



CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA

Paula Andrea Arbeláez Salazar

TESIS DOCTORAL

Supervisada por

Prof.^a Rosa Maria Marcé y Dra. Eva Pocurull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
I QUÍMICA ORGÀNICA

La Prof.^a ROSA MARIA MARCÉ RECASENS, Catedrática del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universitat Rovira i Virgili, y

La Dra. EVA POCURULL AIXALÀ, Profesora Titulada del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universitat Rovira i Virgili,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo, titulado “CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA”, que presenta PAULA ANDREA ARBELÁEZ SALAZAR para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de esta universidad. Todos los resultados son fruto de experiencias realizadas por la mencionada doctoranda.

Tarragona, 1 de septiembre de 2015

Dra. Rosa Maria Marcé i Recasens

Dra. Eva Pocurull i Aixalà

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Culmina una etapa de gran importancia en mi vida, la cual me ha dejado grandes enseñanzas que me permiten crecer a nivel personal, profesional y cultural. Detrás de la realización de esta tesis existen muchas personas que han contribuido para que mi meta propuesta varios años atrás, se haga realidad el día de hoy. Es por ello que en este espacio de la tesis quiero hacer honor a todas esas personas y expresarles mis más sinceros agradecimientos.

Antes que a todo agradecer a Dios, por la salud, bienestar y fortaleza que me proporciona día a día para lograr mis objetivos, además por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda esta etapa.

En el ámbito académico y científico inmensamente agradecida con mis directoras de tesis la Dra. Rosa María Marcé y la Dra. Eva Pocurull; sus conocimientos, orientaciones, manera de trabajar, persistencia, motivación y sobre todo la gran paciencia y comprensión mostrada hacia mí, han sido fundamentales para la culminación de esta tesis, además de que han moldeado mi formación como investigadora, acentuando bases sólidas para posteriores experiencias profesionales. Por todo ello me siento muy afortunada de haber tenido a las mejores directoras de tesis del mundo y una vez más, muchas GRACIAS.

También extender mi agradecimiento al director del Grupo de Cromatografía y Aplicaciones Medioambientales, el Dr. Francesc Borrull, quien dio el aval para pertenecer a este grupo de investigación y me permitió desarrollar mi trabajo de investigación, brindándome todos los recursos necesarios para llevarlo a cabo correctamente. Así mismo,

dooy las gracias a las demás profesoras que forman parte del grupo: la Dra. Carmen Aguilar, Dra. Nuria Fontanals y la Dra. Marta Calull por todas sus aportaciones y disponibilidad cuando requería de ayuda durante estos años.

Quiero agradecer también a mis compañeros del Grupo de investigación, a los que ya se fueron y a los que aún siguen en el proceso: Marta, Antonio, Noelia, Igor, Irene, Marta Palomo, Ana, Alejandro, Daniela, Laura T., Saamer, Alba y Mireia A. A todos ellos porque siempre estuvieron prestos para brindarme su colaboración e intercambiar conocimientos, además de que me dejan muy buenos recuerdos vividos dentro del laboratorio.

A mis amigos Daniel, Judith G., Dominika, Alessia, Victor, Mireia N., Laia, Javi, Mary Luz, Judith A, Nuria G., Tatiana y Laura V., quienes me han brindado su amistad y apoyo incondicional en los momentos difíciles, que han compartido conmigo los momentos felices, que han sabido disculpar mis ausencias y tolerar mis arrebatos del humor, los temores y las dudas, quiero expresarles toda mi gratitud. Y por supuesto como no agradecerle infinitamente al amigo Pol por su apoyo técnico, científico y moral. Cuando se está tan lejos de casa los amigos se convierten en familia, y a todos ellos quiero expresarles todo mi afecto y cariño.

También agradecer a la familia y amigos que se encuentran en Colombia que, a pesar de la distancia, siempre han estado ahí manifestándome su cariño y palabras de fortaleza para no desistir lo emprendido.

A mis padres, por ser el pilar fundamental de mi vida y se esforzaron para que yo obtuviera la mejor educación, quiero agradecerles todo su apoyo y amor incondicional que me han

brindado, y aunque nada me hubiera gustado más en esta vida que presentarle a mi padre, que en paz descanse, su nieto y este logro académico acompañado de un beso y un abrazo de gratitud. Me quedo con que día a día intento cumplir con su deseo de que yo sea una persona íntegra en todos los aspectos de la vida. También darle las gracias a mi hermano mayor Pedro porque también ha puesto su granito de arena en mi formación como persona.

Un especial agradecimiento a mi familia política principalmente a Josep Ramón, Carme y Lidia porque desde el momento que entré en sus vidas me han acogido en su hogar con muchas demostraciones de cariño, velando por mi bienestar y han sabido llenar un poco ese vacío de no tener mi familia biológica cerca de mí.

Edgar, me has acompañado en esta etapa de mi vida de principio a fin, has vivido y sentido en primera persona todo lo que ha conllevado alcanzar este logro, has estado presente en los momentos felices, muchos de ellos propiciados por tí, y también has estado en los momentos más difíciles demostrándome todo tu amor y apoyo incondicional; nunca soltaste mi mano cuando yo sentía desvanecer porque pensaba que nunca lo lograría y no te faltaron las palabras de motivación para cada lágrima derramada; por todo ello te has convertido en una persona indispensable en mi vida. Gracias por tu bondad, generosidad y comprensión y cuidar tan bien de nuestra familia.

Mis últimas palabras son para dedicar esta tesis a mi pequeño Lluç, a quien le pido mis disculpas porque en muchas ocasiones no pude estar a tu lado, pero quiero que sepas que en esos momentos siempre estuviste en mi corazón ☺.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Contaminantes de interés emergente	11
1.1.1. Drogas de abuso	13
1.1.1.1. Presencia en el medioambiente.....	22
1.1.1.2. Epidemiología en las aguas residuales	36
1.1.1.3. Evaluación del riesgo ambiental.....	43
1.1.2. Fármacos hipnótico-sedantes	50
1.1.2.1. Presencia en el medioambiente.....	58
1.1.2.2. Evaluación del riesgo ambiental.....	70
1.1.3. Edulcorantes de alta intensidad.....	74
1.1.3.1. Presencia en el medioambiente.....	86
1.1.3.2. Evaluación del riesgo ambiental.....	94
1.2. Determinación de contaminantes de interés emergente en muestras medioambientales.....	99
1.2.1. Técnicas de extracción	102
1.2.1.1. Técnicas de extracción para muestras líquidas	103
1.2.1.2. Técnicas de extracción para muestras sólidas	126
1.2.2. Técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas	142
1.3. Referencias	163
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	179

CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	183
3.1. Determinación de drogas de abuso en muestras de fangos de depuradora.....	189
3.1.1. <i>Simultaneous determination of drugs of abuse and their main metabolites using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.....</i>	<i>193</i>
3.1.2. Discusión de Resultados	213
3.2. Determinación de hipnótico-sedantes en muestras medioambientales	217
3.2.1. <i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine sedative hypnotic drugs in river water and wastewater.....</i>	<i>223</i>
3.2.2. <i>Determination of sedative hypnotics in sewage sludge by pressurized liquid extraction with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry.....</i>	<i>253</i>
3.2.3. Discusión de Resultados	275
3.3. Determinación de edulcorantes de alta intensidad en muestras medioambientales	281
3.3.1. <i>Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.....</i>	<i>287</i>
3.3.2. <i>Trace-level determination of sweeteners in sewage sludge using selective pressurized liquid extraction</i>	

<i>and liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>	325
3.3.3. Discusión de Resultados.....	349
3.4. Monitorización de productos del cuidado personal, drogas de abuso e hipnótico-sedantes en muestras medioambientales.....	359
3.4.1 <i>Contaminants of emerging concern: occurrence in wastewater and sewage sludge, removal, sewage epidemiology and environmental risk assessment</i>	365
3.4.2. Discusión de resultados.....	415
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	425
ANEXOS	431
Anexo I. Abreviaciones.....	433
Anexo II. Publicaciones.....	436

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

Introducción

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

El desarrollo tecnológico ha permitido diseñar y crear bienes y servicios que facilitan y satisfacen tanto las necesidades esenciales como los deseos de la humanidad. La actividad tecnológica influye en el progreso social y económico, pero desde la perspectiva ambiental tiende a hacer un uso no sostenible del medioambiente siendo la causa principal del creciente agotamiento y degradación de los recursos naturales del planeta. Por otra parte, el acelerado crecimiento demográfico muy ligado con el desarrollo tecnológico, incrementa la necesidad de bienes de consumo en general, originando una gran cantidad de residuos que contribuyen a la contaminación del medioambiente, llegando en algunos casos a atentar contra el equilibrio ecológico de la Tierra [1].

La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afectan a nuestro mundo y es el resultado de la introducción de cualquier sustancia al medioambiente en cantidad tal que cause efectos adversos en el hombre, en los animales, vegetales o materiales expuestos a dosis que sobrepasen los niveles aceptables en la naturaleza [2].

La contaminación puede surgir a partir de ciertas manifestaciones de la naturaleza (fuentes naturales) o bien debido a los diferentes procesos productivos del hombre (fuentes antropogénicas) que conforman las actividades de la vida diaria. Las fuentes que generan contaminación de origen antropogénico más importantes son: industriales, comerciales, agrícolas, domésticas y fuentes móviles (por ejemplo, gases de combustión de vehículos). Tradicionalmente el medioambiente se ha dividido, para su estudio y su interpretación, en tres componentes que son: aire, agua y suelo. Sin embargo, esta división es meramente teórica, ya que la mayoría de los contaminantes interactúan con más de uno de los elementos del ambiente [3].

Entre los diferentes tipos de contaminantes, se encuentran los contaminantes emergentes, cuyo estudio aparece entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la

protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA), o la Comisión Europea.

Recientemente la EPA [4] ha sugerido reemplazar el término contaminantes emergentes por contaminantes de interés emergente, el cual define como sustancias químicas y otras sustancias que no están incluidas actualmente en programas de control rutinario (no reguladas), han sido recientemente descubiertas en los diferentes compartimentos ambientales y potencialmente pueden causar efectos nocivos a la salud humana y al medioambiente. Los contaminantes de interés emergente no son necesariamente nuevos productos químicos y generalmente incluyen contaminantes que a menudo han estado presentes en el medioambiente, pero cuya presencia, importancia y efectos (toxicidad) sólo ahora están siendo evaluados [4].

Muchos de los denominados contaminantes de interés emergente pueden encontrarse durante décadas en el medio acuático o terrestre a niveles que suponen un riesgo significativo, aun cuando se hayan tomado ya amplias medidas para reducir o eliminar las emisiones de dichas sustancias, ya que algunos pueden también transportarse a largas distancias y presentan una gran ubicuidad en el medioambiente.

La lista de contaminantes de interés emergente incluye una amplia variedad de compuestos de diferentes estructuras y usos como también metabolitos y productos de transformación. En la tabla 1 se muestran los contaminantes de interés emergente más representativos. Muchos de éstos son tóxicos o son clasificados como disruptores endocrinos, lo que implica que una exposición a los mismos puede dar lugar a alteraciones en el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento de los organismos vivos [5].

Tabla 1. Contaminantes de interés emergente más representativos.

Grupo de contaminantes	Subgrupo	Compuestos de interés emergente
Fármacos	Antibióticos	Lincosamidas, macrólidos, sulfamidas, tetraciclinas, quinolonas
	Analgésicos y antiinflamatorios	Paracetamol, ácido acetil salicílico, ibuprofeno, diclofenac, oxicam.
	Psiquiátricos	Benzodiazepinas, barbitúricos
	B-bloqueantes	Metoprolol, propranolol, timolol
	Medios de contraste de rayos X	Iopromide, iopamidol, diatrizoato
	Esteroides y hormonas	Estradiol, estrona, estriol, dietilestilbestrol
	Citostáticos	Vincristina, etopósido, cisplatino
Productos del cuidado personal	Parabenos	Metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno
	Filtros solares	Benzofenonas, cinamato, bencilidenos, derivados del alcanfor
	Perfumes	Fragancias nitro, policíclicas y macrocíclicas
Tensoactivos	Sulfonatos	α -olefin sulfonato de sodio
	Alcanolamidas	Lauril monoetanolamida
	Alquilfenoles	Nonilfenol, octilfenol
Aditivos y agentes industriales	Benzotriazoles	Benzotriazol, tolitriazol
	Agentes quelantes	EDTA
Edulcorantes		Sacarina, sucralosa, aspartamo, ciclamato, stevia, NHDC

Tabla 1. Continuación.

Grupo de contaminantes	Subgrupo	Compuestos de interés emergente
Drogas de abuso	Cocaínicos	Cocaína, benzoilecgonina
	Opiáceos	Morfina, codeína
	Opioides	Heroína, metadona

Como se ha comentado anteriormente, los contaminantes de interés emergente son sustancias no reguladas que a medida que se evalúa el riesgo potencial para la salud y su prevalencia en el medioambiente, pueden considerarse para futuras regulaciones y entrar en la lista de las sustancias peligrosas prioritarias que están reguladas actualmente bajo la directiva 2013/39/UE [6]. Esta directiva modifica la Directiva Marco del Agua 2000/60/EC y la *Environmental Quality Standards Directive* en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y amplía la lista solo a 45 sustancias prioritarias, de las cuales 21 son identificadas como peligrosas. Con esta directiva se establece un marco comunitario de actuación para la protección de las aguas superficiales continentales, de transición, costeras y subterráneas; para prevenir o reducir su contaminación, promover su uso sostenible, proteger el medioambiente, mejorar el estado de los ecosistemas acuáticos y atenuar los efectos de las inundaciones y las sequías [6]. En lo relativo a regulación de contaminantes en lodos de depuradora para usos agrícolas solo incluye metales pesados bajo la directiva 86/278/EEC [7].

Otra carencia de las actuales legislaciones además del limitado grupo de sustancias peligrosas prioritarias, es la inclusión de los metabolitos y productos de transformación, ya que una vez los contaminantes son liberados al medioambiente, éstos pueden experimentar cambios estructurales por una variedad de procesos bióticos o no bióticos

incluyendo fotólisis, hidrólisis y biotransformación. Algunos estudios [8] han demostrado la presencia de productos de transformación y metabolitos en el medioambiente que pueden ser potencialmente más tóxicos, más recalcitrantes e incluso más bioacumulables que los contaminantes precursores.

Una de las principales vías de entrada de los contaminantes al medioambiente son los efluentes y fangos de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), ya que al ser liberados al medioambiente los contaminantes hacen su camino de regreso a los humanos, ya sea a través de la cadena alimentaria o del agua potable [9]. En la figura 1 se muestran las posibles fuentes de emisión y destinos de los contaminantes en el medioambiente.

El tratamiento de las aguas residuales es una práctica que, si bien se lleva realizando desde la antigüedad, hoy por hoy resulta algo fundamental para mantener nuestra calidad de vida. Son muchas las técnicas de tratamiento con larga tradición y, evidentemente, se ha mejorado mucho en el conocimiento y diseño de las mismas a lo largo de los años. Aunque las EDARs son diseñadas para eliminar materiales sólidos y reducir los niveles de metales, bacterias y otros patógenos, la mayoría no están diseñadas para eliminar específicamente contaminantes orgánicos. Numerosos estudios en todo el mundo han detectado la presencia de diferentes grupos de contaminantes en las aguas residuales y en fangos a altas concentraciones de hasta miles de $\mu\text{g/L}$ o $\mu\text{g/kg}$, lo que demuestra que los tratamientos aplicados por las EDARs no son suficientemente efectivos en la eliminación de la mayoría de los contaminantes orgánicos de interés emergente, incluso ni siquiera por aquellas EDARs que utilizan tratamientos avanzados [8]. Por lo tanto, hay una necesidad de entender de una manera integrada las fuentes, la trayectoria del flujo, el destino y los efectos de los contaminantes en los seres humanos y los ecosistemas [8].

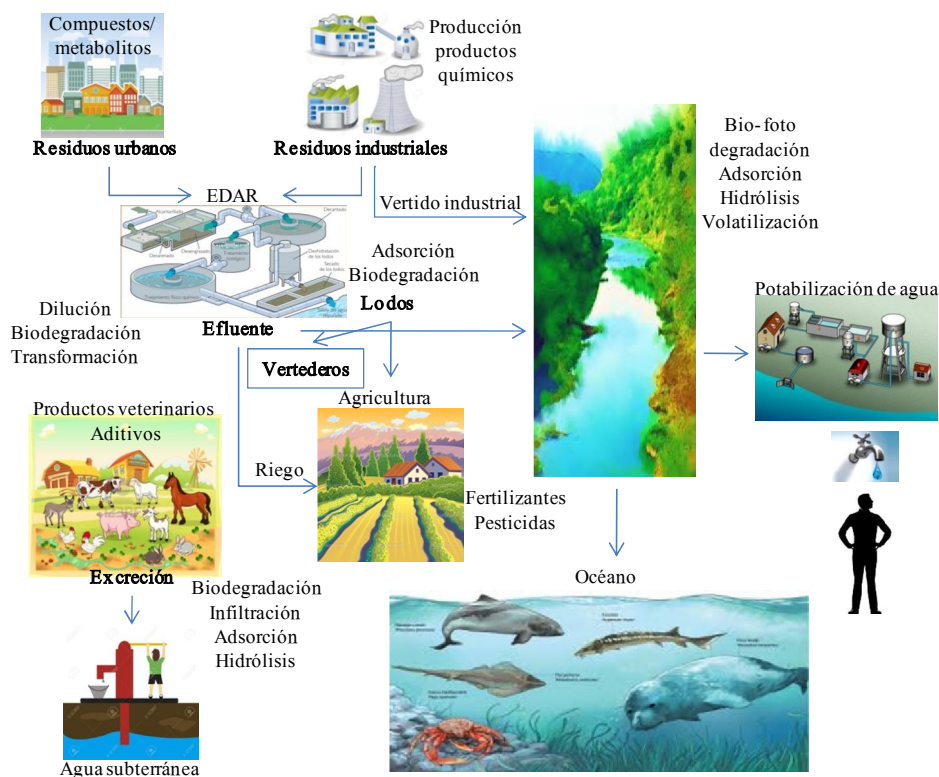


Figura 1. Fuentes de emisión y destino de los contaminantes de interés emergente.

Típicamente el tratamiento convencional que aplican las EDARs para depurar el agua comienza por la separación física inicial de sólidos grandes, posteriormente se aplica un desarenado y desengrase seguido de una sedimentación primaria que separa los sólidos suspendidos existentes en el agua residual. Para eliminar metales disueltos se utilizan reacciones de precipitación. A continuación sigue la conversión progresiva de la materia biológica disuelta en una masa biológica sólida usando bacterias que generalmente están presentes en estas aguas. Una vez que la masa biológica es separada (sedimentación secundaria), el agua tratada puede experimentar procesos adicionales (tratamiento terciario) como

desinfección, filtración, etc. El efluente final puede ser descargado o reintroducido de vuelta al agua natural (río, mar, etc.) u otro ambiente (terreno superficial, subsuelo, etc.). Los sólidos biológicos segregados experimentan un tratamiento de digestión anaeróbica y neutralización adicional antes de la descarga o reutilización apropiada [9].

La capacidad de las EDARs para eliminar los contaminantes depende de varios factores, incluyendo las propiedades físico-químicas, la persistencia biológica del compuesto individual y la tecnología y condiciones del proceso como por ejemplo la temperatura y las variaciones estacionales, el tiempo de retención hidráulico y tiempo de residencia de fangos. Cabe destacar que el término eliminación representa todas las pérdidas del compuesto original producido por los mecanismos químicos y biológicos que conllevan a la transformación, biodegradación y adsorción en la materia sólida. En el último caso se puede dar por diferentes mecanismos: por adsorción en la estructura lipídica de las bacterias y en la fracción grasa de los fangos a través de interacciones hidrofóbicas (grupos alifáticos y aromáticos), por adsorción sobre estructuras polisacáridas que a menudo están cargadas negativamente en el exterior de las células bacterianas a través de interacciones electrostáticas (grupos aminos), por unión química con las proteínas bacterianas y ácidos nucleicos. También otros mecanismos juegan un papel importante en la adsorción como enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas y complejación superficial [10].

El tiempo de retención hidráulico ha revelado ser uno de los parámetros más importantes del proceso en eliminación de la carga de contaminantes. La adsorción de los contaminantes a los sólidos suspendidos para su posterior eliminación por sedimentación, es más relevante para compuestos lipofílicos ($\log P_{ow} > 3$) y algunos compuestos hidrofílicos (surfactantes). Para compuestos muy polares como los fármacos y los correspondientes metabolitos el proceso más importante para eliminarlos es la transformación biológica o mineralización microbiológica [9].

Adicionalmente, algunas EDARs han implementado en su diseño tratamientos avanzados dirigidos a incrementar la eficiencia en la eliminación de la carga contaminante, reducir la ecotoxicidad y los efectos patógenos de las aguas de entrada en las EDARs. En este contexto diferentes estudios han investigado la eficiencia de las EDARs que usan procesos de oxidación (fotoquímico) [11, 12], membranas de filtración [13], carbón activado [14] y humedales [15]. Como resultado, la carga de contaminantes es reducida, pero también resulta en grandes costos, así como también alto consumo energético y emisiones de CO₂.

1.1. Contaminantes de interés emergente

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

La amplia variedad de contaminantes de interés emergente, la diversidad en sus estructuras químicas, la carencia de información con respecto los mecanismos de transporte y transformación y sus efectos en la salud humana y ecosistemas son algunos de los elementos que estimulan las investigaciones realizadas por la comunidad científica como también el interés de las agencias reguladoras. Para medir el riesgo asociado a estos contaminantes algunas cuestiones deben ser direccionadas, como por ejemplo el desarrollo de métodos analíticos sensibles, robustos y rápidos, destino y comportamiento de los contaminantes en las matrices ambientales, toxicidad crónica e impacto por largos periodos de exposición a estos contaminantes. Todas estas cuestiones serán expuestas y analizadas a continuación para algunos grupos de contaminantes de interés emergente, los cuales incluyen drogas de abuso, hipnótico-sedantes, edulcorantes y productos del cuidado personal. Así mismo, se comentará la presencia de estos contaminantes en los diferentes compartimentos ambientales y la eficiencia de eliminación en las EDARs con diferentes tipos de tratamiento de depuración.

1.1.1. Drogas de abuso

Ya en las primeras civilizaciones hay pruebas de que el hombre conocía los efectos de ciertas plantas, como la adormidera del opio, y las usaba. En todas las civilizaciones, desde la asiria hasta la actual del siglo XXI, el ser humano ha consumido todo tipo de drogas por distintos motivos: religiosos, rituales, medicinales, hábitos o costumbres, por distracción, hedonismo, etc.

Según la OMS [16], droga es toda sustancia que, introducida en un organismo vivo, pueda modificar una o varias de sus funciones. Esta definición es poco útil e inexacta, ya que engloba fármacos de prescripción, sustancias psicoactivas, muchas plantas, sustancias químicas o tóxicas para el organismo. El término droga de abuso define mejor lo

que coloquialmente entendemos como droga: sustancia de uso no médico con efectos psicoactivos (capaz de producir cambios en la percepción, el estado de ánimo, la conciencia y el comportamiento) y susceptible de ser autoadministrada. Así, la diferencia entre una droga y un fármaco no viene dada por criterios farmacológicos, químicos o médicos, sino por dos pequeños matices de tipo instrumental y social: el que sea el propio individuo quien se administra la sustancia sin prescripción médica y que el objetivo sea distinto al de la curación de una patología [17].

Las drogas de abuso han sido clasificadas según múltiples sistemas de categorización, predominando, en la actualidad, la clasificación en función de sus efectos farmacológicos. Algunos de los diferentes tipos de clasificación empleados a lo largo del tiempo, se comentan a continuación:

Una primera clasificación hace referencia a su estatus legal, distinguiendo entre drogas legales e ilegales. El alcohol, el tabaco y el café son drogas permitidas por la mayoría de los países occidentales. El resto de las drogas se encuentran sometidas a distintas regulaciones legales. La Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes (organismo dependiente de la organización de las naciones unidas (ONU) para el control de las drogas) [18] distingue cuatro listas con distintos grados de restricción. En realidad, esta clasificación no responde a criterios médicos, farmacológicos o toxicológicos sino a cuestiones de índole política y moral.

Con respecto a la clasificación según su origen, se pueden distinguir drogas naturales (las que aparecen de forma espontánea en la naturaleza, en general hongos o vegetales) y sintéticas (aquellas que requieren de procesos físicos o químicos para su preparación). Pero la distinción entre lo natural y lo sintético no es tan sencilla. Por un lado, para obtener determinadas sustancias es necesario usar procesos físicos o químicos (por ejemplo la obtención de cocaína a partir de la hoja de coca, la extracción del hachís a partir de la marihuana.). Pero además muchas drogas de las llamadas sintéticas (la dietilmida de ácido lisérgico (LSD) o el éxtasis)

tienen sus precursores inmediatos en productos de origen vegetal [19].

Algunos autores distinguen entre drogas duras (cocaína, opioides, alcohol o anfetaminas) y drogas blandas (derivados del cannabis (marihuana, hachís, etc.), la cafeína, etc.). La diferencia es que la dura causa adicción o dependencia tanto física como psíquica, mientras que la blanda causa adicción o dependencia a nivel sólo físico o sólo psíquico. Pero el hecho objetivo es que la morbilidad, mortalidad y gasto sanitario asociadas al alcohol y al tabaco es mucho mayor que el de todas las demás drogas ilegales juntas. En España, la mortalidad atribuida directamente al tabaco y al alcohol es de 55.000 y 12.000 personas por año respectivamente. La peligrosidad de una droga está en relación con factores farmacológicos y extra farmacológicos. La distinción entre drogas blandas y duras expresa en realidad diferencias de tolerancia social y no es útil desde un punto de vista práctico [19].

Clasificar las drogas de abuso en función de sus efectos farmacológicos, como ya se ha comentado, es la más adecuada y aceptada. De esta manera son clasificadas como [20]:

- **Drogas depresoras:** aquellas que ralentizan o inhiben las funciones o la actividad de alguna región del cerebro (antihistamínicos, antipsicóticos, disociativos, GABA-nérgicos, glicinérgicos, narcóticos y simpatológicos).
- **Drogas estimulantes:** aquellas que producen mejoras temporales de la actividad neurológica o física (adamantanos, alquilaminas, arilciclohexilaminas, benzodiazepinas, colinérgicos, convulsivos, eugeroicos, oxazolinas, feniletilaminas, piperazinas, piperidinas, pirrolidinas (nicotina) y tropanos (cocaína)).
- **Drogas alucinógenas:** aquellas que producen cambios en la percepción, emoción o ambos. Este grupo se divide a su vez en tres subgrupos: psicodélicos (LSD, feniletileminas, piperazina, triptaminas, entre otros), disociativos (adamantanos,

arilciclohexilaminas y morfínanos) y delirantes (anticolinérgicos, antihistamínicos y GABA-agonistas).

- **Drogas opiáceas:** son las drogas que se unen a opiáceos situados principalmente en el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal. Hay tres grandes clases de sustancias opiáceas: alcaloides del opio (morfina y codeína), opiáceos semi sintéticos (heroína y oxidodona), y opiáceos completamente sintéticos (petidina y metadona, que tienen una estructura no relacionada con los alcaloides del opio).

Según datos de la oficina de las naciones unidas contra la droga y el delito (UNODC), entre 162 millones y 324 millones de personas de entre 15-64 años han consumido por lo menos una vez alguna droga de abuso a nivel mundial en el año 2012, principalmente sustancias correspondientes al cannabis, opiáceos, cocaína o metanfetaminas [21]. La figura 2 muestra el porcentaje de consumidores de las principales drogas de abuso a escala mundial, siendo la marihuana la droga más consumida. Se cultiva en casi todos los países del mundo y se calcula que entre 130 y 190 millones de personas la fuman al menos una vez al año [21]. Mientras que el mercado de los opiáceos y de la cocaína sigue disminuyendo, el consumo de drogas sintéticas está en aumento. Se estima que el número total de personas que consumen estimulantes de tipo anfetamínico, aproximadamente entre 30 y 40 millones, superará pronto al número de consumidores de opiáceos y cocaína juntos [21].

Los opiáceos y los opiáceos encabezan la lista de sustancias problemáticas que causan más enfermedades y muertes relacionadas con drogas en todo el mundo. En 2013, la producción mundial estimada de heroína volvió a aumentar, hasta alcanzar nuevamente los niveles que se habían registrado en 2008 y 2011. En 2013, la superficie mundial de cultivo ilícito de opio era de 296.720 hectáreas, la mayor desde 1998, año en que se comenzó a disponer de estimaciones [21].

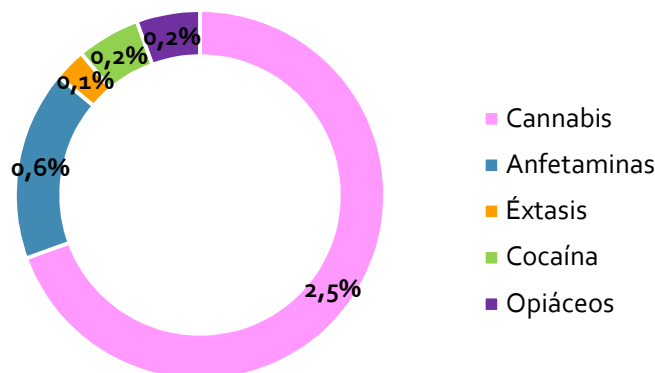


Figura 2. Consumo mundial de drogas de abuso [21].

Aunque la fabricación y el tráfico de cocaína han tenido gran repercusión en el hemisferio occidental, hay indicios de que en general ha disminuido la disponibilidad mundial de esa droga. Según datos de UNODC a 31 de diciembre de 2012 la superficie neta dedicada al cultivo de arbusto de coca era la más reducida desde 1990, año en que comenzó a disponerse de cifras estimadas: 133.700 hectáreas, lo que representaba una disminución del 14% respecto de la superficie calculada en 2011 [21].

Cuando las drogas de abuso son consumidas, éstas actúan sobre el cerebro, aumentando o disminuyendo el efecto de un neurotransmisor determinado. Actúan principalmente sobre serotonina, dopamina, endorfinas y noradrenalina. Las acciones de las drogas pueden darse: de neurona a neurona, con neurotransmisores, con neuronas receptoras, o transportadores. Para enviar un mensaje (figura 3), una célula cerebral (neurona) libera una sustancia química (neurotransmisor) en el espacio (sinapsis) entre ésta y la siguiente célula [22]. El neurotransmisor cruza la sinapsis y se adhiere a las proteínas (receptores) de la célula cerebral receptora. Esto provoca cambios en la célula receptora y se envía el mensaje [22].

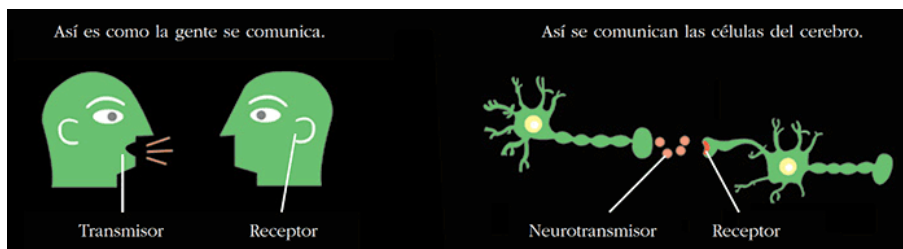


Figura 3. Mecanismo de comunicación de las drogas de abuso [22].

En la tabla 2 se muestran las estructuras químicas, los correspondientes metabolitos, usos clínicos, la vida media y las rutas de eliminación de los opiáceos más consumidos ya sea con fines recreacionales o por prescripción médica. Cocaína y nicotina también se incluyen en la lista por ser drogas con un alto índice de abuso en todo el mundo. Según datos de OMS [16], el tabaco cuyo componente principal es la nicotina, es la segunda sustancia licita más consumida en el mundo con una prevalencia del 19% de la población mundial.

Aunque diferentes opiáceos tengan propiedades farmacodinámicas similares, en cuanto a su lugar de acción, éstos pueden diferir en su farmacocinética. Así, ni la codeína ni la heroína son activas frente a los receptores, y no realizarían acción alguna si no fueran convertidas en morfina. Sus efectos también dependen de la vía de administración, ya que la vía oral favorece la inactivación de codeína y morfina en el hígado. La capacidad metabólica del organismo hace que la vida media de la mayor parte de los opiáceos sea de 2-5 horas (morfina, heroína, codeína, meperidina). Debido a ello, los adictos tienen que consumir una media de 4-6 veces al día [20].

Tabla 2. Estructura química, usos y farmacocinética de las drogas de abuso [23].

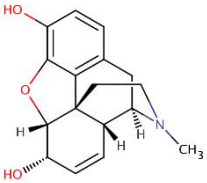
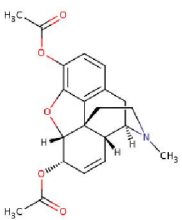
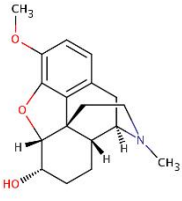
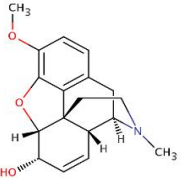
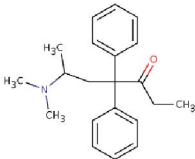
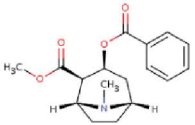
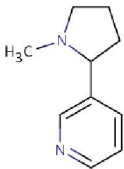
Nombre	Estructura química	Metabolitos	Usos	Vida media	Rutas de eliminación (excreción)
Morfina		Dihidromorfina Normorfina Morfina-3-glucuronido Morfina-3-glucuronido	Anestesia Analgesia	2-4 horas	Biliar, heces (Morfina 7-15%)
Heroína		6-Acetylmorfina Morfina	Dolor agudo Infarto miocárdico Edema pulmonar Dolor crónico	<10 min	Biliar, heces renal, (Heroína <1%, 6-acetylmorfina <1%)
Dihidrocodeína		Dihidromorfina Nordihidrocodeína Dihidromorfina-6-glucuronido	Dolor postoperatorio Dolor crónico Tos	4 horas	Renal (Dihidrocodeína 30-50%)
Codeína		Morfina Norcodeína Codeína-6-glucuronido	Control del dolor Antidiarreico Supresor de la tos	3 horas	Renal (Codeína 64-70%)

Tabla 2. Continuación.

Nombre	Estructura química	Metabolitos	Usos	Vida media	Rutas de eliminación (excreción)
Metadona		EDDP EMDP	Tos seca Abstinencia de drogas Dolor	24-36 horas	Renal, heces (Metadona 28%, EDDP 52-88%)
Cocaína		Benzoilecgonina Ecgoninametil éster	Anestesia local Vasoconstrictor	1 hora	Orina (Cocaína 1-9%, Benzoilecgonina 35-54%)
Nicotina		Cotinina Nornicotina Nicotina glucuronida Norcotinina Nicotine-1'-N-oxide	Abstinencia de nicotina	1-3 horas	Orina (Nicotina 20-30%)

EDDP: 2 etilideno-1,5-dimetil-3,3 difenilpirrolidina
 EMDP: 2 etil- 5 metil- 3,3 difenilpirrolidina

La excreción de los opiáceos se realiza principalmente por el riñón, y en forma de morfina, de tal manera que pueden detectarse en orina entre 48-72 horas tras la última administración. La metadona tiene una vida media de 24-36 horas y tarda más tiempo en eliminarse [20]. La heroína administrada por vía intravenosa, con una vida media de 3 minutos, es hidrolizada rápidamente a 6-acetilmorfina (6-AM), de vida media 3 minutos, y ésta, a su vez, se desacetila dando lugar a morfina, de vida media 2-3 horas. En cuanto a la eliminación, alrededor del 90% de la heroína se elimina, en su mayor parte como glucurónido de morfina (60-

80%) y un pequeño porcentaje como morfina libre (7-15%) y otros metabolitos minoritarios (6-AM, codeína). Por heces se elimina a través de la vía biliar. Parte de este glucurónido de morfina sufre una reabsorción enterohepática, volviendo a la circulación sanguínea y eliminándose por vía renal [20]. En cuanto a la cocaína, una droga estimulante que atraviesa las membranas celulares de forma rápida, se metaboliza rápidamente por hidrólisis enzimática para producir benzoilecgonina, ecgoninametilester y posteriormente ecgonina. Sin embargo, en presencia de etanol, la cocaína es transesterificada a cocaetileno que posee actividad farmacológica y tóxica [24]. La cocaína después de su consumo es excretada en forma inalterada entre 1-9%, en forma de benzoilecgonina entre 35-54% y en forma de ecgoninametilester entre 32-49%.

La nicotina, otra sustancia dentro del grupo de los estimulantes, se une selectivamente a los receptores de acetilcolina en los ganglios autonómicos, la corteza adrenal y el cerebro. La nicotina se metaboliza en el hígado por medio del grupo de enzimas del citocromo P450 (enzimas que tienen la función de eliminar sustancias que no son sintetizadas por el propio organismo), y se convierte en cotinina, nornicotina y aminocetonas para eliminarse por la orina. Alrededor del 70-80% de la nicotina consumida es metabolizada a cotinina, la cual es subsecuentemente hidroxilada a trans-3-hidroxicotinina [25].

Después de ser metabolizadas y excretadas las drogas de abuso y sus metabolitos, el medioambiente es la última destinación de todas estas sustancias, siendo la principal vía de entrada los efluentes y fangos de las EDARs, donde las drogas de abuso sólo son parcialmente eliminadas. Adicionalmente, la eliminación directa ocasional a los sistemas de alcantarillado de estas sustancias, también llega a las EDARs. Así estas sustancias conllevan diversos procesos después de su liberación en el medioambiente, tales como absorción, degradación, lixiviación e interacciones con los sólidos, sedimentos, aguas subterráneas, aguas superficiales, etc. Aunque se ha evidenciado que las drogas de abuso pueden no ser persistentes, debido a su relativamente corta vida media,

estas sustancias pueden exhibir pseudo-persistencia, lo que su continuo consumo da como resultado ser sustancias persistentes en el medioambiente. Las drogas de abuso pueden tener potentes actividades farmacológicas y biológicas y su presencia en las aguas superficiales incluso a bajas concentraciones, junto con los residuos de muchos otros fármacos terapéuticos y otros compuestos orgánicos, pueden provocar inesperadas interacciones farmacológicas causando efectos tóxicos a los organismos acuáticos [26]. Adicionalmente, el agua potable captada en su mayoría de las aguas superficiales, también puede contener trazas de drogas de abuso, como ha sido aceptado por las agencias gubernamentales como la OMS, EPA o la Unión Europea en clara violación del principio de precaución en materia de salud y seguridad pública [27]. En este aspecto, algunos estudios han indicado la presencia de cocaína, benzoilecgonina, metadona y EDDP en agua potable en España [28, 29] y otros países de Europa, Sur América y Japón [30], tal y como se comenta a continuación.

1.1.1.1 Presencia en el medioambiente

Estudiar la presencia de las drogas de abuso en las EDARs permite evaluar aspectos como:

- La eficacia de la EDAR para eliminar la carga contaminante.
- Estimar el índice de consumo en una población a partir del análisis cuantitativo del agua de entrada y teniendo en cuenta los factores farmacocinéticos y metabólicos.
- Estimar el potencial y el riesgo ambiental que posee la carga contaminante no eliminada por la EDAR y que continúa presente en el efluente que va a ser descargado sobre un cuerpo de agua.

La presencia de drogas de abuso y sus metabolitos en los diferentes compartimentos del medioambiente ha sido de interés en las últimas

décadas por los científicos en el campo ambiental. Estas sustancias han sido foco de estudio en aguas residuales y en ríos de diferentes partes del mundo, principalmente en Estados Unidos [31-33], Canadá [34, 35], Europa [36-45] y Australia [46]. En la tabla 3 se recopila el intervalo de concentraciones encontradas en aguas superficiales de ríos y en aguas residuales tanto de entrada como de salida de las EDARs, las cuales fueron estudiadas en los últimos 5 años en diferentes partes del mundo.

Tabla 3. Concentración y frecuencia de detección, en paréntesis, de drogas de abuso en aguas residuales de entrada y efluente de EDAR y aguas de ríos.

Compuesto/ Metabolito	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Morfina	Italia	<LOQ	<LOQ	-	[44]
	Suiza	<LOQ-1970 (88%)	84-1270 (100%)	<LOQ-14(41%)	[36]
	Alemania	440 (100%)	29 (89%)	-	[47]
	Grecia	2-20 (100%)	<LOD-3 (20%)	-	[48]
	España	54-16 (100%)	5-80 (79%)	6-11(11%)	[49]
	España	69-194 (100%)	<LOD-140(80%)	<LOD-89(33%)	[50]
	España	<LOD-27 (60%)	<LOD	-	[39]
	España	90-275 (86%)	60-155 (86%)	12-19 (33%)	[51]
	España	104-166 (100%)	2-53 (100%)	<LOD	[40]
	España	25-278 (86%)	12-81 (50%)	-	[52]
	España	-	-	21-148	[53]
	España	58-309 (100%)	<LOD	-	[45]
	España	-	-	0.3-12 (12%)	[54]
	Francia	56-253 (100%)	-	-	[55]

Tabla 3. Continuación.

Compuesto/ Metabolito	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluentes	Río	
Morfina	Reino Unido	65-985 (99%)	13-266 (69%)	0.5-32 (80%)	[56]
	Croacia	160-476 (100%)	18-101 (100%)	-	[57]
	Canadá	28-43 (100%)	29-65 (100%)	-	[35]
	USA	21-491 (100%)	-	-	[32]
	USA	62-363 (100%)	<LOQ-59 (15%)	-	[33]
6- Acetil morfina	USA	<LOD	-	-	[32]
	Suiza	<LOQ-82 (86%)	<LOQ (88%)	<LOQ-1(86%)	[36]
	Grecia	<LOD	<LOD	-	[48]
	España	<LOD	<LOD	-	[39, 52, 58]
	España	60-79 (50%)	<LOD	<LOD	[40]
	España	n.d-715	<LOD-<LOQ	-	[45]
	España	1-4 (14%)	<LOD	<LOD	[49]
	España	<LOD	<LOD	<LOD	[51]
	España	-	-	<LOD	[53, 54, 59]
	Bélgica	2-33 (100%)	-	-	[41]
	Italia	<LOQ	<LOQ	-	[44]
	Francia	56-253 (100%)	-	-	[55]
	Reino Unido	3-224 (75%)	0.6-8 (11%)	<LOD	[56]
	Reino Unido	69 (80%)	<LOD	<LOD	[60]
	Croacia	3-28 (100%)	<LOQ-7 (90%)	-	[57]

Tabla 3. Continuación.

