figura 7. Espectros de masas de **A)** cafeína, **B)** carbamazepina y **C)** trimetoprim obtenidos en la muestra E. Las líneas rojas representan la posición y abundancia teórica de los iones más abundantes de cada compuesto y las líneas en color representan los valores experimentales.

Un método para evaluar de forma preliminar la eficacia extractiva del proceso es mediante el cálculo del factor de enriquecimiento (EF). Este parámetro indica la preconcentración obtenida gracias al proceso de extracción en comparación con la inyección directa en el LC-MS de un estándar con la misma concentración inicial. Se calcula con la siguiente ecuación:

$$EF = \frac{\text{Área de pico del analito}_{\text{Extracción}}}{\text{Área de pico del analito}_{\text{Estándar}}}$$

La máxima preconcentración (EF_{\max}) se estima como la relación entre el volumen inicial de muestra (50 mL) y el volumen final del extracto final obtenido (0,5 mL, volumen del extracto tras reconstituir). En este trabajo, la EF_{\max} tiene un valor de 100, lo que indica que si la SPE preconcentrara los compuestos en su totalidad, las áreas de pico obtenidas con el método de extracción serían 100 veces mayores que las áreas de pico obtenidas tras la inyección directa de un estándar. Si se compara el valor de EF obtenido para cada analito con el valor de EF_{\max} se obtiene el parámetro ER, que permite evaluar la eficacia extractiva del método de forma relativa:

$$ER = \frac{EF}{EF_{\max}} \times 100$$

Por otro lado, la precisión del método se puede evaluar por medio de la desviación estándar relativa (RSD) de las áreas de pico obtenidas en cuatro extracciones diferentes. Se consideran aceptables valores de RSD menores del 10%.

La **Tabla 4** incluye los valores de EF, ER y precisión obtenidos para los tres analitos. Los EF varían entre 17,1 para la trimetoprim y 61,1 para la carbamazepina, lo que indica que con el método SPE-LC-MS se obtienen áreas de pico entre 17 y 60 veces mayores que las áreas de pico obtenidas inyectando un estándar a la misma concentración. Asimismo, los valores de ER son superiores al 20%, valores totalmente aceptables para técnicas de microextracción. Así, la sensibilidad del método de extracción de SPE-LC-MS es mucho mayor que la del método LC-MS sin ninguna etapa previa de extracción. Además, el método resulta altamente preciso, con valores de RSD menores del 6% para todos los analitos.

Tabla 4. Parámetros de calidad del método de extracción, incluyendo EF, ER y precisión en términos de la RSD.

Analito	EF ^a	ER ^b	RSD ^c (%)
Cafeína	41,2	41,2	4,15
Carbamazepina	61,1	61,1	5,94
Trimetoprim	17,6	17,6	3,99

^a factor de enriquecimiento

^b eficacia extractiva, calculada teniendo en cuenta $EF_{max} = 100$

^c precisión del método obtenida para cuatro repeticiones

4.3. Análisis de muestras

4.3.1. Muestra con pretratamiento

Como se describió en la parte experimental, se tomaron dos muestras de agua: una antes (muestra A) y otra después del pretratamiento (muestra B), y fueron sometidas al proceso SPE-LC-MS por cuadruplicado. Tras realizar una búsqueda con la librería del software de los posibles compuestos presentes en las muestras, se detectaron los principios activos incluidos en la **Tabla 5**.

El criterio utilizado para dar un resultado positivo de presencia de un principio activo en la muestra se basó en las siguientes condiciones:

- Detectar el compuesto en las cuatro repeticiones de cada muestra.
- Obtener picos cromatográficos significativamente mayores que el ruido instrumental con una simetría adecuada.
- Obtener un porcentaje de probabilidad de coincidencia del espectro de masas experimental con respecto al espectro de masas teórico igual o superior al 75%.

Tabla 5. Principios activos que se detectaron en las muestras A y B, incluyendo el porcentaje de probabilidad de coincidencia para cada uno de ellos.