Compuesto/ Metabolito	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Dihidro- codeína	Canadá	<LOD-1 (40%)	<LOD -1 (60%)	-	[35]
	Reino Unido	30-1030 (100%)	8-569 (100%)	1-97 (100%)	[56, 60]
	Alemania	140 (100%)	73 (100%)	-	[47]
	España	-	9 (33%)	-	[61]
	España	<LOQ	43-91 (100%)	-	[45]
	España	<LOQ-16 (95%)	<LOQ-10 (95%)	<LOD	[40]
Codeína	USA	14-981 (100%)	-	-	[32]
	Canadá	88-807 (100%)	69-1230 (100%)	-	[35]
	Suiza	<LOQ-389 (97%)	94-274 (100%)	<LOQ-18(57%)	[36]
	Italia	275-335 (100%)	110-126 (100%)	-	[44]
	Reino Unido	1732-32295 (100%)	1457-15593 (100%)	<LOQ-529 (100%)	[37]
	Reino Unido	236-3972 (100%)	10-1502 (100%)	3-342 (97%)	[56]
	Grecia	85-1632 (100%)	<LOD-112 (80%)	-	[48]
	España	<LOQ-112 (20%)	<LOQ-529 (50%)	-	[39]
	España	243-337 (100%)	4-17 (97%)	<LOD	[40]
	España	<LOQ-474 (95%)	491-748(100%)	-	[45]
	España	<LOD-536 (80%)	<LOD-426 (60%)	<LOD-149 (33%)	[50]
España	234-1556 (93%)	289-786 (100%)	32-174 (50%)	[51]	

Tabla 3. Continuación.

Compuesto/ Metabolito	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Metadona	USA	<LOQ-55(80%)	<LOQ-37(95%)	-	[33]
	Canadá	2-38 (100%)	3-62 (100%)	-	[35]
	Suiza	42-202 (100%)	44-128 (100%)	<LOQ-5 (57%)	[36]
	Reino Unido	3-171 (100%)	1-91 (100%)	0.2-24 (97%)	[56, 60]
	Alemania	130 (100%)	120 (100%)	-	[47]
	Croacia	25-94 (100%)	20-60 (100%)	-	[57]
	Grecia	<LOD-6 (60%)	<LOD-5 (60%)	-	[48]
	España	15-155 (100%)	15-166 (100%)	-	[39, 45]
	España	19-127 (93%)	15-80 (86%)	2-14 (50%)	[51]
	España	-	-	1-55 (100%)	[53, 59]
	España	12-406 (100%)	<LOD -12 (20%)	<LOD	[40]
EDDP	USA	23-71 (100%)	16-192 (100%)	-	[33]
	Suiza	153-634 (100%)	151-442 (100%)	0.6-12 (100%)	[36]
	Canadá	103-227 (100%)	112-148 (100%)	-	[35]
	Reino Unido	236-3972 (100%)	3-162 (100%)	0.5-41 (85%)	[56, 60]
	Croacia	71-156 (100%)	74-163 (100%)	-	[57]
	Grecia	<LOD-4 (80%)	<LOD-7 (60%)	-	[48]
	España	22-55 (100%)	21-34 (100%)	-	[39]
	España	14-29 (90%)	<LOQ-8(90%)	<LOD	[40]

Tabla 3. Continuación.

Compuesto/ Metabolito	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
EDDP	España	<LOQ	<LOQ-8 (75%)	-	[45]
	España	64-542 (86%)	49-90 (86%)	31-40 (33%)	[51]
	España	-	-	1-151 (100%)	[53, 59]
Cocaína	USA	<LOQ-156 (95%)	<LOQ-2 (50%)	-	[33]
	Canadá	137-412 (100%)	118-457 (100%)	-	[35]
	Suiza	<LOQ-1920(95%)	<LOQ-106(92%)	<LOQ-4 (92%)	[36]
	Francia	5-282 (100%)	LOQ-21(100%)	-	[42]
	Reino Unido	5-209 (100%)	0.6-70 (95%)	0.1-17 (97%)	[56, 60]
	Portugal	90-197 (100%)	-	-	[62]
	Croacia	30-114 (100%)	8-70 (100%)	-	[57]
	Grecia	4-49 (100%)	LOQ-11(100%)	-	[48]
	España	97-294 (100%)	23-30 (100%)	-	[39]
	España	160-2486 (90%)	<LOQ-9(90%)	<LOD	[40]
	España	163-500 (100%)	<LOQ-2925 (80%)	-	[45]
	España	110-3291 (100%)	<LOD	-	[58]
	España	195-961 (100%)	2-31 (93%)	0.4-59 (100%)	[49]
	España	37-472 (100%)	<LOD -61 (40%)	<LOD -30 (33%)	[50]
	España	40-820 (100%)	12-496 (100%)	5-87 (50%)	[51]
	España	-	<LOQ-72(60%)	<LOQ-14(60%)	[63]
	España	-	-	<LOD-103 (78%)	[53, 59]

Table 3. Continuación.

Compuesto/ Metabolito	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Benzoi- leccgonina	USA	157-3020(100%)	<LOQ-210(70%)	-	[33]
	Canadá	273-1592(100%)	656-1446 (100%)	-	[35]
	Suiza	<LOQ-1860 (95%)	<37-425 (100%)	<LOQ-11 (100%)	[36]
	Francia	64-849 (100%)	8-149(100%)	-	[42]
	Italia	130-715 (100%)	36-58 (100%)	-	[44]
	Reino Unido	16-567 (100%)	0.8-293 (100%)	0.2-74 (97%)	[56, 60]
	Portugal	203-567 (100%)	-	-	[62]
	Croacia	89-325 (100%)	47-164 (100%)	-	[57]
	Grecia	9-105 (100%)	<LOQ-77(100%)	-	[48]
	España	173-7752 (100%)	170-4003 (100%)	-	[39, 45, 58]
	España	1169-3336 (60%)	1-42 (90%)	19-35 (85%)	[40]
	España	545-4094 (100%)	4-2221 (100%)	1-530 (100%)	[49, 51]
	España	36-2153 (100%)	<LOD -689 (80%)	<LOQ -316 (33%)	[50]
	España	-	<LOQ-656 (80%)	<LOQ-31 (60%)	[63]
España	-	-	2-823 (100%)	[53, 59]	

Tabla 3. Continuación

Compuesto/ Metabolito	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Nicotina	USA	555-64410 (88%)	23-47 (70%)	-	[33]
	Reino Unido	87-9086(100%)	15-1769 (91%)	4-182 (98%)	[56, 60]
	España	77-1105 (90%)	LOQ-15(100%)	<LOD	[40]
	España	7683-23325 (100%)	295-17385 (80%)	175-215 (50%)	[51]
	España	700-6800 (100%)	-	-	[64]
	España	-	-	284-1885 (100%)	[65, 66]
	Italia	1300-6870 (100%)	-	-	[67]

Ref. = referencia
LOD = límite de detección
LOQ = límite de cuantificación
 - = no estudiada

Como se puede observar en la tabla 3, la nicotina representa el compuesto con las concentraciones más altas reportadas tanto en las aguas residuales como en las aguas de río con frecuencias de detección entre 50% y 100%. Por ejemplo, Subedí et al. [33] en Estados Unidos y Martínez Bueno et al. [51] en España, encontraron nicotina en las aguas residuales de entrada a concentraciones de hasta 64410 ng/L y 23325 ng/L, respectivamente; y aunque las EDARs investigadas en ambos estudios cuentan con un tratamiento similar, las concentraciones de nicotina reportadas en las aguas de salida de las EDARs en Estados Unidos no sobrepasan los cientos de ng/L en comparación con las EDARs en España que sobrepasan los miles de ng/L.

Cocaína y su principal metabolito benzoilecgonina, ampliamente estudiados en las EDARs de diferentes países, mostraron mayor concentración del metabolito que del compuesto precursor. Este comportamiento es atribuido principalmente al metabolismo de la cocaína después de ser consumida, ya que solo 1-9% se elimina por la orina sin sufrir alteraciones y su metabolito benzoilecgonina es excretado en mayor proporción entre 35 y 54%. Aunque estos dos compuestos fueron ubicuos en todos los estudios mencionados en la tabla 3, los datos encontrados indicaron mayores concentraciones en las aguas de entrada de las EDARs que fueron investigadas en Suiza [36], España [40, 51, 58] y en Estados Unidos [33], mientras que las concentraciones más bajas fueron reportadas en el Reino Unido [60], Croacia [57] y Portugal [62]. Metadona y su principal metabolito EDDP mostraron similar patrón de presencia que la cocaína y su metabolito pero a concentraciones más bajas. Así, la metadona fue reportada en todos los estudios mencionados en la tabla 3 a menor concentración que su principal metabolito el EDDP. En España fueron encontradas las concentraciones más altas de metadona en aguas residuales de entrada con un máximo de 406 ng/L [40], mientras que en Suiza se determinaron los niveles más altos de EDDP con un máximo de concentración de 634 ng/L [36].

En general, la morfina ha sido determinada en las aguas residuales de entrada a concentraciones relativamente bajas, en un intervalo entre el límite de cuantificación y 491 ng/L, sin embargo concentraciones de hasta 1970 ng/L fueron reportadas en un estudio en Suiza [36]. Cabe destacar que la carga de morfina en las EDARs no puede ser directamente interpretada solo al consumo de heroína, puesto que la morfina no es sólo un metabolito de la heroína, sino que también es un metabolito minoritario de otras opiáceos como la codeína, folcodina y etilmorfina. Además podemos mencionar que la morfina como fármaco es habitualmente usada en medicina para anestesia, analgesia o tratamientos relacionados con dolores por isquemia y edema pulmonar [26, 49]. Por otra parte, la 6-acetilmorfina, otro metabolito activo que resulta de la hidrólisis de la heroína, es un indicador exacto de que la heroína ha sido consumida, pero

al igual que su precursor presenta una vida media corta de tres minutos convirtiéndose por desacetilación a morfina [20]. Esta rápida biotransformación justifica el que la 6-acetilmorfina generalmente se encuentre a muy bajos niveles (ng/L) y con muy poca frecuencia de detección principalmente en las aguas de entrada de las EDARs y en aguas de ríos (tabla 3).

Han sido pocos los estudios de dihidrocodeína en comparación con otras drogas de abuso recopiladas en la tabla 3. Estos estudios muestran que dihidrocodeína fue ubicua en las aguas residuales de entrada y el intervalo de concentraciones encontrado fue entre el límite de cuantificación y 1030 ng/L. Sólo en un estudio realizado en Canadá [56], este compuesto fue encontrado con un máximo de 1 ng/L en el 60 % de las muestras tanto de entrada como de salida de estas EDARs. En cuanto a la codeína con altas frecuencias de detección en las tres matrices de la tabla 3, fue reportada en agua residual de salida a concentraciones más altas que en el agua residual de entrada en dos estudios realizados en España [39, 45] y en un estudio en Canadá [35]. También cabe destacar que el intervalo de concentraciones encontrado por todos los estudios no supera los 4000 ng/L en agua residual de entrada, pero en el estudio hecho por Kasprzyk-Hordern et al. [37] en EDARs del Reino Unido son encontrados altos niveles de concentración de hasta 32295 ng/L y 15593 ng/L en muestras de agua residual de entrada y salida, respectivamente.

En general, las concentraciones encontradas en los efluentes de la mayoría de las EDARs investigadas por los diferentes estudios resumidos en la tabla 3 fueron más bajas que las concentraciones de las aguas de entrada, siendo notoriamente mucho más bajas para la morfina [33, 45, 47, 52], nicotina [33, 40, 56, 60], cocaína y su metabolito benzoilecgonina [39, 40, 49, 50, 58]. Del mismo modo la 6-acetilmorfina solo fue encontrada en muestras de salida a concentraciones un poco mayores del límite de cuantificación en 7 EDARs del Reino Unido [56]. En los demás estudios fue presente por debajo del límite de cuantificación o no detectada. Por otro lado metadona es entre las drogas de abuso que

presenta más baja eliminación en la mayoría de las EDARs, usualmente eliminaciones más bajas del 40% [39, 47, 48]. Incluso varios estudios han reportado concentraciones más altas en los efluentes que en las aguas de entrada [33, 35, 45].

Aunque la mayoría de las EDARs suelen aplicar un sistema convencional de tratamiento con lodos activados, la capacidad de eliminación para alguna de las drogas de abuso fue significativamente variable entre las EDARs. Por ejemplo, mientras que en un estudio de dos EDARs localizadas en Estados Unidos reportaron una elevada eliminación de cocaína, benzoilecgonina, morfina y nicotina (90-100%) [33], en otros estudios en España [45] y Canadá [35], los niveles de concentración de la dihidrocodeína, codeína, morfina, cocaína y benzoilecgonina fueron más altos en el efluente que en las aguas de entrada de las EDARs. Sin embargo, los últimos tres estudios mencionados anteriormente coincidieron en la ineficiencia de las EDARs para eliminar metadona y EDDP en contraste con otras EDARs investigadas en el Reino Unido [56] y en España [51], donde cerca del 80% de EDDP fue eliminado de las aguas residuales. Estas diferencias de eliminación entre las EDARs aun aplicando un sistema de tratamiento similar puede ser explicado por la influencia de las condiciones operacionales (tiempo de retención hidráulica) y por condiciones medioambientales (temperatura, pH, nivel de la luz solar, precipitaciones).

En un estudio realizado en el Reino Unido la eficiencia de eliminación de algunas drogas de abuso en 6 diferentes EDARs fue evaluada utilizando dos tipos de tratamiento, el de lodos activados y filtros percoladores, siendo el tratamiento con lodos activados entre 10% y 70% más eficiente [56].

En cuanto a tratamientos terciarios, son pocas las EDARs que cuentan con este tipo de tratamiento. Su propósito es aumentar la calidad del efluente al estándar requerido antes de que éste sea descargado al ambiente receptor (mar, río, lago, campo, etc.). En este contexto, algunos

estudios concuerdan en que la aplicación de tratamientos terciarios con cloración, coagulación, flotación y filtración [40, 58] son más efectivos para eliminar las drogas de abuso del agua residual (eliminación mayor del 70%) que los tratamientos secundarios o filtros percoladores. Una desventaja de los tratamientos con cloración es que durante ésta, el NaClO reacciona con los compuestos orgánicos por medio de reacciones de oxidación, reacciones de adición de enlaces insaturados y reacciones de sustitución electrofílica en grupos nucleofílicos, que pueden generar compuestos orgánicamente clorados los cuales pueden ser carcinógenos o dañinos para el ambiente [68].

La incompleta eliminación de las drogas de abuso en las EDARs conlleva a que estos compuestos lleguen a las aguas superficiales por medio de las descargas de los efluentes, como ha sido demostrada su presencia en varios estudios en aguas superficiales. Como se puede observar en la tabla 3, las drogas de abuso más frecuentemente encontradas y con las concentraciones más altas reportados en aguas de río son para nicotina con un máximo de hasta 1885 ng/L [65], benzoilecgonina con 823 ng/L [49] en España, y codeína con un máximo de concentración de 529 ng/L en el Reino Unido [37]. Por otro lado, 6-acetilmorfina sólo fue encontrada en un estudio que investigó su presencia en 22 ríos de Suiza, encontrando niveles de concentración muy bajos, entre el LOQ y 1 ng/L [36].

Dado que la mayoría de las aguas de río son la principal fuente de captación para su posterior potabilización, la presencia de drogas de abuso en el agua para consumo humano también ha sido materia de interés. La presencia de drogas no reguladas como nicotina y algunas drogas de abuso fue demostrada a niveles trazas en aguas de grifo en diferentes partes de países Europeos, de América Latina y Japón [30]. Nicotina, cocaína, benzoilecgonina, metadona y EDDP fueron las drogas más frecuentemente determinadas en un intervalo de concentración entre 5.9-40 ng/L para nicotina, <LOQ-0.6 ng/L para cocaína, 0.2-4.5 ng/L para benzoilecgonina, 0.1-0.2 ng/L para metadona y 0.1-0.4 ng/L para EDDP [30].

Otros estudios también han evaluado la eficiencia en eliminar drogas de abuso de algunas plantas potabilizadoras de agua utilizando diferente tipos de tratamiento. Por ejemplo, Boleda et al. [69] compararon el tratamiento convencional con un tratamiento avanzado en una planta potabilizadora de España para eliminar diferentes fármacos y 6 drogas de abuso (benzoilecgonina, cocaína, codeína, EDDP, metadona y nicotina). Los dos tratamientos constan de una primera etapa en común, dioxiclорinación, coagulación/floculación y filtración de arena. Posteriormente el agua es dividida en las dos líneas de tratamiento, la convencional que consta de los procesos de ozonización y filtración con carbono y en la otra línea el tratamiento avanzado donde se aplica ultrafiltración, desinfección ultravioleta y ósmosis inversa. Los resultados presentados por los autores muestran la presencia de 6 drogas de abuso en el agua captada antes de ser potabilizada en un intervalo de concentración entre 0.4 - 43.9 ng/L y que después del tratamiento convencional y avanzado, todas estas drogas fueron completamente eliminadas en ambos tratamientos con excepción de nicotina que fue determinada después del tratamiento convencional a concentraciones de hasta 9.2 ng/L y con el tratamiento avanzado a una máxima concentración de 6.3 ng/L. Benzoilecgonina solo fue encontrada después de aplicar el tratamiento convencional a muy bajo nivel de concentración, entre 0.3 ng/L y 1.9 ng/L.

Del mismo modo, la aplicación de procesos fotocatalíticos ha resultado ser potencialmente eficiente en la completa eliminación de las drogas de abuso en el agua (> 97%) como lo han demostrado tres estudios realizados en España [59, 70, 71]. Postigo et al. [70] investigó dos reacciones catalíticas en presencia de luz solar, las cuales implicaron fotocátalisis heterogénea usando dióxido de titanio y foto-Fenton homogéneo usando sales de hierro en disolución [70], mientras que en otros dos estudios usaron foto-Fenton heterogénea con peróxido de hidrógeno y óxido de hierro soportado sobre sílice en presencia de luz ultravioleta [59, 71].

Por otro lado, estudiar la presencia de drogas de abuso en fangos de depuradora es también de gran interés, puesto que gran parte de las drogas que han sido eliminadas de las aguas residuales son eliminadas principalmente a través de la adsorción y la biodegradación por el lodo activado. La adsorción en las partículas de lodo puede representar una importante ruta para que los contaminantes entren al medioambiente cuando estos fangos son utilizados como fertilizantes en agricultura [72].

Aunque la presencia de drogas de abuso en lodos de depuradora ha sido foco de investigación en muy pocos estudios, varias de estas drogas han sido frecuentemente encontradas en fangos generados en varias EDARs a niveles de concentración significantes. Dos estudios, uno en Estados Unidos [33] y otro en España [73], encontraron concentraciones de cocaína entre <LOQ – 23 ng/g en peso seco (d.w.), benzoilecgonina entre 0.8 - 3.2 ng/g (d.w.), morfina entre 1.9 – 28.7 ng/g (d.w.), metadona entre <LOQ – 111 ng/g (d.w.) y EDDP entre 8.7 – 279 ng/g (d.w.). En ambos estudios las muestras de fango fueron tomadas después de que el fango fuera sometido a digestión anaeróbica, centrifugado y deshidratado. Por otro lado, cocaína y su metabolito benzoilecgonina no fueron detectados en fangos generados en tres EDARs localizadas en Escocia [74].

Recientemente Álvarez-Ruiz et al. [75] evaluaron 41 drogas de abuso que incluyen cocaínicos, triptaminas, anfetaminas, catinonas, derivados de morfina, piperazinas, entre otros psico-estimulantes en sedimentos, fangos y partículas en suspensión de 3 EDARs localizadas en España. Cocaína, benzoilecgonina y metadona fueron siempre detectados en las tres matrices, de las cuales partículas en suspensión presentan las concentraciones más altas en un intervalo de concentración de 3- 258 ng/g (d.w.), mientras que en sedimentos presentó la más baja concentración de 1 ng/g (d.w.) para los tres compuestos. Codeína fue encontrada en fangos (8-78 ng/g) y en partículas en suspensión (3-685 ng/g (d.w.)), entretanto morfina solo fue encontrada en fangos a concentraciones entre 24-171 ng/g (d.w.) [75].

Baker et al. [76, 77] también evaluaron la adsorción de drogas de abuso en las partículas en suspensión de aguas residuales. Estos estudios, realizados en EDARs de la República Checa [76] y en el Reino Unido [77], mostraron que la proporción de adsorción de cocaína, benzoilecgonina y dihidrocodeína en los sólidos suspendidos fue insignificante ($< 3.6\%$). De acuerdo con los altos coeficientes de adsorción de carbono orgánico ($\log k_{oc}$) y de reparto octanol-agua ($\log k_{ow}$) que presentan la metadona y su metabolito, EDDP, la afinidad de estas drogas por los sólidos suspendidos fue la más alta entre las drogas de abuso con proporciones de adsorción entre 8.1-19.6% para la metadona y 12.1 - 49.8% para EDDP. Por otro lado, en el estudio realizado en el Reino Unido la codeína y la morfina mostraron proporciones de adsorción un poco más altas que en el estudio de la República Checa con un máximo de 5.6%.

1.1.1.2 Epidemiología en las aguas residuales

La producción, comercialización y el consumo de las drogas de abuso están entre los principales problemas que afectan la salud y la seguridad mundial. Según el informe mundial sobre las drogas 2014 emitido por UNODC [21], en el 2012 un total aproximado de 183.000 muertes estuvieron relacionadas con las drogas, lo que corresponde con una tasa de mortalidad de 40 muertes por millón en la población mundial entre 15 y 64 años. Para las entidades competentes en las cuestiones relacionadas con el tráfico ilícito, el uso indebido de drogas, prevención del delito, justicia penal, el terrorismo internacional y la corrupción política, es trascendental conocer la tendencia, los niveles de uso y la prevalencia del consumo para iniciar campañas de prevención o para intervenir contra la producción, el tráfico y la delincuencia relacionada con las drogas de abuso.

Actualmente las cifras oficiales en la prevalencia y la incidencia de las drogas de abuso se obtienen a partir de encuestas a la población integradas

con las estadísticas de delincuencia, registros médicos, producción de drogas e índices de incautación [78]. Sin embargo, estas herramientas epidemiológicas presentan varias limitaciones que incluyen el sesgo de la encuesta y cobertura limitada de la población. Esta selección sesgada de la población puede conducir a una estimación incorrecta ya que la mayoría de la información se obtiene de los propios consumidores [78]. Por ello, la epidemiología de las aguas residuales resulta en un enfoque alternativo a los métodos tradicionales para estimar el consumo de las drogas de abuso entre la población. Este enfoque es particularmente adecuado para el seguimiento de consumo en tiempo real, permitiendo rápida identificación de las tendencias de cambio, que es fundamental para identificar el problema, planificar medidas selectivas y evaluar la eficacia del tratamiento. Combinando los resultados aportados por la epidemiología de las aguas residuales con los de las clásicas encuestas a la población, resulta una herramienta integrada y potente para estudiar y vigilar continuamente la tendencia de consumo de drogas en la población [79].

Los estudios epidemiológicos de las aguas residuales se basan en los niveles de las drogas de abuso y sus metabolitos en los efluentes de las EDARs teniendo en cuenta algunos factores farmacocinéticos y metabólicos, así como el destino de los productos de excreción. Un esquema general del análisis de las aguas residuales enfocado a determinar el consumo de drogas de abuso entre una población se muestra en la figura 4. El primer paso consiste en recolectar una muestra representativa del agua de entrada de la EDAR para su posterior análisis cuantitativo (paso 2). Este paso es crucial para obtener una cuantificación exacta (concentración en ng/L) de cada droga residual. En los pasos 3-5 en la figura 4 se muestran los parámetros necesarios para estimar el consumo de la sustancia en determinada población que generalmente se expresa en mg/día/1000 habitantes. Estos parámetros son la concentración hallada en el paso 2, el caudal del agua de entrada, el número de población servida por la EDAR entre 15 y 65 años y el factor de corrección usado para cada droga, el cual es obtenido considerando la tasa de excreción media de la sustancia/metabolito y la tasa del peso molecular de la

sustancia/metabolito. El uso de los metabolitos en los cálculos es preferible sobre el compuesto precursor porque los metabolitos son una prueba de consumo humano, mientras que el compuesto precursor también puede estar presente en las aguas residuales debido a la eliminación deliberada de la sustancia.

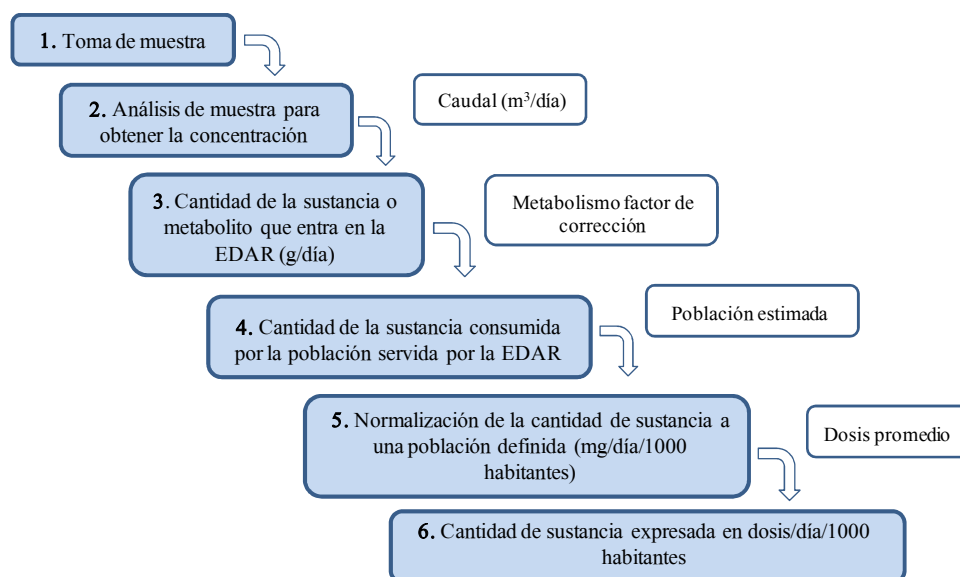


Figura 4. Esquema general en epidemiología de las aguas residuales [79].

En el paso 5 la normalización de los resultados al número de habitantes servida por cada EDAR es necesaria para comparar los resultados estimados en los diferentes lugares. Si la dosis media de una sustancia está disponible, es posible calcular la cantidad de sustancia consumida como el número de dosis/día/1000 habitantes (paso 6 en la figura 4). Sin embargo, una dosis media genérica no es fácil de obtener debido a la alta

variabilidad de dosis consumida que depende de varios factores como la pureza de la droga, la ruta de administración y la frecuencia de uso [79].

Actualmente, el análisis de las aguas residuales ha sido usado ampliamente para estimar el consumo local (ciudades o pequeños pueblos) o nacional de algunas drogas de abuso en varios países como Francia [42, 55, 80], Finlandia [43], Portugal [62], Bélgica [81], España [49, 58], Reino Unido [82], Croacia [57], Eslovaquia [83], República Checa [76], Canadá [34, 35], Estados Unidos [33], Hong kong [84] y Corea [85]. Los valores estimados de consumo de cocaína, heroína, metadona y codeína reportados en los últimos cinco años se muestran en la tabla 4. En la mayoría de estos estudios también son incluidas otras drogas lícitas e ilícitas como benzodiacepinas, marihuana o anfetaminas, pero solo nos hemos centrado en las 4 drogas mencionadas anteriormente porque son las que han sido foco de estudio en esta tesis.

Entre las principales interpretaciones que se pueden deducir de la tabla 4, se destacan que la droga más consumida entre las 4 reportadas es la cocaína, siendo el Reino Unido con la prevalencia de consumo más alta con un máximo de 12876 mg/día por cada 1000 habitantes [82], seguido de Francia [55] y Canadá [34] donde el máximo de consumo estimado fue de aproximadamente 5700 mg/día por cada 1000 habitantes. A diferencia de países como Finlandia [43], Australia [46], China [86] y Corea [85] el consumo estimado de cocaína no supera los 26 mg/día por cada 1000 habitantes. Esta tendencia geográfica en el consumo de cocaína es consistente con el informe mundial sobre las drogas 2014 UNODC [21].

Cabe destacar que en la mayoría de los estudios citados en la tabla 4, el patrón de consumo de cocaína fue notablemente más alto los fines de semana que entre semana, lo que refleja el uso recreacional de esta droga.

Tabla 4. Intervalo de consumo de algunas drogas estimado en diferentes países.

País (Nº EDARs)	Consumo mg/día/1000 habitantes				Ref.
	Cocaína	Heroína	Metadona	Codeína	
Francia (25)	3-2434		4-1594		[80]
Francia (4)	120-5750				[55]
Francia (4)	133-979				[42]
Finlandia (10)	1-25		40-150		[43]
Portugal (1)	464-1324				[62]
Bélgica (1)	220-1550	90-1050	78-190		[81]
España (3)	900-1700				[58]
España (7)	600-3200	60-1950			[49]
Reino Unido (1)	7621-12876	264-1297	78-91	521-622	[82]
Croacia (1)	230	420		105	[57]
Eslovaquia (8)	5-115				[83]
República Checa (3)	115-329		26-47		[76]
Canadá (3)	80-5700				[34]
Canadá (2)	390-3750	65-68			[35]
USA (2)	807-1380		31-67		[33]
Australia (10)	10-15				[46]
Corea (15)	n.d.	n.d.	n.d.	2-14	[85]
China (1)	170				[84]
China (9)	2-12	0.4-2	0.7-2		[86]

n.d. = no detectado

Un estudio realizado simultáneamente en 19 ciudades de la Unión Europea demostró que un análisis estandarizado de biomarcadores urinarios de drogas de abuso en las aguas residuales puede ser favorablemente aplicado para estimar y comparar directamente el uso de estas sustancias a escalas locales e internacionales [87]. Los datos encontrados mostraron distinto patrón en el tiempo y en el espacio en el consumo de cocaína, marihuana y algunas anfetaminas. Así por ejemplo,

el consumo de cocaína fue más alto en el Oeste y Centro de Europa y más bajo en el Norte y Este de Europa. Los consumos más altos de cocaína fueron observados en Amberes seguido por Amsterdam, Valencia, Eindhoven, Barcelona, Londres, Castellón y Utrecht, donde el promedio estimado fue en un intervalo de 987-1998 mg/día/1000 habitantes. Milán, Santiago de Compostela, París y Bruselas mostraron valores entre 511-662 mg/día/1000 habitantes, mientras que el consumo estimado en Budweis, Zagreb, Helsinki, Turku, Oslo, Estocolmo y Umea fue entre 2 y 146 mg/día/1000 habitantes.

Estos resultados coinciden con los datos de prevalencia dados por los informes oficiales del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) [87]. Se estima que en Europa se consumen unos 356 kilogramos por día de cocaína, lo que representa aproximadamente entre el 10 y el 15% del total de cocaína consumida en todo el mundo, según las estimaciones de la UNODC [21].

En cuanto a la heroína, en general la tendencia de consumo fue similar para la mayoría de países donde esta sustancia ha sido monitorizada (tabla 4). Los países que presentaron mayor consumo corresponden a España [49], Reino Unido [82] y Bélgica [81] con un intervalo similar de prevalencia en consumo entre 60-1297 mg/día/1000 habitantes, mientras que en países como China [86] o Corea [85] el consumo fue menor de 2 mg/día/1000 habitantes. Se debe remarcar que el consumo de heroína fue estimado en algunos estudios a partir de las concentraciones del metabolito 6-acetilmorfina [81, 82, 86] y que en otros estudios fue utilizada la concentración de morfina [35, 49, 57], por lo que una sobreestimación en los valores de consumo calculados con morfina puede darse debido a que este metabolito puede estar presente en el agua por el uso terapéutico de otros opiáceos como morfina, codeína, etilmorfina, etc [78]. Por otro lado, aunque la 6-acetilmorfina es un metabolito exclusivo de la heroína, su uso para calcular el consumo en muchas ocasiones no es posible puesto que la proporción de excreción es muy baja (1.3%) por lo que en las aguas residuales es detectado con poca frecuencia [78]. Otra

desventaja del uso de 6-acetilmorfina es el alto factor de corrección usado en los cálculos, lo que podría generar mayor incertidumbre en los resultados [82].

Respecto a la metadona, su consumo fue estimado en varios países Europeos (tabla 4) con un intervalo similar entre 26-190 mg/día/1000 habitantes, aunque estas cifras aumentaron considerablemente hasta 1594 mg/día/1000 habitantes en algunas ciudades del Noreste de Francia [80]. Variaciones altas en el consumo de metadona entre semana o los fines de semana no fue observado en ninguno de estos países, lo cual concuerda con el hecho de que esta droga es principalmente y ampliamente utilizada como tratamiento sustitutivo de la dependencia a las drogas opiáceas. Este hecho también podría ser una explicación al bajo consumo reportado en China [86] (< 2 mg/día/1000 habitantes) o en Corea [85] donde esta sustancia no fue determinada en las aguas residuales, puesto que el consumo estimado de heroína reportado en estos países fue también muy bajo. En la mayoría de los estudios citados en la tabla 4, el consumo estimado fue similar a los datos oficiales de prescripción de metadona aportados por las entidades de salud pública de cada país.

Finalmente, el consumo de codeína ha sido poco investigado en los estudios epidemiológicos. En el Reino Unido su consumo ha sido estimado en un intervalo entre 521-622 mg/día/habitante, representando la más alta prevalencia de consumo comparado con otros países como Croacia [57] con un consumo de 105 mg/día/habitante o Corea [85] con un intervalo estimado de consumo entre 2-14 mg/día/habitante. En el caso del Reino Unido y de Corea los datos de consumo fueron comparados con los datos aportados por las entidades nacionales de salud pública y una subestimación en el uso de codeína fue observado por ambos países, ya que los datos oficiales en el Reino Unido son de media de consumo 1946 mg/día/1000 habitantes y en Corea la media es de 14 mg/día/1000 habitantes. Los autores propusieron que una posible causa a esta subestimación es que los datos de excreción utilizados para llevar a cabo el cálculo no han sido representativos de la población local, lo que resulta

en un subregistro o que no toda la codeína prescrita fue consumida/eliminada. Del mismo modo, como la codeína también es metabolizada a morfina, transformación similar puede producir efectos como fue discutido anteriormente con la heroína [82].

1.1.1.3 Evaluación del riesgo ambiental

Aunque las drogas de abuso han sido detectadas en los efluentes de las EDARs y en las aguas superficiales en diferentes partes del mundo, sus efectos ecotoxicológicos han sido poco investigados. La evidencia sugiere que las drogas de abuso pueden no ser persistentes en el medioambiente, pero sí pueden mostrar pseudo-persistencia por su constante uso recreativo. Algunos estudios han evidenciado los efectos de las drogas de abuso sobre los organismos acuáticos y aunque la investigación es limitada, una amplia gama de organismos acuáticos, incluyendo bacterias, algas, invertebrados y peces, tienen receptores que los hacen potencialmente sensibles a estos compuestos [88]. Existe evidencia científica que las drogas de abuso, en su mayoría proveniente de plantas derivadas de alcaloides, tienen propiedades antimicrobiales afectando hongos y bacterias patógenas [89], por lo que las consecuencias de la presencia de las drogas de abuso en los ecosistemas acuáticos pueden comenzar en la base de la cadena alimentaria e incluir una gama de organismos acuáticos. Así mismo, algunos grupos funcionales como las aminas alifáticas y aminoácidos que conforman la mayoría de las moléculas de las drogas de abuso, han sido conocidos por inhibir la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno en el alga *Chloroella* y las aminas de cadena larga son fuertes inhibidores del crecimiento de esta microalga [90].

Los invertebrados acuáticos también han mostrado ser sensibles a la exposición de las drogas de abuso; por ejemplo, la cocaína y sus metabolitos tienen efectos negativos sobre la fisiología del mejillón cebra

en concentraciones de relevancia ambiental. En este aspecto, varios estudios han indicado que la exposición de los mejillones a estas sustancias puede causar daños en el ADN, la inactivación de compuestos defensivos y el estrés oxidativo [91-94]. Por otro lado, la exposición del mejillón acuático *Elliptio complanata* a la morfina produjo cambios fisiológicos en los tejidos como reducción de la serotonina y aumento de la dopamina por lo que puede inducir a un estado de relajación [95]. Inyecciones directas de cocaína (que van de 2.5 a 10 mg/g) también alteraron la locomoción de los cangrejos de río [88], organismos importantes en muchos ecosistemas acuáticos.

Otras investigaciones sobre la exposición de drogas de abuso en los vertebrados (por ejemplo, peces) también han demostrado efectos negativos sobre estas especies. Por ejemplo, experimentos con anguilas dieron como resultado que la exposición a cocaína en concentraciones ambientales afecta las dopaminas cerebrales, las catecolaminas y la actividad pituitaria [96].

En vista de la toxicidad de las drogas de abuso sobre los diferentes tipos de organismos que habitan los ecosistemas, es importante la evaluación de riesgo ambiental. Mediante esta evaluación se determina si existe una amenaza potencial que comprometa la calidad del agua, aire o suelo, que afecte directa o indirectamente al ambiente y a su biodiversidad, en un lugar y tiempo determinado como consecuencia de la exposición de los contaminantes presentes en el ambiente. En general, el riesgo ambiental depende de tres factores:

- Cantidad de la sustancia presente en el medioambiente (por ejemplo suelo, agua o aire).
- Tiempo de exposición del receptor con el medio ambiental contaminado.
- La toxicidad inherente de la sustancia.

En la evaluación del riesgo ambiental se utilizan datos y observaciones

sobre los efectos nocivos que pueden generar sustancias tóxicas o situaciones peligrosas hacia el medioambiente y la salud, y valorar el riesgo que implican. La evaluación consiste en obtener datos para determinar la dosis de exposición de un organismo a un contaminante y la respuesta que éste provocará. Los datos empíricos de dosis-respuesta se comparan con la exposición que reciben los humanos u otros organismos vivos, para tener una evaluación completa del riesgo generado en determinado ambiente contaminado [97].

La evaluación del riesgo ambiental se puede desarrollar siguiendo la guía sugerida por la EPA [4], que está divididas en cuatro etapas como se ilustra en la figura 5.

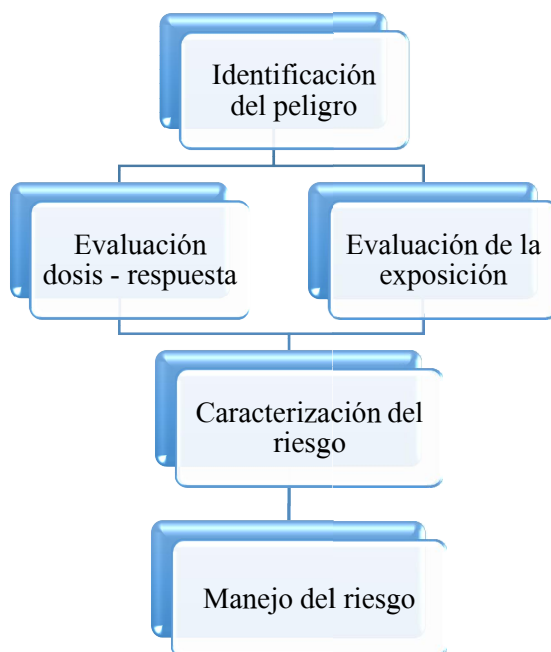


Figura 5. Etapas de la evaluación del riesgo ambiental [97].

En la primera etapa (figura 5), que es la **identificación del peligro**, se examinan los factores causantes de estrés ambiental y los efectos ecológicos potenciales, así como las características del ecosistema en riesgo. La identificación del peligro no cuantifica los daños, pero sí realiza una descripción cualitativa revisando los datos toxicológicos de las sustancias químicas. Para identificar los peligros, se deben conocer las rutas de exposición y vías de ingestión que siguen las sustancias tóxicas. Las rutas de exposición son los caminos que sigue el contaminante hasta llegar a la población afectada, y pueden ser el aire, el agua, el suelo y los alimentos. Las vías de ingestión representan el camino que sigue la incorporación del contaminante en el organismo, y pueden ser la vía oral, cutánea o respiratoria.

En la evaluación de la exposición, la base fundamental es entender que para que haya riesgo los organismos u otra parte del ecosistema deben estar en contacto, o por lo menos coincidir en espacio y tiempo, con el contaminante. El término exposición abarca desde la liberación del contaminante físico, químico o biológico, a partir de la fuente de origen, hasta su captación o interacción con el ecosistema o con alguno de los componentes que lo integran. La estimación de la exposición es el proceso de medir o estimar la frecuencia, magnitud, ruta y duración de la exposición. Existen dos métodos para evaluar la exposición del contaminante: los directos e indirectos. Los directos evalúan la cantidad del tóxico que entró en el organismo. Los indirectos, en cambio, miden la concentración del contaminante en el medioambiente y lo comparan con una dosis de exposición admisible. La exposición está en función del tiempo y la concentración del contaminante en el ambiente; dependiendo de si la dosis es crónica o aguda.

En la **evaluación dosis-respuesta** se establece la relación entre la incidencia o frecuencia del efecto tóxico de una sustancia tóxica concreta dentro del organismo, en función de la dosis recibida o administrada. Para un análisis dosis-respuesta se utilizan los siguientes conceptos de

toxicología:

Concentración efectiva media (CE₅₀): concentración obtenida estadísticamente o estimada gráficamente que causa un efecto determinado en 50% del grupo de organismos, bajo condiciones específicas.

Concentración letal media (CL₅₀): concentración (en aire o agua) obtenida estadísticamente o estimada gráficamente que causa la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de esta, del 50% del grupo de organismos durante un periodo determinado y otras condiciones específicas. Generalmente CL₅₀ se expresa en mg/L.

Dosis letal media (DL₅₀): dosis individual de una sustancia que estadísticamente, o estimada gráficamente es letal para 50% del grupo de organismos bajo condiciones específicas. Generalmente DL₅₀ se expresa en mg/kg de peso corporal.

Nivel sin efecto observable (NOEL): La mayor concentración o cantidad de una sustancia hallada experimentalmente o por observación que no causa alteraciones en la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo o duración de la vida de los organismos, distinguibles de los observados en organismos normales (control) de la misma especie y cepa, bajo condiciones idénticas a las de exposición.

Menor nivel de efecto observable (LOEL): La menor concentración o cantidad de una sustancia que según observación o experimentación causa cualquier modificación indeseable de un organismo distinguible de un organismo idéntico de control.

Dado la gran complejidad que presentan los ecosistemas acuáticos, no es posible evaluar el efecto de los contaminantes sobre la totalidad de los organismos que viven en ellos. Es por esto que, para poder evaluar los efectos individuales de los contaminantes, se utilizan especies de prueba representativas de los ecosistemas. La elección de las especies de prueba se efectúa considerando una serie de criterios, como importancia

ecológica, sensibilidad a los contaminantes o factibilidad de crecer en condiciones de laboratorio. En este sentido, es importante destacar que sólo un pequeño porcentaje de organismos se pueden mantener en laboratorio y, por lo tanto, sometidos a ensayos de toxicidad bajo condiciones controladas. Uno de los organismos más utilizados en la realización de bioensayos de toxicidad es el género *Daphnia* (*Cladocera: Daphnidae*). Este organismo cumple un importante rol en la cadena trófica de los sistemas dulceacuícolas, siendo el consumidor dominante de los productores primarios y es una importante fuente de alimento para predadores vertebrados e invertebrados.

En la etapa de **caracterización del riesgo** se integra la información sobre exposición y efectos, se describen las fuentes de incertidumbre, y se evalúa qué tan significativos son los cambios ecológicos pronosticados. Para caracterizar el riesgo ecológico se puede utilizar un modelo empírico, el cual consiste en comparar la exposición ambiental que sufre un organismo ante una sustancia tóxica con un valor de concentración toxicológicamente efectivo para esa sustancia. Para ello se define un indicador denominado coeficiente de riesgo (Q), que es el cociente de la concentración ambiental estimada o medida (CAE) por la concentración sin efecto ecológico (PNEC): $Q = CAE/PNEC$. El valor PNEC se obtiene desde los bioensayos toxicológicos (CE_{50} , CL_{50} , NOEL, LOEL), cuyo valor resultante es dividido por un factor de seguridad. De acuerdo con la guía de orientación técnica sobre evaluación de riesgos de la Comisión Europea [98] el factor de seguridad es constante y se aplica según el nivel de incertidumbre que se tenga en la variable toxicológica con los siguientes valores establecidos: un factor de 10 para NOEL, 50 para LOEL y 1000 para CE_{50} y CL_{50} .

Cuando no se tienen datos experimentales de toxicidad en ninguna especie, éstos son calculados usando un programa proporcionado por la EPA [94] llamado relación estructura-actividad ecológica (ECOSAR, *Ecological Structure Activity Relationships*). ECOSAR es un programa con un sistema computarizado que estima la toxicidad aguda o crónica de

una sustancia química para organismos acuáticos como peces, invertebrados acuáticos y plantas acuáticas, así como también algunos organismos terrestres como la lombriz de tierra. ECOSAR utiliza la relación estructura-actividad con base en su similitud estructural con las sustancias para los cuales los estudios de toxicidad están disponibles.

Q normalmente se calcula considerando el “peor escenario” utilizando la concentración de efecto sobre los organismos o grupo de organismos más sensibles comparándolo con la CAE de mayor valor estimada o medida en el compartimiento ambiental. Los valores de Q pueden interpretarse con la siguiente jerarquización: si los valores de Q están por debajo de 0.01 no se espera ningún efecto adverso; si los valores se encuentran entre 0.01 y 0.09 el riesgo es bajo pero la posibilidad de efectos adversos debe ser considerada; si los valores se encuentran entre 0.1 y 1 algún efecto adverso o riesgo moderado es probable y si los valores de Q están por encima de 1 se prevé riesgo [99].

La última etapa en una evaluación del riesgo ambiental es el **manejo del riesgo**, que es el proceso de toma de decisiones que se basa en la información técnica resultante del análisis del riesgo como en información económica, social y política, para priorizar y definir las acciones necesarias para reducir ese riesgo. Este proceso incluye el diseño y la implementación de las políticas y estrategias que resulten de la toma de decisiones. La evaluación del riesgo es necesaria para manejarlo, pero no es suficiente para tomar decisiones. En el proceso del manejo del riesgo, los tomadores de decisiones tienen en cuenta aspectos como qué grado de exposición es seguro, los controles que deben realizarse, los sectores en los que se debe enfocar la atención y el control, cómo debe hacerse la negociación entre beneficios y costos y los riesgos/peligros que deben recibir mayor atención. Todos estos aspectos deben fundamentarse en la evaluación del riesgo, y complementarse con la percepción de éste, la capacidad para controlarlo, la legislación aplicable, la opinión del público y los costos [97].

Hasta el momento, solo tres estudios han realizado una caracterización de riesgo ambiental de las drogas de abuso en compartimientos acuáticos (ríos, agua de consumo humano y aguas residuales de EDARs) [28, 29, 58]. En dos de estos estudios el riesgo potencial para el ambiente y posible exposición en humanos de las drogas de abuso a través del consumo de agua potable fue investigado en Holanda [28] y España [29]. En ambas investigaciones la caracterización preliminar de riesgo en la salud humana concluyó que no se esperan efectos tóxicos a los niveles de concentración detectados en el agua de consumo humano.

Sin embargo, en la caracterización de riesgo ambiental en aguas de río en España [29] indicaron que morfina y EDDP algún efecto adverso o riesgo moderado es probable ya que se obtuvieron valores de Q entre 1 y 10. Los autores también advierten que para otras drogas evaluadas como cocaína, benzoilecgonina, 6-acetil morfina y metadona, para las cuales Q no indicó ningún efecto adverso, los resultados deben ser tomados con precaución, ya que los datos de exposición utilizados para el cálculo se basan en un evento de muestreo puntual, y a pesar de que representan la realidad del momento de muestreo no dan una imagen real de la exposición a largo plazo de los organismos presentes en los ecosistemas estudiados [29]. Por otro lado en un estudio en España, no encontraron riesgo ecotoxicológico de la benzoilecgonina a la concentración liberada por efluentes de EDARs al ambiente [58].

1.1.2. Fármacos hipnótico-sedantes

Los fármacos hipnótico-sedantes comprenden un gran número de medicamentos, entre ellos se encuentran las benzodiazepinas y los barbitúricos. Los hipnótico-sedantes son fármacos que tienden a deprimir el sistema nervioso central (SNC) y dado que estas acciones se pueden obtener con otras sustancias, como los opiáceos, la característica distintiva de los hipnótico-sedantes es su capacidad selectiva para lograr sus efectos

sin afectar el estado de ánimo o la reducción de la sensibilidad al dolor [17].

En la tabla 5 se muestra la estructura química, metabolitos, principales usos, vida media y rutas de eliminación de las benzodiazepinas y barbitúricos que son foco de estudio en esta tesis.

La primera benzodiazepina comercializada fue sintetizada en 1955 por los laboratorios Roche en Nutley, New Jersey, aunque sus propiedades farmacológicas y aplicaciones clínicas no fueron apreciadas hasta 1957. Actualmente, las benzodiazepinas tienen un grado variable de efecto sedante, hipnótico, amnésico, ansiolítico, anticonvulsivos y relajante muscular. Por lo tanto, estarían indicadas en el tratamiento de la ansiedad, depresión, insomnio, alteraciones músculo esqueléticas, convulsiones, síndrome de abstinencia al alcohol y como tratamiento coadyuvante en la anestesia [17].

Debido a la amplia disponibilidad de las benzodiazepinas, es la intoxicación medicamentosa más frecuente. Generalmente, se produce por la ingestión del fármaco con fines autolíticos, con frecuencia acompañado de alcohol etílico y otras sustancias. Es un fármaco que suele acompañar a las sobredosis de drogas de abuso y es utilizado por los adictos para disminuir los síntomas de los síndromes de abstinencia [17].

La estructura química básica de las benzodiazepinas (mostradas en la tabla 5) es la 1,4 benzodiazepina que es un anillo heterocíclico de siete átomos, cinco carbonos y dos nitrógenos, y que tiene un grupo carboxamida. El anillo heterocíclico está unido a dos anillos aromáticos con cuatro grupos fundamentales en los que se hacen sustituciones con grupos nitro o halógenados, sin pérdida de actividad farmacológica [17].

Tabla 5. Estructura química, usos y farmacocinética de hipnótico-sedantes [17, 23].

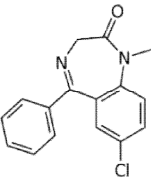
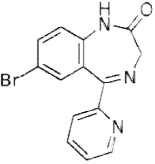
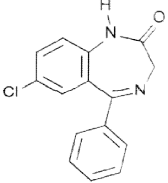
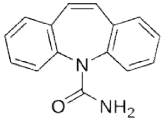
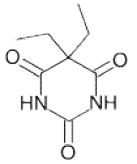
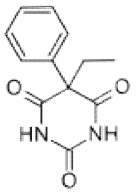
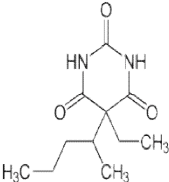
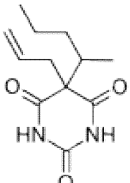
Nombre	Estructura química	Metabolitos	Uso principal	Vida media	Rutas de eliminación (excreción)
Diazepam		Nordiazepam Temazepam Oxazepam Desmetildiazepam	Espasmos musculares	20-100 horas	Renal (50-70%)
Bromazepam		3-hidroxi-bromazepam	Relajante del músculo esquelético	12-20 horas	Renal (3%)
Nordiazepam		Oxazepam conjugado	Ansiedad	36-200 horas	Renal
Carbamazepina		Carbamazepina-10,11-epóxido	Crisis epilépticas Trastorno bipolar	18-55 horas	Renal (2-3%)
Barbital		Alcoholes, cetonas y ácidos conjugados con glucurónido	Ansiedad Veterinaria		Renal
Fenobarbital		Alcoholes, cetonas y ácidos conjugados con glucurónido	Anticonvulsivo Epilepsia canina	53-118 horas	Renal Fecal (25%)

Tabla 5. Continuación.

Nombre	Estructura química	Metabolitos	Uso principal	Vida media	Rutas de eliminación (excreción)
Pentobarbital		Alcoholes, cetonas y ácidos conjugados con glucurónido	Anticonvulsivo Sedación preoperatoria Veterinaria	15-48 horas	Renal (50%)
Secobarbital		Alcoholes, cetonas y ácidos conjugados con glucurónido	Deprime la actividad cerebral	15-40 horas	Renal

Las benzodiazepinas ejercen su acción al actuar sobre el neurotransmisor principal del SNC llamado ácido γ -aminobutírico (GABA). En la figura 6 se representa el mecanismo y sitio de acción de los hipnótico-sedantes que incrementan la acción del GABA. La duración de la acción de las benzodiazepinas depende de la liposolubilidad de cada compuesto. Así, las más lipofílicas tienen una acción más corta, ya que tienden a distribuirse rápidamente entre la sangre y el cerebro, disminuyendo sus efectos sobre el SNC. Las benzodiazepinas y sus metabolitos activos se fijan a las proteínas plasmáticas en un porcentaje muy alto (85-99%) [100].

El metabolismo de las benzodiazepinas es hepático y se puede dividir en dos fases. La fase I es una vía oxidativa que da lugar a una hidroxilación o N-dealquilación por parte del sistema enzimático citocromo P 450, produciéndose durante esta primera fase una serie de metabolitos farmacológicamente activos. La fase II, consiste en una

conjugación de grupos hidroxilo y amino para formar compuestos inactivos que son excretados por la orina. El metabolismo hepático difiere entre las diferentes benzodiazepinas. Así, algunas como el diazepam, clordiacépoído, flurazepam, triazolam, midazolam y clonazepam tienen que pasar tanto por la fase I y II; y otras solo necesitan la fase II como el lorazepam, oxazepam y temazepam [17].

Otro hipnótico-sedante es la carbamazepina, que fue descubierta por el químico Walter Schindler de J.R. Geigy AG (en la actualidad parte de Novartis) en Basilea, Suiza, en 1953. Schindler logró sintetizar la droga en 1960 antes de que sus efectos antiepilépticos fuesen descubiertos. Estructuralmente se trata de un derivado iminostilbeno de estructura similar a la imipramina. No se conoce con exactitud su mecanismo de acción, aunque se sabe que bloquea los canales de sodio dependientes de potencial, interactuando con su forma inactivada, lo que explica que actúe de forma selectiva sobre aquellas neuronas que sufren descargas epilépticas, en las que se incrementa el número de estos canales inactivados [17].

La absorción de este tipo de medicamento es lenta y variable, pero se absorbe casi por completo en el tracto gastrointestinal. Tiene una alta unión a proteínas (entre el 55% y el 59% en niños y 76% en adultos), por lo que tiene múltiples interacciones medicamentosas. Se bio transforma de forma completa en el humano, a través del sistema del citocromo P450, produciendo metabolitos activos, mucho de los cuales presentan actividad antiepiléptica. El metabolito principal es el 10,11-epóido de carbamazepina, que representa el 50% de la concentración plasmática de la carbamazepina y posee actividad antiepiléptica y neurotóxica. Este metabolito se excreta luego por orina como glucurónido. Sólo el 3% de la droga precursora o del epóido se excretan inalterados por orina. La vida media de la carbamazepina se encuentra en el intervalo de 18-55 horas, pero con la administración repetida se reduce a 20 horas aproximadamente. El 10,11-epóido de carbamazepina presenta una vida media más corta (6-7 horas) [101].

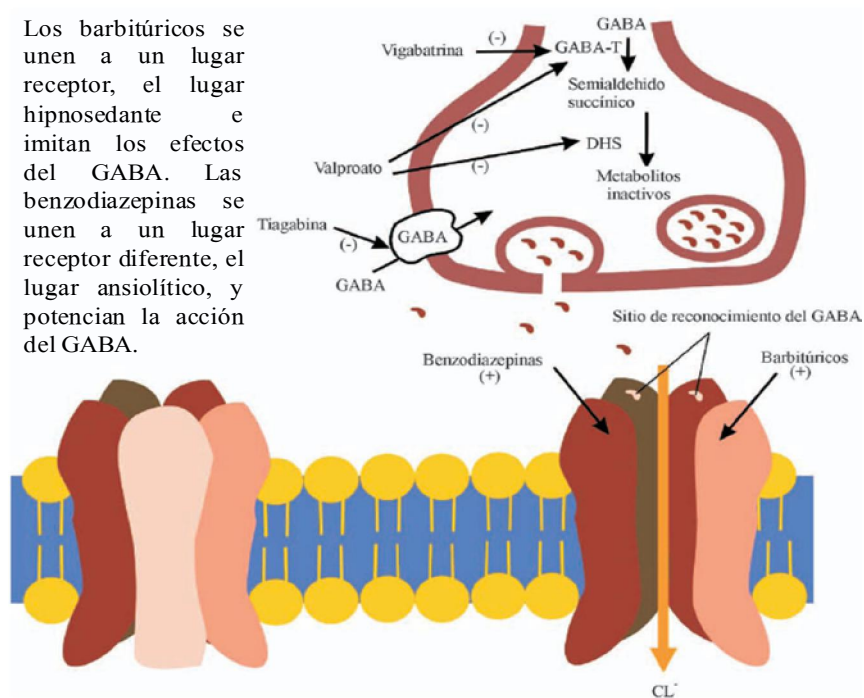


Figura 6. Representación esquemática del mecanismo y sitio de acción de los hipnótico-sedantes. **GABA-T** = GABA Transaminasa, **DHS** = Deshidrogenasa succínica [100].

Los barbitúricos son una familia de fármacos derivados del ácido barbitúrico que actúan como sedantes del SNC y producen un amplio esquema de efectos, desde sedación suave hasta anestesia total. También son efectivos como ansiolíticos, como hipnóticos y como anticonvulsivos. Los barbitúricos también tienen efectos analgésicos, sin embargo, estos efectos son algo débiles, impidiendo que los barbitúricos sean utilizados en cirugía en ausencia de otros analgésicos. Tienen un alto potencial de adicción, tanto física como psicológica. Los barbitúricos han sido parcialmente reemplazados por las benzodiazepinas en la práctica médica de rutina, por ejemplo, en el tratamiento de la ansiedad y el insomnio, principalmente porque las benzodiazepinas son mucho menos peligrosas

en sobredosis. Sin embargo, todavía se utilizan barbitúricos en la anestesia general, para la epilepsia y el suicidio asistido [17]. El ácido barbitúrico, es una 2,4,6-trioxohexahidropirimidina (estructura general de los barbitúricos, tabla 5). El compuesto carece de actividad depresora central, pero la presencia de grupos alquilo o arilo en la posición 5 le confiere actividades sedante-hipnóticas. El barbital es un derivado dietílico, que fue utilizado por primera vez como agente hipnótico sedante en 1903. Así, pues, todos los derivados del ácido barbitúrico tienen una importante acción depresora sobre los tejidos excitables, aumentando la acción inhibitoria postsináptica del GABA en las terminaciones nerviosas. Los barbitúricos actúan potenciando la acción del GABA a través de la unión a un sitio en el canal GABA receptor/cloruro, una propiedad que también comparte con las benzodiazepinas (figura 6), aunque los sitios de unión de los dos tipos de fármacos difieren y como resultado, la acción de los barbitúricos es menos específica, por eso el índice terapéutico es bajo [17].

Clásicamente, los barbitúricos se han agrupado según la duración de su acción. Los barbitúricos de acción ultracorta son muy liposolubles, distribuyéndose rápidamente por el SNC y posteriormente al resto de los tejidos. Administrados por vía parenteral, su efecto comienza inmediatamente y tiene una duración inferior a una hora, por lo que tienen un papel predominante en anestesia. Los barbitúricos de acción intermedia o corta, tienen una liposolubilidad intermedia y se usan como ansiolíticos y sedantes. Los de acción larga, son relativamente poco liposolubles y se usan principalmente como anticonvulsivos. La eliminación depende del grado de liposolubilidad. Los menos liposolubles como el fenobarbital son excretados por la orina sin grandes modificaciones, mientras que el resto sufre una degradación hepática que lo transforma en compuestos cada vez menos activos y más polares, que son finalmente eliminados por el riñón. Estos compuestos son alcoholes, cetonas y ácidos que aparecen en la orina como conjugados de glucurónido [17].

Respecto al consumo de hipnótico-sedantes, el informe anual de sustancias psicotrópicas del año 2014 de la JIFE [18] da a conocer que la

mayor manufactura de barbitúricos en el 2011 fue en China, Estados Unidos, Alemania, Rusia, Japón y Dinamarca (orden decreciente). Por ejemplo, la producción mundial total de secobarbital en el año 2013 fue de 841 kg, de los que Alemania representa más del 95% de la producción total mundial (835 kg). Los principales usuarios en el 2013 fueron (en orden decreciente) Reino Unido, Alemania y Suiza.

Para ese mismo año, el consumo de pentobarbital disminuyó con respecto a años anteriores, siendo los principales consumidores Estados Unidos, seguido del Reino Unido, Alemania, Canadá, Francia y Australia (en orden decreciente). Entre los barbitúricos, fenobarbital es el que más se comercializa cada año con una media de 140 países. La manufacturación global del fenobarbital fue de 1.5 billones de dosis diaria definida (DDD) en 2012, que fueron consumidos principalmente en Brasil, Estados Unidos, Japón, Etiopía, China, Filipinas e Italia (orden decreciente). Por otro lado, el consumo total calculado para el barbital incrementó considerablemente de 7.2 toneladas en el año 2012 a 59 toneladas en el 2013, con el mayor consumo en China (50 toneladas), Japón, Italia y Tailandia (orden decreciente) [18].

Referente a las benzodiazepinas, alprazolam y diazepam son las sustancias más manufacturadas y más consumidas en todas las regiones del mundo, como lo indica el informe de la JIFA. Según el informe, el consumo global calculado de diazepam en el 2012 fue de 4.6 billones de DDD. Los países que presentaron mayor uso fueron Brasil (734 millones DDD), Estados Unidos (648 millones DDD), Ghana (579 millones DDD), Congo (392 millones DDD) y el Reino Unido (387 millones DDD). Así mismo, el consumo global calculado de bromazepam fue de 1.2 billones de DDD en el año 2012, presentando los niveles más altos de consumo Francia (251 millones DDD), Brasil (153 millones S-DDD), Italia (85 millones DDD), Japón (74 millones DDD) y Pakistán (73 millones DDD). El informe también indica que el uso de nordiazepam es limitado a muy pocos países, principalmente Finlandia, Marruecos, Italia y Singapur (orden decreciente) [18].

Por otro lado, el informe sobre utilización de medicamentos de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) documenta el gran incremento en la utilización de fármacos ansiolíticos e hipnóticos que se ha producido en España entre 2000 y 2012. El informe explica que los fármacos ansiolíticos e hipnóticos han sido uno de los grupos farmacológicos más prescritos en la mayoría de países desarrollados. España estaría situada por encima de la media europea en consumo de estos fármacos. La prevalencia de uso de hipnótico-sedantes en España durante el año 2011 fue del 11.4% en población general. Según el informe de la AEMPS, la DDD por 1000 habitantes de ansiolíticos e hipnóticos ha pasado de 56.7 en el año 2000 a 89.3 en el año 2012 lo que significa un incremento en el consumo del 57.4%, con la mayor variación en los años 2008 y 2011 [102].

1.1.2.1 Presencia en el medioambiente

Como se ha indicado anteriormente, los hipnótico-sedantes son sustancias con un alto índice de consumo por la población mundial, por lo que es de esperar que estas sustancias se encuentren en el medioambiente. Como se muestra en la tabla 6 la presencia de los hipnótico-sedantes en el ambiente acuático ha sido foco de investigación en varios países del mundo (España, Alemania, Reino Unido, Grecia, USA). Su presencia y niveles de concentración varían ampliamente según el país o región, dependiendo de la tasa de producción, la dosis y la frecuencia de uso, el metabolismo, la eficacia de eliminación en las EDARs y la persistencia ambiental. Entre el grupo de los hipnótico-sedantes, carbamazepina y diazepam son las sustancias que más han sido investigadas en los diferentes compartimentos del medioambiente, posiblemente porque son las sustancias más consumidas como lo indica el informe anual de sustancias psicotrópicas del año 2014 de la JIFA [18].

Tabla 6. Concentración y frecuencia de detección, en paréntesis, de hipnótico-sedantes en aguas residuales de entrada y efluentes de EDAR y aguas de ríos.

Compuesto	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Diazepam	España	<LOD	<LOD	<LOD	[103, 104]
	España	5-16 (100%)	<LOQ-10 (50%)	<LOQ	[105]
	España	-	19 (100%)	LOQ-7 (100%)	[106]
	España	-	<LOD-63 (64%)	4 (39%)	[107]
	España	-	<LOD-9(50%)	<LOD -LOQ (8%)	[108]
	España	-	-	<LOD -3(8%)	[109]
	España	LOQ-10 (100%)	2-3 (100%)	<LOD	[110]
	España	-	-	3-138 (100%)	[29, 53, 59, 71]
	Alemania	-	127 (100%)	10 (100%)	[111]
	Alemania	<LOQ	<LOQ	<LOD 0.002 (10%)	[112]
	Alemania	<LOD	<LOD	-	[47, 113]
	Bélgica	<LOQ-1180 (100%)	<LOQ-660 (100%)	-	[114]
	Reino Unido	<LOD-8 (3%)	<LOD-7 (65%)	<LOD -1 (40%)	[56, 60]
	Eslovenia	21-25 (100%)	18-22 (100%)	<LOD-9(33%)	[115]
	Grecia	0.6-3 (100%)	3-5 (100%)	-	[48]
	Portugal	<LOD	<LOD	-	[116]
Serbia	-	<LOD	<LOD	[117, 118]	

Tabla 6. Continuación.

Compuesto	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Diazepam	Francia	-	<LOD	<LOD	[119]
	Italia	<LOQ	<LOQ	-	[44]
	Holanda	<LOD	2-5 (65%)	<LOD	[28, 120]
	USA	2-10 (100%)	<LOD-4 (85%)	-	[121]
	USA	<LOD 100 (10%)	10-20 (10%)	-	[122]
Nordiazepam	España	5-26 (100%)	15-25 (100%)	<LOD	[104, 110]
	Alemania	<LOD	<LOD	<LOD	[112]
	Alemania	<LOD	<LOD	-	[47]
	Francia	-	<LOD-8	<LOD-2	[119]
	Reino Unido	5-64 (100%)	14-16 (100%)	<LOD-7 (55%)	[56, 60]
	Grecia	0.6- (100%)	3-5 (100%)	-	[48]
	Holanda	<LOD	13-31 (65%)	<LOD	[28, 120]
	USA	2-10 (100%)	3-7 (100%)	-	[121]
Bromazepam	España	<LOD	<LOD	<LOD	[110]
	Alemania	<LOD	<LOD	<LOD	[112]
	Eslovenia	<LOD	<LOD-32 (20%)	<LOD	[115]
	Grecia	52-316 (100%)	34-87 (100%)	-	[48]
	Portugal	<LOD	<LOD	-	[116]
	Italia	<LOQ (100%)	<LOQ (100%)	-	[44]

Tabla 6. Continuación.

Compuesto	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Carbamazepina	España	37-277 (100%)	114-1900 (100%)	1-60 (100%)	[103, 105]
	España	-	2-366 (100%)	<LOD-98 (90%)	[63, 106- 108]
	España	-	-	<LOD-67715 (90%)	[65, 109, 123]
	Alemania	1000-2000 (100%)	13-1429 (100%)	81-265 (100%)	[47, 111, 112]
	Grecia	<LOQ-6822 (100%)	<LOD-2200 (94%)	-	[48, 124]
	Serbia	-	<LOD-303 (36%)	<LOQ-36(73%)	[117]
	Serbia	-	-	6-130 (90%)	[118]
	Reino Unido	-	-	<LOQ-794 (100%)	[125]
	Francia	-	157-295 (100%)	<LOD-56 (45%)	[119]
	Italia	81-288 (100%)	151-348 (100%)	-	[44]
	China	19-23 (100%)	13-22 (100%)	-	[126]
	Canadá	356-420 (100%)	251-261 (100%)	-	[127, 128]
	Jordania	700-3600 (100%)	400-1300 (100%)	-	[129]
	USA	160-570 (100%)	160-580 (100%)	-	[122]]
Korea	31-4 (100%)	2-18 (25%)	-	[130]	

Tabla 6. Continuación.

Compuesto	País	Concentración (ng/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Barbital	Holanda	n.d.	15 (13%)	7-12 (14%)	[120]
Fenobarbital	España	<LOD	<LOD	<LOD	[103, 106, 107]
	España	-	-	<LOQ (8%)	[109]
	Serbia	-	-	n.d.	[118]
	Alemania	-	-	800	[131]
	Alemania	<LOD	360 (50%)	-	[113]
	Grecia	<LOD	<LOD-127(20%)	-	[48]
	Holanda	98 (75%)	96 (100%)	7-27 (93%)	[120]
	USA	110 (100%)	<LOD	-	[132]
	USA	60-250 (50%)	70-330 (60%)	-	[122]
Pentobarbital	España	<LOD	<LOD	<LOD	[103, 106, 107]
	España	-	-	<LOQ (8%)	[109]
	Alemania	-	-	5400 (100%)	[131]
	Grecia	<LOD-35 (40%)	<LOD	-	[48]
	Holanda	<LOD	<LOD-13 (50%)	<LOD-4 (3%)	[120]
Secobarbital	Alemania	-	-	100 (100%)	[131]
	USA	<LOD	<LOD	-	[122, 132]

Ref. = referencia

LOD = límite de detección

LOQ = límite de cuantificación

- = no estudiada

Los diferentes estudios citados en la tabla 6 muestran que la carbamazepina es una sustancia frecuentemente detectada en las EDARs y que presenta las más altas concentraciones con respecto a los otros hipnótico-sedantes. El intervalo de concentración encontrado en las aguas de entrada es amplio, entre 19-6822 ng/L. China [126] y Korea [130] reportan los más bajos niveles de concentración, que no superan los 50 ng/L, mientras que Grecia [48], Alemania [47, 112] y Jordania [129] detectan las más altas concentraciones.

Como se puede observar en la tabla 6, la mayoría de estudios coinciden en que las concentraciones de carbamazepina encontradas en los efluentes son similares o incluso mayores que las encontradas en las aguas de entrada en las EDARs. Este hecho puede ser atribuido a la naturaleza hidrofílica de la carbamazepina ($\log K_{ow} < 3$), a su estabilidad química y a la conversión de los metabolitos conjugados a carbamazepina durante la depuración del agua [124].

En general, diazepam y nordiazepam han sido detectadas en aguas de entrada de EDARs a niveles similares de concentración entre LOQ - 100 ng/L (tabla 6), aunque en un estudio realizado en Bélgica [114] encontraron concentraciones elevadas de diazepam de hasta 1180 ng/L en aguas de entrada. Por otro lado, pocos estudios han investigado la presencia de bromazepam en el ambiente, y en la mayoría de estos estudios no ha sido detectada en las aguas residuales. Solo en Grecia detectaron esta sustancia en las aguas de entrada y en los efluentes de 5 EDARs a concentraciones máximas de 316 ng/L y 87 ng/L, respectivamente.

Los estudios de la presencia de barbitúricos en el medioambiente acuático son limitados, siendo fenobarbital el barbitúrico con mayores frecuencias de detección y niveles de concentración en aguas residuales (tabla 6). Por ejemplo, fenobarbital se encontró en EDARs de Holanda y Estados Unidos en un intervalo de concentración entre 60-330 ng/L tanto en aguas de entrada como en los efluentes. En otros países como Alemania

y Grecia no se detectaron fenobarbital en las aguas de entrada pero sí fueron detectados en los efluentes. Borova et al. [48] en su estudio, explican que este hecho ocurre por la formación de productos durante el metabolismo humano, y/o productos de transformación que están en las EDARs y que se pueden convertir de nuevo en los compuestos originales [48]. Pentobarbital y barbital fueron poco detectados y a bajos niveles de concentración, que no superan los 35 ng/L, y secobarbital no fue detectado en ninguno de los dos estudios llevados a cabo en Estados Unidos [122, 132]. Estos resultados concuerdan con el informe anual de sustancias sicotrópicas del año 2014 de la JIFA [18], en el que señalan el fenobarbital como el barbitúrico más consumido.

Según la información recopilada de los diferentes estudios, los hipnótico-sedantes no son totalmente eliminados de las aguas residuales por medio de los tratamientos convencionales realizados en las EDARs, existiendo además evidencias de que muchas de estas sustancias muestran concentraciones más altas en los efluentes que en las aguas de entrada. Este es el caso de la carbamazepina que es difícilmente degradada en las EDARs, y a este hecho adicionar la conversión de los glucurónidos de la carbamazepina y otros metabolitos conjugados al compuesto original por los procesos enzimáticos que ocurren en las EDARs [107, 133].

Varios estudios encontraron que la eficiencia en eliminar carbamazepina en diferentes EDARs aplicando en la mayoría tratamiento convencional con lodos activados fue por debajo del 30% [122, 134] y en la mayoría de casos fue menor del 10% [44, 47, 103, 105, 107, 124, 126]. Zhang et al. [124] cuando compararon varias publicaciones que aplican diferentes tiempos de retención hidráulica durante el tratamiento de depuración del agua, encontraron que la eliminación de la carbamazepina no se ve afectada por este parámetro. Sin embargo, recientemente un estudio en Korea [130] reveló alta eliminación de la carbamazepina (85%) durante la etapa de coagulación-floculación seguido de filtración con arena. Los autores argumentan que la alta eliminación puede ser por la turbidez de la muestra indicando que a mayor turbidez del agua, mayor

adsorción de esta sustancia en los sólidos suspendidos.

Otro estudio en Grecia [135], donde fueron evaluadas ocho EDARs que aplican tratamiento con lodos activados en todas pero con diferentes tiempos de retención hidráulico y de lodos, encontraron un amplio intervalo de eliminación entre valores negativos (-30%) hasta 80%. Algunos tratamientos avanzados como nanofiltración y biorreactores de membranas no fueron completamente efectivos en eliminar la carbamazepina del agua residual [136]. Al contrario, otros tipos de tratamientos avanzados como adsorción con carbón activo, ozonización y procesos de oxidación avanzada, han mostrado alta efectividad para eliminar la carbamazepina de las aguas residuales [136]. El carbón activo ha sido considerado como un adsorbente efectivo para tratar compuestos orgánicos persistentes/no-biodegradables como la carbamazepina, la cual ha mostrado eliminación entre 75-100%. La ozonización por su parte, también ha logrado resultados muy prometedores en la degradación de la carbamazepina (eliminación > 90%), gracias a la capacidad oxidante del ozono o de los radicales hidroxilos generados por la descomposición del ozono en medio alcalino. La generación de $\bullet\text{OH}$ puede ser promovida con la presencia de H_2O_2 , reactivo de Fenton y UV [136].

Concerniente al diazepam, nordiazepam y bromazepam, la mayoría de estudios coinciden que la tasa de eliminación es muy baja (< 10%) en las EDARs aplicando tratamientos secundarios [28, 48, 56, 104, 110, 120]. Las benzodiazepinas son normalmente compuestos halogenados, y esto sugiere que la presencia de un halógeno en su estructura química reduce significativamente su susceptibilidad a la biodegradación [115]. Por ejemplo, diazepam ha mostrado ligeramente mayor eliminación aplicando tratamiento con lodos anaeróbicos que aplicando el tratamiento biológico convencional, indicando que la eliminación se favorece por la adsorción al lodo activado y no por degradación [115]. Kosjek et al. [115] evaluaron la eliminación de diazepam, bromazepam y oxazepam durante tratamientos biológicos y fotoquímicos en una EDAR piloto. El tratamiento biológico consistió en biorreactores óxicos y anóxicos mientras que el tratamiento

fotoquímico consistió en fotólisis con UV y adición de H_2O_2 . Los autores obtuvieron eliminación completa de estas sustancias con el acoplamiento de estos dos tratamientos seguido de un tratamiento con carbón activado.

Recientemente ha aumentado el interés por la aplicación de tratamientos basados en la transformación de enzimas catalizadas. Para este propósito, las lacasas resultan muy útiles debido a su amplio rango de sustratos y que solo necesitan oxígeno molecular como co-sustrato. Las lacasas son enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul. Catalizan la oxidación de un sustrato orgánico o inorgánico y la reducción de oxígeno molecular a agua, por medio de un mecanismo de transferencia de un electrón, como se representa en la figura 7.

Para asegurar la estabilidad de las enzimas y permitir la retención y re-uso, la inmovilización o insolubilización de los biocatalizadores parecen ser los prerequisites para aplicaciones continuas en el tratamiento de las aguas residuales [137].

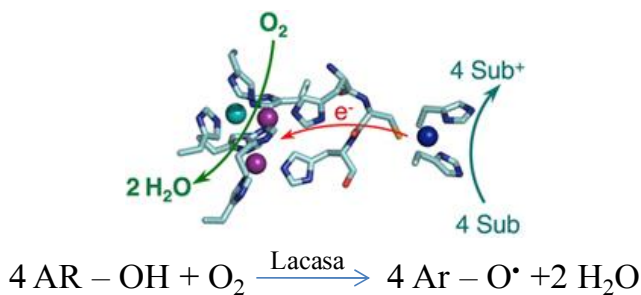


Figura 7. Oxidasa de cobre azul [138].

La eliminación de diazepam y nordiazepam por medio de varios sistemas mediadores con lacasas ha sido evaluada en algunos estudios, y

aunque estas benzodiazepinas no son completamente eliminadas, mostraron una mejora (45% de eliminación) comparada con los tratamientos secundarios convencionales (eliminación < 10%) [137].

Como se puede observar en la tabla 6, los barbitúricos presentaron incremento de la concentración en todos los efluentes que han sido investigados en los diferentes países, lo que indica que no son eliminados con los tratamiento secundarios convencionales aplicados en estas EDARs; incluso en un estudio que evaluó la presencia de fenobarbital en 4 EDARs de Estados Unidos [122], dos de ellas aplicando tratamiento terciario con UV, tampoco esta sustancia fue eliminada de las aguas residuales. Este aumento de la concentración de estas sustancias en los efluentes es atribuido a varios factores: no tener en cuenta el tiempo de retención hidráulico en la toma de muestras del agua de entrada para que coincida con la toma de muestra del efluente y conversión de los metabolitos glucurónidos y otros metabolitos conjugados al compuesto original por los procesos enzimáticos que se pueden generar durante el tratamiento [122]. Sin embargo, la completa eliminación de fenobarbital fue lograda solo en una EDAR también en Estados Unidos [132]. Tratamientos alternativos a los convencionales con lodos activados también han sido evaluados para los barbitúricos. Por ejemplo, un leve incremento en eliminación de pentobarbital y fenobarbital fue demostrado por Verlicchi et al. [134] cuando evaluaron la eficacia en eliminación con humedales subsuperficiales de flujo horizontal, encontrando eliminaciones entre 45-60%.

Referente a la presencia de los hipnótico-sedantes en ríos, la mayoría de estudios fueron realizados en España y al igual que en las aguas residuales, la carbamazepina y el diazepam fueron los hipnótico-sedantes siempre detectados en un amplio intervalo de concentración que varía desde los pocos ng/L hasta los cientos de ng/L (tabla 6). En general, para el resto de hipnótico-sedantes nombrados en la tabla 6 la frecuencia de detección y la concentración es baja o no fueron detectados en los ríos investigados de los diferentes países. Sin embargo, en algunos estudios

fueron encontradas concentraciones elevadas, como es el caso de la carbamazepina en aguas de río en España (67715 ng/L) [65], pentobarbital (5400 ng/L) y fenobarbital en Alemania (800 ng/L) [131]. Por otro lado, bromazepam no fue detectado en ninguno de los tres estudios mencionados en la tabla 6.

La presencia de los hipnótico-sedantes en las aguas de río son la vía principal hacia el agua de consumo humano, y algunos factores determinantes para ser encontrados en el agua potable son la concentración del hipnótico-sedante en las fuentes de agua receptoras que dependen de la dilución, la atenuación natural y el tipo de tratamiento de agua residual aplicado. La presencia de hipnótico-sedantes en agua potable ha sido foco de estudio en varios países como España [29, 59, 69, 105], Alemania [112], Francia [119], Holanda [28, 120], Serbia [117], Irán [139], Canadá y Reino Unido [105], en los cuales sustancias como carbamazepina [105, 112, 117, 119], diazepam [59, 105], fenobarbital, pentobarbital y barbital [120] han sido determinadas después del tratamiento de potabilización a niveles de hasta 43 ng/L.

En las EDARs, la eliminación de los contaminantes del agua residual en gran parte sucede por la adsorción de éstos a los fangos. Aunque la presencia de los hipnótico-sedantes en fangos de depuradora ha sido menos estudiada en comparación con otras matrices ambientales, algunas de estas sustancias han sido detectadas en diferentes países a niveles que alcanzan los cientos de ng/g. De acuerdo con la bibliografía consultada, de los hipnótico-sedantes que son foco de investigación en esta tesis solo carbamazepina, diazepam y nordiazepam han sido estudiadas en fangos de depuradora en diferentes países como se muestra en la tabla 7. Aunque Fago-Ferrero et al. [140], investigaron recientemente la presencia de bromazepam, pentobarbital y fenobarbital en fangos de 5 EDARs en Grecia, y ninguna de estas sustancias fueron detectadas.

Tabla 7. Intervalo de concentración y frecuencia de detección, en paréntesis, de hipnótico-sedantes en fangos.

País	Intervalo de concentración (ng/g)			Ref.
	Carbamazepina	Diazepam	Nordiazepam	
España	10-11 (100%)	<LOD	-	[141]
	20-45 (100%)	9 (88%)	-	[142]
	10-12 (100%)	3-9 (100%)	-	[143]
	1-7 (100%)	3-5 (100%)	-	[144]
	-	0.6-3 (73%)	-	[73]
Francia	<LOQ-50 (85%)	23 (9%)	-	[145]
Grecia	18-113 (100%)	<LOD	<LOD	[140]
Escocia	62-86 (100%)	-	-	[74]
Irlanda	120 (100%)	-	-	[146]
Canadá	2-330 (100%)	-	-	[147]
	258 (100%)	-	-	[127]
	15 (100%)	-	-	[128]
USA	29-191 (100%)	<LOD -2 (25%)	<LOD -3 (50%)	[121]
Korea	LOQ-103 (100%)	2-5 (15%)	1-9 (45%)	[148]
República Checa*	LOQ (100%)	<LOD	-	[76]
Reino Unido*	n.d	<LOD	-	[77]

Ref. = referencia

LOD = límite de detección

LOQ = límite de cuantificación

- = no estudiada

* estudios realizados en partículas en suspensión.

Como se puede observar en la tabla 7, la carbamazepina es el hipnótico-sedante siempre detectado y con las más altas concentraciones encontradas en los fangos de hasta 330 ng/g (d.w.), donde estos niveles altos corresponden a EDARs en Canadá y Estados Unidos. En general, diazepam y nordiazepam presentan bajas frecuencias de detección y bajos niveles de concentración en un intervalo entre 0.6-23 ng/L (d.w.). Algunos estudios han demostrado que la adsorción de los hipnótico-sedantes a las partículas en suspensión es baja (<11%) [76, 77, 121], explicando este hecho los niveles bajos de concentración encontrados en los diferentes estudios.

Debido a que los fangos son una importante fuente de introducción de contaminantes tanto en el medioambiente como en la cadena alimenticia, enfoques alternativos para la eliminación de los contaminantes de los fangos ha sido materia de gran interés en los últimos años. La bioaumentación (adición de microorganismos) ha aparecido como una técnica de limpieza ventajosa para mejorar la degradación de algunos contaminantes. La bioaumentación emplea hongos de la podredumbre blanca que comprenden un grupo de organismos capaces de degradar una amplia gama de contaminantes por medio de sus enzimas ligninolíticas extracelulares y complejos enzimáticos intracelulares. En este contexto, Rodríguez-Rodríguez et al. [141] investigaron el proceso de bioremediación utilizando *trametes vesicolor* como agente de bioaumentación para la eliminación de carbamazepina y otros fármacos del fango. Aunque los autores demostraron que el tratamiento biológico con hongos mostró ser efectivo para varios fármacos, la carbamazepina no mostró degradación significativa.

1.1.2.2 Evaluación del riesgo ambiental

Como se mencionó en el apartado de la evaluación de riesgo ambiental para las drogas de abuso, los bioensayos de toxicidad permiten evaluar los efectos de una sustancia sobre la biota. En estos bioensayos se determinan distintas variables como la toxicidad aguda cuyo valor calculado se denomina concentración letal (CL_{50}) y la toxicidad crónica cuyo valor calculado se denomina concentración efectiva (CE_{50}) [68]. Para la mayoría de hipnótico-sedantes ni su toxicidad ni el riesgo ambiental han sido estudiados extensamente.

Sin embargo, varios estudios han demostrado que la exposición de los organismos acuáticos a hipnótico-sedantes como diazepam y carbamazepina (los dos compuestos más estudiados) afecta la reproducción, las funciones endocrinas o la fotosíntesis [68, 121, 148, 149]. En el caso de las benzodiazepinas, éstas actúan sobre una variedad

de sistemas endocrinos que incluye el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, y también puede afectar a la secreción de prolactina y la hormona del crecimiento [149].