Analito	Muestra A (entrada)	Muestra B (salida)
Benzoilecgonina o Norcoocaína*	✓ (88,0%)	✓ (85,7%)
THC (Delta-9- tetrahidrocannabinol)	✓ (84,4%)	✓ (75,4%)
11-OH-THC (11-hidroxi-delta-9-tetra hidrocannabinol)	✓ (84,7%)	✓ (77,9%)
MDMA (3,4.metilenedioximetanfetamina)	✓ (93,9%)	✓ (86,0%)
MDA (3,4.metilenedioxianfetamina)	N.D.	N.D.
Metanfetamina	N.D.	N.D.
Anfetamina	N.D.	N.D.
Metadona	N.D.	N.D.
Morfina	✓ (93,1%)	N.D.
Codeína	✓ (78,7%)	N.D.
Oxicodona	N.D.	N.D.
Omeprazol	N.D.	N.D.
Ranitidina	✓ (91,5%)	✓ (86,7%)
Paracetamol	✓ (95,0%)	✓ (94,6%)
Metformina	✓ (84,9%)	✓ (93,2%)
Simvastatina	N.D.	N.D.
Atorvastatina	N.D.	N.D.
Ibuprofeno	N.D.	N.D.
Ácido salicílico	N.D.	N.D.
Bisoprolol	✓ (86,1%)	✓ (84,1%)
Losartán	✓ (92,5%)	✓ (98,0%)
Tramadol	✓ (87,3%)	✓ (83,7%)
Alprazolam	N.D.	N.D.
Lormetazepam	✓ (86,3%)	✓ (83,3%)
Lorazepam	✓ (87,3%)	✓ (83,3%)
Furosemida	N.D.	N.D.
Carbamazepina	✓ (96,8%)	✓ (94,8%)
Cafeína	✓ (95,4%)	✓ (92,7%)
Amoxicilina	N.D.	N.D.
Claritromicina	✓ (98,1%)	✓ (97,9%)
Trimetoprim	N.D.	N.D.

*La benzoilecgonina y la Norcoocaína presentan la misma masa molecular por lo que el software no es capaz de distinguirlos.

N.D.: no detectado

La **Figura 8** muestra, a modo representativo, los cromatogramas EIC obtenidos para el paracetamol y el tramadol, detectados en la muestra A (entrada) y B (salida), respectivamente. Asimismo, la **Figura 9** incluye los espectros de masas registrados para los mismos compuestos.