Diferentes estudios mencionados en la reciente publicación de Lorenzi et al. [149], han evidenciado que el diazepam puede unirse a los receptores de GABA también en los cerebros de peces y puede afectar a las respuestas de comportamiento. Por ejemplo, en el pez cebra, la exposición de diazepam puede tener efectos ansiolíticos, como también han observado una reducción en el comportamiento grupal en peces *medaka* por la exposición a diazepam en concentraciones de 15 mg/L de peso corporal, lo que sugiere que diazepam disminuye la ansiedad de aislamiento. En el pez cebra, 0.05 mg/L de diazepam suprimió la preferencia típica por el borde del estanque, y una concentración de 2.5 mM disminuyó el comportamiento típico de evadir lo oscuro durante la prueba de preferencia de luz/oscuridad, lo que muestra un efecto ansiolítico de la droga. En peces *Holbrooki Gambusia*, los machos expuestos a 7.36 mg/L de diazepam mostraron pigmentación oscura y un comportamiento anormal como letargo y nadar cerca de la superficie. Del mismo modo, la exposición de 235 ng/L de diazepam durante 14 días a embriones de pez cebra alteró el comportamiento de natación y la expresión de genes implicados en los ritmos circadianos. Por otro lado, los receptores GABA también están implicados en la modulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, por lo que el diazepam también podría tener efectos significativos en la reproducción de organismos acuáticos [149].

Los efectos de la exposición de diferentes organismos a la carbamazepina también han sido evaluados en varios estudios, los cuales son mencionados en la publicación de Chen et al. [150], en los que se destaca que esta sustancia afecta múltiples rutas oxidativas y bioquímicas en mejillones a concentraciones relevantes en el ambiente como: influenciar en los sistemas de la enzima antioxidante cAMP y la proteína de resistencia mitoxantrona en los mejillones, reprimir los niveles de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) y superóxido dismutasa de mRNA

en las branquias y metalotionina y P-glicoproteína en la glándula digestiva de mejillones cebra (*Dreissena polymorpha*). También la exposición de carbamazepina a concentraciones entre 0.01-100 µg/L en células in vitro del mejillón *M. galloprovincialis* resultó ser citotóxico e incrementó en las células aniones superóxidos y óxido nítrico. En el estudio de Chen et al. [150], los autores evaluaron la exposición crónica de carbamazepina en almejas de agua dulce (*Corbicula fluminea*) y sus resultados confirmaron que a concentraciones medioambientales esta sustancia puede ejercer un efecto negativo en los tejidos de las almejas a nivel molecular y de proteínas.

Son escasos los estudios sobre los efectos ecotoxicológicos de los hipnótico-sedantes en los organismos terrestres, a pesar del papel fundamental en los ecosistemas terrestres y la naturaleza recalcitrante reconocida de estas sustancias en el suelo. En este aspecto, Oliveira et al. [151] evaluaron los efectos a corto plazo de una especie de colémbolo (*Folsomia candida*), expuesta a carbamazepina utilizando como criterios de valoración la conducta de evitación, el daño peroxidativo (peroxidación lipídica), las colinesterasas (sistema nervioso colinérgico) y glutación S-transferasa (biotransformación y la defensa antioxidante). Los autores encontraron que después de 96 horas de exposición con 4 y 40 mg/kg de carbamazepina, *Folsomia candida* mostró conducta de evitación y daños peroxidativos, así mismo, a una concentración de 40 mg/kg los autores observaron inhibición de glutación S-transferasa.

En general la caracterización del riesgo ambiental para los hipnótico-sedantes en los efluentes de las EDARs y aguas de ríos se ha llevado a cabo calculando los coeficientes de riesgo (Q) en tres organismos acuáticos que son peces, daphnia y algas. La mayoría de estudios están centrados en evaluar el riesgo que posee la carbamazepina y el diazepam, seguramente porque existen más datos toxicológicos para estas sustancias, son las más consumidas y en consecuencia con más frecuencias de detección en el ambiente. Los valores de Q mostraron variaciones entre los diferentes estudios que lo han evaluado debido a las variaciones en las

concentraciones que existen entre las EDARs que están influenciadas principalmente por el uso regional de los hipnótico-sedantes y la eficiencia en eliminar estas sustancias durante el tratamiento en las EDARs. Otro punto a destacar es que los valores de Q fueron más altos en los efluentes que en las aguas de río porque estas sustancias son diluidas al entrar en el cauce fluvial [107].

De acuerdo con el criterio de riesgo explicado en el apartado de la evaluación de riesgo para las drogas de abuso, la carbamazepina presentó un bajo riesgo para los peces a los niveles de concentración en los efluentes de EDARs en Grecia [135] y España [109]. Los valores de Q calculados en el estudio realizado con los efluentes en Grecia mostraron no poseer riesgo de la carbamazepina sobre daphnia y algas, pero si una baja probabilidad de que exista riesgo en el estudio realizado en España [152]. En el estudio realizado por Santos et al. [153], la carbamazepina presenta un riesgo medio para los organismos acuáticos medido en efluentes de EDARs en España.

Por otro lado, el diazepam presente en efluentes de EDARs investigadas en España [107] mostraron no poseer riesgo para ninguno de los tres organismos acuáticos, mientras que Verlicchi et al. [152] obtuvieron un máximo de coeficiente de riesgo de 6, el cual fue calculado a partir de concentraciones de efluentes de EDARs recopilados en 78 publicaciones, lo que sugiere una alta probabilidad de riesgo del diazepam a los organismos acuáticos. Así mismo, la presencia de diazepam en aguas de ríos de España presentó un riesgo medio a los organismos acuáticos [29], mientras que en ríos de Holanda el coeficiente de riesgo no pudo ser calculado porque esta sustancia no fue detectada en los ríos evaluados [28].

1.1.3. Edulcorantes de alta intensidad

El consumo abusivo de los hidratos de carbono, principalmente los refinados, ha sido relacionado con enfermedades de hipernutrición como la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Todo esto ha contribuido a la búsqueda y desarrollo de nuevas sustancias con la capacidad de conferir sabor dulce a los alimentos y que, a diferencia de los usados tradicionalmente, no supongan un aporte calórico, o que lo tengan restringido, para ser empleados con fines dietéticos en la elaboración de productos alimenticios de bajo aporte calórico para obesos, diabéticos o no cariogénicos. Los edulcorantes son definidos como todos aquellos aditivos utilizados para dar sabor dulce a los productos alimenticios y/o que son utilizados por sus propiedades edulcorantes [154].

La sacarosa constituye el edulcorante clásico natural por antonomasia de los alimentos, y al ser metabolizada aporta 4 kcal/g. En los últimos años ha aumentado el conocimiento de la fisiología y bases moleculares de los receptores del sabor dulce, lo que ha permitido el desarrollo de múltiples sustancias sintéticas con un poder edulcorante muy superior al de la sacarosa. La química orgánica de síntesis ha permitido, de acuerdo a modificaciones moleculares de sustancias con efecto edulcorante, el diseño de otras nuevas en las que se ha producido un aumento considerable en varios cientos o millares de veces el poder edulcorante, con la simple eliminación o inserción de un grupo en la estructura de la misma. Este diseño no ha estado exento de controversia, principalmente desde el punto de vista toxicológico [154].

De todos los sabores básicos, el sabor dulce es el de mayor complejidad, ya que cambios pequeños en las moléculas pueden originar modificaciones muy dispares en el sabor [154].

La percepción del dulce empieza en la lengua y el paladar suave donde los receptores del gusto interactúan con los alimentos o bebidas. Cuando los diferentes sabores entran en contacto con el receptor localizado en la

superficie de las células del sabor (TRCs), se activan neuronas sensoriales locales que se proyectan a las áreas del cerebro que procesan e interpretan la información sensorial. Estas células que contienen el receptor para el sabor dulce están organizadas dentro de las papilas que se encuentran en la lengua. La detección del sabor dulce se lleva a cabo por los receptores del sabor (TR, *taste receptor*). Los edulcorantes naturales y artificiales activan de manera diferente los receptores del sabor [155].

En la figura 8 se ilustra el mecanismo de transducción de señales activas por edulcorantes, el cual ocurre cuando una molécula de señalización extracelular activa un receptor de superficie de la célula. A su vez, este receptor altera moléculas intracelulares creando una respuesta. Durante este proceso una molécula de señalización activa un receptor específico en la membrana celular y luego un segundo mensajero transmite la señal hacia la célula, provocando una respuesta fisiológica [156].

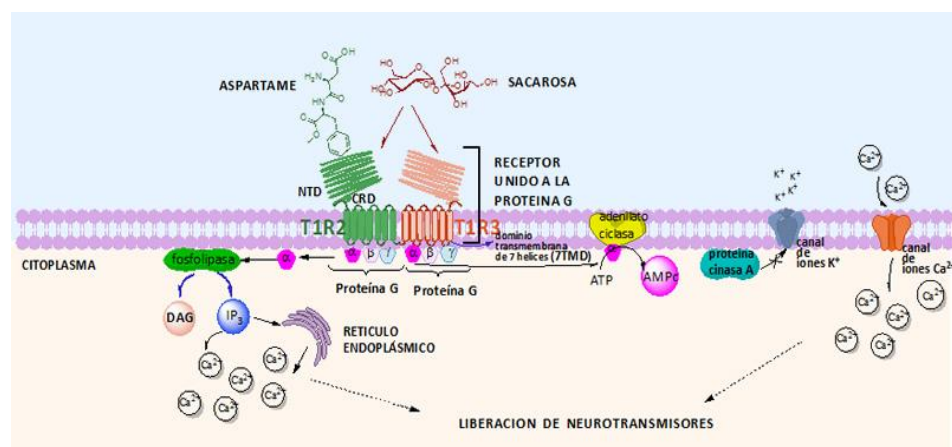


Figura 8. Mecanismo de transducción de señales activas por edulcorantes [156].

Existen dos grandes grupos de edulcorantes: nutritivos y no nutritivos o de alta intensidad (figura 9). Los edulcorantes nutritivos son generalmente carbohidratos que proporcionan energía (calorías) y que tienen su origen en alguna planta o fruto. Por otro lado, los edulcorantes de alta intensidad son sustancias sápidas sintéticas o naturales, que sin tener cualidades nutritivas, poseen un poder edulcorante superior al de la caña de azúcar, remolacha o cualquier hidrato de carbono al que tratan de sustituir. A su vez se entiende por poder edulcorante los gramos de sacarosa que hay que disolver en agua para obtener un líquido con igual sabor que la disolución de 1 gramo de edulcorante en el mismo volumen [154].

Los edulcorantes de alta intensidad tienen diferentes estructuras químicas y por eso diversas propiedades. Entre sus principales características se pueden destacar intensidad alta de dulzor entre 30 y 300 veces más dulce que la sacarosa, aporte de calorías insignificante o nulo, ausencia de otras funciones tecnológicas (no caramelizan, no confieren textura, no son higroscópicos), apropiados para diabéticos y no provocan caries [157]. En la tabla 8 se presenta la estructura química, la ingesta diaria admisible (IDA) y el poder edulcorante según la escala que usa de referencia la dulzura de la sacarosa de 1, para los edulcorantes de alta intensidad.

La sacarina fue el primer edulcorante artificial que se descubrió hace ahora más de 120 años. Es 300 - 600 veces más dulce que el azúcar, pero tiene un sabor final metálico ligeramente desagradable. Tiene un índice glucémico cero, no contiene calorías y es apto para diabéticos. No tolera altas temperaturas por lo que no es apto para cocinar. En al menos 90 países la sacarina continua siendo usada en formulaciones de comida y bebidas. Se mezcla muy bien con otros edulcorantes, o incluso con una pequeña cantidad de azúcar como en algunas bebidas “cero” [153, 157, 158].

Edulcorantes	No nutritivos (alta intensidad)	Artificiales sintéticos	Acesulfamo Alitamo Aspartamo Ciclamato	Neotamo Sacarina Sucralosa	
		Semisintéticos	Neohesperidina dihidrochalcona		
		Naturales	Glicirizina Stevia Taumatina		
	Nutritivos	Calóricos	Sacarosa Melaza Miel y jarabe de arce		
			Derivados del almidón	Glucosa Fructosa	
		Baja calorías	Alcoholes de azúcar	Monosacáridos	Eritritol Manitol Sorbitol Xilitol
				Disacáridos	Isomalt Lactitol Maltitol
		Hidrolizado de almidón hidrogenado			
	Tagatosa				

Figura 9. Clasificación de los edulcorantes [157].

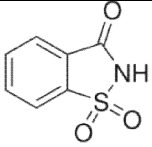
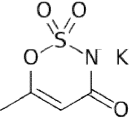
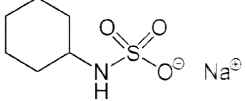
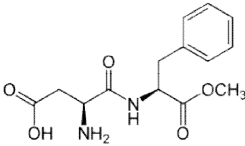
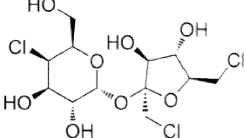
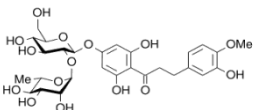
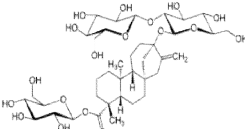
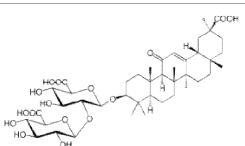
El ciclamato es el segundo edulcorante artificial más antiguo en uso hoy en día. Es el menos potente de este grupo, sólo 40 veces más dulce que el azúcar. Por esta razón, a menudo se mezcla con otros edulcorantes como sacarina. El ciclamato puede ser metabolizado en un 60% a

ciclohexilamina. Es estable al calor y tiene una larga vida de almacenamiento por lo que es adecuado para la cocina y para la industria alimentaria. El ciclamato posee un índice glucémico cero y no aporta calorías. Su uso está autorizado en Europa y en otros 50 países, pero está prohibido en los Estados Unidos desde 1969 por una supuesta asociación con el desarrollo de tumores de vejiga en modelos animales y no ha vuelto a revisarse desde entonces [153].

La sucralosa es una forma modificada de azúcar común (sacarosa) sin calorías y 600 veces más dulce que el azúcar. Es sintetizada a partir de azúcar común a través de un proceso de fabricación patentado de múltiples etapas que sustituye selectivamente tres grupos hidroxilo de la molécula de azúcar por tres átomos de cloro. Tiene un sabor que difiere considerablemente del azúcar común y no se descompone con el calor. La sucralosa resiste la hidrólisis en el tracto digestivo de los humanos, siendo excretada sin cambio en las heces, y una pequeña proporción absorbida es eliminada rápidamente por la orina después de sufrir conjugación glucurónica. Es muy utilizada a nivel mundial, sola o con otros edulcorantes, y se puede encontrar en más de 4.500 alimentos y bebidas [153].

Acesulfamo-K es otro compuesto proteico 150-200 veces más dulce que la sacarosa. No se metaboliza y se elimina sin modificaciones. Frecuentemente, se utiliza en bebidas refrescantes, néctares de fruta, edulcorantes de mesa, productos lácteos, productos hechos al horno, pasta de dientes y productos farmacéuticos. Existe una combinación de aspartamo y acesulfamo cuya composición es de un 64%-36%, respectivamente. Ésta se denomina bajo el código E-962, mantiene un valor nutritivo no apreciable y su poder edulcorante respecto a la sacarosa es de 350 [157].

Tabla 8. Estructura química, poder edulcorante (relativo a la sacarosa =1) e IDA de los edulcorantes de alta intensidad [157].

Nombre	Estructura química	Poder edulcorante	IDA (mg/kg peso/día)	
			JECFA	SCF
Sacarina (E-954)		300 - 600	5	5
Acesulfamo-k		150-200	15	9
Ciclamato (E-952)		30-40	11	7
Aspartamo (E-951)		160-220	40	40
Sucralosa (E-955)		400 - 800	15	15
Neohesperidina Dihidrocalcona (E-959)		1000-2000	No evaluado	5
Stevia (glucósido de steviol) (960)		250-300	4	4
Glicirrizina (958)		50-100	No evaluado	100

JECFA= Comité de expertos en aditivos alimentarios

SCF = Comité científico de la Unión Europea sobre la alimentación

El aspartamo es casi 200 veces más dulce que el azúcar. Es una proteína y contiene 4 calorías por gramo. Sin embargo, es tan dulce que sólo se necesita una pequeña cantidad, y por consiguiente sin valor calórico significativo. El aspartamo es sintetizado a partir de dos aminoácidos, L-ácido aspártico y L-fenilalanina. Es metabolizado en el intestino delgado por enterasas y peptidasas que lo hidrolizan a una molécula de ácido aspártico, una molécula de fenilalanina y una molécula de metanol. Sigue siendo uno de los edulcorantes intensos más utilizados y más conocidos, gracias en su mayor parte a su fuerte posicionamiento en los Estados Unidos, su principal productor, que consume el 60% de la demanda global de esta sustancia. Se descompone con el calor y, por lo tanto, no es adecuado para cocinar. Ha desbancado casi por completo a la sacarina como edulcorante más utilizado en las bebidas “cero”. Existen grandes controversias sobre su seguridad aunque los informes de las agencias afirman que su consumo es seguro [157].

La neoespiridina dihidrocalcona (NHDC) es un edulcorante semi-sintético que se obtiene por modificación química de dos flavonoides presentes en la naranja amarga (neoespiridina o naringin). Su potencia edulcorante es entre 1000 y 2000 veces mayor que la sacarosa y tiene un sabor dulce más persistente, con regusto a regaliz. NHDC tiene la capacidad de disminuir la percepción de amargura, salinidad y atributo picante. La intensidad del dulzor depende de factores como concentración, pH y del producto al que va ser adicionado. Una pequeña proporción del compuesto es absorbida sin cambio en el intestino pequeño. Después de la ruptura del lado de la cadena del glicósido por la mucosa intestinal o por las bacterias glicosiladas, una parte de los metabolitos residuales primarios son excretados sin cambio en la bilis y otra parte son metabolizados. NHDC no está aprobada por FDA pero sí está permitida en Europa [157].

Probablemente, uno de los edulcorantes que más ha suscitado interés en foros científicos y divulgativos en los últimos años es la stevia. Ésta se emplea como sustituto del azúcar y presenta un sabor más lento al comienzo y una duración más prolongada, aunque algunos de sus

extractos pueden tener un sabor amargo similar al regaliz en altas concentraciones. Aunque la palabra stevia se refiere a toda la planta, sólo algunos de los componentes de la hoja de stevia son dulces. Estos componentes dulces se conocen como glucósidos de esteviol (alcohol que puede encontrarse en estado natural en la planta). Además, el término stevia usualmente hace referencia a una preparación cruda (ya sea en polvo o líquida) hecha a base de las hojas de la planta y estas preparaciones contienen una mezcla de varios componentes, no sólo los que dan a la hoja el sabor dulce.

Los glucósidos de esteviol son los componentes dulces de la hoja de stevia y existen varios tipos, si bien los más abundantes son la steviosida y el rebaudiósido A. La steviosida es el glucósido de esteviol más abundante en la hoja de stevia, y ha sido estudiada ampliamente. Por su parte el rebaudiósido A es el glucósido de esteviol de mejor sabor, y se metaboliza de la misma forma que una esteviosida. Dichos edulcorantes son hasta 480 veces más dulces que el azúcar. Sus hojas tienen un dulzor natural 15-30 veces mayor al del azúcar. Se trata de un producto natural, con un índice glucémico cero, y, por tanto, adecuado para los pacientes diabéticos. Es estable al calor y adecuado para cocinar así como para su uso en alimentos procesados. Su regularización en el mercado americano a partir de 2008 con el reconocimiento GRAS (reconocido como seguro) ha resultado compleja [158]. Este edulcorante también fue autorizado en el mismo año por el órgano regulador de la seguridad alimentaria de Australia y Nueva Zelanda (FSANZ) y por las autoridades suizas, mientras que la agencia francesa de seguridad alimentaria (AFSAA) lo hacía un año más tarde, en septiembre de 2009, después de que el país consiguiese permiso para utilizarlo dos años antes de la autorización prevista en toda la UE. Los edulcorantes de la stevia no consiguieron la autorización de la Comisión Europea para usos en alimentos y bebidas hasta noviembre de 2011 [159].

La planta nativa contiene proteínas, fibra, hierro, fósforo, calcio, potasio, zinc, vitamina A y sus derivados frecuentemente aportan unas cantidades variables de los compuestos activos lo cual supone una

limitación importante para su uso. Se han realizado diversos estudios buscando efectos sobre peso, apetito o flora intestinal con resultados no totalmente concluyentes por lo que se precisan más estudios en el futuro para tener una opinión clara al respecto. La IDA recomendada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) para la stevia, o glucósidos de esteviol, es coherente con el nivel adoptado en el pasado por el Comité conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la OAA/OMS (JECFA, Joint FAO/WHO Expert committee on Food Additives) [158].

La glicirrizina es un glicósido triterpenoide con ácido glicirretínico y es extraído de la raíz de la planta *Glycyrrhiza glabra L.* Es 50-100 veces más dulce que la sacarosa y el sabor al inicio es dulzura seguido por un regusto-regaliz persistente. La glicirrizina incrementa el sabor de la comida, enmascara el sabor amargo e incrementa el nivel de dulzura de la sacarosa. También tiene el potencial para proporcionar características funcionales, incluyendo la formación de espuma, control de viscosidad, formación de gel, y las características posiblemente antioxidantes. Glicirrizina es usado en Japón y en otros países como agente endulzante [153].

El consumo mundial de edulcorantes de alta intensidad depende en gran medida de la producción de bebidas gaseosas y alimentos. Las bebidas representan el mayor consumo de edulcorantes de alta intensidad en el mundo, seguido de otros productos que también contienen edulcorantes como alimentos, productos de cuidado personal (un ejemplo, pasta de dientes), productos farmacéuticos y edulcorantes de mesa. Según el informe *Chemical Economics Handbook - High Intensity Sweeteners* elaborado por la compañía Información de servicios de manipulación (IHS) [160], el consumo mundial de edulcorantes de alta intensidad contenidos en los diferentes productos ascendió a más de 129.000 toneladas métricas en el año 2013.

Como muestra la figura 10, China es el mayor consumidor de edulcorantes de alta intensidad, representando el 30% del consumo global de edulcorantes. China es también la mayor fuente mundial de edulcorantes, representando más del 70% de la producción mundial en 2013, seguidos de Indonesia, Estados Unidos y Europa central [160]. El ciclamato fue el edulcorante líder en términos de volumen de consumo, que representa el 51% del consumo mundial de edulcorantes de alta intensidad en 2013. La sacarina, que es 300 veces más dulce que la sacarosa, fue el edulcorante líder en términos de equivalentes de sacarosa, a pesar de ser el segundo lugar con respecto al volumen de consumo. Sacarina representó el 42% del total de equivalentes de sacarosa en 2013 [160].

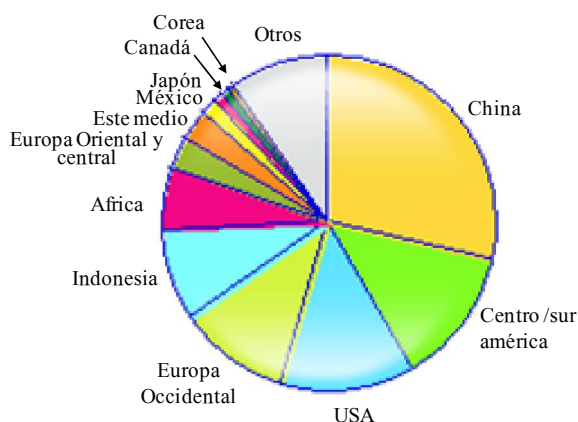


Figura 10. Consumo global de edulcorantes de alta intensidad en 2013 [160].

Sacarina y ciclamato son los edulcorantes de alta intensidad de más bajo costo disponibles, y por lo tanto gozan de un amplio uso en casi todos los mercados, especialmente en regiones como Asia, África y América Central y del Sur. Las excepciones notables para ciclamato son Estados

Unidos, Japón y la República de Corea, donde está prohibido su consumo. América del Norte fue el mayor consumidor de acesulfamo, aspartamo y sucralosa en el 2013 [160].

Japón, China y otros países asiáticos han utilizado durante mucho tiempo extractos de stevia como edulcorantes. Mercados de stevia en Europa Occidental y Norte América están aún en desarrollo. Se espera que el consumo de extracto de stevia para los próximos cinco años aumente a una tasa más alta que otros edulcorantes de alta intensidad. Sin embargo, debido que el extracto de stevia es un producto natural, la composición específica del extracto (es decir, la relación de los diversos glucósidos de esteviol) depende de cómo se cultiva la stevia específica, el clima, el procesamiento y otros factores [160].

En lo que concierne a los aspectos legales de la utilización de los edulcorantes a nivel Europeo, como normativa reguladora inicial surgió la Directiva 94/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de junio de 1994 relativa a todos los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios. Se trata de una directiva específica resultante de la Directiva marco, sobre los aditivos alimentarios empleados para endulzar. Los artículos de esta ley contienen explicaciones y disposiciones especiales sobre la utilización de edulcorantes en alimentos y bebidas. En el anexo de ésta, se indican los niveles máximos de utilización de cada uno de los edulcorantes bajos en calorías en una categoría alimenticia determinada. Esta Directiva, a lo largo de los años, se ha modificado en tres ocasiones, para adaptarse a los avances tecnológicos en el área de los edulcorantes. Más tarde, el Parlamento Europeo y el Consejo aprobarían un reglamento marco (Reglamento N°1333/2008) con el cual, desde enero de 2011, se consolidan todas las autorizaciones vigentes de edulcorantes y aditivos alimentarios en un único texto legal. En la actualidad, en la Unión Europea están autorizados los siguientes edulcorantes bajos en calorías: acesulfamo-K (E950), aspartamo (E951), sal de aspartamo-acesulfamo (E962), ciclamato (E952), neohesperidina dihidrocalcona (E959), sacarina (E954), sucralosa (E955), taumatina (E957) y neotamo (E-961) [161].

Tras el dictamen favorable de la EFSA, el uso definitivo de los derivados de la stevia y los glucósidos de esteviol es aprobado como edulcorante natural no calórico en todo el mercado europeo. Con la aprobación del Reglamento (UE) N° 1131/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a los glucósidos de esteviol (E-960), y se establecen sus límites de uso como edulcorantes en diferentes productos alimenticios y bebidas (refrescos, productos lácteos fermentados aromatizados, helados, edulcorantes de mesa, alimentos dietéticos para control del peso). Se podrá utilizar la stevia y los glucósidos de esteviol como aditivo alimentario y de esta manera dar una alternativa sana y natural para endulzar alimentos, sobre todo a personas que padecen de diabetes o control del peso, por ejemplo: bebidas aromatizadas o alimentos dietéticos destinados al control de peso [162].

La seguridad de los edulcorantes se evalúa por las autoridades nacionales, por el Comité Científico de la Unión Europea sobre la Alimentación (SCF, Scientific Committee for Food of the European Community) y por el Comité Mixto OAA/OMS de JECFA. El SCF fue el responsable de ello desde 1974 hasta 2003, año en el cual, pasó a ser responsabilidad de la EFSA. Dentro de la EFSA, la Comisión técnica de aditivos alimentarios y fuentes de nutrientes añadidos a los alimentos (ANS) es la responsable actual de la regulación legal de estas sustancias. Los aspectos legales precisan ser revisados de forma continuada para actualizar las nuevas aportaciones científicas publicadas sobre seguridad o eficacia en el uso de los edulcorantes. Al ser moléculas muy diversas las fuentes de riesgos potenciales son múltiples: interferencia en la absorción, metabolismo o excreción de nutrientes o cualquier metabolito intermedio, así como cualquier reacción alérgica, acumulación en los tejidos, efectos sobre la flora intestinal normal, alteración de la regulación de la glucosa en sangre, o la interacción con otros fármacos o drogas [158].

1.1.3.1 Presencia en el medioambiente

El alto incremento del consumo de los edulcorantes artificiales de alta intensidad en los últimos años, ha situado a este grupo de compuestos como uno de los más importantes contaminantes de interés emergente desde que pueden entrar al medioambiente y sus efectos dentro de éste es aún incierto. Por eso hasta hace muy pocos años se ha despertado el interés por evaluar la presencia de los edulcorantes de alta intensidad en los diferentes compartimentos del medioambiente.

En la tabla 9 se recopilan los estudios publicados hasta el momento sobre la presencia de edulcorantes de alta intensidad en aguas residuales y aguas de ríos. Los diferentes estudios evidencian la amplia presencia de edulcorantes de alta intensidad en aguas residuales y aguas de ríos en diferentes lugares del mundo. Sacarina, ciclamato, acesulfamo y sucralosa son los edulcorantes más investigados, posiblemente por los altos niveles de concentración a los que son encontrados en el medioambiente y/o su parcial o ninguna eliminación de algunos de estos edulcorantes durante el tratamiento en las EDARs. Estos edulcorantes fueron omnipresentes en las aguas residuales. Las más altas concentraciones corresponden al ciclamato con 200 $\mu\text{g/L}$ [163] y al acesulfamo con 305 $\mu\text{g/L}$ [164] en aguas de entrada de dos EDARs en Alemania. Sucralosa y sacarina fueron determinadas en un intervalo de concentración entre 0.01-46 $\mu\text{g/L}$, siendo los niveles más altos encontrados en Grecia [165] y en Estados Unidos [166]. En general, aspartamo y NHDC no fueron detectados frecuentemente, en el caso de aspartamo solo ha sido determinado recientemente en Estados Unidos [166] y Singapur [167] a concentraciones que no superan los 2 $\mu\text{g/L}$, mientras que NHDC solo ha sido determinada en China a una concentración de 0.4 $\mu\text{g/L}$ [168].

Tabla 9. Concentración y frecuencia de detección, en paréntesis, de los edulcorantes de alta intensidad en aguas residuales de entrada y efluente de EDAR y agua ríos.

Compuesto	País	Concentración (µg/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Sacarina	España	LOQ-20 (100%)	LOQ (100%)	LOQ (100%)	[169]
	España	18-22 (100%)	7-9 (100%)	0.5-20 (65%)	[170]
	Alemania	34-50 (100%)	3-5 (100%)	0.01-0.3 (100%)	[163]
	Alemania	20 (100%)	< LOD	-	[164]
	Suiza	4-18 (100%)	0.3-2 (90%)	< LOD-0.2	[171]
	Suiza	-	0.1-16 (100%)	< LOQ-0.2(66%)	[172]
	Finlandia	-	-	< LOQ-0.2 (100%)	[173]
	Grecia	15-46 (100%)	<LOD-0.3(42%)	-	[165]
	China	11 (100%)	0.3 (100%)	0.2-0.8 (100%)	[168]
	Singapur	0.5-135 (100%)	-	0.04-0.8 (100%)	[167]
	USA	-	<LOD-5 (20%)	<LOD	[174]
	USA	2-25 (100%)	0.1-15 (100%)	-	[166]
Sucralosa	España	3-9 (100%)	<LOD-9 (66%)	<LOQ (100%)	[169]
	España	3-5 (100%)	16-18 (100%)	0.6-5 (100%)	[170]
	Alemania	1-15 (100%)	0.8 (100%)	0.01-0.11 (100%)	[163]
	Suiza	2-9 (100%)	2-9 (100%)	<LOD-0.2	[171]
	Suiza	-	0.7-8 (100%)	<LOQ-1 (61%)	[172]
	Suecia	-	6-7 (100%)	0.2 (100%)	[175]

Tabla 9. Continuación.

Compuesto	País	Concentración (µg/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Sucralosa	Suecia	2-3 (100%)	2-3 (100%)	-	[176]
	Finlandia	-	-	<LOQ -1(100%)	[173]
	Grecia	6-25 (100%)	6-27 (100%)	-	[165]
	Canadá	0.01-0.02 (100%)	0.003-0.03 (100%)	-	[177]
	USA	-	0.8-2 (100%)	<LOD-0.3(36%)	[174]
	USA	-	0.1-49 (90%)	-	[178-180]
	USA	16-46 (100%)	15-55 (100%)	-	[166]
	China	2 (100%)	3 (100%)	0.3 (100%)	[168]
	Singapur	0.1-5 (100%)	-	<LOQ	[167]
	Arabia Saudita	-	0.4-36 (100%)	-	[181]
Acesulfamo	España	<LOQ-38 (100%)	<LOQ-17 (100%)	<LOQ (100%)	[169]
	España	25-27 (100%)	31-33 (100%)	1-54 (100%)	[170]
	Alemania	60-70 (100%)	50-60 (100%)	0.3-3 (100%)	[163]
	Alemania	304 (100%)	99 (100%)	-	[164]
	Suiza	12-43 (100%)	14-46 (100%)	<LOD-3	[171]
	Suiza	-	9-61 (100%)	<LOQ-7 (93%)	[172]
	Finlandia	-	-	0.03-10 (100%)	[173]
	Grecia	12-25 (100%)	12-27 (100%)	-	[165]
	USA	0.05-2 (100%)	0.6-4 (100%)	-	[166]
	USA	-	0.1-4 (100%)	-	[180]

Tabla 9. Continuación.

Compuesto	País	Concentración (µg/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Acesulfamo	China	12 (100%)	10 (100%)	3-5 (100%)	[168]
	Singapour	0.2-75 (100%)	-	0.005-0.4 (100%)	[167]
	Arabia Saudita	-	1-4 (60%)	-	[181]
Ciclamato	España	< LOQ-109 (100%)	< LOQ-1 (100%)	< LOQ (100%)	[169]
	España	26-36 (100%)	17-20 (100%)	0.5-16 (100%)	[170]
	Alemania	190-200 (100%)	0.8-3 (100%)	0.03-0.3 (100%)	[163]
	Suiza	15-65 (100%)	< LOD-0.8 (50%)	< LOD-0.1	[171]
	Suiza	-	< LOQ-19(64%)	< LOQ-2 (91%)	[172]
	Finlandia	-	-	< LOQ-0.12 (100%)	[173]
	Grecia	6-58 (100%)	1-5 (100%)	-	[165]
	China	28 (100%)	0.1 (100)	0.2-0.3 (100%)	[168]
	Singapur	0.3-250 (100%)	-	0.03-1 (100%)	[167]
Aspartamo	España	<LOD-<LOQ (33%)	<LOD	<LOD	[169]
	España	<LOD	<LOD	<LOD	[170]
	Alemania	<LOD	<LOD	<LOD	[163]
	Suiza	-	<LOD-11 (7%)	<LOD	[172]
	Grecia	<LOD	<LOD		[165]
	USA	-	<LOD	<LOD	[174]

Tabla 9. Continuación.

Compuesto	País	Concentración (µg/L)			Ref.
		Entrada	Efluente	Río	
Aspartamo	USA	0.01-0.4 (100%)	0.02-0.2 (100%)	-	[166]
	China	-	0.06 (100%)	<LOD	[168]
	Singapour	<LOQ-2	-	<LOQ	[167]
NHDC	España	<LOD	<LOD	<LOD	[169, 170]
	Suiza	-	<LOD	<LOD	[172]
	China	0.4 (100%)	<LOD	<LOD-0.02(33%)	[168]
	Singapour	<LOQ	-	<LOQ	[167]

Ref. = referencia

LOD = límite de detección

LOQ = límite de cuantificación

- = no estudiada

En los diferentes estudios citados en la tabla 9, los niveles de concentración que han sido encontrados en los efluentes de las diferentes EDARs estudiadas, sugieren poca o nula eliminación del acesulfamo y sucralosa durante el tratamiento convencional con lodos activados, mientras que sacarina y ciclamato presentan una eliminación mayor del 90% [163, 165, 168, 171]. Así pues, como puede observarse en los estudios citados en la tabla 9 los niveles de concentración de acesulfamo y sucralosa encontrados en las aguas de entrada son similares a las concentraciones de los efluentes, en tanto que los niveles de concentración de acesulfamo y ciclamato son significativamente menores en los efluentes. Las máximas concentraciones de acesulfamo en efluentes fueron encontradas en Alemania [164] a 99 µg/L y para el ciclamato fueron encontradas en España [170] y Suiza a 20 µg/L [172]. Un estudio exhaustivo para evaluar la presencia de acesulfamo y sucralosa entre otros

contaminantes en efluentes de 90 EDARs distribuidas por todos los estados miembros de la Unión Europea fue realizado por Loos et al. [182]. Los autores obtuvieron altas frecuencias de detección, mayores del 80%, para ambos compuestos, y niveles máximos de concentración de 2.5 mg/L con media de concentración de 14.3 $\mu\text{g/L}$ para el acesulfamo, mientras que para la sucralosa los niveles máximos fueron de 13 $\mu\text{g/L}$ y media de concentración de 1.7 $\mu\text{g/L}$.

Scheurer et al. [163] realizaron en Alemania un estudio comparativo de la eficacia de eliminación entre el tratamiento convencional con un tratamiento avanzado mediante un sistema suelo acuífero, el cual sólo presentó diferencia en la eliminación de sucralosa, aumentando el porcentaje de eliminación de un 15% con el tratamiento convencional a un 80% aplicando el sistema suelo acuífero. Sin embargo, otro tipo de tratamiento basado en lagunas aplicado en una EDAR en Canadá tampoco fue eficiente en la eliminación de sucralosa [177], incluso los autores indicaron valores negativos de eliminación. La sucralosa es un compuesto muy hidrofílico con $\log K_{ow}$ de -0.50 y no es susceptible a degradación microbiana debido a la presencia de átomos de cloro. Por ello es resistente a los tratamientos de depuración de agua [166, 177]. En este aspecto Soh et al. [183] demostraron en su investigación que la sucralosa es un compuesto persistente, que resiste la degradación microbiana, hidrólisis, adsorción a los sólidos, cloración, ozonización y la fotólisis con UV. Hasta el momento, la eliminación de aspartamo en las EDARs solo ha sido evaluado en dos EDARs en Estados Unidos [166], porque los otros estudios donde ha sido investigado este edulcorante no ha sido detectado en las aguas residuales o solo han estudiado los efluentes. En este estudio el 68% de aspartamo fue eliminado de las aguas residuales aplicando tratamiento con lodos activados [166].

Por otro lado, en las aguas de río, varios de los edulcorantes de alta intensidad han sido detectados en diferentes estudios a nivel mundial (tabla 9). Los edulcorantes con mayor frecuencia de detección son sacarina, sucralosa, acesulfamo y ciclamato. Así mismo, las más altas

concentraciones fueron encontradas en aguas de río de España [170] con valores máximos entre 5 $\mu\text{g/L}$ (sucralosa) y 54 $\mu\text{g/L}$ (acesulfamo). NHDC sólo ha sido detectado en China a bajos niveles de $\mu\text{g/L}$ [168], y el aspartamo no fue detectado en ninguno de los estudios mencionados en la tabla 9. En otro estudio, el análisis de 120 muestras de agua de río en 27 países Europeos confirma la amplia distribución de la sucralosa en el medioambiente acuático a concentraciones de hasta 1 $\mu\text{g/L}$ [184]. Este edulcorante fue encontrado principalmente en aguas de río del Reino Unido, Bélgica, Holanda, Francia, Suiza, España, Italia, Noruega y Suecia.

Por otra parte, los edulcorantes de alta intensidad también han mostrado ser resistentes a los tratamientos aplicados en la potabilización del agua, desde que han sido detectados en los sistemas de distribución del agua o en el agua de grifo. En este aspecto, Mawhinney et al. [185] evaluó la eficacia en eliminar sucralosa de 19 plantas de tratamiento de agua potable en Estados Unidos, las cuales aplican un tratamiento en común que consiste en coagulación, floculación, sedimentación, oxidación con cloro libre y filtración; y otros tratamientos con cloramina, dióxido de cloro, ozonización, ultravioleta, filtración con arena y/o carbón activado granular también son incluidos, los cuales varían según el proceso de la planta potabilizadora. Según los resultados obtenidos por los autores, la mayoría de las plantas potabilizadoras mostraron muy baja eliminación de sucralosa, incluso aquellas potabilizadoras que utilizan tratamiento con ozono como oxidante. La más alta eliminación (48%) la presentó una planta potabilizadora aplicando preoxidación con dióxido de cloro y tratamiento UV antes de la cloración. Así, el intervalo de concentraciones encontradas en la red de distribución del agua potable oscilaron entre 49 y 2400 ng/L . Otro estudio realizado también en Estados Unidos encontró sucralosa en agua potable a concentraciones de hasta 465 ng/L [178], mientras que en otro estudio llevado a cabo en Suecia, este edulcorante fue encontrado a concentración de 5.3 ng/L [176]. De la misma manera, la sucralosa y otros edulcorantes como acesulfamo, ciclamato y sacarina también han sido detectados en agua de grifo de diferentes lugares públicos en China, siendo siempre presentes estos edulcorantes en todos

los puntos de captación en un intervalo de concentración entre 30 ng/L (ciclamato) y 800 ng/L (acesulfamo) [168]. Por otro lado, acesulfamo resultó ser eficientemente eliminado (85-95%) después del tratamiento con ozonización aplicado en una planta potabilizadora en Suiza, disminuyendo la concentración de 2600 ng/L en el agua sin tratar hasta 20 ng/L en el agua potable [171].

Los edulcorantes son compuestos muy hidrofílicos por lo que tienden a permanecer en la fase acuosa (solubilidad en el agua varía entre 565 a 1.00×10^6 mg/L a 25 °C) [166]. A pesar de sus coeficientes de adsorción relativamente bajos, los edulcorantes han sido encontrados a niveles altos de concentración en los fangos de depuradora. Hasta el momento solo en cuatro países se han llevado a cabo investigaciones sobre la presencia de edulcorantes de alta intensidad en fangos de depuradora. Subedí et al. realizaron dos estudios en Korea [186] y en Estados Unidos [166], Ordoñez et al. [187] en España y Buerge et al. [188] en Suiza. Aunque algunos edulcorantes como ciclamato y sacarina mostraron ninguna o poca eliminación durante los tratamientos de depuración sugiriendo poca adsorción hacia los fangos, estos edulcorantes presentaron altas frecuencias de detección en todos los estudios. Por ejemplo, en Korea [186] detectaron las más altas concentraciones de sacarina de hasta 3240 ng/g (d.w.), mientras que en España [187] se detectaron los más altos niveles de ciclamato, a concentraciones máximas de 326 ng/g (d.w.). El acesulfamo fue encontrado a niveles similares en un intervalo de concentración entre 14 y 201 ng/g (d.w.) en todos los estudios, mientras que aspartamo solo fue detectado en Estados Unidos [166] y en Korea [186] a concentraciones que van desde 28 ng/g hasta los 5220 ng/g (d.w.), siendo los más altos niveles encontrados en Korea [186]. Por otro lado los niveles de concentración de sucralosa variaron según cada país, en Estados Unidos se encontraron los más altos niveles de hasta 1980 ng/g (d.w.) [166], siguiendo España con una máxima concentración de 628 ng/g (d.w.) [187]. Korea con 122 ng/g (d.w.) [186] y Suiza donde se encontró los más bajos niveles de sucralosa, a una concentración máxima de 8.6 ng/g (d.w.) [188].

Subedí et al. [166] en su estudio calculó la fracción de masa absorbida de los edulcorantes hacia las partículas suspendidas, encontrando los siguientes porcentajes en orden descendiente: aspartamo (50.4%), acesulfamo (10.9%), sacarina y sucralosa (0.8%). Estos datos nos pueden indicar la preferencia del aspartamo por permanecer en las partículas suspendidas o en los fangos, en comparación con los otros edulcorantes.