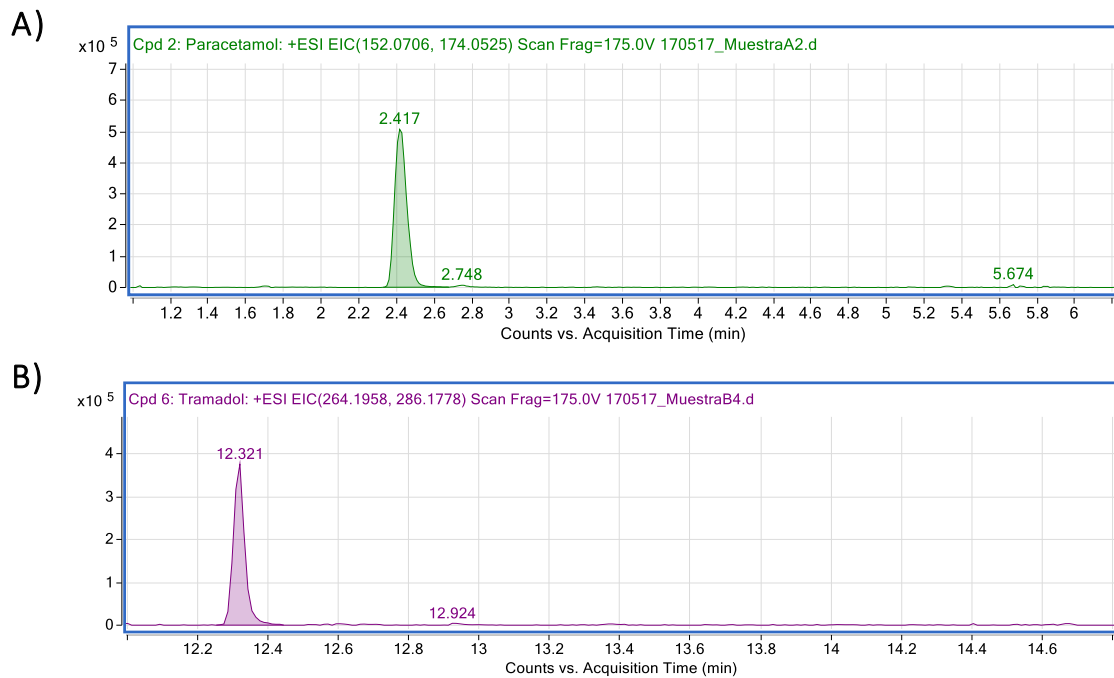


Figura 8. Cromatogramas EIC del A) paracetamol detectado en la muestra A, y del B) tramadol identificado en la muestra B.

En ambas muestras (A y B) se detectaron los mismos principios activos, a excepción de la morfina y la codeína, que solo se encontraron en la muestra de entrada. En este sentido, se puede confirmar que este tipo de tratamiento no es capaz de eliminar los contaminantes emergentes presentes en el agua.

4.3.2. Muestras tras un proceso de EDAR

Se analizaron dos muestras provenientes de una depuradora (muestras C y D) por cuadruplicado siguiendo el proceso experimental. En la **Figura 10** se muestran los cromatogramas TIC de las muestras B y D como ejemplos representativos. Tal y como se puede observar, el cromatograma de la muestra D presenta menos picos, menos ruido y menos alteraciones en la línea base, lo que sugiere *a priori* que las muestras provenientes de la depuradora están más limpias.