1.1.3.2 Evaluación del riesgo ambiental

La información disponible sobre el impacto ecotoxicológico de los edulcorantes de alta intensidad es aún limitada a unos pocos estudios. La mayoría de éstos están enfocados a la sucralosa, debido a su excepcional estabilidad, alta solubilidad en el agua y su extendida distribución en el medioambiente a altos niveles de concentración. La mayoría de los edulcorantes de alta intensidad son considerados seguros para el consumo humano, pero sus efectos en el ecosistema no han sido estudiados en profundidad por la disponibilidad limitada de datos ecotoxicológicos.

Hjorth et al. [189] llevaron a cabo un estudio para investigar los efectos a corto plazo (96 h) de sucralosa en los ecosistemas acuáticos árticos. Los factores que evaluaron fueron la producción de huevos, la tasa de eclosión, la ingesta de alimentos y mortalidad de dos especies de copépodos árticos del género *calanus*, *C. glacialis* and *C. finmarchicus*. Los copépodos fueron expuestos a diferentes concentraciones que coinciden en el intervalo de concentración en el que ha sido encontrada en el medioambiente (0-50 µg/L). Los resultados de los autores mostraron que ambas especies respondieron débilmente a la sucralosa, pero siendo *C. galcialis* más sensible que *C. finmarchicus* [189].

Otros estudios recopilados en la publicación de Kokotou et al. [190] también evaluaron los efectos de la sucralosa en algunas capacidades funcionales de *Daphnia magna*, *Americamysis bahía* y *Gammarids*. La supervivencia o reproducción de *Daphnia magna* no se vio reducida por la

exposición de sucralosa hasta que fueron expuestos a concentraciones muy altas, de hasta 62 g/L. Igualmente para la especie *Americamysis bahía* su supervivencia, crecimiento y reproducción no fueron afectados por concentraciones inferiores de 693 mg/L de sucralosa. Los valores encontrados de NOEL y LOEL para *Daphnia magna* fueron de 1800 y > 1800 mg/L, respectivamente. Los valores encontrados de NOEL y LOEL para *Americamysis bahía* fueron de 93 y > 93 mg/L, respectivamente. Sin embargo, otro estudio también mencionado en la publicación de Kokotou et al [190], demostraron que la fisiología y el comportamiento locomotor de *Daphnia magna* y *Gammarids* pueden ser afectados por la exposición de sucralosa. Mientras que para *Daphnia magna* fueron afectadas la altura y la velocidad al nadar, para los *Gammarids* el tiempo en alcanzar el alimento y encontrar resguardo fueron los comportamientos afectados.

En controversia a los estudios previamente mencionados, Tollefsen et al. [191] hallaron que la sucralosa no altera la supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos acuáticos (plantas, algas, crustáceos y peces) a concentraciones > 9000 veces más altas que aquellas detectadas en el medioambiente.

En un estudio reciente, acesulfamo, ciclamato, sacarina y sucralosa no mostraron efectos significativos en pruebas de corto tiempo usando comunidades microbianas de tratamiento de aguas residuales, *Scenedesmus vacuolatus* y *Daphnia magna*, o en las pruebas de toxicidad crónica con *Lemna minor* a concentraciones máximas de 1000 mg/L. De esta manera, los autores establecieron los NOELs y LOELs para todas las especies expuestas a los 4 edulcorantes bajo estudio en 1000 mg/L y > 1000 mg/L, respectivamente. Según los autores estos valores indican un peligro y riesgo potencial bajo hacia esos organismos acuáticos [192].

Investigadores también han evidenciado otros efectos derivados por los edulcorantes de alta intensidad, por ejemplo la exposición crónica de sacarina indujo cáncer de vejiga en ratas, el aspartamo exhibió efectos carcinogénicos en ratas principalmente por los metabolitos [186], y

también se ha demostrado que los edulcorantes interfieren en la fotosíntesis de las plantas [166].

Hermesen et al. [193] recientemente evaluaron los efectos en la expresión génica de los peces cebra por exposición a sacarina a una concentración de 10 mM durante 72 horas utilizando la prueba toxicidad embrionaria, pero los autores no encontraron ningún efecto negativo.

Por otro lado, diferentes estudios también han investigado los posibles efectos por la ingesta o exposición de stevia en ratas, salmonellas y hámsteres. Geuns et al. [194] recopilaron varios de estos estudios en su publicación, en los cuales aspectos como la toxicidad aguda, mutagenicidad, carcinogenicidad, fertilidad y teratogenicidad fueron evaluadas. Los resultados de toxicidad aguda en hámsteres por ingesta de esteviol (el aglicón del steviosida) proporcionaron valores de DL_{50} de 5.2 g/kg peso corporal en machos y 6.1 g/kg peso corporal en hembras. En ratas y ratones las DL_{50} fueron más altas de 15 g/kg peso corporal, demostrando que los hámsteres son más sensibles al esteviol. En los estudios de toxicidad crónica, valores de NOEL superiores a 2.5 g/kg peso corporal fueron encontrados para ratas y hámsteres. En estudios mutagénicos en *Salmonella typhimurium* TM677 el esteviol mostró efectos leves como transiciones, transversiones, duplicaciones y supresiones en el gen guanina fosforribosiltransferasa. Respecto al efecto de la ingesta de steviosida en la fertilidad o reproducción en ratones, ratas o hámsteres existe controversia entre los diferentes estudios que han sido recopilados en la publicación de Geuns et al. [194]; mientras algunos estudios concluyen que ningún efecto significativo es observado en la espermatogénesis, ni en la proliferación celular intersticial ni tampoco formación de tumores en los testículos de ratas, otros estudios sugirieron una posible disminución en la fertilidad de las ratas por altas dosis de extractos de stevia. Por otro lado, la ingesta de esteviol en hámsteres durante 6-10 días en dosis entre 500 y 1000 mg/kg peso corporal redujo el número de fetos vivos y el peso medio fetal. Los riñones maternos mostraron un aumento dependiente de la dosis en la severidad de túbulos

contorneados en los riñones [194].

El número de estudios sobre evaluación del riesgo ambiental de los edulcorantes en el medioambiente es limitado a un estudio y en éste únicamente se evalúa la sucralosa [191]. Los autores evaluaron el riesgo ambiental con base a la concentración ambiental prevista de sucralosa (PEC) obtenida de datos medidos en aguas de río. De esta manera Q fue calculado aplicando el cociente PEC/PNEC, en el que PNEC lo determinaron utilizando el valor más bajo de NOEL obtenido en estudios crónicos con *Mysid Shrimp*. Según el resultado obtenido por los autores, el valor de Q fue menor a 1 (0.08) lo que indica un insignificante riesgo para los organismos acuáticos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

1.2. Determinación de contaminantes de interés emergente en muestras medioambientales

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Generalmente los métodos analíticos para determinar contaminantes de interés emergente en muestras medioambientales incluyen técnicas de extracción combinadas con técnicas de determinación. La combinación de estas técnicas debe proporcionar métodos analíticos altamente sensibles, selectivos y robustos. Estas características en un método analítico son indispensables cuando se analizan muestras medioambientales, por la complejidad que conlleva este tipo de muestras y por los bajos niveles de concentración a los que usualmente se encuentran los contaminantes de interés emergente en el medioambiente, como ha sido demostrado en las diferentes publicaciones citadas en las secciones anteriores, donde el intervalo típico de concentración es entre los ng/L y escasos $\mu\text{g/L}$ en el caso de las muestras líquidas, y los escasos ng/g en muestras sólidas. Las muestras medioambientales son complejas porque contienen gran cantidad de sustancias como ácidos húmicos, sales, sustancias inorgánicas, pigmentos, lípidos, urea, compuestos análogos o metabolitos con estructura química similar a la del contaminante foco de investigación, que pueden alterar la calidad del resultado analítico [195]. Por eso la importancia de armonizar las técnicas de extracción, que usualmente incluyen procesos de preconcentración y *clean-up* con las técnicas de determinación que usualmente incluyen técnicas cromatográficas y espectrometría de masas.

La mayoría de métodos para determinar contaminantes en el medioambiente son métodos multiresiduos, en los cuales un gran número de compuestos son determinados en un solo análisis, por lo que deben tenerse en consideración varios factores al desarrollar dichos métodos [196]:

- Aunque los compuestos poseen diferentes propiedades fisicoquímicas, la preparación de la muestra y preconcentración deben realizarse preferiblemente en un solo paso, para minimizar la manipulación de la muestra.

- Obtención de límites de detección y de cuantificación suficientemente bajos para cada compuesto.
- Detección específica del compuesto.
- Aplicación a varias matrices (agua potable, agua de río, agua residual, etc.).

En las siguientes secciones se discutirán las técnicas de extracción y de determinación que actualmente se utilizan para el desarrollo de métodos analíticos para determinar contaminantes de interés emergente en muestras de agua de río, aguas residuales y fangos de depuradora, centrándonos principalmente en drogas de abuso, hipnótico-sedantes, edulcorantes de alta intensidad y PCPs. En este contexto, en las tablas 10 y 11 se han recopilado las publicaciones más recientes para destacar los avances en instrumentación y/o equipos para la preparación de muestra, separación cromatográfica y detección de estos 4 grupos de contaminantes de interés emergente en muestras ambientales líquidas y sólidas, respectivamente.

1.2.1. Técnicas de extracción

En el análisis de muestras medioambientales, la preparación de la muestra es un paso muy importante y crucial para alcanzar resultados analíticos óptimos. Este paso es la principal fuente de incertidumbre en un método analítico en gran parte por la complejidad de las muestras medioambientales, las cuales llevan consigo incontables sustancias difíciles de aislar del compuesto de interés durante el proceso de preparación de muestra, y que como consecuencia pueden interferir en la determinación, principalmente cuando se utiliza espectrometría de masas como técnica de identificación y cuantificación. Ante esto, la preparación de la muestra implica procesos como son la extracción del analito, *clean-up* de los extractos y preconcentración [197].

En este contexto, las tendencias más recientes en técnicas de preparación de muestras en los últimos años son [197]:

- Automatización a través del acoplamiento de la técnica de extracción y la técnica de detección.
- Miniaturización de las técnicas de extracción ya existentes.
- Materiales nuevos y avanzados de retención selectiva de los compuestos objeto de estudio.
- Aplicación de técnicas respetuosas con el medioambiente, como técnicas que implican un consumo reducido de disolventes.

En las siguientes dos secciones se presentan las técnicas que han sido aplicadas para la extracción, *clean-up* y preconcentración de los contaminantes de interés emergente en muestras ambientales líquidas y sólidas, profundizando en mayor detalle en aquellas técnicas de extracción que han sido utilizadas para los compuestos que son centro de estudio en esta Tesis.

1.2.1.1. Técnicas de extracción para muestras medioambientales líquidas

Durante la última década, la extracción de contaminantes de interés emergente de las muestras medioambientales líquidas ha estado mayoritariamente basada en el principio de retención en una fase sólida. Bajo este fundamento ha surgido la técnica extracción en fase sólida (SPE, *Solid-Phase Extraction*), la cual puede ser acoplada en línea a técnicas cromatográficas o de detección [197].

En la SPE los analitos se aíslan en función de su retención relativa por la matriz de la muestra y el sorbente. Este factor hace que la elección del sorbente sea uno de los parámetros más importantes durante la optimización de la SPE. La interacción sorbente-analito puede responder a

diferentes mecanismos entre los que cabe destacar la adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión molecular, afinidad o una combinación de ellos [198].

En este aspecto, continuamente la ciencia avanza en el desarrollo de nuevos sorbentes en la búsqueda de mejorar la capacidad, selectividad o especificidad hacia los analitos de interés, la capacidad de sorción (para mejorar el factor de preconcentración) y una mayor estabilidad química o físico-mecánica. De este modo el avance de nuevos materiales abre interesantes posibilidades para el tratamiento de muestra, como son materiales poliméricos de modo mixto (combinación de diferentes interacciones), los materiales de acceso restringido (RAM, *Restricted Access Materials*), polímeros de impresión molecular (MIPs, *Molecularly Imprinted Polymers*), materiales obtenidos a través de procesos sol-gel, sorbentes basados en líquidos iónicos, nanomateriales, inmunosorbentes, grafeno y materiales derivados [199].

Aunque todas las modalidades en sorbentes anteriormente mencionadas han sido eficazmente aplicadas en la extracción de varios contaminantes de interés emergente, la mayoría de métodos encontrados en la bibliografía para la extracción de drogas de abuso, hipnótico-sedantes, edulcorantes y productos del cuidado personal (PCPs, *Personal Care Products*) han aplicado sorbentes de base sílica o polimérica modificados con diferentes grupos funcionales. Estos grupos funcionales determinan el tipo de interacción del sorbente con el analito, la cual suele ser hidrofóbica (fase inversa), polar (fase normal), electrostática (intercambio iónico) o una combinación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas de las que se obtienen los sorbentes de modo mixto. Generalmente todos estos tipos de sorbentes están orientados fundamentalmente al análisis multiresiduo, contrario a otros tipos de sorbentes como los MIPs que proporcionan elevada selectividad para la retención de analitos específicos [200].

Cabe destacar que los sorbentes de material polimérico, especialmente los de estructura hiper-entrecruzada (*hipercrosslinked*), poseen mayor

capacidad de retención que los sorbentes de base sílica, debido a que en el proceso de post-entrecruzamiento se producen resinas que tienen una estructura con un elevado contenido de microporos y una elevada área superficial de hasta 2000 m²/g [201]. Por otro lado, los sorbentes poliméricos de modo mixto además de aportar capacidad aportan selectividad, puesto que estos sorbentes combinan un esqueleto polimérico con grupos iónicos y, de esta manera, disponen de dos tipos de interacciones: las de fase inversa y las de intercambio iónico [202]. Una descripción detallada de las propiedades químicas y morfológicas de las diferentes clases de sorbentes de SPE puede ser encontrada en dos publicaciones de Fontanals et al. [201, 202].

Entre los sorbentes comerciales, el copolímero de divinilbenceno/n-vinilpirrolidona con interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas (patentado por Waters bajo el nombre Oasis HLB) es uno de los sorbentes más utilizados para la extracción/preconcentración de contaminantes en muestras ambientales líquidas. La elevada área específica del Oasis HLB (en torno a 800 m²/g) y la presencia en el polímero del grupo pirrolidona, que es un aceptor de hidrógeno, mejora notablemente la retención de compuestos polares, mientras que el polímero de divinilbenceno permite la retención eficaz de los compuestos hidrófobos, lo que lo hace un sorbente ideal para análisis multiresiduo con analitos de diferentes propiedades químicas (ácidas, básicas o neutras) [201].

Por ejemplo, el grupo de los edulcorantes de alta intensidad contiene compuestos que presentan propiedades físico-químicas muy diferentes entre ellos. Zygler et al. [203] evaluaron el comportamiento de retención de nueve edulcorantes de alta intensidad en 7 sorbentes comerciales de fase reversa en base sílica (Chromabond C₁₈, Bakerbond Octadecyl, Bakerbond phenyl, LiChrolut RP-18, Supelclean LC-18, Discovery DSC-18 y Zorbax C₁₈) y tres sorbentes de base polimérica (Strata X-RP, Oasis HLB y Bakerbond SDB-1). En este estudio las características de cada sorbente como la estructura, porosidad (40-300 Å), diámetro de partícula (30-50 μm), la existencia de *end-capping*, área superficial (475-1060

mg²/g) y la cantidad de sorbente empaquetado (60-1000 mg) fueron correlacionadas con la recuperación de cada compuesto. Además, la influencia en las recuperaciones de varias soluciones tampones a pH entre 3.5 y 8.4 utilizadas como solvente de acondicionamiento y así mismo como solvente de *clean-up* después de pasar la muestra por el sorbente. Los autores que obtuvieron recuperaciones $\geq 92\%$ usando sorbentes de base sílica ligados con C₁₈. Así mismo, obtuvieron recuperaciones aceptables con los sorbentes poliméricos Oasis HLB y Strata-X RP. Sin embargo, usando Oasis HLB (300 mg) el ciclamato fue el único compuesto menos retenido por este sorbente (83%), y por otro lado las recuperaciones también disminuyeron para este compuesto y acesulfamo utilizando Oasis HLB con menos cantidad de sorbente (60 mg). Concerniente al tampón, el ácido fórmico-N,N-diisopropiletilamina ajustado a pH 4.5 es el que proporcionó mejores resultados.

Grujić et al. [118] también evaluaron la retención de 19 fármacos (incluyendo algunos hipnótico-sedantes) en varios sorbentes con diferentes mecanismos de retención. Los autores compararon dos sorbentes de fase inversa con base sílica Speedisk Octadecyl C₁₈ y Supelclean ENVI-18, cuatro sorbentes poliméricos de los cuales dos son de fase inversa Bakerbond SDB-1 y Supelclean ENVI- Chrom P, uno hidrofílico Speedisk H₂O-Phylic DVB y otro hidrofílico-lipofílico Oasis HLB y dos sorbentes de intercambio catiónico Supelclean LC-SCX y Oasis MCX. Según los resultados del estudio, en el caso de las benzodiazepinas las mejores recuperaciones se obtuvieron con el sorbente de intercambio catiónico Supelclean LC-SCX (96-106%) y en el caso del fenobarbital y carbamazepina la mejor recuperación fue con Oasis HLB, con recuperaciones de 90% y 96%, respectivamente. Sin embargo, debido a que en el grupo de fármacos incluidos en el estudio se encuentran compuestos ácidos, básicos y neutros y de diferentes polaridades, el sorbente que proporcionó mayor eficiencia para la mayoría de compuestos bajo estudio fue el Oasis HLB con un intervalo de recuperaciones entre 81-115%.

En la tabla 10, se muestran otros ejemplos de la aplicabilidad de Oasis HLB en métodos multiresiduo presentados en varios estudios para la determinación de drogas de abuso [33, 50, 54, 57, 204], hipnótico-sedantes [107-109, 111, 112, 121, 134], edulcorantes [166, 169, 170, 181, 182] y PCPs [205-207] en muestras medioambientales líquidas.

El solvente de elución es un parámetro que influye en el buen desempeño de la SPE, puesto que, es el responsable de la desorción de los analitos, rompiendo las interacciones sorbente-analito. Factores como la polaridad, solubilidad y pH del solvente de elución podrían afectar el rendimiento y la selectividad en la SPE. Estos factores son determinados en función de las propiedades químicas del analito y del tipo de interacción que presenta con el sorbente. Ante esto, metanol es usualmente seleccionado como solvente de elución en métodos multiresiduo que utilizan sorbentes con bases sílica o polimérica ligados a fases no polares (fase inversa), porque puede interaccionar con compuestos que contienen grupos polares y no polares favoreciendo la desorción de éstos del sorbente [208]. En la mayoría de los estudios citados anteriormente, principalmente en los que determinan drogas de abuso e hipnótico-sedantes, el solvente de elución en común es el metanol utilizando volúmenes entre 2-10 mL.

Entre estos estudios que utilizan Oasis HLB, otros solventes de elución como acetona [112], acetona y acetato de etilo [50] también han sido utilizados, principalmente aquellos estudios con pocos compuestos objeto de estudio o pertenecientes al mismo grupo de contaminantes y en algún caso por compatibilidad con los instrumentos de análisis.

Tabla 10. Métodos analíticos para determinar drogas de abuso (DA) hipnótico-sedantes (HS), edulcorantes y PCPs en muestras medioambientales líquidas.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción (sorbente)	Técnica cromatográfica Columna analítica	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/L)	Ref.
DA	Agua residual	SPE (Bond Elut)	GC Phenilmetilsilicona (0.33µm, 12 m x 0.2 mm)	MS IT	87-109	3.7-25 (LOQ)	[209]
DA	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis HLB)	GC HP-5MS (0.25µm, 30 m x 0.25 mm)	MS IT	63-134	1 -12	[50]
Fármacos Barbitúricos Triclosan	Agua residual	SPE (Strata X)	GC DB-5MS (0.25µm, 30 m x 0.25 mm)	MS Q	31-85	2 - 4	[132]
Benzodiazepinas	Agua de grifo	SPE (C ₁₈) DLLME	GC HP-5 fused silica (0.25µm, 30 m x 0.25 mm)	FID	39-72	20 - 50	[139]
Barbitúricos	Agua de río	SPE (Oasis HLB)	GC HP-5MS (0.25µm, 30 m x 0.25 mm)	MS Q	74-103	1-5	[131]
Benzodiazepinas	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis HLB)	GC DB-5MS (0.25µm, 30 m x 0.25 mm)	MS Q	84-101	3	[115]
Fármacos Benzodiazepinas	Agua residual Agua de río Agua potable	SPE (Oasis MCX)	GC HP-5MS (0.25µm, 30 m x 0.25 mm)	MS Q	87-101	1.4-22	[119]
Parabenos Triclosan	Agua residual	MEPS (C ₁₈ MEPS)	GC HP-5MS (0.25µm, 30 m x 0.25 mm)	MS Q	85-120	0.02-0.06	[210]

Tabla 10. Continuación.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción (sorbente)	Técnica cromatográfica Columna analítica	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/L)	Ref.
Sucralosa	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	GC DB-5MS (0.25µm, 30 m x 0.25 mm)	MS IT	88%		[211]
DA	Agua residual	On-line SPE (Oasis MAX)	LC Hypersil gold aQ C ₁₈ (3 µm, 150 x 2.1 mm)	MS/MS (HESI-II) Q-Orbitrap	66-79	0.7 - 1.2	[32]
DA	Agua residual	Inyección directa	LC Hydro RP C ₁₈ (2.5 µm, 150 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	79-118	20 - 100	[36]
DA	Agua residual	On-line SPE (Oasis HLB)	LC Purospher star C ₁₈ (5 µm, 125 x 2 mm)	MS/MS (ESI) Qq-LIT	22-97	6 - 7.5	[38]
DA	Agua residual	SPE (Oasis MCX)	LC Nucleosil 100-3 C ₁₈ (3 µm, 125 x 2 mm)	MS/MS (ESI) Q-TOF	63-82	2 - 50 (LOQ)	[39]
DA	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis MCX)	LC Ascentis express C ₁₈ (2.7 µm, 125 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	25-77	0.5-50	[40]
DA	Agua residual	SPE (Oasis MCX)	LC Luna HILIC (5 µm, 150 x 3 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	85-115	1 - 2	[41]
DA	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	LC X Bridge phenyl (3.5 µm, 150 x 3 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	74-89	0.1 - 12.8	[42]

Tabla 10. Continuación.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción (sorbente)	Técnica cromatográfica Columna analítica	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/L)	Ref.
DA	Agua residual	SPE (UCT XRDAH)	LC Luna PFP (4 µm, 50 x 4.6 mm)	MS/MS (ESI) Qq-LIT	53-92	10	[46]
DA Catinones	Agua residual	SPE (Oasis MCX)	UPLC Acquity CSH C ₁₈ (1.7 µm, 75 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	83-100	n.e	[43]
DA	Agua residual	SPE (Oasis MCX)	LC Genesis C ₁₈ (4 µm, 150 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	n.e	0.01 - 5.1	[35]
DA Benzodiazepinas	Agua residual	On-line SPE (C ₁₈)	LC Varian Pursuit C ₁₈ (4.6 µm, 150 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	n.e	0.5- 150	[44]
DA	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	LC X Bridge phenyl (3.5 µm, 150 x 3 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	61-24	5 - 40 (LOQ)	[55, 80]
Fármacos DA HS	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis MCX)	UPLC Acquity BEH C ₁₈ (1.7 µm, 150 x 1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	n.e	0.8- 119	[56]
DA	Agua residual	SPE (Strata X)	UPLC Kinetex C ₁₈ (1.7 µm, 50 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ y QTOF	66-114	6 - 15 (LOQ)	[58]
DA	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	LC Luna HILIC (5 µm, 150 x 3 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	92-100	1.3 - 15 (LOQ)	[62]

Tabla 10. Continuación.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción (sorbente)	Técnica cromatográfica Columna analítica	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/L)	Ref.
DA	Agua residual Agua de río	Inyección directa	LC Zorbax eclipse XDB C ₈ (5 µm, 150 x 4.6 mm)	MS/MS (ESI) Qq-LIT	n.e	0.3- 700	[51]
DA	Agua residual Agua de río	On-line SPE (Oasis WCX)	LC Ascentis Express C ₁₈ (2.7 µm, 50 x 4.6 mm)	MS (ESI) Q	63-115	0.5 - 2	[61]
Fármacos uso veterinaria DA	Agua residual Agua de río	Inyección directa	UPLC Acquity BEH C ₁₈ (1.7 µm, 100 x 2.11 mm)	MS/MS (ESI) Qq-LIT	64-110	0.1 - 1.1	[63]
DA	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	LC Ultra biphenyl C ₁₈ (5 µm, 100 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	80-150	0.1-5	[33]
DA	Agua residual	On-line SPE (Hypersil gold C ₁₈)	LC Cogent bidentate (3 µm, 50 x 2.1 mm)	MS/MS (HESI-II) TSQ	n.e	0.5 - 13 (LOQ)	[83]
Multiresiduo 400 compuestos DA Triclosan	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis MCX)	UPLC Zorbax Eclipse C ₁₈ (1.8 µm, 50 x 4.6 mm)	MS/MS (ESI) QTOF	17-87	1 - 24 (LOQ)	[66, 204]
DA	Agua residual	SPE (Oasis MCX)	LC Luna C ₁₈ (3 µm, 150 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	94-125	0.05 - 0.7	[85]
DA	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	LC X bridge C ₁₈ (3.5 µm, 150 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) LTQFT Orbitrap	70-120	2-68 (LOQ)	[212]

Tabla 10. Continuación.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción (sorbente)	Técnica cromatográfica Columna analítica	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/L)	Ref.
DA Benzodiazepinas	Agua de río Agua potable	On-line SPE (PLRPs)	LC Purospher Star C ₁₈ (5 µm, 125 x 2 mm)	MS/MS (ESI) Qq-LIT	63-118	0.1-1.4	[59]
DA Benzodiazepinas	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis MCX)	UPLC Acquity BEH C ₁₈ (1.7 µm, 150 x 1 mm)	MS (ESI) QqQ	38-139	0.1 - 65 (LOQ)	[60, 76, 82]
DA HS	Agua residual	SPE (Strata-XC)	UPLC Kinetex PFP (1.7 µm, 50 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	58-119	0.3 - 162	[48]
HS	Agua residual	On-line SPE (Oasis HLB)	LC X-Bridge C ₁₈ (3.5 µm, 150 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	88-95	0.3-0.5 (LOQ)	[126]
Fármacos HS	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis HLB)	LC Purospher Star (5 µm, 125 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	61-112	0.3-3	[103]
Fármacos HS	Agua residual Agua de río	On-line SPE (Hysphere resin)	LC Purospher Star (5 µm, 125 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	25-91	0.3-38	[106]
Benzodiazepinas	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis MCX)	LC Synergi Fusion (4 µm, 100 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	84-108	1-5.8 (LOQ)	[104, 110]
HS	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	LC Hypesil Gold C ₁₈ (3 µm, 150 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	57-75	n.e	[121]
Fármacos PCPs	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	LC Hypersil Gold C ₁₈ (5 µm, 150 x 2.1 mm)	UV/Vis-MS LTQ Orbitrap	ne	ne	[135]

Tabla 10. Continuación.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción (sorbente)	Técnica cromatográfica Columna analítica	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/L)	Ref.
Fármacos HS	Agua de río Agua de río	SPE (Oasis HLB)	LC Acquity BEH C ₁₈ (1.7 µm, 150 x 1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	44-117	0.06-18	[109]
Fármacos HS	Agua de río	SPE (Oasis HLB)	LC Zorbax Eclipse C ₁₈ (3.5 µm, 75 x 4.6 mm)	MS (ESI) IT	89-100	0.2-1.3	[118]
DA HS Fármacos	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis HLB)	LC Polaris C ₁₈ -Ether (3 µm, 150 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	n.e	1.4-11	[111]
Fármacos HS	Agua residual	SPE (Oasis MAX)	LC Pursuit C ₁₈ (2.4µm, 50 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) IT	63-145	1-2	[116]
Fármacos HS	Agua residual Agua de río Agua Potable	SPE SPE (Oasis HLB)	UPLC Acquity UPLC HSS T ₃ (1,7 µm, 50 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	98-124	0.7-2.4	[105, 117]
HS	Agua residual	SPE (RP-C ₁₈)	UPLC Acquity BEH C ₁₈ (1.7 µm, 150 x 1 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	25-91	0.3-38	[106]
Benzodiazepinas	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis MCX)	LC Synergi Fusion (4 µm, 50 x 2.1 mm)	MS (ESI) Q	37-60	10	[113]
Fármacos HS	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	LC Purospher Star C ₁₈ (5 µm, 125 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	44-145	1-7	[134]
Edulcorantes	Agua residual Agua de río	SPE (Oasis HLB)	LC Synchronis HILIC (5 µm, 100 x 2.1 mm)	MS/MS(HESI-II) Orbitrap	57-101	2-700	[169]

Tabla 10. Continuación.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción (sorbente)	Técnica cromatográfica Columna analítica	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/L)	Ref.
Edulcorantes	Agua de río Agua de río	SPE (Oasis HLB)	LC Luna C ₁₈ (3 µm, 100 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	75-112	10-500	[170]
Edulcorantes	Agua residual Agua de río	SPE (Bakerbond SDB1)	LC Zorbax Eclipse XDB C ₈ (5 µm, 150x 4.6 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	30-106	1-10	[163]
Edulcorantes	Agua residual Agua de río Agua potable	On-line SPE	LC Gemini C ₁₈ (5 µm, 150 x 2 mm)	MS/MS (APCI) QqQ	n.e	10-300	[171]
Edulcorantes	Agua residual Agua de río	Inyección directa	LC Atlantis C ₁₈ (3 µm, 150 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	55-100	10 (LOQ)	[172]
Edulcorantes	Agua de río	SPE (Oasis WAX)	UPLC Acquity HSS T ₃ (1,8 µm, 50 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	44-83	1-20	[173]
Edulcorantes	Agua residual Agua de río	SPE (PWAX)	LC Athena C ₁₈ -WP (3 µm, 150 x 4.6 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	53-104	0.1-1.9	[168]
Edulcorantes PCPs Fármacos	Agua residual Agua de río	SPE (HR-X)	LC Zorbax SB – C ₁₈ (3.5 µm, 150 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	62-98	1-16	[167]
Edulcorantes	Agua residual Agua de río	SPE (Bond elut PPL y NH ₂)	Cromatografía de capa delgada		84	100	[175]
Sucralosa	Agua residual Agua potable	SPE (Oasis HLB)	UPLC Hypersil Gold PFP (1.9 µm, 100 x 2.1 mm)	MS/MS (APCI) QqQ	85	8.5-45	[178]

Tabla 10. Continuación.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción (sorbente)	Técnica cromatográfica Columna analítica	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/L)	Ref.
Sucralosa Fármacos	Agua de río	On-line SPE (Oasis HLB)	LC LunaC ₁₈ (5 µm, 150 x 4.6 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	n.e	20-30 (LOQ)	[181]
Acesulfamo	Agua residual	MIP (VBTA)	LC Ascentis Express C ₁₈ (2.7µm, 100x 3 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	75-100	120	[164]
Edulcorantes	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	LC Hypersil Gold C ₁₈ (3 µm, 150 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	49-83	n.e	[166]
Edulcorantes	Agua residual	SPE (Oasis Strata-X)	LC Kinetex HILIC (3.6 µm, 100 x 2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	40-95	5-88	[165]
Edulcorantes PCPs	Agua residual	Inyección directa	LC Agilent Pursuit C ₈ (3 µm, 100 x 2 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	85-106	2-100	[180]
Sucralosa	Agua potable	SPE (n.e)	LC Allure Organic Acids (5 µm, 150 x 43.2 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	85	1.6	[185]

Abreviatura: Ref.: referencia, %REC: % recuperación, SPE: extracción en fase sólida, MEPS: microextracción por sorbente empaquetado, MIP: polímero de impresión molecular, MISPE: extracción en fase sólida con impresión molecular, LC: cromatografía de líquidos, UPLC: cromatografía líquida de ultra alta resolución, GC: cromatografía de gases, MS: espectrometría de masas, MS/MS: espectrometría de masas en tándem, ESI: ionización electrospray, HESI: ionización electrospray caliente, FID: detector de ionización de llama. **Analizadores:** IT: trampa iónica, Q: cuadrupolo, QqQ: triple cuadrupolo, Qq-LIT: triple cuadrupolo-trampa lineal de iones, QTOF: cuadrupolo tiempo de vuelo, Q-Orbitrap: cuadrupolo-Orbitrap, LTQFT-Orbitrap: transformación de fourier trampa iónica lineal-Orbitrap, LTQ-Orbitrap: trampa lineal-Orbitrap, TSQ: triple cuadrupolo.

González-Mariño et al. [50] desarrollaron un método para determinar drogas de abuso en muestras medioambientales líquidas utilizando Oasis HLB y posterior determinación por cromatografía de gases, por lo que los autores seleccionaron solventes apróticos para poder favorecer el proceso de derivatización, el cual es necesario para el posterior análisis de estos compuestos por cromatografía de gases. De esta manera, los autores después de evaluar varios solventes apróticos encontraron los mejores resultados eluyendo los compuestos con 5 mL de acetato de etilo y 8 mL de acetona.

Por otro lado, los sorbentes poliméricos de modo mixto, especialmente los que se basan en la estructura polimérica del Oasis HLB, también han sido eficientemente aplicados en muchos métodos multiresiduo, con la diferencia de que sólo son aplicables a un grupo de compuestos con interacciones electrostáticas similares. En estos sorbentes, el copolímero divinilbenceno/n-vinilpirrolidona es modificado químicamente con grupos iónicos para ser convertidos en 4 tipos de sorbentes de modo mixto: los de intercambio catiónico fuerte (SCX, *Strong Cation Exchange*) patentado por Waters como Oasis MCX, intercambio catiónico débil (WCX, *Weak Cation Exchange*) patentado como Oasis WCX, intercambio aniónico fuerte (SAX, *Strong Anion Exchange*) patentado como Oasis MAX e intercambio aniónico débil (WAX, *Weak Anion Exchange*) patentado como Oasis WAX. Oasis MCX está modificado con grupos sulfónicos ($pK_a < 1$), Oasis WCX con grupos carboxílicos, Oasis MAX con aminas cuaternarias ($pK_a > 18$) y Oasis WAX con grupos piperazina [201].

El sorbente Oasis MCX ha sido repetidamente utilizado en el análisis multiresiduo de drogas de abuso y sus metabolitos (tabla 10) [35, 39-41, 43, 56, 85, 86, 213], principalmente por los grupos aminos que contienen las moléculas de la mayoría de las drogas de abuso, lo que le dan el carácter básico susceptible para ser retenidos en Oasis MCX u otros sorbentes de intercambio catiónico [40]. En este aspecto, Pedrouzo et al. [40] compararon la retención de diez drogas de abuso en dos sorbentes poliméricos: Oasis HLB y Strata X (fase inversa) y en dos sorbentes

poliméricos SCX: Oasis MCX y Strata -XC. Los autores encontraron mejores recuperaciones con los sorbentes SCX, pero utilizando Strata-XC los picos cromatográficos de la morfina y 6-acetil morfina mostraron distorsión, y ante esto los autores escogieron Oasis MCX.

En otro estudio para determinar drogas de abuso en muestras medioambientales líquidas utilizando también Oasis MCX, evaluaron el solvente de elución junto con otros parámetros que también afectan la eficiencia de la SPE como son el pH y volumen de muestra [39]. Dependiendo del tipo de sorbente usado en la SPE, el pH de la muestra puede ser ajustado para incrementar la afinidad de los analitos hacia el sorbente [208]. En este estudio [39], el efecto del pH de la muestra en la retención de los compuestos en el Oasis MCX fue evaluado en un intervalo de pH entre 2.5 y 10. De acuerdo con los resultados de los autores, los compuestos más básicos (p. ej. benzoilecgonina y codeína), mostraron recuperaciones cercanas al 90% en todo el intervalo de pHs evaluado, por lo que los autores argumentan que estos compuestos incluso en su forma neutra, son retenidos eficientemente en sorbentes de modo mixto a través de interacciones propias de la fase reversa. Sin embargo, algunas drogas de abuso como metadona presentaron muy bajas recuperaciones a pHs básicos, requiriendo también la interacción iónica entre la carga positiva del compuesto y el grupo sulfónico del sorbente para ser cuantitativamente extraído de la muestra. Por otro lado, los valores de recuperación del 11-nor-9-carboxi-delta⁹-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) aumentaron con el pH propio de la muestra (sin ajuste de pH). Este compuesto existe como especie neutra solo a $\text{pH} \leq 2.5$ o como especie cargada negativamente a pH superiores de 2.5, por lo que la interacción con el Oasis MCX fue solamente a través de mecanismos de fase inversa. Ante estos resultados los autores encontraron que el pH de muestra adecuado es 4.5 para favorecer el mecanismo dual de retención. En cuanto al volumen de muestra, los autores encontraron que 150 mg de sorbente Oasis MCX puede concentrar hasta 500 mL de muestra de entrada de EDAR sin disminución significativa de la recuperación [39].

Como se indica en la tabla 10, los hipnótico-sedantes principalmente benzodiazepinas también han sido eficientemente retenidos en sorbentes de SCX como Oasis MCX [60, 110, 119, 125] y Strata-XC (comercializado por Phenomenex) [48]. Las benzodiazepinas a un pH de 2.5 tienen especies neutras y especies cargadas positivamente, puesto que esos compuestos pueden aceptar un protón del grupo amino. Por ejemplo, la eficiencia del sorbente polimérico Strata-XC (fase reversa y SCX) en retener/preconcentrar hipnótico-sedantes y drogas de abuso entre otros fármacos (68 compuestos en total) fue comparada con el sorbente Strata-X (fase inversa) [48]. El sorbente Strata-X es un polímero de poli-vinil-3-piperidona-divinilbenzeno con interacción hidrofílica-lipofílica y el sorbente Strata-XC contiene el mismo polímero modificado con grupos sulfónicos. En general, de acuerdo a los resultados del estudio los dos sorbentes mostraron ser eficientes en la retención/preconcentración de las drogas de abuso e hipnótico-sedantes con recuperaciones propias de la SPE entre 90-120%, aunque el THC-COOH mostró pobre retención en ambos sorbentes (10-25%), no obstante, los autores seleccionaron Strata-XC debido a que algunos fármacos no fueron satisfactoriamente recuperados con el Strata-X [48].

En todos los métodos citados anteriormente utilizando sorbentes de SCX el solvente de elución es una solución entre 2 - 7% de NH_4OH en metanol. El solvente en un medio básico es necesario para romper la interacción electrostática entre analito-sorbente invirtiendo el estado iónico del analito [208].

Por otro lado, sorbentes de WAX como Oasis WAX [173] y CNW Poly-Sery PWAX (CNW Technologies GmbH) [168] mostraron alto rendimiento para extraer/preconcentrar edulcorantes de muestras medioambientales líquidas. CNW Poly-Sery PWAX es un copolímero hidrofílico de fase inversa (estireno/divinilbenzeno) modificado químicamente con el grupo funcional dietilaminopropil para obtener un sorbente polimérico de modo mixto con interacciones de fase inversa y WAX, normalmente muy adecuado para compuestos ácidos fuertes.

Gan et al. [168] seleccionaron este sorbente para la extracción/preconcentración de siete edulcorantes de muestras medioambientales líquidas, cuya eficiencia fue comparada previamente con cuatro sorbentes de base sílica con diferentes mecanismos de interacción: CNWBOND LC-C18, CNWBOND HC-C18, CNWBOND PHE y CNWBOND SAX y cinco sorbentes de base polimérica con diferentes interacciones: CNW Poly-Sery MAX, CNW Poly-Sery HLB, CNW Poly-Sery PSD (CNW Technologies GmbH), Oasis HLB y Oasis WAX. Según los resultados obtenidos por los autores, solo tres de estos sorbentes mostraron suficiente capacidad para retener todos los edulcorantes, dos sorbentes de intercambio mixto con interacciones propias de fase inversa y WAX: Oasis WAX, CNW Poly-Sery PWAX y uno de fase inversa e hidrofílico: CNW Poly-Sery PSD. Este último es un copolímero neutro altamente entrecruzado con estireno-divinilbenzeno. Sin embargo uno de los edulcorantes (acesulfamo) mostró más baja recuperación (50%) que utilizando los sorbentes poliméricos de intercambio mixto, en los cuales las recuperaciones fueron $\geq 95\%$ excepto aspartamo (77%). En el caso de aspartamo, los autores argumentan su baja recuperación por la fuerte interacción con el sorbente y a la baja capacidad del solvente de elución para romper esta interacción. En este aspecto los autores evaluaron tres composiciones diferentes de solvente de elución simultáneamente con los 10 sorbentes evaluados: metanol (100%), metanol conteniendo 2% de hidróxido de amonio, y metanol conteniendo 1 mM de tris (hidroximetil) amino metano (TRIS), encontrando como solvente de elución óptimo para los sorbentes de modo mixto (WAX) el metanol 1 mM TRIS.

En este estudio Gan y sus colaboradores también evaluaron la influencia del pH de la muestra en un intervalo de 3 a 10 en los dos sorbentes tipo WAX, encontrando que a $\text{pH} < 9$ la retención de los compuestos en estos sorbentes no varía y la explicación a este hecho es atribuida al pK_a de los sorbentes (aproximadamente 9.8), por tanto los autores decidieron trabajar las muestras sin ajuste de pH. Posteriormente, los autores para determinar la influencia de la matriz en las recuperaciones

con ambos sorbentes WAX, utilizaron agua del grifo, de río y de mar en el proceso de SPE, por lo que observaron mejor eficiencia con CNW Poly-Sery PWAX [168].

Otros sorbentes de base polimérica en fase inversa como PLRP-s (polímero entrecruzado con estireno-divinilbenzeno) e hySphere resin GP (polímero de polidivinil-benzeno) han sido utilizados en métodos multiresiduo basado en *on-line* SPE. *On-line* SPE típicamente consiste en el acoplamiento de la SPE al sistema cromatográfico, aunque algunos métodos realizan el acoplamiento directamente a los sistemas de detección (habitualmente espectrómetros de masas). En la *on-line* SPE, con la automatización de los pasos de acondicionamiento, lavado y elución, el desarrollo del método es más rápido que en los métodos basados en *off-line* SPE, y el volumen de la carga de la muestra y el consumo de solvente es mucho más bajo. Otras ventajas del acoplamiento es la disminución del riesgo de contaminación de la muestra, eliminación de pérdida de analito por evaporación o degradación durante la preparación por lo que mejora la precisión y exactitud. Igualmente, la sensibilidad aumenta debido a la transferencia de la totalidad de la muestra al sistema de detección [214]. Sin embargo, tiene como inconvenientes que el análisis puede presentar mayor efecto matriz, menos flexibilidad para combinar el uso de diferentes cartuchos de SPE, limitada portabilidad y equipamiento costoso en comparación con SPE.

La eficiencia de *on-line* SPE ha sido demostrada en algunos estudios (tabla 10) para determinar drogas de abuso [49, 53, 59] y filtros ultravioleta [215] en muestras líquidas usando como sorbente de extracción/preconcentración el PLRP-S, mientras que otro estudio demostró la eficaz aplicación para determinar hipnótico-sedantes usando el sorbente hySphere resin GP [106]. En otro estudio para determinar sucralosa utilizaron *on-line* SPE con una mezcla de sorbentes para incluir un *clean-up* en el mismo proceso; estos sorbentes fueron situados de la siguiente manera: la primera capa con Oasis HLB y en la capa posterior una mezcla de sorbentes constituida por Isolute ENV+, Strata X-CW y

Strata X-AW [176]. Isolute ENV+ es un sorbente de fase inversa de estructura hiper-entrecruzada de poliestireno-divinilbenzeno, por otro lado, Strata X-CW (WCX) y Strata X-AW (WAX), como ya se ha comentado son sorbentes de modo mixto con base polimérica poli-vinil-3-pipridona-divinilbenzeno modificados químicamente con ácido carboxílico y grupos di-amino, respectivamente.

En los últimos años, investigaciones con MIPs como sorbentes selectivos para la SPE han demostrado que son validos para la extracción de uno o más PCPs de varias matrices. Esta técnica de extracción es conocida como extracción en fase sólida con impresión molecular (MISPE, *Molecular Impresión SPE*). El proceso de impresión usualmente empieza con la interacción entre el grupo funcional del monómero y la molécula plantilla en un solvente que actúa como agente porógeno. El complejo es luego polimerizado a través de foto-iniciación o térmicamente en presencia de un entrecruzador, produciendo una estructura tridimensional. Finalmente la molécula plantilla es extraída de la estructura polimérica permitiendo la creación de sitios unidos específicamente. Entre las ventajas de estos materiales destacan la sencillez y rapidez de preparación de muestra y la elevada estabilidad química, física y térmica [200].

En este aspecto, una publicación muy reciente de Figueiredo et al. [200] recopila las últimas tendencias en materiales altamente selectivos de MIPs para la extracción/preconcentración de PCPs, con particular énfasis en el diseño, preparación y aplicación de los MIPs con muestras medioambientales. Según los estudios de MISPE para PCPs recopilados en esa publicación, la mayoría de MIPs fueron sintetizados usando la misma molécula del compuesto a determinar. Los monómeros funcionales más comunes para la impresión molecular son el ácido metacrílico (MAA), ácido acrílico (AA) y 2 o 4-vinilpiridina (2-o 4-VP). Entre estos el MAA fue el más utilizado seguido del 4-VP, particularmente para la determinación de parabenos. MAA es normalmente seleccionado debido a la posibilidad de interactuar con la molécula plantilla a través de

interacciones no covalentes y covalentes. En cuanto a los agentes entrecruzadores, el etilenglicol dimetacrilato (EGDMA), trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM) y divinilbenceno (DVB) son los más utilizados para la producción de MIPs, siendo el EGDMA mas ampliamente usado en MIPs para PCPs.

Sensores basados en MIPs también han sido introducidos en métodos para determinar PCPs. Con esta técnica el polímero de impresión se acopla con un transductor que convierte las propiedades sensoras del MIP en una señal medible. La sensibilidad del sensor resultante se ve directamente afectada por la afinidad mostrada por el polímero impreso hacia el analito. Por lo tanto es deseable usar partículas impresas en tamaños de micro o nanómetros con alta relación superficie/volumen. De esta manera, sensores basados en MIPs han sido aplicados eficazmente en métodos para determinar triclosan y parabenos, reduciendo tiempo y costos de preparación de muestra que con los MIPs convencionales [200].

Por otro lado, muy recientemente Zarejousheghani et al. [164] sintetizaron un MIP de intercambio iónico el cual fue completamente eficaz para la extracción/preconcentración de acesulfamo de muestras de agua residual. Los autores usaron cloruro de vinilbencil trimetil amonio (VBTA) como novedoso monómero funcional y catalizador de transferencia de fase. VBTA aumentó la solubilidad del acesulfamo cargado negativamente en el diclorometano que es usado como solvente orgánico (porógeno).

En la búsqueda por minimizar o eliminar el empleo de disolventes orgánicos en muchos casos costosos y/o tóxicos, las técnicas miniaturizadas tanto en fase sólida como líquida han experimentado en los últimos años un enorme auge, además de que son técnicas simples, rápidas en efectuar, fáciles de automatizar y relativamente de bajo coste. Entre las técnicas miniaturizadas en fase sólida destacan la microextracción en fase sólida (SPME, *Solid-Phase Micro Extraction*), microextracción mediante sorbentes empaquetados (MEPS, *Micro Extraction by Packed sorbent*),

microextracción en fase sólida dispesiva (DMSPE, *Dispersive Micro Solid Phase Extraction*) y extracción por sorción en barra agitadora (SBSE, *Stir-Bar Sorptive Extraction*) [216]. En la figura 11 se muestran algunas de las configuraciones de SPME, el fundamento de cada una de las cuales está explicado en profundidad en la publicación de Souza-Silva et al. [217].

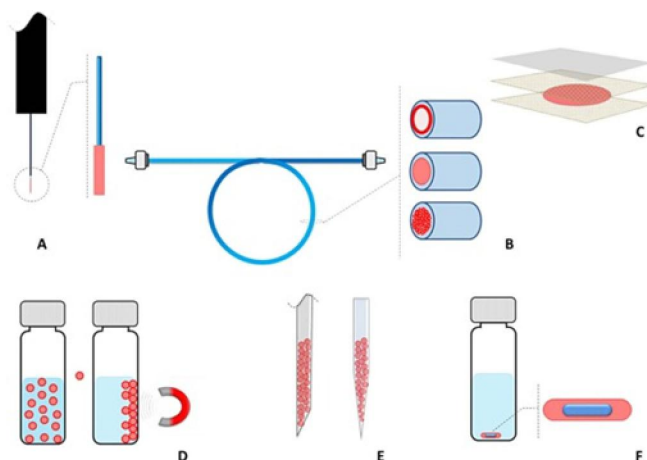


Figura 11. Algunas configuraciones en SPME: (A) Fibra. (B) En Tubo. (C) Capa delgadas. (D) Magnética. (E) En punta. (F) Agitación. [217]

De las configuraciones estudiadas, las técnicas de microextracción en fase sólida han sido principalmente aplicadas a la extracción de PCPs. Los PCPs son un grupo de contaminantes extensamente estudiado en muestras de diferentes orígenes (aguas de río, lagos, aguas residuales, agua potable y agua subterránea), por lo que en la bibliografía se encuentra una gran cantidad de métodos desarrollados utilizando una amplia variedad de técnicas de extracción además de la SPE. En una publicación reciente de Díaz-Cruz et al. [218] se recopila la mayoría de métodos analíticos que

han sido usados para la determinación de los PCPs en muestras medioambientales líquidas. De acuerdo con esta publicación, entre las técnicas de microextracción basadas en fase sólida las más extensamente utilizadas para estos compuestos son SPME y SBSE.

La SPME consiste en una fibra delgada de sílice fundida, recubierta de un sorbente que atrapa los analitos. Conforme a la publicación de Díaz-Cruz et al. [218], las fibras más comúnmente utilizadas en SPME para la extracción/preconcentración de los PCPs han sido el polidimetilsiloxano (PDMS) de carácter apolar y poliacrilato (PA) de carácter polar. Igualmente fibras de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), carbowax-divinilbenzeno (CW-DVB) o carboxeno-divinilbenzeno (CAR-DVB) también han sido usadas.

La SBSE consiste de una barra magnética agitadora recubierta con una pequeña cantidad de sorbente. Entre los recubrimientos más usados en SBSE el más común es PDMS, principalmente porque hasta hace pocos años no se habían comercializado otros recubrimientos con interacciones polares [218]. En este aspecto, recientemente Gilart et al. [219] compararon el PDMS (nombre comercial PDMS Twister) con dos recubrimientos polares de PA con una proporción de polietilenglicol (PEG) (nombre comercial Acrylate Twister) y PEG con silicona modificada (nombre comercial EG Silicone Twister) para extraer PCPs de muestras de agua residual, demostrando que el recubrimiento EG Silicone extrajo algunos de los compuestos polares más eficientemente mientras la retención de los compuestos apolares fue mejorada en comparación con los otros dos recubrimientos.

Por otra parte, entre las técnicas de microextracción en fase líquida (LPME, *Liquid Phase Micro Extraction*) se encuentran la microextracción en gota (SDME, *Single Drop Micro Extraction*), microextracción líquida en fibra hueca (HF-LPME, *Hollow fiber Liquid Phase Micro Extraction*), extracción en punto de enturbiamiento (CPE, *Cloud-Point Extraction*), extracción líquido-líquido con membrana asistida (MALLE, *Membrane-*

Assited Liquid-Liquid Extraction), y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*) [220, 221]. En la figura 12 se presentan algunas configuraciones de la LPME, cuyos funcionamientos están explicados en profundidad en una publicación reciente de Padrón et al. [221].

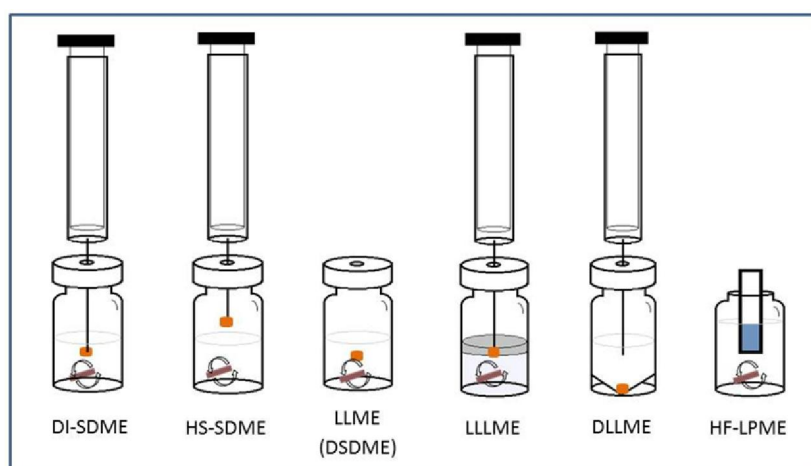


Figura 12. Algunas configuraciones de la LPME [221].

Modificaciones en la SDME, HF-LPME y DLLME también han surgido en los últimos años como técnicas alternativas de extracción de contaminantes de interés emergente en muestras medioambientales líquidas [220, 221]. Por ejemplo, muy recientemente Caldas et al. [222] aplicaron la microextracción líquido-líquido dispersiva con solvente des-emulsificante (SD-DLLME, *Solvent Demulsification Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*) en un método multiresiduo, el cual incluía la extracción de fármacos y PCPs de aguas de río. Esta técnica es una modificación de la DLLME con la inclusión de un solvente

desemulsificante. En esta investigación evaluaron el tipo y volumen del solvente dispersante y de extracción, pH, la adición de sal y el tipo de solvente desemulsificante. Los mejores resultados los obtuvieron utilizando octanol como solvente de extracción, acetona como solvente dispersante, y agua como solvente desmulsificante. La técnica permitió obtener recuperaciones en un intervalo de 61-130% para todos los compuestos objeto de estudio, y entre este intervalo las recuperaciones de la carbamazepina, algunos parabenos, triclocarban y triclosan, fueron entre 77% y 111%.

Generalmente, las técnicas de LPME implican la extracción de muestras líquidas o sólidas con muy bajos volúmenes de solvente (μL o sub μL), permitiendo altos factores de concentración. LPME se desarrolla normalmente usando una pequeña cantidad de solvente inmisible con agua y una fase líquida conteniendo el analito de interés [221].

En términos generales, las técnicas de microextracción basadas en fase sólida consumen más tiempo que las basadas en fase líquida, debido a que la difusión del analito a través del recubrimiento estará más dificultada, por tanto, más lenta será la cinética de extracción, demorando la transferencia de masa. En las técnicas de microextracción en fase líquida solo se requieren tiempos muy largos cuando el solvente de extracción permanece estático como en la SDME, HFLPME o MALLE. Sin embargo, tiempos de extracción muy cortos son suficientes en la DLLME debido a que el contacto entre la fase del donador y el receptor es infinitamente larga y el estado de equilibrio es alcanzado instantáneamente [218].

1.2.1.2 Técnicas de extracción para muestras sólidas

La mayoría de métodos analíticos encontrados para la determinación de las drogas de abuso, hipnótico-sedantes, edulcorantes y PCPs están principalmente enfocados en matrices medioambientales líquidas. Pocos

métodos han sido desarrollados para la determinación de estos contaminantes en matrices sólidas.

Las muestras sólidas son matrices muy complejas, puesto que además de contener contaminantes orgánicos, en el caso de lodos también contienen otras sustancias que son adicionadas durante el tratamiento en las EDARs (p. ej. tensoactivos, agentes coagulantes, polímeros coloidales o cal). Todo el conjunto de esta composición de sustancias convierte en un reto la determinación de los contaminantes de interés emergente a niveles traza en las muestras sólidas. Así mismo, otro factor que genera dificultad en la extracción de este tipo de matriz, es que la interacción entre los analitos y la muestra suele ser más intensa que en el caso de las matrices líquidas [217, 218].

Usualmente, la extracción del analito de interés implica la desorción del compuesto de la matriz sólida y luego en disolución en un solvente apropiado o diferentes mezclas de solventes. Con el objetivo de alcanzar suficiente sensibilidad y selectividad, el proceso de extracción generalmente requiere el tratamiento de una cantidad considerable de muestra, el desarrollo de extracciones repetidas para asegurar el aislamiento completo del analito de interés, una etapa de limpieza del extracto y la evaporación del disolvente. Todos estos pasos son necesarios para incrementar la eficiencia de extracción, sensibilidad y minimizar o eliminar las interferencias que puedan afectar la determinación del compuesto o compuestos de interés [218].

En la última década, los métodos de extracción para muestras medioambientales sólidas usualmente han estado basados en partición sólido-líquida con extracción asistida por ultrasonidos (UAE, *Ultrasound-Assisted Extraction*), extracción asistida por microondas (MAE, *Microwave-Assisted Extraction*), extracción con fluidos supercríticos (SFE, *Supercritical Fluid Extraction*), o con técnicas más avanzadas como extracción con líquidos presurizados (PLE, *Pressurized Liquid Extraction*), las cuales han reemplazado la extracción con Soxhlet. Estas

técnicas ofrecen importantes beneficios como tiempos de extracción cortos, bajo consumo de solvente y mínima manipulación de la muestra en comparación con el proceso tradicional de extracción con Soxlet [217]. Usualmente en el proceso de preparación de muestra, un paso de *clean-up* es necesario, debido a que las técnicas de extracción sólido-líquido no aportan suficiente selectividad. En este aspecto, la SPE ha demostrado ser muy efectiva en el *clean-up* de los extractos que se obtienen después del proceso de extracción [218]. Además, la SPE también resulta muy adecuada como técnica de preconcentración.

Recientemente otras tendencias nuevas en preparación de muestra sólidas han surgido como alternativas eficientes para la extracción/preconcentración de los contaminantes de interés emergente, como son técnicas de microextracción (principalmente SPME), QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, *Matrix Solid Phase Dispersion*) o combinaciones entre estas técnicas [217, 223].

En esta sección haremos mayor énfasis en aquellas técnicas que han sido utilizadas para extraer los 4 grupos de contaminantes estudiados en esta Tesis, las cuales son principalmente UAE y PLE. La tabla 11 muestra un resumen de varios métodos analíticos encontrados en la bibliografía para determinar drogas de abuso, hipnótico-sedantes, edulcorantes y PCPs en muestras de fangos de depuradora.

En la técnica UAE el efecto mecánico de los ultrasonidos provoca una mayor penetración del solvente en los sólidos, facilitando la transferencia de los analitos de la matriz al disolvente. La elección del solvente es esencial para la completa extracción de los analitos de interés, siendo los solventes de extracción más típicos metanol, etanol, acetonitrilo y acetona.

De acuerdo con la bibliografía revisada (tabla 11), se han desarrollado varios métodos para la determinación de drogas de abuso [33, 34, 75, 140], hipnótico-sedantes [72, 128, 147, 148], edulcorantes [166, 186] y

PCPs [224, 225] en fangos de depuradora o partículas en suspensión basados en UAE. En general, una composición de metanol:agua en diferentes proporciones ha sido el solvente óptimo de extracción en todos estos estudios excepto en el caso de los PCPs, donde otros solventes han sido utilizados (p. ej. acetonitrilo). En un estudio [225] para determinar PCPs y carbamazepina, entre otros contaminantes en fangos de EDAR, evaluaron metanol, acetona, acetonitrilo y tres mezclas de cada uno de estos solventes con agua (solvente:agua, 5:3, v/v), obteniendo resultados satisfactorios con todos los solventes puros para la mayoría de los PCPs, probablemente por la lipofilicidad moderada de los compuestos. Sin embargo, el acetonitrilo y la acetona mostraron pobre eficiencia de extracción para otros compuestos objeto de estudio (β -bloqueadores) y el metanol propició recuperaciones relativamente altas para otros compuestos (bisfenol >120%), y entre las tres composiciones, acetonitrilo:agua presentó recuperaciones satisfactorias para todos los compuestos (63-119%).

Cabe destacar que en el caso de la extracción de las drogas de abuso la acidificación del solvente de extracción ha favorecido la extracción de los compuestos (carater básico) de la matriz sólida [34, 75, 140]. Por ejemplo, muy recientemente Álvarez-Ruiz et al. [75] extrajeron siete drogas de abuso de diferentes matrices medioambientales sólidas con 10 mL de metanol:tampón McIlvaine pH 4.5 (1:1, v/v), obteniendo recuperaciones $\geq 50\%$ para la mayoría de compuestos. Los autores argumentan que algunos analitos no están cargados usando el solvente a pH neutro y que la extracción aumenta en un medio ácido porque favorece que estos analitos se cargen positivamente favoreciendo la extracción y solubilización de los analitos. Igualmente, Gago-Ferrero et al. [140] desarrollaron un método multiresiduo para la determinación de 148 contaminantes de interés emergente (incluyendo drogas de abuso e hipnótico-sedantes) en fangos de depuradora. En este estudio, 0.1% EDTA en agua pH 2.5, metanol, acetonitrilo, acetona y acetato de etilo fueron comparados para evaluar su eficiencia en extraer los analitos de la matriz sólida.

Tabla 11. Métodos analíticos para determinar drogas de abuso (DA) hipnótico-sedantes (HS), edulcorantes (EAD) y PCPs en muestras sólidas.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción		Técnica de Separación (Columna)	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/g)	Ref.
		Técnica Solvente	Clean-up Sorbente					
DA	Fangos	UAE Metanol:agua (5:3, V/V)	SPE Oasis HLB	LC Ultra Biphenyl (5µm, 100x2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	73-128	0.1-1	[33]
DA	Fangos Sedimentos SPM	USE Metanol:McIlvain pH 4.5 (1:1, v/v)	SPE Strata X	UPLC Kinetex XB-C ₁₈ (1.7µm, 50x2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	14-106	0.04 - 1.2	[75]
Fármacos DA HS	Fangos	UAE Metanol:agua 0.1%EDTA pH 2.5 (1:1, V/V)		LC Atlantis T3 C ₁₈ (3µm, 100x2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	46-119	1-5	[140]
DA	SPM	UAE Metanol:agua ácida (20:80, v/v)	SPE Oasis MCX	LC Genesis C ₁₈ (4µm, 150x3 mm)	MS (ESI) QTrap	70-87	0.01- 0.05	[34]
DA HS	Fangos	PLE Metanol:agua (9:1, v/v)	SPE Evolute ABN	LC Purospher Star C ₁₈ (5µm, 125x2 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	41-113	0.1-2.5	[73]
DA HS PCPs	Fangos	PLE metanol		UPLC Acquity BEHC ₁₈ (1.7µm, 50x2.1 mm)	MS (ESI) Q	114- 130	2-20	[74]

Tabla 11. Continuación.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción		Técnica de Separación (Columna)	Técnica de detección	%Rec	LOD (ng/g)	Ref.
		Técnica Solvente	Clean-up Sorbente					
DA HS	SPM	UAE Metanol:agua (5:3, V/V)	SPE Oasis HLB	UPLC Acquity BEHC ₁₈ (1.7µm, 50x1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	38-91	0.02- 0.4	[76, 77]
HS	Fangos	UAE Metanol:agua (5:3, V/V)	SPE Oasis HLB	LC Hypersil Gold C ₁₈ (3µm, 150x2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	96	1	[148]
Carbamazepina	Fangos	PLE Acetona:agua (3:7, V/V)	SPE Oasis HLB	LC Genesis C ₈ (3µm, 150x2.1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	92	170	[127]
DA HS PCPs	Fangos	QuEChERS		LC Poroshell 120 EC- C ₁₈ (2.7µm, 150x2.1 mm)	HRMS (ESI) TOF	21-91	2-42	[145]
Fármacos HS	Fangos	PLE Metanol:agua (1:2, V/V)	SPE Oasis HLB	LC Purospher Star C ₁₈ (5µm, 125x2 mm)	MS/MS (ESI) QqLIT	93-121	0.1-7	[141, 143] [142]
HS	Fangos	UAE Metanol:agua pH 2(1:1, v/v)	SPE Strata-XC	UPLC Kinetex XB-C ₁₈ (1.7µm, 100x2.1 mm)	MS (ESI) QqQ	71	0.05	[147]

Tabla 11. Continuación.

Grupo	Matriz	Técnica de extracción		Técnica de Separación (Columna)	Técnica de detección	%Rec.	LOD (ng/g)	Ref.
		Técnica Solvente	Clean-up Sorbente					
Fármacos HS	Fangos	PLE Agua	SPE Isolute SAX Oasis HLB	LC Sunfire C ₁₈ (3,5µm, 150x4,6 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	85-78	0.2-0.8	[144]
Edulcorantes PCPs	Fangos	UAE Metanol:agua (5:3, V/V)	SPE Oasis HLB	LC Hypersil Gold C ₁₈ (3µm, 150x2,1 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	49-124	5	[166, 186]
Edulcorantes	Fangos	PLE agua 500 mM formiato de amonio pH 3.5	SPE Oasis HLB	LC Luna C ₁₈ (3µm, 100x2 mm)	MS/MS (ESI) QqQ	87-105	0.3-16 (LOQ)	[187]

Abreviatura: Ref.: referencia, %REC: % recuperación, SPE: extracción en fase sólida, PLE: extracción con líquidos presurizados, UAE: extracción asistida por ultrasonidos, LC: cromatografía de líquidos, UPLC: cromatografía líquida de ultra alta resolución, MS/MS: espectrometría de masas en tándem, ESI: ionización electrospray. **Analizadores:** QqQ: triple cuadrupolo, Qq-LIT: triple cuadrupolo-trampa lineal de iones, TOF: tiempo de vuelo.

Gago-Ferrero et al. [140] también evaluaron diferentes composiciones de estos solventes: 0.1% EDTA en agua ácida:metanol (1:1, v/v), 0.1% EDTA en agua ácida:metanol:acetona (1:1:1, v/v), 0.1% EDTA en agua ácida:metanol:acetato de etilo (1:1:1, v/v). Según la discusión de resultados de los autores, el uso de acetona, acetato de etilo o acetonitrilo no fueron eficientes en la extracción de la mayoría de los compuestos. El uso de las diferentes composiciones de solventes favoreció el proceso de extracción, siendo 0.1% EDTA en agua ácida:metanol (1:1, v/v) la composición más eficiente.

En los métodos basados en UAE encontrados en la bibliografía referente a los 4 grupos de contaminantes foco de estudio en esta Tesis, la extracción ha requerido tiempos de sonicación que varían entre 10-30 min. Así por ejemplo, mientras Subedí et al. [33] necesitaron 30 minutos de sonicación para extraer las drogas de abuso de fangos, Álvarez-Ruiz et al. [75] indicaron que 10 minutos son suficientes para extraerlas de los fangos.

Después de la sonicación, los analitos extraídos son separados de la muestra sólida por filtración o centrifugación. El proceso es repetido usualmente dos o tres veces para alcanzar una eficiencia alta en la extracción. En el caso de los hipnótico-sedantes, el proceso de extracción con UAE lo han efectuado solo con un ciclo [72, 128, 147, 148].

Después de la extracción con UAE, la mayoría de métodos han incluido la etapa de *clean-up* basada principalmente en SPE. Como muestra la tabla 11, el sorbente utilizado comúnmente es Oasis HLB, el cual ha sido incluido en métodos para drogas de abuso [33], hipnótico-sedantes [148], edulcorantes [166, 186] y PCPs [225], aunque sorbentes con interacción de intercambio catiónico como Oasis MCX (drogas de abuso) [34] y Strata-XC (hipnótico-sedantes) [147] también han sido aplicados.

Por otro lado, MISPE también ha sido utilizado como estrategia de *clean-up* en métodos para determinar contaminantes en matrices sólidas.

Por ejemplo, Nuñez et al. [224] desarrollaron un método para determinar parabenos en fangos de depuradora en el que la preparación de la muestra fue realizada con UAE seguido de MISPE como *clean-up*. Para esta finalidad, los autores prepararon un MIP polimérico para el bencilparaben. La combinación de estas dos técnicas permitió a los autores obtener recuperaciones entre 80% y 90%.

PLE es una técnica de extracción sólido-líquido que combina la utilización de temperaturas (40-200°C) y presiones elevadas (500-3000 psi), con disolventes en estado líquido para proporcionar una extracción rápida y eficaz de los analitos de la matriz sólida, contenidos en una celda de acero sellada. La transferencia de los analitos de la matriz al solvente está fuertemente influenciada por la polaridad del solvente y sus propiedades físicas, que se correlacionan con otros parámetros del proceso [226].

En términos generales, para compuestos polares los solventes más apropiados son agua, metanol o acetonitrilo, y para compuestos menos polares los solventes suelen ser acetona, diclorometano, hexano o heptano. Así mismo, el uso de diferentes composiciones de solventes ha demostrado que en algunos casos mejora la interacción del solvente con el compuesto facilitando la desorción de este de la matriz sólida. De esta manera, mientras que uno de los solventes favorece la solubilidad del analito, el otro favorece la desorción de éste. En este contexto, el agua normalmente resulta ser muy útil para romper la interacción de hidrógeno que pueda tener el analito-matriz [226]. Por ejemplo, Mastroianni et al. [73] encontraron una composición de metanol:agua (9:1, v/v) como solvente de extracción óptimo para extraer drogas de abuso y algunas benzodiazepinas de fangos de depuradora, recuperando entre 18-80%, mientras que Baker et al. [77] encontraron como óptima una composición metanol:agua (1:1, v/v) a pH 2 para extraer 60 contaminantes de interés emergente, incluyendo drogas de abuso e hipnótico-sedantes de partículas suspendidas, con recuperaciones para estos dos grupos de contaminantes entre 76-109%. En este estudio, metanol y varias composiciones de

metanol:agua a pH 2 fueron también probadas, observando poca influencia de las diferentes composiciones en las recuperaciones de la mayoría de compuestos. En el estudio de Mastroianni et al. [73] los autores evaluaron también una composición de metanol:acetona (1:1, v/v), pero compuestos como EDDP, morfina y diazepam presentaron recuperaciones más bajas que usando metanol:agua.

Otros estudios multiresiduo que incluyen hipnótico-sedantes también han aplicado PLE con solvente de extracción metanol:agua (1:2, v/v) [108, 141-143] y agua neutra [144] (tabla 11). En estos métodos, no se realiza ajuste de pH al solvente de extracción, principalmente porque los compuestos a analizar presentan diferentes propiedades físico-químicas y de este modo se alcanza un balance en el proceso de extracción para todos los compuestos. En otro estudio para la determinación de PCPs en fangos de depuradora, después de evaluar diferentes solventes con una amplia polaridad, seleccionaron metanol con otro ciclo consecutivo de extracción con una composición de metanol:agua (1:1, v/v) [227].

Como se ha explicado anteriormente en la técnica con UAE, el pH del solvente de extracción también es un factor importante en el proceso de extracción con PLE. Ordoñez et al. [187] evaluaron agua neutra, agua a pH 3.5 y dos soluciones tampón en agua:formiato de amonio 50 y 500 mM ajustado a pH 3.5, para la extracción de edulcorantes de alta intensidad en fangos de depuradora. Para estos compuestos el pH no afecta la extracción y tan solo el aspartamo presentó un aumento considerable en la recuperación usando 500 mM formiato de amonio en agua pH 3.5, pasando de tener recuperaciones < 5% a ser recuperado un 80% con este tampón. Los autores atribuyen este hecho a que la respuesta del aspartamo en el instrumento de detección se reduce con el incremento del pH, y que solo el tampón a la mayor concentración es capaz de mantener el pH en los extractos del PLE (pH 3.7), mientras que el resto de soluciones probadas como solvente de extracción carecen de suficiente capacidad tampón, por lo que el pH de los extractos del PLE se eleva entre 6-7.

En el PLE, la desorción, difusión, solvatación y otros mecanismos de transporte son controlados por la temperatura y presión. Casi siempre la presión de trabajo es 1500 psi. Por su parte, las altas temperaturas disminuyen la viscosidad del solvente y la tensión superficial, permitiendo su mejor penetración en la matriz sólida. De esta manera, temperaturas suficientemente altas promueven la solubilidad del compuesto y la cantidad de masa transferida. En el caso de agua como solvente de extracción, el aumento de temperatura disminuye su constante dieléctrica significativamente, favoreciendo la cinética de extracción principalmente para los compuestos no polares, y así el solvente orgánico puede ser usado en bajas cantidades o evitado [226]. Vazquez-Roig et al. [144] demostraron que el aumento de temperatura de 50 a 90 °C, la extracción con agua de algunos fármacos como diazepam y codeína se favorece, los cuales alcanzaron recuperaciones $\geq 80\%$, sin embargo a temperaturas > 90 °C algunos compuestos sufrieron degradación térmica.

En ese aspecto, temperaturas altas también podría conllevar a la degradación de los compuestos, o pérdida de selectividad, puesto que también podrían extraer otros compuestos que no son objeto de estudio (interferencias) lo que podría conllevar al aumento del efecto matriz [226].

En general, la aplicación de PLE para extraer drogas de abuso de fangos y partículas en suspensión ha sido utilizando temperaturas en un intervalo entre 50-80 °C [73, 74, 77], para los hipnótico-sedantes se han extraído a 90 °C [144] y 100 °C [108, 141-143], los edulcorantes a 80 °C [187] y PCPs a 100 °C [227, 228].

Otros factores que también influyen en el proceso de extracción con PLE son el tiempo de extracción estático y el número de ciclos. El tiempo estático debe ser lo suficientemente largo para mantener el contacto entre los compuestos y el solvente de extracción [226]. En los diferentes estudios citados anteriormente, han requerido tiempos de extracción entre 5 y 10 minutos, aunque en el estudio de edulcorantes el tiempo de extracción estático necesitó de 21 minutos [187]. El número de ciclos es

importante porque introduce solvente fresco para mantener un equilibrio adecuado entre solvente-matriz y así mejorar la difusión de los analitos en el solvente de extracción [77]. Ciclos entre 1 y 3 han sido utilizados en el PLE. Por ejemplo, mientras Mastroianni et al. [73] solo necesitaron 1 ciclo para extraer drogas de abuso e hipnótico-sedantes de fangos de depuradora, Baker et al. [77] requirieron de 3 ciclos para extraerlos de la matriz siendo material particulado en suspensión. En este último estudio, los autores muestran un aumento considerable en las recuperaciones de los compuestos principalmente de las drogas de abuso, por mencionar los ejemplos más significativos, compuestos como EDDP, cocaína y dihidrocodeína presentaron recuperaciones < 30% con un ciclo, las recuperaciones aumentaron hasta el 80% para cocaína y dihidrocodeína, y en el caso de EDDP la recuperación aumentó de 10% a 45%. Por otro lado, los autores obtuvieron recuperaciones para las benzodiazepinas cercanas al 80% utilizando un ciclo, las cuales no mostraron cambios significativos al aumentar el número de ciclos.

Generalmente, para reducir la formación de partículas en grumos y ayudar a la canalización del disolvente en la celda de extracción, la muestra se mezcla con un agente inerte dispersante/desecante, usualmente estos suelen ser tierra de diatomeas, arena de mar o hidromatriz [226]. Normalmente el agente dispersante/desecante no afecta el proceso de extracción, pero es un factor que se debe tener en consideración por si existe alguna interacción con el compuesto objeto de estudio.

Aunque PLE ofrece fácil manipulación de la muestra, tiempo de extracción corto, completamente automatizado, consumo de solvente relativamente bajo y requiere poca cantidad de muestra, presenta como inconveniente, al igual que las otras técnicas basadas en partición líquida, baja selectividad hacia el analito objeto de estudio [229]. En los últimos años, la mayoría de estudios de contaminantes de interés emergente basados en PLE han llevado a cabo el proceso de extracción y *clean-up* simultáneamente, así los analitos de interés son extraídos mientras que las interferencias de la matriz se eliminan en el mismo proceso de extracción,

por la incorporación de sorbentes en la celda de extracción. De esta manera, los compuestos interferentes son atrapados por un sorbente adecuado, incrementando la selectividad de los compuestos objeto de estudio [226, 229]. Varios términos analíticos han sido usados para describir esta técnica, incluyendo extracción selectiva con PLE (SPLE, *Selective PLE*), extracción mejorada con PLE (EPL, *enhanced PLE*), *in-situ clean-up* e *in-cell clean-up* [229].

El grado de interacción que presenta el sorbente es un factor importante en la selección de este. La interacción debe ser interferencia-sorbente, así las interferencias son retenidas, mientras que los compuestos objeto de estudio son solubilizadas en el solvente de extracción [229].

La aplicabilidad de SPLE ha sido demostrada en varias investigaciones para la determinación de varios grupos de contaminantes de interés emergente en muestras sólidas, incluyendo fangos, sedimentos, polvo y tejidos biológicos [229]. Sin embargo, para el grupo de contaminantes de interés emergente foco de estudio en esta Tesis, la evaluación de sorbentes para SPLE se limita sólo a dos estudios que investigan edulcorantes [187] y PCPs [228]. Canosa et al. [228] compararon las recuperaciones de los compuestos utilizando Florisil, alúmina, sílica y C_{18} . Sílica y C_{18} no presentaron cambios significantes en las recuperaciones. La utilización de Florisil y alúmina proporcionó extractos de PLE más limpios visualmente y cromatogramas más limpios o sin mucho ruido de fondo, pero Florisil presentó recuperaciones más altas que usando alúmina. En este estudio también incluyeron una limpieza con solvente para reducir la presencia de interferencias no polares que son pobremente retenidas en Florisil. Para esto, los autores realizaron el primer ciclo de extracción con hexano el cual no solubiliza a ninguno de los compuestos objeto de estudio (parabenos y triclosan). Posteriormente, los compuestos objeto de estudio fueron extraídos con acetato de etilo.

Ordoñez et al. [187] evaluaron tres sorbentes: C_{18} , PSA (sílica enlazada con grupos etilenodiamina-N-propil) y Florisil. En términos de

recuperación y efecto matriz los autores observaron que ninguno de estos sorbentes proporcionó significativo *clean-up* al proceso de extracción, obteniendo resultados similares para los tres sorbentes, por lo que los autores decidieron llevar a cabo el proceso de PLE sin adición de sorbente en la celda. Por otro lado, los autores también evaluaron como alternativa de *clean-up*, someter los extractos del PLE a SPE con Oasis HLB. Según los autores, SPE resultó eficiente en la retención de las interferencias, favoreciendo las recuperaciones de algunos compuestos, como por ejemplo, el ciclamato que presenta una recuperación del 70% sin *clean-up* con SPE y aumenta hasta 94%; al incluir el *clean-up* de este modo, los autores obtuvieron recuperaciones para todos los compuestos en un intervalo de 94-116% por disminución del efecto matriz [187].

En otro estudio [144] para determinar fármacos, incluyendo codeína, carbamazepina y diazepam en sedimentos de pantanos, el proceso de *clean-up* de los extractos del PLE lo realizaron acoplado dos tipos diferentes de sorbentes de SPE. El acoplamiento consistió en ubicar el cartucho de SPE Isolute SAX por encima del cartucho Oasis HLB. Con esta configuración, el sorbente SAX reduce las interferencias de la matriz por la adsorción de ácidos húmicos y fúlvicos contenidos en la matriz, evitando contaminación y sobrecarga del Oasis HLB. Los extractos acuosos del PLE tienen un pH de 7, por lo que los fármacos bajo estudio se encuentran en su forma neutra o catiónica y, por consiguiente, no son retenidos en el sorbente SAX. Bajo las condiciones óptimas de PLE y posterior *clean-up* con SPE acoplado dos sorbentes, los compuestos presentaron recuperaciones >70% para la gran mayoría.

Como se puede observar en la tabla 11, Oasis HLB también ha sido utilizado como sorbente de *clean-up*/preconcentración de los extractos del PLE en varios estudios investigando hipnótico-sedantes entre otros contaminantes en muestras medioambientales sólidas [141-143]. Mastroianni et al. [73] después de comparar la eficiencia de dos sorbentes poliméricos Oasis HLB y Evolute ABN en *clean-up* para drogas de abuso e hipnótico-sedantes, seleccionaron Evolute ABN, porque mejoró las

recuperaciones de varios compuestos, y entre ellos los más representativos, la morfina que aumenta de 20% a 60%, 6-acetilmorfina de 30% a 75% y diazepam de 22% a 105%.

Una técnica de extracción muy aplicada en muestras de alimentos, pero que actualmente está surgiendo como técnica de extracción de contaminantes de interés emergente en muestras medioambientales sólidas es la Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto y Seguro (QuEChERS, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Esta técnica combina una primera fase de extracción simple con acetonitrilo y diferentes sales y una segunda etapa de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE, *Dispersive Solid Phase Extraction*). Esta última fase permite la eliminación del agua presente en la muestra y *clean-up*, que se consigue adicionando una mezcla de sulfato de magnesio y un sorbente, que puede ser una amina primaria-secundaria (PSA, *Primary-Secondary Amine*), C₁₈, carbón negro grafitado (GCB, *Graphitized Carbon Blank*) o una mezcla de éstos [230].

Recientemente, QuEChERS ha sido aplicado en un método multiresiduo para la determinación de 136 contaminantes de interés emergente en fangos de depuradora. Entre los compuestos se encuentran carbamazepina, codeína, diazepam, triclosan y triclocarban. Se obtuvieron recuperaciones cercanas al 80% para estos cinco compuestos bajo las siguientes condiciones: en la primera etapa del proceso se utiliza 1% ácido acético en acetonitrilo como solvente orgánico base, acetato como tampón y 0.1 M de EDTA en agua como solvente acuoso. 1 mL de heptano es adicionado modificando la composición del solvente orgánico, lo que según los autores redujo el efecto matriz. En la segunda etapa, la dSPE se realiza utilizando PSA como sorbente de *clean-up*.

Recientemente, Cerqueira et al. [230, 231] desarrollaron dos métodos basados en la extracción con QuEChERS para aislar fármacos y PCPs de fangos de estaciones de tratamiento de agua potable. Los compuestos fueron extraídos sometiendo el fango al acetonitrilo acidificado con ácido acético en presencia de las diferentes sales (MgSO₄ y NaCl). En la etapa

de *clean-up* con dSPE, uno de los métodos [231] utilizó el sorbente PSA, obteniendo recuperaciones >50% para todos los compuestos, siendo las recuperaciones de la carbamazepina y de los PCPs entre 84-93%. En el otro método [230], inicialmente evaluaron diferentes sorbentes para dSPE, C₁₈, PSA, carbón negro grafitado (GCB, *Graphitized Carbon Black*), chitin y una mezcla de sorbentes C₁₈+PSA. El sorbente que mostró mejores resultados fue chitin, el cual es un sorbente biopolímero que se encuentra en el esqueleto de los crustáceos, en las paredes celular de los hongos y otros materiales biológicos. Bajo estas condiciones los compuestos presentaron recuperaciones similares en ambos métodos entre 50% y 120%. Por otro lado, el uso de GCB conllevó a la retención de muchos de los compuestos bajo estudio, por lo que los autores argumentan que GCB contiene grupos altamente polares en la superficie, con potencial alto de formar enlaces de hidrogeno, por lo que existe retención fuerte de aquellos compuestos que contienen uno o más grupos activos en su estructura.

En general, la mayoría de las técnicas de extracción para contaminantes de interés emergente en muestras medioambientales sólidas no son selectivas, particularmente cuando se trata de determinar a niveles traza, por eso casi siempre estas técnicas de extracción aplicables solo a muestras sólidas van acompañadas de un *clean-up* para disminuir los posibles interferentes presentes en el extracto de la muestra. Este *clean-up*, como se ha comentado durante esta sección, normalmente se realiza utilizando las técnicas de extracción para muestras líquidas. El método aplicado depende principalmente de la naturaleza de los analitos, el solvente en el cual son disueltos y la complejidad del extracto, pero también depende de la selectividad y la sensibilidad de la técnica analítica utilizada para la determinación del analito y/o analitos objeto de estudio.

1.2.2. Técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas

Como se ha mencionado en previas secciones, la determinación analítica de los contaminantes de interés emergente en las muestras medioambientales, requiere el uso de técnicas que proporcionen sensibilidad, selectividad, precisión y exactitud. Por eso, después de la extracción, *clean-up* y concentración, los contaminantes de interés emergente son determinados normalmente usando técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas. Entre las técnicas cromatográficas más ampliamente utilizadas para la separación de los contaminantes de interés emergente se encuentran la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC). Independientemente de la selectividad del sistema de detección, una buena separación y/o resolución de los compuestos objeto de estudio necesaria, debido a la presencia potencial de sustancias que podrían interferir con la correcta identificación y cuantificación de los compuestos que son de interés en el análisis [232].

La GC es una técnica de separación cromatográfica que mediante el uso de columnas capilares, proporciona una elevada capacidad de resolución para compuestos orgánicos no polares y de volatilidad media-alta. Para el análisis de compuestos medio-altamente polares, termolábiles y volatilidad baja es posible el análisis con GC mediante derivatización de los compuestos o mediante otras alternativas de inyección. Con la derivatización, se consigue que los compuestos sean menos polares, se incrementa su volatilidad y estabilidad térmica. Con la GC, el análisis es menos propenso a sufrir efecto matriz, pero requiere de preparación de muestra más laboriosa, principalmente para aquellos compuestos que requieren derivatización, lo que implica tiempo más largo en la preparación de muestra, y además el uso de reactivos que pueden ser altamente tóxicos y/o cancerígenos [215].