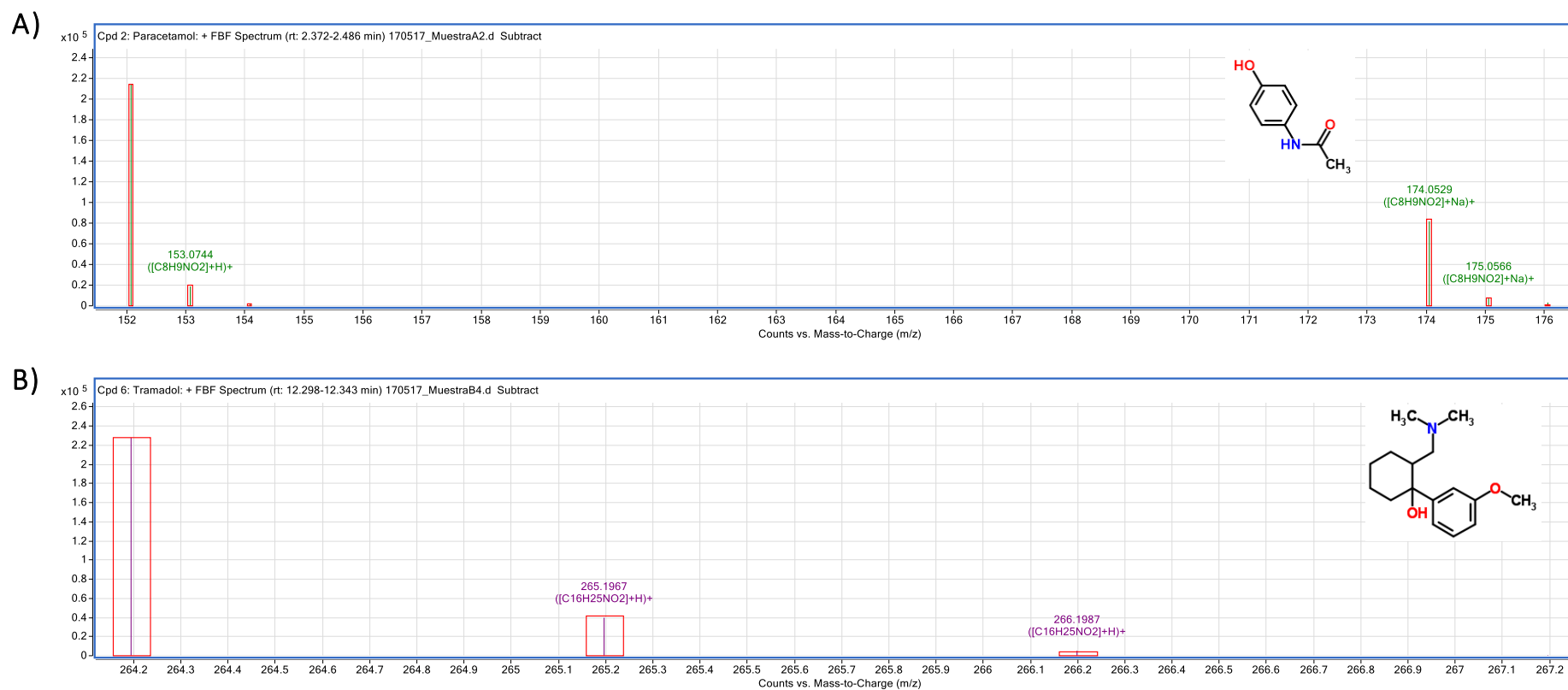


Figura 9. Espectros de masas del A) paracetamol en la muestra A, y del B) tramadol encontrado en la muestra B. Las líneas rojas representan la posición y abundancia teórica de los iones más abundantes del compuesto y las líneas de colores representan los valores experimentales.

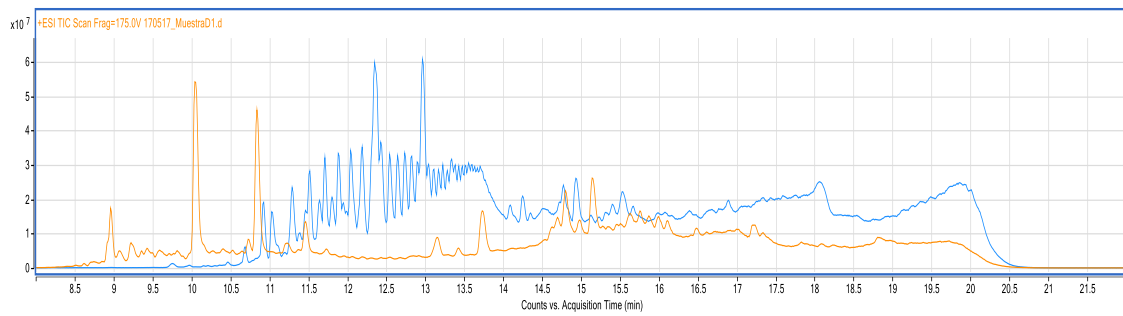


Figura 10. Cromatogramas TIC obtenidos para la muestra B (color azul) y la muestra D (color naranja).

Del mismo modo que con las muestras anteriores, se realizó una búsqueda de los analitos con ayuda de la librería del software. La **Tabla 6** muestra los compuestos que se detectaron acompañados del porcentaje de probabilidad.

Como ejemplos representativos, la **Figura 11** incluye los cromatogramas EIC obtenidos para el lormetazepam y el EDDP encontrados en la muestra C y D respectivamente, mientras que la **Figura 12** muestra los espectros de masas registrados para los mismos compuestos.

Teniendo en cuenta los resultados, se observa un menor número de analitos en las muestras C y D provenientes de una EDAR, en comparación con las muestras A y B, que simplemente fueron sometidas a un pretratamiento. Por tanto, los diferentes tratamientos de depuración de aguas residuales son útiles para eliminar parcialmente estos compuestos, aunque no de forma completa.

Tabla 6. Principios activos que se detectaron en las muestras C y D, incluyendo el porcentaje de probabilidad de coincidencia para cada uno de ellos.