Como muestra la tabla 10, la separación cromatográfica de los contaminantes de interés emergente objeto de estudio en esta tesis por medio de la GC, ha sido demostrada en varios estudios, aún siendo la

mayoría de éstos compuestos polares, de volatilidad baja y termolábiles. Un ejemplo de estos compuestos son las drogas de abuso, las cuales fueron determinadas en aguas residuales [50, 209] y en aguas de río [50] mediante GC acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) con trampa iónica. Después de la derivatización de los compuestos, la separación cromatográfica es realizada utilizando columnas capilares 5% fenil-95%metilsilicona [209] y 5% fenil- 95% metilsiloxano [50] (HP- 5MS), con tiempos de análisis de 5 minutos (3 compuestos) y 45 minutos (13 compuestos), respectivamente. En estos métodos los límites de detección (LOD) fueron de la misma magnitud, entre 1-12 ng/L. Las columnas capilares HP-5MS como fase estacionaria, con típicas dimensiones de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor de película, son las columnas preferidas para la separación de los compuestos en métodos multiresiduos por GC.

Los hipnótico-sedantes, principalmente las benzodiazepinas, aún siendo compuestos polares, han sido también determinadas por GC-MS en muestras medioambientales líquidas [115, 132, 139], incluso sin necesidad de ser derivatizados [119, 131, 139]. A modo de similitud entre los estudios que no aplicaron derivatización de los hipnótico-sedantes, la separación cromatográfica fue llevada a cabo con columnas capilares HP-5MS y utilizando como sistemas de detección de ionización de llama (FID, *Flame Ionization Detector*) [139] y el detector selectivo de espectrometría de masas (MSD) dotados con analizadores de cuadrupolo [119, 131]. Los métodos con detectores MSD alcanzaron LOD (1-5 ng/L, en agua de río) muy inferiores al método con detección FID (20-50 ng/L en agua del grifo). Los MSDs además de aportar sensibilidad también aportan una alta selectividad al método. Por otro lado, los métodos desarrollados con previa derivatización de los hipnótico-sedantes, utilizaron columnas capilares conteniendo en su fase estacionaria 95% dimetil- 5% polisilfenileno (DB-5MS) [115, 132]. En ambos estudios los compuestos fueron detectados por medio de MSD con analizador de cuadrupolo, alcanzando LODs entre 2 ng/L y 4 ng/L.

La determinación de PCPs en varias matrices también ha sido posible por GC-MS gracias a la sililación de los compuestos [233] y a las diferentes estrategias de inyección al sistema como son volúmenes grandes de inyección (LVI) [210] o por medio de la desorción térmica (TD) [234]. González- Mariño et al. [210] desarrollaron un método basado en MEPS acoplado *at-line* a LVI-GC/MS para determinar parabenos y triclosan en aguas residuales. De esta forma, los compuestos adsorbidos en sorbentes de MEPS C₁₈ fueron eluidos directamente dentro del inyector vaporizador de temperatura programable (PTV). Los compuestos fueron separados con la columna capilar HP-5MS en 35 minutos y la detección fue realizada con MSD, permitiendo un intervalo de LOD entre 0.02-0.59 ng/L. Por otro lado, la aplicabilidad de la TD como estrategia para evitar la derivatización de compuestos semivolátiles como son los PCPs ha sido demostrada por Ramírez et al [234]. En este estudio, 28 PCPs fueron determinados en muestras de aire, las cuales fueron muestreadas en tubos rellenos de sorbente que retienen los compuestos y luego éstos son desorbidos térmicamente o inyectados en el sistema cromatográfico. Una columna capilar de media polaridad conteniendo 50% fenil – 50% dimetilpolisiloxano (ZB-50) fue utilizada en este estudio para la separación cromatográfica acoplado a un detector MSD. El método desarrollado por los autores les permitió obtener LODs entre 0.03 ng/m² y 125 ng/m².

Referente a los edulcorantes, solo un estudio ha determinado sucralosa en aguas residuales por medio de GC-MS [211]. La sucralosa fue convertida a un compuesto más volátil mediante derivatización para su separación por GC usando una columna capilar DB-5MS y posterior detección con un espectrómetro de masas de trampa iónica.

Teniendo presente las características físico-químicas de drogas de abuso, hipnótico-sedantes, edulcorantes y PCPs, la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) ha sido la técnica de separación y detección más ampliamente utilizada para la

determinación de estos 4 grupos de contaminantes de interés emergente en matrices medioambientales.

En la separación de estos contaminantes mediante LC, las columnas cromatográficas más ampliamente utilizadas son las que contienen una fase estacionaria en fase inversa (tablas 10 y 11). El uso de LC en fase inversa se ajusta adecuadamente a la determinación de compuestos polares e incluso iónicos, si se hace uso de la formación de pares iónicos. El tipo de material apolar con que se rellena las columnas de LC fase inversa suele ser sílica químicamente modificada con cadenas de grupos octadecil C_{18} u octil C_8 , y con un tamaño de partícula usualmente entre 3-5 μm . En el caso de las drogas de abuso, la gran mayoría de métodos publicados desde el año 2010, han sido desarrollados utilizando columnas C_{18} [32, 34, 35, 39, 44, 59, 67, 84]. Los tiempos de análisis de estos métodos usando C_{18} varían entre 15 minutos y 40 minutos dependiendo del número de compuestos a separar, las dimensiones de la columna, la fase móvil, el gradiente de elución, el flujo y la temperatura. Columnas de fase estacionaria con grupos C_8 ha sido menos utilizada en separaciones cromatográficas de drogas de abuso. Martínez et al. [51] separaron 22 drogas de abuso utilizando una columna de marca comercial Zorbax eclipse XDB C_8 con un tamaño de partícula de 5 μm . Bajo las condiciones cromatográficas óptimas, la separación de los 22 compuestos la realizaron en 16 minutos. Las columnas C_8 presentan similar selectividad que las columnas C_{18} pero la retención de los compuestos en esta fase estacionaria es más reducida. Así mismo, fases estacionarias en fase inversa modificadas con otros grupos químicos funcionales, también han sido aplicadas en la separación cromatográfica de las drogas de abuso. Ejemplo de estas columnas ofreciendo otras alternativas de selectividad son las de sílica modificada con grupos fenilos (XBridge phenyl, 3.5 μm) [42, 55, 80], bifenil (Ultra Biphenyl, 5 μm) [33], fenilos unido a éter (Synergy 4 μm Polar-RP) [57] y fenil perfluorados (Luna PFP, 3 μm) [46]. Estas fases estacionarias con grupos fenilos aportan selectividad o especificidad para compuestos aromáticos como la mayoría de drogas de abuso, y en el caso de las fases estacionarias con grupos PFP, los átomos de fluor

alrededor del anillo fenil aumentan las interacciones π - π con los compuestos aromáticos.

Otra modalidad de LC relativamente nueva es el desarrollo de métodos analíticos con el uso de instrumentos y columnas analíticas que toleren altas presiones (hasta 1500 psi/1000 bar). Esta técnica se conoce como cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC, *Ultra-High Pressure Liquid Chromatography*), la cual usa columnas con partículas de diámetro sub-2 μm . De esta manera, el desempeño cromatográfico es mucho más alto en términos de velocidad, sensibilidad y resolución que el conseguido con columnas convencionales empaquetadas con partículas de 3-5 μm . Además reduce la co-elución de compuestos interferentes, disminuyendo en algunos casos el efecto matriz. Sin embargo, debido a los picos cromatográficos muy estrechos, esta técnica requiere el uso de instrumentos de MS con velocidades de escaneo rápidas [197, 235]. Tal y como muestra las tablas 10 y 11, UHPLC ha sido aplicado ampliamente en varios métodos para determinar drogas de abuso en diferentes muestras medioambientales líquidas, utilizando columnas de fase inversa C_{18} con tamaño de partícula de 1.7 μm [37, 43, 52, 56, 58, 60, 63, 213]. Así mismo, para muestras medioambientales sólidas también ha sido utilizada [74-77]. Con UHPLC se pueden alcanzar tiempos de análisis cortos, como ha sido demostrado por Robles-Molina et al. [66, 204] en dos métodos multiresiduo, en los cuales la separación de 400 compuestos solo requirió 23 minutos con una columna comercial ZORBAX Eclipse Plus C_{18} , 1.8 μm . De la misma forma, columnas analíticas sub-2 μm empaquetadas con sílica modificada con grupos PFP también han sido aplicadas en la separación de drogas de abuso e hipnótico-sedantes [48]. Las dimensiones típicas de columnas UHPLC (50 x 2.1 mm, 1.7 μm) en gran parte son las responsables de alcanzar tiempos cortos de análisis, en comparación con las dimensiones de las columnas convencionales de LC que suelen ser 150 x 4.6 mm, 5 μm [236].

Otra alternativa al uso de columnas sub-2 μm son las columnas de partículas superficialmente porosas con un núcleo fusionado (*fused-core* o

core-shell), las cuales pueden ser usadas en instrumentos convencionales de LC. Las columnas *fused-core* consiste en un recubrimiento poroso fino y un núcleo fusionado sólido, proporcionando efectivamente distancias de difusión más cortos con valores de permeabilidad similares a aquellas columnas convencionales con partícula 3-5 μm . Puesto que las partículas (normalmente de tamaño 2.7 μm) no son completamente porosas, la transferencia de masa es más rápida, resultando en menos ensanchamiento de banda. La distribución de las partículas más ordenadas también permite a presiones razonables en la columna, haciendo posible alcanzar alta eficiencia en la separación y velocidades de análisis rápidos comparables a las columnas de sub-2 μm sin la necesidad de instrumentos UHPLC [197]. Métodos analíticos basados en fase inversa con C_{18} usando columnas *fused-core*, han sido satisfactoriamente desarrollados para la determinación de drogas de abuso en muestras medioambientales líquidas, resultando los compuestos completamente separados en menos de 10 minutos [40, 45, 61].

En general, las fases móviles consisten de una mezcla de agua y solvente orgánico, típicamente metanol o acetonitrilo. El porcentaje y tipo de modificador orgánico en la fase móvil son también factores determinantes en la separación cromatográfica. Fases móviles tamponadas son muy usadas en fase inversa para controlar la ionización de los compuestos y mejorar la resolución cromatográfica. Sin embargo, el tipo de tampón ha de considerarse cuando la detección se lleva a cabo por MS, debido a que algunos tampones tradicionales no-volátiles precipitan en la fuente de ionización, y además podrían fomentar el efecto matriz. En los análisis mediante LC-MS, se adicionan modificadores específicos en la fase móvil para influenciar la ionización. Por ejemplo, pequeños ácidos orgánicos como ácido fórmico y ácido acético podrían mejorar la ionización por protonación $[\text{M}+\text{H}]^+$ o desprotonación $[\text{M}-\text{H}]^-$ y consecuentemente la sensibilidad. En algunos casos otros modificadores como formiato o acetato de amonio, son también usados para beneficiar la separación cromatográfica en términos de retención, resolución y/o la forma del pico [215]. En el caso de las drogas de abuso, los métodos

desarrollados han modificado la fase acuosa u orgánica o ambas con 0.05-0.5% de ácido fórmico [33, 46, 51, 58, 61, 66, 204] o de ácido acético [40, 56] o han adicionado estos ácidos hasta obtener un pH entre 2.5 y 4.5. Así mismo, tampones de formiato de amonio y 0.1-1% de ácido fórmico o adición de este ácido hasta obtener un pH entre 2.5-3.5 [30, 32, 36, 43] también han sido utilizados como fases móviles. González-Mariño et al. [39] en su estudio para determinar drogas de abuso en aguas residuales, ajustaron la fase móvil para obtener una buena separación entre dos cannabinoides (carácter ácido) y el resto de las drogas de abuso (carácter básico), y conseguir agruparlos en dos diferentes segmentos temporales. Así que, los autores acidificaron la fase orgánica a un pH de 4.5, mientras que la fase acuosa fue tamponada a un pH 8.5. De esta forma, los compuestos básicos fueron retenidos efectivamente en una columna C_{18} con bajo contenido de fase orgánica, al mismo tiempo, el gradiente del contenido orgánico fue acompañado por un gradiente de pH, incrementando la retención de los compuestos ácidos y disminuyendo la retención de los compuestos básicos con más altos tiempos de retención.

Por otro lado, el uso de cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC, *Hydrophilic Interaction chromatography*) también ha sido aplicado como alternativa de separación cromatográfica de las drogas de abuso [41, 62, 81, 86]. HILIC se basa en una fase estacionaria polar y fases móviles parecidas a las que se usan en fase inversa, compuesta de más de un 50% del solvente orgánico (usualmente acetonitrilo) y agua o agua taponada (sales amónicas, ácido fórmico o acético). Los mecanismos de retención de HILIC son una compleja combinación de partición, intercambio iónico y enlaces de hidrógeno, dando lugar en algunos casos a una relación mejorada para analitos polares. Las columnas son de sílica o un soporte polimérico que pueden estar modificados con grupos aminopropil, diol, y zwitteriónicos, o simplemente el material del soporte no es modificado [236]. En los estudios anteriormente citados, la separación de los compuestos se realizó con la columna comercial Luna HILIC con tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil consistió de agua taponada con 5 mM de acetato de amonio y acetonitrilo como solvente

orgánico. Bajo estas condiciones los autores consiguieron una separación cromatográfica de todos los compuestos en 10 minutos [41, 62, 81, 86]. Una ventaja de HILIC es que el uso de porcentajes altos del solvente orgánico favorece la ionización de los compuestos en los sistemas MS/MS, por tanto la sensibilidad incrementa [236].

En el acoplamiento de LC con el sistema de detección MS, la interface es el punto de unión de ambos. Las interfaces más ampliamente usadas son ionización química a presión atmosférica (APCI) e ionización electrospray (ESI). Ambas interfaces pueden trabajar en modo de ionización positiva o en modo negativo. Trabajando en ionización positiva puede ocurrir la formación de aductos de sodio, potasio o amonio [237]. Según la bibliografía consultada, la interface que ha sido exclusivamente utilizada en la determinación de las drogas de abuso y sus metabolitos es ESI (tablas 10 y 11) en modo positivo $[M+H]^+$, excepto para aquellas drogas de abuso con carácter ácido que usan modo negativo $[M-H]^-$. Sin embargo, ESI es considerada a ser más afectada por las interferencias de la matriz que APCI, causando más supresión o aumento de la señal de los analitos [237].

Aunque MS puede ser usado para la determinación de los contaminantes de interés emergente en muestras medioambientales, la detección por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es una herramienta analítica muy poderosa actualmente disponible para la determinación cualitativa y cuantitativa de la mayoría de los compuestos orgánicos en matrices complejas. La adquisición en MS/MS ofrece una gran selectividad, ya que permite la posibilidad de aislar un ion en la celda de colisión, eliminando otros iones o fragmentos que puedan interferir. Además, dependiendo del tipo de analizador MS/MS que se seleccione para el análisis, la calidad y la cantidad de información proporcionada, aumenta la selectividad y la capacidad de la técnica para la elucidación estructural [232].

En los últimos años, la mayoría de métodos desarrollados para la determinación de drogas de abuso en diferentes compartimentos del medioambiente han sido basados en LC-(ESI)MS/MS (tablas 10 y 11), particularmente con analizadores triple cuadrupolo (QqQ) [33, 40-42, 44, 45, 48, 50, 54, 55, 57, 60, 62, 67, 75, 76, 82, 140, 148, 213]. En estos estudios operando en modo de adquisición monitoreo de reacción seleccionada (SRM), los límites de detección se encuentran en un intervalo entre 0.01-250 ng/L para muestras ambientales líquidas y entre 0.02-5 ng/g para muestras sólidas. Este intervalo tan amplio en los LODs principalmente en las muestras líquidas depende de factores como el tipo de compuesto, la técnica cromatográfica utilizada, tratamiento de la muestra y el tipo de matriz. El uso de MS/MS bajo el modo SRM, facilita la exactitud de la cuantificación de los compuestos objeto de estudio a niveles traza. Además, la adquisición de varias SRM transiciones (generalmente dos o tres transiciones más abundantes), el tiempo de retención y la medida de la relación de intensidades relativas de iones le confieren al método niveles de confianza muy altos en términos de selectividad, sensibilidad y robustez. Típicamente, la transición SRM de mayor abundancia es seleccionada como ión de cuantificación, y la transición o transiciones adicionales son seleccionadas como ión de confirmación. Sin embargo, la aplicación de QqQ para análisis cualitativo es limitado debido a su relativa baja resolución (aproximadamente 1 Da) y menor sensibilidad en modo barrido de todos los iones (*full scan*) [232]. En este aspecto Andrés-Costa et al. [58], analizaron muestras de agua residual para determinar 8 drogas de abuso, realizando la cuantificación por medio del analizador QqQ y posterior confirmación/identificación por medio de un analizador híbrido cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF). QTOF ofrece la medida de los iones producto con un alto poder de resolución y exactitud de masa, permitiendo la asignación de una fórmula empírica a cada ión, facilitando proponer una estructura química para cada ión producto, así como la ruta de fragmentación del ión precursor aislado. Por eso, la elucidación estructural de compuestos desconocidos como también la identificación de compuestos objeto de estudio puede ser

alcanzada en un grado muy alto de certidumbre [238]. En otro estudio, el potencial del QTOF también fue demostrado para identificar la presencia de 76 drogas de abuso en agua residual [239]. En este estudio aplicaron dos modos de adquisición con diferentes energías de colisión, un modo a baja energía donde pobre o ninguna fragmentación ocurre, y otro modo a alta energía donde la fragmentación en la celda de colisión es fomentada. Este enfoque, conocido como adquisición MS^E , permite la adquisición de un espectro completo de masas exactas de las moléculas protonadas o desprotonadas (baja energía) y de los iones fragmentos (alta energía) en una sola inyección, proporcionando información relevante que facilita la rápida detección e identificación confiable de los compuestos. Además, compuestos isómeros como la morfina y norcodeina pueden ser discriminados por su fragmento específico observado en el espectro de alta energía, sin utilizar estándares referentes.

Otro tipo de analizador con capacidades similares que el QqQ también ha sido aplicado en la determinación de drogas de abuso. Como se puede observar en las tablas 10 y 11, este analizador es un híbrido triple cuadrupolo-trampa lineal de iones (QqLIT) [34, 38, 46, 49, 59, 63, 73, 84, 85]. QqLIT es una excelente herramienta por la posibilidad de múltiples transiciones ión-ión con una capacidad de almacenamiento de iones muy alta y una eficiencia mayor en capturarlos [240]. En los diferentes estudios citados anteriormente, QqLIT permitió a los autores alcanzar LODs entre 0.1 ng/L y 700 ng/L en muestras ambientales líquidas y entre 0.01 ng/g y 2.5 ng/g en muestras ambientales sólidas [34, 73].

En los últimos años, la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, *High-Resolution Mass Spectrometry*) proporcionada por analizadores de masas como tiempo de vuelo (TOF) o Orbitrap se está convirtiendo en una alternativa muy poderosa para la determinación de los contaminantes de interés emergente en muestras medioambientales. HRMS ofrece la posibilidad de ejecutar un análisis de barrido completo (*full scan*) con alta resolución y exactitud de masa, así, se pueden identificar un número ilimitado de compuestos, sin requerir la preselección

de los analitos o incluso sin tener disponibles estándares [240]. Las capacidades del analizador de masas híbrido cuadrupolo-Orbitrap (Q-Orbitrap), han sido recientemente aplicadas para la determinación de drogas de abuso en aguas residuales con resultados muy satisfactorios en términos de identificación/confirmación, ya que en términos de sensibilidad los resultados son muy comparables a los de otros analizadores como QqQ [32, 83]. En estos estudios la ionización se realiza por medio de una fuente de ionización electrospray caliente (HESI-II, *Heat Electrospray Ionization*) en modo positivo y el analizador Orbitrap opera en *full scan*. La nueva generación de instrumentos Orbitrap combina el alto desempeño del cuadrupolo en seleccionar el precursor con la alta resolución/exactitud de masa del Orbitrap [212].

Federova et al. [241] compararon la cuantificación del Q-Orbitrap (Q-Exactive) con el analizador comúnmente utilizado QqQ (*triple-stage quadrupole*, TSQ Quantum Ultra), de lo que los autores concluyeron que Q-Orbitrap es una herramienta idónea para la detección y cuantificación de drogas de abuso y otros fármacos en aguas residuales, con resultados muy similar al QqQ pero con inigualable mejor selectividad. QqQ permitió obtener LOQs entre 1.3-15 ng/L para la mayoría de compuestos, mientras que Q-Orbitrap operado en *full scan* permitió límites entre 0.4-13 ng/L, y operado en *targeted MS/MS* LOQs fueron entre 1.7-11 ng/L. Algunas pocas excepciones presentaron LOQs más altos (hasta 180 ng/L) utilizando los tres enfoques de cuantificación.

Otro tipo de analizador híbrido basado en transformación de Fourier trampa iónica lineal y Orbitrap (LTQFT-Orbitrap) también ha sido satisfactoriamente aplicado en el análisis cualitativo y cuantitativo de 24 drogas de abuso en muestras de aguas residuales [212]. Los datos fueron adquiridos en *full scan* en ESI y medidas simultáneas en MSⁿ para obtener información de fragmentos de iones generados en la trampa iónica lineal. Además Orbitrap también proporcionó una cuantificación satisfactoria a muy bajos niveles de concentración. La masa exacta de la molécula protonada, la masa nominal de al menos un ión producto y el tiempo de

retención permitió la identificación segura de los compuestos detectados. Según los resultados de los autores, se confirma la cuantificación con casi la misma sensibilidad que con los métodos basados en QqQ, con LOQs entre 2-68 ng/L.

Referente a la determinación de los hipnótico-sedantes, la gran mayoría de métodos analíticos desarrollados para la determinación de los hipnótico-sedantes se basan en LC-MS/MS. Cabe destacar que la mayoría de métodos encontrados en la bibliografía son métodos multiresiduo, en donde se incluye solo 2 o hasta 4 hipnóticos-sedantes, y que principalmente son investigados en muestras medioambientales líquidas. Entre el grupo de los hipnótico-sedantes, la sustancia más estudiada ha sido la carbamazepina seguido de las benzodiazepinas.

Como muestra las tablas 10 y 11, la separación analítica de los hipnótico-sedantes mediante LC, ha sido obtenida en su gran mayoría con columnas convencionales de fase inversa C_{18} con tamaño de partícula entre 3-5 μm [65, 73, 103, 106-108, 118, 126, 129, 134, 135, 140-144, 146]. Sin embargo, en algún estudio puntual, columnas C_{18} con un tamaño de partícula menor de 2.4 μm permiten la completa resolución de 23 compuestos incluyendo bromazepam y diazepam en 13 minutos [116]. Otras fases inversas proporcionando diferente selectividad a la fase estándar C_{18} también han sido aplicadas en pocos estudios para la separación de los hipnótico-sedantes. La columna cromatográfica bajo nombre comercial Synergy Polar-RP (4 μm) empaquetada con fase fenilo unido a éter ha sido utilizada en un método multiresiduo de 21 compuestos, en el cual son incluidos 3 benzodiazepinas y 4 drogas de abuso, así esta fase proporciona selectividad de fase inversa polar y aromática a la separación [47]. Columnas de fase inversa con grupos C_{18} – éter (3 μm) permitieron la separación de 46 compuestos incluyendo 2 benzodiazepinas y 1 droga de abuso en un tiempo de análisis de 46 minutos [111]. En otro estudio determinando carbamazepina y sus metabolitos en agua residual y fangos aplicaron una columna con fase C_8 para separar estas sustancias [127].

Por otro lado, Peysson et al. [145] demostró las capacidades de separación de las columnas *fused core* en tiempos relativamente cortos de análisis similares a las columnas de UHPLC pero requiriendo mucha menor presión. En este estudio 136 sustancias incluyendo algunas benzodiazepinas, drogas de abuso y PCPs fueron parcialmente separadas en 26 minutos de tiempo de análisis. Los autores argumenta que la completa resolución de todos los compuestos no fue posible en un tiempo razonable de tiempo, por la amplia diferencia en las propiedades físico químicas de los compuestos. Sin embargo, este hecho no supuso un gran inconveniente en la detección de los compuestos, ya que esta fue llevada a cabo con MS/MS de alta resolución con un analizador de tiempo de vuelo (TOF)

Referente a la técnica HILIC en métodos para determinar hipnótico-sedantes, ésta solo ha sido utilizada en un estudio el cual fue mencionado anteriormente en la determinación de drogas de abuso y que incluye 2 benzodiazepinas [28].

Métodos basados en UHPLC con fase estacionaria C_{18} y tamaño de partícula $1.7 \mu\text{m}$, han sido desarrollados en varios estudios para determinar varios grupos de fármacos incluyendo los hipnótico-sedantes [69, 74, 82, 109, 113, 117, 125, 147]. Por ejemplo, López-Serna et al [109] utilizó una columna Acquity BEH C_{18} para separar 74 fármacos incluyendo algunos barbitúricos y benzodiazepinas. En este método solo requirieron 13 minutos de tiempo de análisis con aceptable resolución de todos los compuestos, demostrando así el alto desempeño de UHPLC.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la fase móvil es un parámetro de gran importancia que puede afectar la resolución y simetría del pico cromatográfico como también la intensidad de la señal en el MS/MS. Muchas de las separaciones cromatográficas utilizando fase estacionaria inversa C_{18} citadas anteriormente, encontraron el mejor equilibrio en cuanto resolución, simetría e intensidad del pico utilizando fases móviles acidificadas con ácido fórmico (0.01-0.2%), ya sea en la

fase conteniendo agua o en la fase orgánica (usualmente metanol o acetonitrilo) o en ambas fases [65, 106, 110, 116, 121, 126, 129, 144, 145]. También se ha adicionado ácido acético entre 0.1-10% en las fases móviles [104, 110, 113, 118]. Otros métodos también han utilizado fases móviles tamponadas con 10-20 mM formiato de amonio/ácido fórmico [73, 110, 130, 140], o fases móviles tamponadas con 1-10 mM acetato de amonio/ácido acético [63, 69, 74]. Sin embargo, algunos estudios han desarrollado el análisis cromatográfico sin adición de ningún modificador en la fase móvil [103, 107]. Por ejemplo, Gros et al. [103], desarrollaron un método multiresiduo de 74 fármacos incluyendo 5 hipnótico-sedantes. Debido a la gran diferencia en las características físico-químicas entre los compuestos, la separación cromatográfica la realizaron en dos análisis. En el primer análisis utilizan una fase móvil sin modificadores para los compuestos determinados bajo ionización negativa (compuestos ácidos o neutros, p. ej. barbitúricos). En este caso los autores argumentan en su publicación, que la acidificación de la fase móvil disminuyó considerablemente la sensibilidad de los compuestos ionizados en modo negativo, así mismo seleccionaron una mezcla acetonitrilo/metanol ya que observaron mayor incremento de la señal en algunos compuesto que utilizando los solventes puros. En el segundo análisis para los compuestos determinados bajo ionización positiva (compuestos básicos, p. ej. benzodiazepinas), utilizaron una fase móvil compuesta de una fase con agua con 0.1% ácido fórmico y la fase orgánica con acetonitrilo.

Referente a los sistemas de detección, la mayoría de los estudios existentes para determinar hipnótico-sedantes incluidos en métodos multiresiduo utilizan analizadores QqQ (tablas 10 y 11) [28, 47, 48, 56, 69, 82, 104, 109, 111, 112, 120, 121, 125, 126, 130, 140, 148]. Seguido de éste, el analizador híbrido QqLIT también ha sido aplicado ampliamente con la misma finalidad [59, 65, 73, 103, 107, 108, 117, 129, 134, 141-143, 192]. En todos estos estudios, ESI ha sido operado en positivo $[M+H]^+$ y modo negativo $[M-H]$ dependiendo de las características físico-químicas de los compuestos, y por otro lado, la adquisición de datos con fines de cuantificación ha sido en modo SRM. Como se mencionó

previamente en la parte de determinación de las drogas de abuso, SRM proporciona buena sensibilidad y selectividad garantizando la confiabilidad de los resultados con dos o tres transiciones específicas para cada compuesto monitorizado. Sin embargo, en el caso concreto de los barbitúricos solo es posible monitorizar hasta dos transiciones, ya que estos compuestos presentan poca fragmentación del ion precursor, además que también presentan una señal baja.

El analizador de masas QqLIT además de tener las mismas habilidades de cuantificación que un QqQ, QqLIT aumenta la sensibilidad en los modos de trabajo *full-scan* y *product ion scan*. Por ejemplo, Gros et al. [103] determinó 72 fármacos incluyendo hipnótico-sedantes utilizando el analizador QqLIT, con el cual cuantificó adquiriendo en modo SRM, e identificó con la función *Information Dependent Acquisition* (IDA), la cual fue especialmente importante en el caso de compuestos que solo pueden generar una sola transición.

Otros analizadores tradicionales como trampa de iones cuadrupolares (QIT, *Quadrupole Ion Trap*) [116, 118] y TOF [145], también fueron aplicados en la determinación de hipnótico-sedantes en diferentes matrices medioambientales. La diferencia entre las generaciones de analizadores más recientes y estos analizadores principalmente QIT, está en la capacidad de confinamiento y almacenamiento de los iones, siendo muy superior en las nuevas generaciones de analizadores. Este hecho se traduce directamente en una mayor sensibilidad, rango dinámico y mejor rendimiento en experimentos MS^n [237]. Por otro lado, la aplicación de TOF en métodos de determinación de contaminantes de interés emergente es principalmente con fines cualitativos (identificación y confirmación), investigación de metabolitos o productos de degradación o elucidación estructural de desconocidos. Aunque el rango dinámico de la respuesta lineal de TOF no es tan amplio como otros tipos de analizadores con cuadrupolos, la utilización de TOF con fines cuantitativos ha sido posible. Por ejemplo, recientemente, Peysson et al. [145] por primera vez desarrolló un método multiresiduo basado en TOF para la determinación

de 136 fármacos en fangos de depuradora, obteniendo límites de detección para los compuestos centro de estudio en esta tesis como carbamazepina, diazepam, morfina, codeína, triclosan y triclocarban entre 2 - 42 ng/g.

Otras modalidades de detección involucrando HRMS, también han sido propuestas en algunos métodos multiresiduos. Kosma et al [135] desarrollo un método basado en LC-UV/visible (ESI)-MSD seguido de una confirmación con un analizador híbrido cuadrupolo de trampa lineal (LTQ, *Linear Trap Quadrupole*) acoplado con un Orbitrap (LTQ-Orbitrap) para determinar 12 compuestos entre fármacos (carbamazepina) y PCPs (triclosan) en aguas residuales. Los autores realizaron la cuantificación por medio el ión molecular y escogieron al menos un ion de confirmación por medio de la adquisición del ión seleccionado (SIM). Los LODs utilizando está técnica fueron entre 2-112 ng/L. Posteriormente, la confirmación de los compuestos presentes en la muestra se realiza con LTQ-Orbitrap con la adquisición de datos en *full-scan*. Como ya se ha mencionado, LTQ-Orbitrap es un analizador que permite la detección de un amplio rango de masas con alto poder de resolución, masa exacta y rango dinámico.

En cuanto a técnicas de determinación de edulcorantes de alta intensidad, métodos basados en LC-MS/MS han sido bien establecidos como la mejor selección para la cuantificación e identificación de los edulcorantes en muestras medioambientales, principalmente por su carácter hidrofílico y altamente polar de estos compuestos. En LC, columnas de fase inversa C₁₈ [164, 166, 167, 170-172, 177, 179, 181] o C₈ [163, 174, 180, 242] son las fases estacionarias principalmente seleccionadas para la resolución cromatográfica de los edulcorantes. En algunos estudios, la retención/separación de los edulcorantes de estas dos fases estacionarias (compuestos de carácter ácido y altamente polar) han sido comparadas [163, 168]. Por ejemplo, Gan et al. [168] encontró que ambas columnas proporcionan excelente retención, sin embargo, en su estudio encontró que la fase con C₁₈ exhibió parcialmente mejor separación de todos los compuestos.

Según la bibliografía consultada, solo se han encontrado dos estudios que utilizan UHPLC [173, 178]. En estos estudios la separación cromatográfica se ha llevado a cabo con columnas analíticas comerciales, de fase inversa bajo el nombre Acquity UPLC HSS T3 (fase estacionaria C_{18} , 1.8 μm) para separar 4 edulcorantes [173], y Hypersil Gold PFP (fase estacionaria PFP, 1.9 μm) para separar sucralosa [178]. En ambos métodos los tiempos de análisis fueron relativamente cortos, de 9 y 12 minutos, respectivamente.

Por otro lado, Ordoñez et al. [170] compararon dos mecanismos de separación, fase inversa (Luna C_{18} , 3 μm) e HILIC (Luna HILIC, 3 μm). Bajo las condiciones cromatográficas óptimas propias de cada mecanismo de separación los autores encontraron mejor desempeño en cuanto simetría del pico cromatográfico y parámetros de validación analítica (por ejemplo linealidad, LODs, RSDs) utilizando la columna de fase inversa C_{18} . En términos de resolución, también la columna C_{18} mostró una mejor resolución que HILIC, aunque en ninguna de las dos fueron completamente separados los 6 edulcorantes en estudio.

Sin embargo, algunos estudios han demostrado la habilidad en resolución de HILIC para este tipo de compuestos en su mayoría altamente polares. Kokotou et al. [165] compararon dos columnas HILIC con fase estacionaria polar de base sílica, una columna de partícula completamente porosa con puentes de etileno (tecnología BEH) (XBridge HILIC, 3.5 μm) y una columna *fused core* con fase de sílica libre (Kinetex HILIC, 3.6 μm). Los autores observaron que el mecanismo de retención predominante de los edulcorantes en ambas columnas con base de sílica es de partición hacia la fase conteniendo agua y en segundo lugar mecanismos de puentes de hidrógeno, así mismo, los autores obtuvieron menor factor asimétrico utilizando la columna *fused core* que con la columna de partícula completamente porosa. Por otro lado, dos tipos de fase estacionaria en HILIC también fueron evaluadas en un estudio, para su posterior aplicación en un método determinando 8 edulcorantes de alta intensidad en aguas residuales y aguas de ríos [169]. Así, las columnas

HILIC evaluadas fueron: Atlantis HILIC empaquetada con fase estacionaria con base de sílica libre, y la columna Synchronis HILIC empaquetada con sílica ligada a grupos zwitteriónicos, ambas columnas con un diámetro de partícula de 5 μm . La fase estacionaria de tipo zwitteriónica permite una ecualización total de cargas y, por lo tanto, en una superficie neutra pero altamente polar. Este mecanismo permitió a los autores obtener mejor retención para algunos compuestos (acesulfamo y sacarina) que son pobremente retenidos en la otra fase estacionaria con base de sílica libre. Además algunos compuestos presentaron una baja resolución de separación (stevia y aspartamo) con sílica libre, por lo que, la separación fue mejorada utilizando la fase estacionaria ligada con grupos zwitteriónicos.

La fase móvil en común de la mayoría de métodos utilizando fase estacionaria inversa, ha sido agua como fase acuosa y metanol como fase orgánica, ambas tamponadas con acetato de amonio a concentraciones desde 1 mM hasta 20 Mm [167, 170-172, 181, 242]. En dos estudios encontraron que la adición de un agente de par iónico como el tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) a la fase móvil tamponada con acetato de amonio, mejoró la separación y simetría de los compuestos, pero se observó una gran mejora en la sensibilidad de la mayoría de compuestos [69, 168], ya que un tampón básico en la fase móvil facilita la desprotonación de los analitos. Otra fase móvil que también ha resultado como óptima para la separación de los edulcorantes utilizando fase inversa es agua (fase acuosa) y acetonitrilo (fase orgánica) ambas acidificadas con 0.1% de ácido fórmico [166, 174, 177-180]. En cuanto a HILIC, Salas et al. [169] encontraron que una concentración alta del tampón formiato de amonio (100 Mm)/ácido fórmico pH 3.75, favoreció la retención de los compuestos y la simetría de los picos cromatográficos. Mientras que Kokotou et al. [165] encontraron que una mezcla de 5 Mm de formiato de amonio:metanol:acetonitrilo (15:10:75, v/v/v) incrementa la sensibilidad de los compuestos durante su detección con MS/MS. De acuerdo a los autores, la adición de metanol en la fase móvil utilizando columnas HILIC, promueve el efecto puente de hidrógeno en la retención.

De acuerdo a los estudios anteriormente citados, en el proceso de ionización de los edulcorantes por medio de ESI, una mayor sensibilidad y fragmentación de los iones precursores es alcanzada operando en modo ESI negativo, excepto en un estudio que operaron ESI en modo positivo [174]. Usualmente, en la determinación de edulcorantes, el ión precursor es la molécula desprotonada $[M-H]$. Aunque en el caso de la sucralosa, su aducto de acetato $[M+C_2H_3O_2]$ también ha sido seleccionado como ión precursor [187], para aumentar la sensibilidad de este compuesto [187]. De forma similar, en el estudio operado en ESI positivo, el espectro de masas de la sucralosa, solo mostró un gran pico del aducto de sodio [174]. Por otro lado, ionización utilizando una fuente APCI fue seleccionada en un estudio, puesto que los autores al compararla con una fuente HESI, obtuvieron mejor sensibilidad de todos los compuestos. Además, los autores también observaron que el espectro obtenido operando con HESI contenía varios y abundantes series de iones aductos con metanol e iones inorgánicos [178].

En cuanto a los sistemas de detección (tablas 10 y 11), también en este caso el analizador QqQ es el más ampliamente aplicado en la determinación de edulcorantes de alta intensidad en muestras medioambientales [164-168, 170-173, 178-180, 242]. De hecho, solo tres estudios han utilizado QqLIT [163, 181, 185] y de HRMS solo ha sido utilizado Orbitrap [169]. Las capacidades de identificación y detección de cada uno de estos analizadores de masas ya se han comentado en la parte de determinación de las drogas de abuso e hipnótico-sedantes.

En la última década, diferentes métodos analíticos han sido desarrollados para determinar PCPs incluyendo filtros UV, conservantes y antimicrobiales en diferentes compartimentos del medioambiente. En términos generales, LC-MS/MS es la técnica dominante aplicada para la determinación de estos compuestos. En los estudios más recientes, columnas de UHPLC principalmente en fase inversa ligadas con grupos C_{18} , han sido muy utilizadas [74, 122, 204, 225, 227, 243, 244]. Aunque varios tipos de analizadores como por ejemplo TOF [204] y QqLIT [181]

han sido seleccionados para la identificación y cuantificación de los PCPs, el analizador más utilizado con fines de cuantificación continua siendo el QqQ [225, 227, 243, 245]. En término de interfaces, ESI en positivo o en negativo dependiendo de la naturaleza del analito, es preferida en lugar de APCI [243].

En la bibliografía existen varias publicaciones recopilando los métodos analíticos existentes para la determinación de los PCPs en muestras medioambientales, incluyendo técnicas de extracción y de determinación [215, 218, 238, 243], como también la presencia de este grupo de contaminantes en los diferentes compartimentos del medioambiente [68, 133, 136, 246]. Por esta razón, en esta tesis no se realizó una discusión en profundidad de los métodos de determinación de PCPs, como tampoco de la presencia de éstos en el medioambiente.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

1.3. Referencias

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

- [1] N. Nudelman, Química sustentable, Ediciones UNL, Santa Fe, (2004), 303 p.
- [2] M.G. Clavero, Educación para la ciudadanía y los derechos humanos, Editex, Madrid, (2007), 128 p.
- [3] M.A.C. Martí, Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente, Tébar, (2007), 320 p.
- [4] <http://water.epa.gov/scitech/cec/Environmental>, *United States Environmental Protection Agency*, (Acceso marzo 2015).
- [5] M. Stuart, D. Lapworth, E. Crane, A. Hart, *Sci. Total Environ.* 416 (2012) 1.
- [6] Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, (2013).
- [7] *Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture (86/ 278/EEC)*, (1986).
- [8] K. Kümmerer, *Emerging Contaminants*, Elsevier, Oxford, (2011), 69 p.
- [9] D. Barceló, M. Petrovic, *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste*, Springer, Berlin, (2008), 284 p.
- [10] A. Jelic, *Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment processes*, Universitat de Barcelona, Barcelona, (2012), 224 p.
- [11] A.J. Watkinson, E.J. Murby, S.D. Costanzo, *Water Res.* 41 (2007) 4164.
- [12] A. Putschew, U. Mieke, A.S. Tellez, M. Jekel, *Ozonation and reductive deiodination of iopromide to reduce the environmental burden of iodinated X-ray contrast media*, (2007), 159 p.
- [13] T. Heberer, D. Feldmann, *Removal of Pharmaceutical Residues from Contaminated Raw Water Sources by Membrane Filtration*, Springer, Berlin, (2008), 427 p.
- [14] N. Nowotny, B. Epp, C. von Sonntag, H. Fahlenkamp, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 2050.
- [15] V. Matamoros, J.M. Bayona, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5811.
- [16] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/es/>, Organización Mundial de la Salud, (Acceso abril 2015).
- [17] N.M. Patiño, *Farmacología medica / Medical Pharmacology*, Medica Panamericana Sa de, México D.F, (2008), 934 p.

- [18] https://www.incb.org/documents/Psychotropics/technical-publications/2014/Tech_2014.pdf, Junta internacional de Fiscalización de Estupefacientes, (Acceso mayo 2015).
- [19] M.I.S. González, La Educación para la Salud Del Siglo XXI: Comunicación y Salud, Díaz de Santos, Madrid, (2002), 602 p.
- [20] M.M. Ruiz, A.A. Ros, G.R. Valladolid, Manual de drogodependencias para enfermería, Díaz de Santos, Madrid, (2002), 349 p.
- [21] https://www.unodc.org/documents/wdr2014/V1403603_spanish.pdf, Informe mundial sobre las drogas 2014. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, (Acceso marzo 2014)
- [22] <http://www.drugabuse.gov/es/publicaciones/las-drogas-el-cerebro-y-el-comportamiento-la-ciencia-de-la-adiccion/las-drogas-y-el-cerebro>, Las drogas, el cerebro y el comportamiento: La ciencia de la adicción (2014). National Institute on Drug Abuse, (Acceso marzo 2015).
- [23] <http://www.drugbank>, (Acceso marzo 2015).
- [24] L.L.L.H. Lorenzo, P.L. Fernandez, Drogodependencias, Médica Panamericana, Madrid, (2009), 712 p.
- [25] A. Molero Chamizo, J.E. Muñoz Negro, Trastornos Adictivos 7 (2005) 137.
- [26] R. Pal, M. Megharaj, K.P. Kirkbride, R. Naidu, Sci. Total Environ. 463–464 (2013) 1079.
- [27] http://www.i-sis.org.uk/Illicit_Drugs_in_Drinking_Water.php Illicit (Acceso mayo 2015).
- [28] M. van der Aa, L. Bijlsma, E. Emke, E. Dijkman, A.L.N. van Nuijs, B. van de Ven, F. Hernández, A. Versteegh, P. de Voogt, Water Res. 47 (2013) 1848.
- [29] A. Mendoza, J.L. Rodríguez-Gil, S. González-Alonso, N. Mastroianni, M. López de Alda, D. Barceló, Y. Valcárcel, Environ. Int. 70 (2014) 76.
- [30] M. R. Boleda, M. Huerta-Fontela, F. Ventura, M.T. Galceran, Chemosphere 84 (2011) 1601.
- [31] A.C. Chiaia, C. Banta-Green, J. Field, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 8841.
- [32] N.V. Heuett, C.E. Ramirez, A. Fernandez, P.R. Gardinali, Sci. Total Environ. 511 (2015) 319.
- [33] B. Subedi, K. Kannan, Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 6661.
- [34] C. Metcalfe, K. Tindale, H. Li, A. Rodayan, V. Yargeau, Environ. Pollut. 158 (2010) 3179.