Analito	Muestra C	Muestra D
Benzoilecgonina o Norcocaína*	N.D.	✓ (85,7%)
THC (Delta-9- tetrahidrocannabinol)	N.D.	N.D.
11-OH-THC (11-hidroxi-delta-9-tetra hidrocannabinol)	N.D.	N.D.
MDMA (3,4.metilenedioximetanfetamina)	N.D.	N.D.
MDA (3,4.metilenedioxianfetamina)	N.D.	N.D.
EDDP (2-etilidin-1, 5-dimetil-3, 3-difenilpirrolidina)	N.D.	✓ (81,5%)
Metanfetamina	N.D.	N.D.
Anfetamina	N.D.	N.D.
Metadona	N.D.	N.D.
Morfina	N.D.	✓ (84,3%)
Codeína	N.D.	N.D.
Ranitidina	N.D.	N.D.
Paracetamol	N.D.	N.D.
Metformina	N.D.	N.D.
Simvastatina	N.D.	N.D.
Atorvastatina	N.D.	N.D.
Ibuprofeno	N.D.	N.D.
Ácido salicílico	N.D.	N.D.
Bisoprolol	✓ (83,4%)	✓ (96,2%)
Losartán	✓ (93,3%)	✓ (97,8%)
Tramadol	✓ (91,2%)	✓ (91,3%)
Lormetazepam	✓ (77,8%)	✓ (80,0%)
Lorazepam	N.D.	N.D.
Furosemida	N.D.	N.D.
Carbamazepina	N.D.	✓ (89,7%)
Cafeína	N.D.	N.D.
Amoxicilina	N.D.	N.D.
Claritromicina	N.D.	N.D.

*La benzoilecgonina y la Norcocaína presentan la misma masa molecular por lo que el software no es capaz de distinguirlos.

N.D.: no detectado

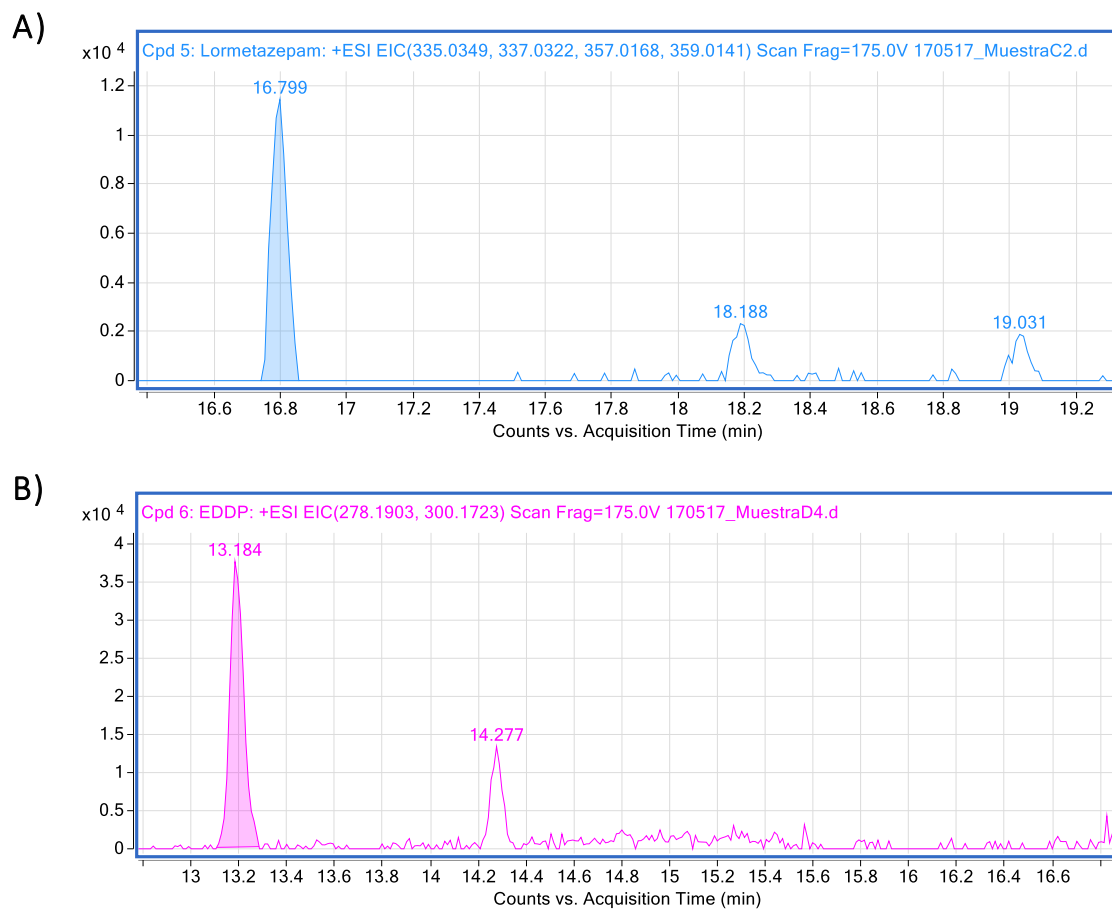


Figura 11. Cromatogramas EIC del A) lormetazepam detectado en la muestra C, y del B) EDDP identificado en la muestra D.

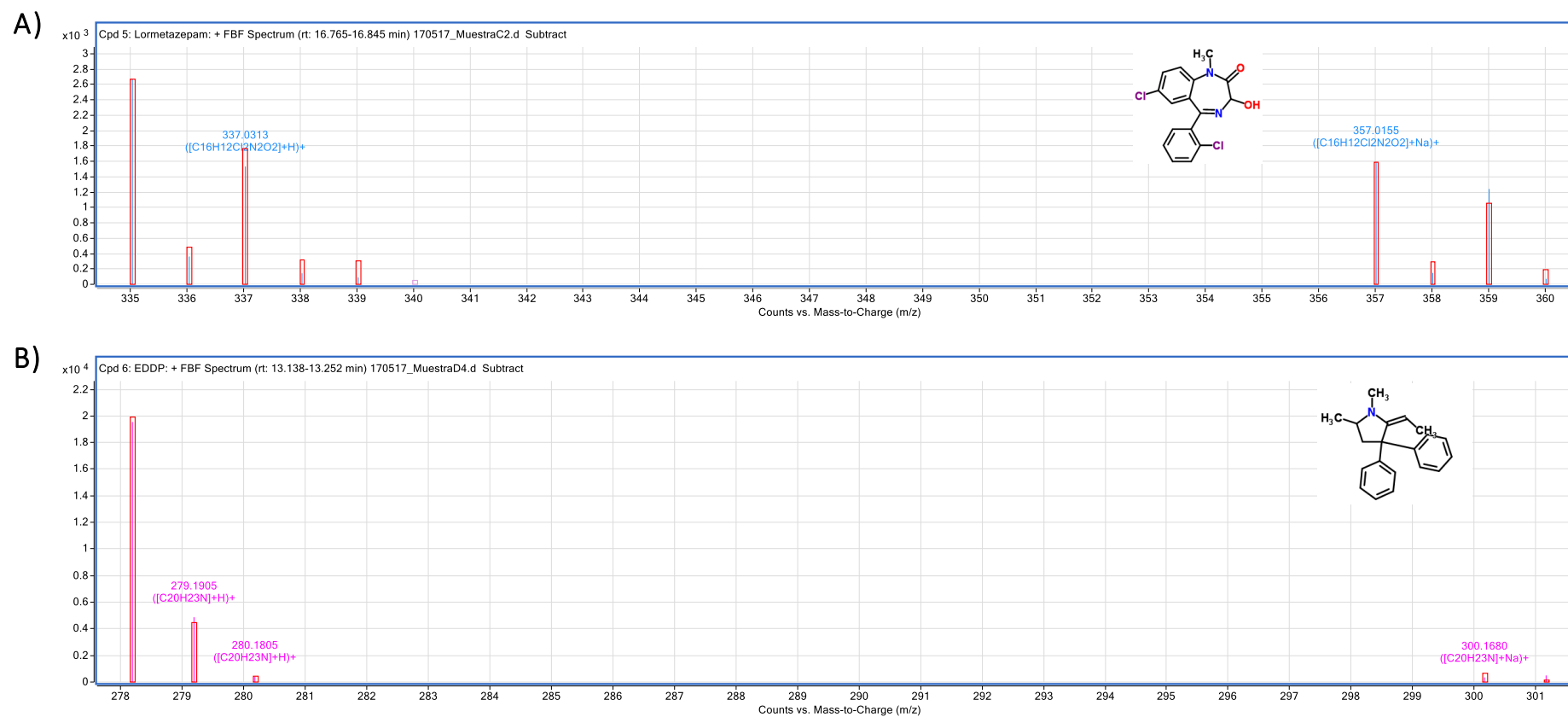


Figura 12. Espectros de masas del A) lormetazepam en la muestra C, y del B) EDDP encontrado en la muestra B. Las líneas rojas representan la posición y abundancia teórica de los iones más abundantes del compuesto y las líneas de colores representan los valores experimentales.

5. Conclusiones

Los resultados de este trabajo confirman la presencia de contaminantes de interés emergentes, concretamente drogas de abuso y fármacos, en muestras de agua residual. Más de 15 contaminantes fueron detectados en las muestras tomadas antes y después del proceso de pretratamiento, existiendo mínimas diferencias entre ambas muestras. En este sentido, se puede deducir que este tipo de tratamiento no es capaz de eliminar los contaminantes emergentes presentes en el agua.

Por otro lado, las muestras tomadas tras el tratamiento de la EDAR presenta alrededor de un 65% menos de carga contaminante que el agua que sufrió tan sólo un pretratamiento. Por tanto, los tratamientos convencionales empleados en las EDARs son capaces de eliminar de modo efectivo parte de los principios activos presentes en la muestra, pero no consigue su eliminación completa. Por consiguiente, resulta de gran importancia la necesidad de realizar nuevas investigaciones para incluir un nuevo tratamiento en las EDARs que incremente la eficacia de eliminación de este tipo de contaminantes.

6. Referencias

- 1- Barceló, D.; López, M. *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*; Seguimiento de la política de aguas: CSIC, ES, 2007.
- 2- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Informe Anual del Sistema Nacional de Salud 2015. ES, 2015
- 3- Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. Informe Europeo sobre Drogas: Tendencias y novedades. ES, 2016.
- 4- Sendino, R.; Álvarez, E.; Brime, B.; Llorens, N.; Ruiz, A.; Sánchez-Franco, E. *Informe 2015: Alcohol, Tabaco y drogas ilegales en España*; Informe del Observatorio español de la droga y la toxicomanía, ES, 2015.
- 5- Belgiorno, V.; Rizzo, L.; Fatta, D.; Della Rocca, C.; Lofrano, G.; Nikolaou, A.; Naddeo, V.; Meric, S. Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination*, **2007**, *215*, 166–176.
- 6- Postigo, C.; López de Alda, M.; Barceló, D. Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation. *Environ. Int.*, **2010**, *36*, 75–84.
- 7- Real Decreto 140/ 2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua del consumo humano. (Boletín Oficial del Estado, número 45, de 21/02/2003; actualizada el 30/07/2016)
- 8- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013, por el que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. (Diario Oficial de la Unión Europea, número 226, de 24/08/2013)
- 9- Ternes, T. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trac-Trends Anal. Chem.*, **2001**, *20*, 419–434.

- 10- Farré, M.; Petrovic, M.; Barceló, D. Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, *387*, 1203–1214.
- 11- Brown, S.; Melton, T. Trends in bioanalytical methods for the determination and quantification of club drugs: 2000-2010. *Biomed. Chromatogr.*, **2011**, *25*, 300–321.
- 12- Gómez, M.; Agüera, A.; Mezcua, M.; Hurtado, J.; Mocholí, F.; Fernández-Alba, A. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography-tandem mass spectrometry in waste water. *Talanta*, **2007**, *73*, 314–320.
- 13- Mogolodi, K.; Nomngongo, P. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *Elvesier.*, **2016**, *82*, 199-207.
- 14- Snyder, L. R.; Dolan, J. W.; Kirkland, J. J. *Introduction to modern liquid chromatography*; Wiley: Hoboken, N.J, 2010.
- 15- Borova, V.; Maragou, N.; Gago-Ferrero, P.; Pistos, C.; Thomaidis, N. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, *406*, 4273–4285.
- 16- Bijlsma, L.; Beltrán, E.; Boix, C.; Sancho, J.; Hernández, F. Improvements in analytical methodology for the determination of frequently consumed illicit drugs in urban wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, *406*, 4261–4272.
- 17- Kinyua, J.; Covaci, A.; Maho, W.; McCall, A.; Neels, H.; van Nuijs, A. L. N. Sewage-based epidemiology in monitoring the use of new psychoactive substances: Validation and application of an analytical method using LC-MS/MS. *Drug Test. Anal.*, **2015**, *7*, 812–818.
- 18- Nuijs, A. L. N.; Gheorghe, A.; Jorens, P. G.; Maudens, K.; Neels, H.; Covaci, A. Optimization, validation, and the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of new drugs of abuse in wastewater. *Drug Test. Anal.*, **2014**, *6*, 861–867.

- 19- Aminot, Y.; Litrico, X.; Chambolle, M.; Arnaud, C.; Pardon, P.; Budzindki, H. Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water, sediment, and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, *407*, 8585–8604.
- 20- van Nuijs, A. L. N.; Castiglioni, S.; Tarcomnicu, I.; Postigo, C.; de Alda, M. L.; Neels, H.; Zuccato, E.; Barcelo, D.; Covaci, A. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: A critical review. *Sci. Total Environ.*, **2011**, *409*, 3564–3577.
- 21- Borova, V. L.; Gago-Ferrero, P.; Pistos, C.; Thomaidis, N. S. Multi-residue determination of 10 selected new psychoactive substances in wastewater samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, **2015**, *144*, 592–603.
- 22- Andres-Costa, M. J.; Rubio-Lopez, N.; Morales Suarez-Varela, M.; Pico, Y. Occurrence and removal of drugs of abuse in Wastewater Treatment Plants of Valencia (Spain). *Environ. Pollut.*, **2014**, *194*, 152–162.
- 23- Zuccato, E.; Chiabrando, C.; Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ. Health Perspect.*, **2008**, *116*, 1027–1032.
- 24- Postigo, C.; López de Alda, M.; Barceló, D. Fully automated determination in the low nanogram per liter level of different classes of drugs in sewage water by on-line solid-phase extraction- liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 3123–3134.
- 25- Boles T.; Wells M. Analysis of amphetamine and methamphetamine in municipal wastewater influent and effluent using weak cation-exchange SPE and LC-MS/MS. *Electrophoresis*, **2016**, *37*, 3101–3108.
- 26- Vazquez-Roig P.; Andreu V.; Blasco C.; Picó Y. SPE and LC-MS/MS determination of 14 illicit drugs in surface waters from the Natural Park of L'Albufera (Valencia, Spain). *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, *397*, 2851–2864.
- 27- Bade R.; Bijlsma L.; Sancho J.; Baz-Lomba, J.; Castiglioni, S.; Castrignano, E.; Causanilles, A.; Gracia-Lor, E.; Kasprzyk-Hordern, B.; Kinyua, J.; McCall, A.; van

- Nuijs, A.; Ort, C.; Ramin, P.; Thomas, K.; Zuccato, E.; Hernández, F. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of synthetic cathinones and phenethylamines in influent wastewater of eight European cities. *Chemosphere*, **2017**, 168, 1032–1041.
- 28- Huerta-Fontela, M.; Galceran, M.; Ventura, F. Ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters. *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 3821–3829.
- 29- Alygizakis, N.; Gago-Ferrero, P.; Borova, V.; Pavlidou, A.; Hatzianestis, I.; Thomaidis, N. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Sci. Total Environ.*, **2016**, 541, 1097–1105.
- 30- Senta I.; Krizman I.; Ahel M.; Terzic S. Integrated procedure for multiresidue analysis of dissolved and particulate drugs in municipal wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, 405, 3233–3268.

7. Anexo: Glosario

EDAR	Estación depuradora de agua residual
EDDP	2-etilidin-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina
EF	Factor de enriquecimiento
EF _{max}	Factor de enriquecimiento máximo
EIC	Cromatograma de iones extraídos
ER	Eficacia extractiva
ESI	Ionización por electrospray
LC	Cromatografía líquida
LPME	Microextracción en fase líquida
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
MS	Espectrometría de masas
N.D.	No detectado
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RSD	Desviación estándar relativa
SEMALL	Servicio de Medio Ambiente de la Universidad de La Laguna
SNS	Sistema Nacional de Salud
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
THC	Delta-9-tetrahidrocannabinol
TIC	Cromatograma total
TOF	Tiempo de vuelo