- [35] V. Yargeau, B. Taylor, H. Li, A. Rodayan, C.D. Metcalfe, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 722.
- [36] J.D. Berset, R. Brenneisen, C. Mathieu, *Chemosphere* 81 (2010) 859.
- [37] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Water Res.* 43 (2009) 363.
- [38] C. Postigo, M.L. de Alda, D. Barceló, *Environ. Int.* 37 (2011) 49.
- [39] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, M. González-Díez, R. Cela, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1708.
- [40] M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1091.
- [41] A.L.N. Van Nuijs, J.F. Mougel, I. Tarcomnicu, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 1008.
- [42] S. Karolak, T. Nefau, E. Bailly, A. Solgadi, Y. Levi, *Forensic Sci. Int.* 200 (2010) 153.
- [43] A. Kankaanpää, K. Ariniemi, M. Heinonen, K. Kuoppasalmi, T. Gunnar, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 696.
- [44] C. Repice, M.D. Grande, R. Maggi, R. Pedrazzani, *Sci. Total Environ.* 463-464 (2013) 27.
- [45] N. Gilart, P.A.G. Cormack, R.M. Marcé, N. Fontanals, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 1325 (2014) 137.
- [46] R.J. Irvine, C. Kostakis, P.D. Felgate, E.J. Jaehne, C. Chen, J.M. White, *Forensic Sci. Int.* 210 (2011) 69.
- [47] A. Wick, G. Fink, A. Joss, H. Siegrist, T.A. Ternes, *Water Res.* 43 (2009) 1060.
- [48] V. Borova, N. Maragou, P. Gago-Ferrero, C. Pistos, N. Thomaidis, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4273.
- [49] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Environ. Int.* 36 (2010) 75.
- [50] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1748.
- [51] M.J. Martínez Bueno, S. Uclés, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, *Talanta* 85 (2011) 157.
- [52] M.R. Boleda, M.T. Galceran, F. Ventura, *Water Res.* 43 (2009) 1126.
- [53] A. Mendoza, M. López de Alda, S. González-Alonso, N. Mastroianni, D. Barceló, Y. Valcárcel, *Chemosphere* 95 (2014) 247.
- [54] P. Vazquez-Roig, V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2851.
- [55] D.A. Damien, N. Thomas, P. Hélène, K. Sara, L. Yves, *Sci. Total Environ.* 490 (2014) 970.

- [56] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, *Sci. Total Environ.* 454–455 (2013) 442.
- [57] S. Terzic, I. Senta, M. Ahel, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2686.
- [58] M.J. Andrés-Costa, N. Rubio-López, M. Morales Suárez-Varela, Y. Pico, *Environ. Pollut.* 194 (2014) 152.
- [59] Y. Valcárcel, F. Martínez, S. González-Alonso, Y. Segura, M. Catalá, R. Molina, J.C. Montero-Rubio, N. Mastroianni, M. López de Alda, C. Postigo, D. Barceló, *Environ. Int.* 41 (2012) 35.
- [60] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1620.
- [61] N. Fontanals, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 1286 (2013) 16.
- [62] A. Lopes, N. Silva, M.R. Bronze, J. Ferreira, J. Morais, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 673.
- [63] C. Boix, M. Ibáñez, J.V. Sancho, J. Rambla, J.L. Aranda, S. Ballester, F. Hernández, *Talanta* 131 (2015) 719.
- [64] T. Rodríguez-Álvarez, R. Rodil, M. Rico, R. Cela, J.B. Quintana, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10274.
- [65] Y. Valcárcel, S. González Alonso, J.L. Rodríguez-Gil, A. Gil, M. Catalá, *Chemosphere* 84 (2011) 1336.
- [66] J. Robles-Molina, B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, *Sci. Total Environ.* 479–480 (2014) 247.
- [67] I. Senta, E. Gracia-Lor, A. Borsotti, E. Zuccato, S. Castiglioni, *Water Res.* 74 (2015) 23.
- [68] B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, *Water Res.* 72 (2015) 3.
- [69] M.R. Boleda, M.T. Galceran, F. Ventura, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 1584.
- [70] C. Postigo, C. Sirtori, I. Oller, S. Malato, M.I. Maldonado, M. López de Alda, D. Barceló, *Appl. Catal. B Environ.* 104 (2011) 37.
- [71] M. Catalá, N. Domínguez-Morueco, A. Mígens, R. Molina, F. Martínez, Y. Valcárcel, N. Mastroianni, M. López de Alda, D. Barceló, Y. Segura, *Sci. Total Environ.* 520 (2015) 198.
- [72] T.A. Ternes, N. Herrmann, M. Bonerz, T. Knacker, H. Siegrist, A. Joss, *Water Res.* 38 (2004) 4075.
- [73] N. Mastroianni, C. Postigo, M.L. de Alda, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1322 (2013) 29.
- [74] K.H. Langford, M. Reid, K.V. Thomas, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 2284.
- [75] R. Álvarez-Ruiz, M.J. Andrés-Costa, V. Andreu, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1405 (2015) 103.

- [76] D.R. Baker, V. Očenášková, M. Kvicalova, B. Kasprzyk-Hordern, *Environ. Int.* 48 (2012) 28.
- [77] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7901.
- [78] A.L.N. van Nuijs, S. Castiglioni, I. Tarcomnicu, C. Postigo, M.L. de Alda, H. Neels, E. Zuccato, D. Barcelo, A. Covaci, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 3564.
- [79] S. Castiglioni, K.V. Thomas, B. Kasprzyk-Hordern, L. Vandam, P. Griffiths, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 613.
- [80] T. Nefau, S. Karolak, L. Castillo, V. Boireau, Y. Levi, *Sci. Total Environ.* 461–462 (2013) 712.
- [81] A.L.N. van Nuijs, J.-F. Mougel, I. Tarcomnicu, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, *Environ. Int.* 37 (2011) 612.
- [82] D.R. Baker, L. Barron, B. Kasprzyk-Hordern, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 629.
- [83] T. Mackulák, J. Škubák, R. Grabic, J. Ryba, L. Birošová, G. Fedorova, V. Špalková, I. Bodík, *Sci. Total Environ.* 494–495 (2014) 158.
- [84] F.Y. Lai, R. Bruno, H.W. Leung, P.K. Thai, C. Ort, S. Carter, K. Thompson, P.K.S. Lam, J.F. Mueller, *Forensic Sci. Int.* 233 (2013) 126.
- [85] K.Y. Kim, F.Y. Lai, H.-Y. Kim, P.K. Thai, J.F. Mueller, J.-E. Oh, *Sci. Total Environ.* 524–525 (2015) 440.
- [86] U. Khan, A.L.N. van Nuijs, J. Li, W. Maho, P. Du, K. Li, L. Hou, J. Zhang, X. Meng, X. Li, A. Covaci, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 710.
- [87] K.V. Thomas, L. Bijlsma, S. Castiglioni, A. Covaci, E. Emke, R. Grabic, F. Hernández, S. Karolak, B. Kasprzyk-Hordern, R.H. Lindberg, M. Lopez de Alda, A. Meierjohann, C. Ort, Y. Pico, J.B. Quintana, M. Reid, J. Rieckermann, S. Terzic, A.L.N. van Nuijs, P. de Voogt, *Sci. Total Environ.* 432 (2012) 432.
- [88] E.J. Rosi-Marshall, D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, A. Paspalof, J.L. Tank, *J. Hazard. Mat.* 282 (2015) 18.
- [89] N.S. Radulovic, P.D. Blagojevic, Z.Z. Stojanovic-Radic, N.M. Stojanovic, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 932.
- [90] R.H. Crist, K. Oberholser, B. Wong, D.R. Crist, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 1523.
- [91] A. Binelli, A. Pedriali, C. Riva, M. Parolini, *Chemosphere* 86 (2012) 906.

- [92] M. Parolini, A. Pedriali, C. Riva, A. Binelli, *Sci. Total Environ.* 444 (2013) 43.
- [93] A. Binelli, I. Marisa, M. Fedorova, R. Hoffmann, C. Riva, *Aquat. Toxicol.* 140-141 (2013) 268.
- [94] M. Parolini, A. Binelli, *Environ. Pollut.* 182 (2013) 371.
- [95] F. Gagné, C. André, M. Gélinas, *Comp. Biochem. Phys. C* 152 (2010) 207.
- [96] F. Gay, M. Maddaloni, S. Valiante, V. Laforgia, A. Capaldo, *Water Air Soil Poll.* 224 (2013) 1.
- [97] J. Evans, *Introducción al análisis de riesgos ambientales*, Instituto Nacional de Ecología, (2003), 123 p.
- [98] Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, Part II, (2003).
- [99] M.M.P. Tsui, H.W. Leung, P.K.S. Lam, M.B. Murphy, *Water Res.* 53 (2014) 58.
- [100] G.M.V. Rivera, M.J.T. Martínez, E.G. Roque, *Farmacología Proceso de Atención en Enfermería*, Ecimed La Habana (2009), 442 p.
- [101] M.S. Vallejo, P.R.P.R. Salazar Vallejo, *Tratado de Psicofarmacología*, Médica Panamericana, Madrid, (2009), 961 p.
- [102] Utilización de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos en España durante el periodo 2000-2012. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.
http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/ansioliticos_hipnoticos-2000-2012.pdf, (Acceso junio 2015).
- [103] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Chem.* 81 (2009) 898.
- [104] I. Racamonde, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, *Microchem. J.* 119 (2015) 58.
- [105] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 104.
- [106] R. López-Serna, S. Pérez, A. Ginebreda, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta* 83 (2010) 410.
- [107] M. Gros, M. Petrović, A. Ginebreda, D. Barceló, *Environ. Internat.* 36 (2010) 15.
- [108] S. Bianca Ferreira da, A. Jelic, R. López-Serna, A.A. Mozeto, M. Petrovic, D. Barceló, *Chemosphere* 85 (2011) 1331.

- [109] R. López-Serna, M. Petrović, D. Barceló, *Chemosphere* 85 (2011) 1390.
- [110] I. Racamonde, R. Rodil, J.B. Quintana, E. Villaverde-de-Sáa, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1352 (2014) 69.
- [111] K. Nödler, T. Licha, K. Bester, M. Sauter, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6511.
- [112] D. Hummel, D. Löffler, G. Fink, T.A. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7321.
- [113] U. Hass, U. Dunnbier, G. Massmann, A. Pekdeger, *Anal. Meth.* 3 (2011) 902.
- [114] K. Van der Ven, W. Van Dongen, B.U.W. Maes, E.L. Esmans, R. Blust, W.M. De Coen, *Chemosphere* 57 (2004) 967.
- [115] T. Kosjek, S. Perko, M. Zupanc, M. Zanoški Hren, T. Landeka Dragičević, D. Žigon, B. Kompare, E. Heath, *Water Res.* 46 (2012) 355.
- [116] M.A. Sousa, C. Gonçalves, E. Cunha, J. Hajšlová, M.F. Alpendurada, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 807.
- [117] M. Petrović, A. Biljana, B. Škrbić, L. Ferrando-Climent, D. Barcelo, *Sci. Total Environ.* 468-469 (2014) 415.
- [118] S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4989.
- [119] A. Togola, H. Budzinski, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 150.
- [120] Van der Aa. N.G.F.M, Dijk man. E, B. L, E. E, Van de Ven. B.M, V.N. A.L.N., P.d. Voogt, *Drugs of abuse and tranquilizers in Dutch surfaces waters, drinking water and wastewater National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), (2010), 92 p.*
- [121] B. Subedi, K. Kannan, *Sci. Total Environ.* 514 (2015) 273.
- [122] T.S. Oliveira, M. Murphy, N. Mendola, V. Wong, D. Carlson, L. Waring, *Sci. Total Environ.* 518-519 (2015) 459.
- [123] R. López-Roldán, M. López de Alda, M. Gros, M. Petrovic, J. Martín-Alonso, D. Barceló, *Chemosphere* 80 (2010) 1337.
- [124] Y. Zhang, S.-U. Geißen, C. Gal, *Chemosphere* 73 (2008) 1151.
- [125] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 132.
- [126] S. Yuan, X. Jiang, X. Xia, H. Zhang, S. Zheng, *Chemosphere* 90 (2013) 2520.
- [127] X.-S. Miao, J.-J. Yang, C.D. Metcalfe, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 7469.
- [128] D.P. Mohapatra, S.K. Brar, R.D. Tyagi, P. Picard, R.Y. Surampalli, *Talanta* 99 (2012) 247.

- [129] I. Al-Tarawneh, M. El-Dosoky, M. Alawi, M. Batarseh, A. Widyasari, R. Kreuzig, M. Bahadir, *Clean – Soil, Air, Water* 43 (2015) 504.
- [130] S.-W. Nam, B.-I. Jo, Y. Yoon, K.-D. Zoh, *Chemosphere* 95 (2014) 156.
- [131] M. Peschka, J. Eubeler, T. Knepper, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7200.
- [132] J. Yu, K. Bisceglia, E. Bouwer, A.L. Roberts, M. Coelhan, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 583.
- [133] E.N. Evgenidou, I.K. Konstantinou, D.A. Lambropoulou, *Sci. Total Environ.* 505 (2015) 905.
- [134] P. Verlicchi, A. Galletti, M. Petrovic, D. Barceló, M. Al Aukidy, E. Zambello, *Sci. Total Environ.* 454–455 (2013) 411.
- [135] C.I. Kosma, D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, *Sci. Total Environ.* 466–467 (2014) 421.
- [136] Y. Luo, W. Guo, H.H. Ngo, L.D. Nghiem, F.I. Hai, J. Zhang, S. Liang, X.C. Wang, *Sci. Total Environ.* 473–474 (2014) 619.
- [137] C. Gasser, E. Ammann, P. Shahgaldian, P.X. Corvini, *App. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 9931.
- [138] Z. Xiao, A.G. Wedd, *Aust. J. Chem.* 64 (2011) 231.
- [139] M. Ghobadi, Y. Yamini, B. Ebrahimpour, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 287.
- [140] P. Gago-Ferrero, V. Borova, M. Dasenaki, N. Thomaidis, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 4287.
- [141] C.E. Rodríguez-Rodríguez, A. Jelić, M.A. Pereira, D.Z. Sousa, M. Petrović, M.M. Alves, D. Barceló, G. Caminal, T. Vicent, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 12012.
- [142] A. Jelić, M. Gros, A. Ginebreda, R. Cespedes-Sánchez, F. Ventura, M. Petrovic, D. Barceló, *Water Res.* 45 (2011) 1165.
- [143] A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta.* 80 (2009) 363.
- [144] P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2471.
- [145] W. Peysson, E. Vulliet, *J. Chromatogr. A* 1290 (2013) 46.
- [146] L. Barron, J. Tobin, P. Brett, *J. Environ. Monit.* 10 (2008) 353.
- [147] A. Lajeunesse, S.A. Smyth, K. Barclay, S. Sauvé, C. Gagnon, *Water Res.* 46 (2012) 5600.
- [148] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 13321.
- [149] V. Lorenzi, R. Choe, D. Schlenk, *Environ. Toxicol.* (2014) n/a.
- [150] H. Chen, J. Zha, X. Liang, J. Li, Z. Wang, *Aquat. Toxicol.* 155 (2014) 1.

- [151] M. Oliveira, D.N. Cardoso, A.M.V.M. Soares, S. Loureiro, *Chemosphere* 120 (2015) 86.
- [152] P. Verlicchi, M. Al Aukidy, E. Zambello, *Sci. Total Environ.* 429 (2012) 123.
- [153] J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, *Environ. Int.* 33 (2007) 596.
- [154] M.N. ALARCÓN, Aspectos bromatológicos y toxicológicos de los edulcorantes: Toxicología alimentaria, Díaz de Santos, S.A., Madrid, (2012)
- [155] J. Dyer, K. Daly, K. Salmon, D. Arora, Z. Kokrashvili, R. Margolskee, S. Shirazi-Beechey, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1191.
- [156] Mecanismo de acción de los edulcorantes, http://www.hablemosclaro.org/Articulos/Mecanismo_de_acci%C3%B3n_de_los_edulcorantes#.VbIRGrPtmkR, (Acceso julio 2015).
- [157] M.C. Yebra-Biurrun, *Sweeteners*, San Diego: Elsevier Academic., (2005), 562 p.
- [158] J.M. García-Almeida, G.M. Casado Fdez, J. García Alemán, *Nut. Hosp.* 28 (2013) 17.
- [159] <http://www.isosugar.org/>, Edulcorantes alternativos en un contexto de altos precios del azúcar (2012), (Acceso julio 2015).
- [160] <https://www.ihs.com/products/high-intensity-sweeteners-chemical-economics-handbook.html>, *Information Handling Services (IHS) Sweeteners, High-Intensity* (2014), (Acceso agosto 2015).
- [161] *European Commission, Commission regulation (EU) No 1129/2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives*, (2011).
- [162] *European Parliament and Council of the European Union, Regulation (EC) No 1333/2008 on food additives*, (2008).
- [163] M. Scheurer, H.-J. Brauch, F. Lange, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1585.
- [164] M. Zarejousheghani, S. Schrader, M. Möder, P. Lorenz, H. Borsdorf, *J. Chromatogr. A* 1411 (2015) 23.
- [165] M.G. Kokotou, N.S. Thomaidis, *Anal. Meth.* 5 (2013) 3825.
- [166] B. Subedi, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 13668.
- [167] N.H. Tran, J. Hu, S.L. Ong, *Talanta* 113 (2013) 82.
- [168] Z. Gan, H. Sun, R. Wang, B. Feng, *J. Chromatogr. A* 1274 (2013) 87.
- [169] D. Salas, F. Borrull, N. Fontanals, R. Marcé, *Anal. Bioanal. Chem.* (2014) 1.

- [170] E.Y. Ordóñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 197.
- [171] I.J. Buerge, H.-R. Buser, M. Kahle, M.D. Müller, T. Poiger, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 4381.
- [172] J.-D. Berset, N. Ochsenbein, *Chemosphere* 88 (2012) 563.
- [173] N. Perkola, P. Sainio, *Environ. Pollut.* 184 (2014) 391.
- [174] I. Ferrer, E.M. Thurman, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4127.
- [175] G.E. Morlock, L. Schuele, S. Grashorn, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2745.
- [176] T.-S.S. Neset, H. Singer, P. Longrée, H.-P. Bader, R. Scheidegger, A. Wittmer, J.C.M. Andersson, *Sci.Total Environ.* 408 (2010) 3261.
- [177] M.E. Hoque, F. Cloutier, C. Arcieri, M. McInnes, T. Sultana, C. Murray, P.A. Vanrolleghem, C.D. Metcalfe, *Sci.Total Environ.* 487 (2014) 801.
- [178] S. Batchu, N. Quinete, V. Panditi, P. Gardinali, *Chem. Central J.* 7 (2013) 1.
- [179] J. Oppenheimer, A. Eaton, M. Badruzzaman, A.W. Haghani, J.G. Jacangelo, *Water Res.* 45 (2011) 4019.
- [180] T. Anumol, S. Wu, M. Marques dos Santos, K.D. Daniels, S.A. Snyder, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* (2015).
- [181] M. Alidina, C. Hoppe-Jones, M. Yoon, A.F. Hamadeh, D. Li, J.E. Drewes, *Sci.Total Environ.* 478 (2014) 152.
- [182] R. Loos, R. Carvalho, D.C. António, S. Comero, G. Locoro, S. Tavazzi, B. Paracchini, M. Ghiani, T. Lettieri, L. Blaha, B. Jarosova, S. Voorspoels, K. Servaes, P. Haglund, J. Fick, R.H. Lindberg, D. Schwesig, B.M. Gawlik, *Water Res.* 47 (2013) 6475.
- [183] L. Soh, K.A. Connors, B.W. Brooks, J. Zimmerman, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1363.
- [184] R. Loos, B.M. Gawlik, K. Boettcher, G. Locoro, S. Contini, G. Bidoglio, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1126.
- [185] D.B. Mawhinney, R.B. Young, B.J. Vanderford, T. Borch, S.A. Snyder, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 8716.
- [186] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, *Environ. Int.* 68 (2014) 33.
- [187] E.Y. Ordoñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1320 (2013) 10.
- [188] I.J. Buerge, M. Keller, H.-R. Buser, M.D. Müller, T. Poiger, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2010) 615.
- [189] M. Hjorth, J.H. Hansen, L. Camus, *Chem. Ecol.* 26 (2010) 385.

- [190] M.G. Kokotou, A.G. Asimakopoulos, N.S. Thomaidis, *Anal. Meth.* 4 (2012) 3057.
- [191] K.E. Tollefsen, L. Nizzetto, D.B. Huggett, *Sci.Total Environ.* 438 (2012) 510.
- [192] S. Stolte, S. Steudte, N.H. Schebb, I. Willenberg, P. Stepnowski, *Environ. Int.* 60 (2013) 123.
- [193] S.A.B. Hermsen, T.E. Pronk, E.-J. van den Brandhof, L.T.M. van der Ven, A.H. Piersma, *Toxicol. Appl. Pharm.* 272 (2013) 161.
- [194] J.M.C. Geuns, *Phytochemistry* 64 (2003) 913.
- [195] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, *Talanta* 115 (2013) 104.
- [196] M. Petrovic, M. Farré, M.L. de Alda, S. Perez, C. Postigo, M. Köck, J. Radjenovic, M. Gros, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4004.
- [197] M. Farré, L. Kantiani, M. Petrovic, S. Pérez, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 86.
- [198] F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollón, S.C.G.N. Braga, *Trac-Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 14.
- [199] B.H. Fumes, M.R. Silva, F.N. Andrade, C.E.D. Nazario, F.M. Lanças, *Trac-Trends Anal. Chem.* (2015).
- [200] L. Figueiredo, G.L. Erny, L. Santos, A. Alves, *Talanta*.
- [201] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *Contributions to Science* 6 (2010) 199.
- [202] E.S. Dragan, *Advanced Separations by Specialized Sorbents*, CRC Press, New York, (2014), 358 p.
- [203] A. Zygler, A. Wasik, J. Namieśnik, *Talanta* 82 (2010) 1742.
- [204] J. Robles-Molina, F.J. Lara-Ortega, B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, *J. Chromatogr. A* 1350 (2014) 30.
- [205] B. Subedi, N. Codru, D.M. Dziejwski, L.R. Wilson, J. Xue, S. Yun, E. Braun-Howland, C. Minihane, K. Kannan, *Water Res.* 72 (2015) 28.
- [206] N. Negreira, I. Rodríguez, M. Ramil, E. Rubí, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 654 (2009) 162.
- [207] M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6994.
- [208] S.C. Moldoveanu, V. David, *Modern Sample Preparation for Chromatography*, Elsevier Science, Amsterdam, (2014), 453 p.
- [209] F. Mari, L. Politi, A. Biggeri, G. Accetta, C. Trignano, M. Di Padua, E. Bertol, *Forensic Sci. Int.* 189 (2009) 88.

- [210] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, S. Schrader, M. Moeder, *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) 59.
- [211] R.N. Mead, J.B. Morgan, G.B. Avery Jr, R.J. Kieber, A.M. Kirk, S.A. Skrabal, J.D. Willey, *Mar. Chem.* 116 (2009) 13.
- [212] L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández, P. de Voogt, *Anal. Chim. Acta* 768 (2013) 102.
- [213] L. Bijlsma, R. Serrano, C. Ferrer, I. Tormos, F. Hernández, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 703.
- [214] M. Rogeberg, H. Malerod, H. Roberg-Larsen, C. Aass, S.R. Wilson, *J. Pharma. Bio. Anal.* 87 (2014) 120.
- [215] S. Ramos, V. Homem, A. Alves, L. Santos, *Sci. Total Environ.* 526 (2015) 278.
- [216] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, *Trac-Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 19.
- [217] É.A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, *Trac-Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 224.
- [218] M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *Personal Care Products in the Aquatic Environment*, Springer Suiza, (2015), 413 p.
- [219] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, *Anal. Chim. Acta* 774 (2013) 51.
- [220] A. Spietelun, Ł. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namieśnik, *Talanta* 119 (2014) 34.
- [221] M. Padrón, C. Afonso-Olivares, Z. Sosa-Ferrera, J. Santana-Rodríguez, *Molecules* 19 (2014) 10320.
- [222] S.S. Caldas, C. Rombaldi, J.L. de Oliveira Arias, L.C. Marube, E.G. Primel, *Talanta* (Submitted) (2015).
- [223] J. Escobar-Arnanz, L. Ramos, *Trac-Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 275.
- [224] L. Núñez, E. Turiel, A. Martín-Esteban, J.L. Tadeo, *Talanta* 80 (2010) 1782.
- [225] Y. Yu, Q. Huang, J. Cui, K. Zhang, C. Tang, X. Peng, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 891.
- [226] P. Vazquez-Roig, Y. Picó, *Trac-Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 55.
- [227] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5619.
- [228] P. Canosa, D. Pérez-Palacios, A. Garrido-López, M.T. Tena, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 105.
- [229] B. Subedi, L. Aguilar, E.M. Robinson, K.J. Hageman, E. Björklund, R.J. Sheesley, S. Usenko, *Trac-Trends Anal. Chem.* 68 (2015) 119.

- [230] M.B.R. Cerqueira, S.S. Caldas, E.G. Primel, *J. Chromatogr. A* 1336 (2014) 10.
- [231] M.B.R. Cerqueira, J.R. Guilherme, S.S. Caldas, M.L. Martins, R. Zanella, E.G. Primel, *Chemosphere* 107 (2014) 74.
- [232] F. Hernández, M. Ibáñez, R. Bade, L. Bijlsma, J.V. Sancho, *Trac-Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 140.
- [233] B. Albero, R.A. Pérez, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, *J. Hazard. Mat.* 239–240 (2012) 48.
- [234] N. Ramírez, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4430.
- [235] T.H. Walter, R.W. Andrews, *Trac-Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 14.
- [236] O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 298.
- [237] M. Holčápek, R. Jirásko, M. Lísa, *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 3.
- [238] Z. Sosa-Ferrera, C. Mahugo-Santana, J. Santana-Rodríguez, *BioMed Res. Int.* 2013 (2013) 23.
- [239] F. Hernández, L. Bijlsma, J.V. Sancho, R. Díaz, M. Ibáñez, *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) 96.
- [240] P. Vazquez-Roig, C. Blasco, Y. Picó, *Trac-Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 65.
- [241] G. Fedorova, T. Randak, R.H. Lindberg, R. Grabic, *Rapid Commun. Mass Sp.* 27 (2013) 1751.
- [242] L. Wolf, C. Zwiener, M. Zemmann, *Sci.Total Environ.* 430 (2012) 8.
- [243] M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *Trac-Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 749.
- [244] P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *Chemosphere* 84 (2011) 1158.
- [245] R. Celano, A.L. Piccinelli, L. Campone, L. Rastrelli, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 26.
- [246] N. Ratola, A. Cincinelli, A. Alves, A. Katsoyiannis, *J. Hazard. Mat.* 239–240 (2012) 1.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Objetivos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

El principal objetivo de esta tesis doctoral es desarrollar métodos analíticos para determinar tres familias de contaminantes de interés emergente y evaluar su presencia en muestras medio ambientales. Los compuestos estudiados en esta tesis son drogas de abuso, hipnótico-sedantes y edulcorantes artificiales de alta intensidad.

Para ello se utilizará la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas y como técnica de extracción se evaluarán la extracción en fase sólida para muestras líquidas y la extracción con líquidos presurizados para muestras sólidas. La presencia de estos contaminantes de interés emergente, su eliminación en las estaciones depuradoras de aguas residuales, y una evaluación preliminar del riesgo ambiental serán objeto de estudio en esta tesis.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

Parte Experimental, Resultados y Discusión

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Actualmente existe un interés creciente por los contaminantes emergentes, ya que son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medioambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran medida inadvertidas, pudiendo causar problemas ambientales y de riesgo para los seres acuáticos y terrestres. Tal y como se ha hecho referencia en el capítulo 1 de esta tesis, muchos de los contaminantes de interés emergente se encuentran diseminados en el medioambiente, principalmente como consecuencia de la nula o poca eliminación en las EDARs. Consecuentemente, éstos se han detectado en aguas de río, fuentes de abastecimiento de agua, aguas subterráneas e incluso en agua potable. Así mismo, los contaminantes de interés emergente que no se introducen al medioambiente por medio de los efluentes de las EDARs, pueden ser introducidos por medio de los fangos de depuradora cuando éstos son usados para fines agrarios.

Teniendo presente estos aspectos medioambientales comentados anteriormente, en esta tesis nos hemos centrado en el estudio de cuatro grupos de contaminantes de interés emergente: drogas de abuso, hipnótico-sedantes, edulcorantes y PCPs en diferentes matrices medioambientales. Esta tesis ha sido desarrollada en el grupo de investigación en Cromatografía Aplicaciones Medioambientales de la Universitat Rovira i Virgili, el cual cuenta con una experiencia muy amplia en la determinación de la presencia de contaminantes orgánicos de interés o potencialmente toxicológicos en muestras medioambientales a concentraciones traza. Con la realización de esta tesis se pretende aportar informaciones relevantes sobre la presencia, distribución y el riesgo ambiental preliminar de los cuatro grupos de contaminantes de interés emergente ya mencionados, en aguas de río, aguas residuales y fangos de depuradora. En la zona de estudio, estos contaminantes han sido poco estudiados, y además, según la literatura revisada, la presencia de estos contaminantes en fangos de depuradora ha sido muy poco estudiada a nivel mundial.

Esta tesis se ha realizado con la ayuda financiera otorgada por el ministerio de Economía y Competitividad de España, con los proyectos de investigación de referencia CTM2011-28765-CO2-01 y CTM2008-06847-CO2-01/TECNO.

Este capítulo engloba la parte experimental y discusión de resultados de los diferentes estudios que se han llevado a cabo en esta Tesis. Los resultados han sido recopilados en seis publicaciones científicas, de las cuales cinco ya han sido publicados en revistas científicas de reconocimiento internacional y uno está en proceso de preparación. Este capítulo presentando la parte experimental y la discusión de resultados, se ha dividido en cuatro secciones según el grupo de contaminantes y la finalidad del estudio. Cada sección consta de una breve introducción describiendo el contexto de la investigación, la presentación de los resultados en formato artículo científico, y por último la discusión de los resultados más relevantes de cada estudio. En el anexo II se encuentra la lista de las seis publicaciones científicas.

En las tres primeras secciones se describe el desarrollo de cinco métodos analíticos para la determinación de drogas de abuso en fangos de depuradora (sección 3.1), hipnótico-sedantes en aguas de río, residuales y fangos de depuradora (sección 3.2) y edulcorantes en aguas de río, residuales y fangos de depuradora (sección 3.3). En el caso de las muestras medioambientales líquidas la extracción se ha realizado mediante SPE, y en el caso de las muestras medioambientales sólidas la extracción se ha realizado por medio de PLE. La determinación de estos tres grupos de contaminantes se ha realizado mediante LC-(ESI)MS/MS utilizando QqQ como analizador de masas. Todos los métodos han sido aplicados al análisis de muestras tomadas de dos EDARs localizadas en la ciudad de Tarragona y Reus y los ríos Ebre, Ter, Llobregat y Segre localizados en Cataluña.

En la última sección se muestran los resultados obtenidos del estudio desarrollado para evaluar la presencia y comportamiento de drogas de

abuso, hipnótico-sedantes y PCPs monitorizados durante 1 año en aguas residuales y fangos de depuradora de 5 EDARs localizadas en Cataluña. Además con los datos de concentración obtenidos en efluentes y fangos, también se hace una evaluación preliminar del riesgo medioambiental de estas sustancias en organismos acuáticos y terrestres. En el caso de las drogas de abuso los datos de concentración de la entrada de aguas residuales se utilizaron para hacer un estudio epidemiológico de las zonas donde fueron recogidas las muestras.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

3.1. Determinación de drogas de abuso en muestras de fangos de depuradora

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

En esta sección se discutirá el desarrollo de un método analítico para la determinación de drogas de abuso y sus metabolitos en fangos de depuradora, usando PLE como técnica de extracción y LC-(ESI)MS/MS como técnica de determinación. La información acerca de la presencia de las drogas de abuso en fangos de depuradora se limita a unos cuantos estudios, los cuales han sido realizados previamente a nuestro estudio utilizando PLE [1, 2] y UAE [3] como técnica de extracción. Posterior al estudio que se describe en esta Tesis, otros estudios también han sido desarrollados con la misma finalidad, pero éstos basan la extracción de las drogas de los fangos en UAE [4-6].

Los fangos de depuradora producidos durante el tratamiento del agua residual en Europa son utilizados usualmente en agricultura o desechados en vertederos y/o desechados vía incineración. La aplicación del fango con fines agrícolas como por ejemplo fertilizante del suelo, constituye una ruta adicional de entrada de los contaminantes en el medioambiente [1]. Ante este hecho, la evaluación de la presencia de las drogas de abuso y sus metabolitos en fangos de depuradora es de fundamental importancia para medir el posible riesgo ambiental de estas sustancias, y para este fin, es esencial el desarrollo de métodos analíticos robustos y sensibles.

La técnica de determinación aplicada en este estudio, se basa en otro estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación para determinar drogas de abuso y sus metabolitos en aguas residuales y aguas de ríos [7]. De esta manera la separación analítica se realiza con una columna *fused core* y la detección se realiza con el analizador de masas QqQ con ESI en modo positivo. Referente a la técnica de extracción, varios parámetros que afectan la eficiencia de extracción en el PLE fueron evaluados con la finalidad de obtener las más altas recuperaciones para todos los compuestos objeto de estudio.

El método fue aplicado al análisis de muestras de fango producido en dos EDARs ubicadas en la ciudad de Tarragona y Reus. Anteriormente a

este estudio, la presencia de drogas de abuso y sus metabolitos en fangos de estas dos EDARs no había sido demostrada.

Los resultados de este estudio han sido publicados en la revista científica *Talanta* 125 (2014) 65-71.

Referencias

- [1] N. Mastroianni, C. Postigo, M.L. de Alda, D. Barcelo, J. Chromatogr. A 1322 (2013) 29.
- [2] K.H. Langford, M. Reid, K.V. Thomas, J. Environ. Monit. 13 (2011) 2284.
- [3] W. Peysson, E. Vulliet, J. Chromatogr. A 1290 (2013) 46.
- [4] B. Subedi, K. Kannan, Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 6661.
- [5] R. Álvarez-Ruiz, M.J. Andrés-Costa, V. Andreu, Y. Picó, J. Chromatogr. A 1405 (2015) 103.
- [6] P. Gago-Ferrero, V. Borova, M. Dasenaki, N. Thomaidis, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 4287.
- [7] M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, J. Sep. Sci. 34 (2011) 1091.

*3.1.1. Simultaneous determination of drugs of abuse and their
main metabolites using pressurized liquid extraction
and liquid chromatography-tandem mass
spectrometry*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF DRUGS OF ABUSE AND THEIR MAIN METABOLITES USING PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

Paula Arbeláez, Francesc Borrull, Rosa Maria Marcé, Eva Pocurull

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Universitat Rovira i Virgili, Sescelades Campus, Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

An analytical method based on pressurized liquid extraction (PLE) and liquid chromatography–(electrospray)–tandem mass spectrometry was developed for the simultaneous determination of nicotine, four drugs of abuse (opiates and alkaloids) and four of their main metabolites in sewage sludge. The optimum PLE conditions were: cell volume 11 mL, dichloromethane as extraction solvent, 5 min preheating time, 100°C temperature, 1500 psi pressure, 60% flush volume, 1 cycle, 15 min static extraction time, 120 s purge time and sample weight 1g. Absolute recoveries for all compounds were between 25% and 65%. Data acquisition was done by selective reaction monitoring and the two most abundant product ions were used for confirmation. Limits of detection were lower than 10 µg/kg dry weight (d.w.) and limits of quantification were between 2.5 and 25 µg/kg (d.w.).

The highest concentrations found in sludge samples from two sewage treatment plants were for nicotine and cocaine in the range of 23-173 µg/Kg (d.w.) and 9-232 µg/kg (d.w.) respectively.

Keywords: *drugs of abuse, liquid chromatography, tandem mass spectrometry, sewage sludge, pressurized liquid extraction.*

1. INTRODUCTION

In the last few years the determination of drugs of abuse and their metabolites in the aquatic environment has attracted considerable attention, and the measured analyte concentration has also been used to back-calculate drug usage in local communities [1]. As is well known, drugs of abuse may undergo partial degradation in the human organism and can be excreted through urine into sewage as an intact form or as metabolites. They are then released to the sewage treatment plants (STPs), where they are partially removed via degradation or sorption into the sludge.

Although there are several studies in which drugs of abuse have been determined in influent and effluent sewage [2, 3], surface water [1, 4] and even air samples [5-7], less attention has been devoted to their determination in sludge, which is generated during the treatment process in the STPs. The presence of these contaminants in sludge may limit its re-use due to public health and environmental protection requirements, although they are not included in current legislation.

Recent studies [8, 9] related to the presence of these contaminants in sewage include their determination not only in sewage but also in sewage-suspended particulate matter (SPM), and some of these contaminants such as cocaine and its metabolite benzoylecgonine are definitively found in SPM. This confirms that some of these contaminants tend to be retained in particulate matter and hence they can also be found in sludge, although drugs of abuse are relatively polar and not expected to be much retained in the sludge. Therefore only a few studies evaluate the presence of drugs of abuse in sludge, and most of these study only a limited number of drugs. Kaleta et al. [10], for instance, study the presence of amphetamine in sewage sludge, Langford et al. [11] develop a multiresidue method for sludge samples in which some drugs of abuse are included although none were found in the samples, and Jones-Lepp et al. [12] determined methamphetamine in sludge. Very recently, Mastroianni et al. [13] developed a method to determine 20 drugs of abuse (cocainics, amphetamines, opioids, benzodiazepines, LSD and cannabinoids) and 16

compounds were found in sludge samples at concentrations from 0.4 to 579 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of dry weight (d.w.).

Several extraction techniques have been applied to extract drugs of abuse from sludge [10-12], the most popular being pressurized liquid extraction (PLE) and ultrasonic solvent extraction (USE). In some cases solid-phase extraction (SPE) is further applied as a clean-up technique. For instance USE followed by SPE has been used to determine amphetamine [10] and PLE has been applied to determine methamphetamine [12] and a group of various drugs [11]. As regards SPM, once the sample is filtered, the suspended matter is extracted in a similar way to sludge, with PLE [8, 9, 14] being the most used technique.

After extraction, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is usually applied [15, 16], although gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after derivatization has also been used [17]. As regards LC-MS/MS, ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) is increasingly used [8, 11] and different analysers have been used to determine these

compounds in water, SPM and sludge samples, with triple quadrupole (QqQ) being the most frequent [4, 18, 19], although quadrupole-linear trap (QTRAP) [20, 21] and quadrupole-time of flight (QTOF) [22] have also been used.

The aim of this study is to develop an analytical method for the simultaneous determination of nicotine, four drugs of abuse (morphine, codeine, cocaine and methadone) and some of their main metabolites (2-ethylidene-1,5 dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine, dihydrocodeine, 6-acetylmorphine and benzoyllecgonine) in sewage sludge. Although nicotine is a legal drug, it was included in this study due to the high consumption of tobacco worldwide. The method is based on PLE and liquid chromatography-(electrospray) tandem mass spectrometry (LC-(ESI)MS/MS) and was applied to determine these drugs of abuse in several sludge samples from two STPs.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Reagents and standards

Standards of nicotine (NIC), codeine (COD), dihydrocodeine (DIC), 6-acetylmorphine (6-

AM), cocaine (COC), benzoylecgonine (BE), 2-ethylidene-1,5 dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), methadone (MTD), morphine (MOR), 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) and the surrogates EDDP-d₃, COD-d₆ and MOR-d₆ were acquired from Cerilliant (Round Rock, TX, USA), available as solution in 1 mL of methanol or acetonitrile at 1000 mg/L. Stock solutions of individual standards were prepared by diluting each compound in methanol at 100 mg/L and storing them at -20°C in the dark. A mixture of all compounds in methanol:water (1:1 v/v) at 100 µg/L was prepared weekly. Working solutions were prepared daily by appropriate dilution of this solution with methanol:water (1:1 v/v).

Ultra pure water was obtained using a purelab ultra purification system (Veolia water, Sant Cugat del Vallés, Spain). The acetonitrile, acetone, dichloromethane and methanol (HPLC-grade) came from SDS (Peypin, France), the nitrogen from Carbueros Metálicos (Tarragona, Spain) and the acetic acid from Prolabo (Bois, France). Diatomaceous earth was supplied

by Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.2 Sample pre-treatment

Sewage sludge samples were collected from two urban STPs in two cities of about 130,000 inhabitants located in southern Catalonia. They were then homogenized, frozen and lyophilized using the freeze-dry system (Labconco, Kansas City, MO, USA). The lyophilized samples were homogenized by mortar and pestle, sieved through a 125 µm screen and stored at room temperature.

To optimize the method, the pretreated sludge samples were spiked with the analytes dissolved in acetone, and then the solvent was evaporated at room temperature while submitted to vigorous shaking. The volume of acetone was enough to completely cover the sludge.

2.3 Pressurized liquid extraction

Pretreated sludge samples were extracted by PLE using an ASE 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Deuterated compounds (MOR-d₃, COD-d₆ and EDDP-d₃) at a concentration of 125 µg/kg d.w. were added to 1 g of pretreated sludge. This was then

thoroughly mixed with 2 g of diatomaceous earth to remove possible traces of water from the sludge and maximize effectiveness in the extraction process, especially in the case of solvents immiscible with water. The mixture was then transferred to the inside of the extraction cell and a Whatman glass fibre filter (Ahlstrom, PA, USA) was put at the top and bottom of the cell.

The extraction solvent was dichloromethane and the operating conditions were: preheating period 5 min, extraction temperature 100°C, extraction pressure 1500 psi with a static period of 15 min in one cycle, flush volume 60% of cell volume and nitrogen purge time 120 s. The final extraction volume was approximately 15 mL, which was evaporated to dryness under a nitrogen stream and redissolved in 5 mL of methanol:water (1:1 v/v), filtered with a microfilter of 0.20 µm (Teknokroma, Barcelona, Spain), and then analysed by LC-MS/MS.

2.4 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

The determination was performed using an HP 1200

series liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with electrospray ionization (ESI). The chromatographic column was a fused core Ascentis Express C₁₈ (4.6 x 50 mm) with a 2.7 µm particle size (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and the volume injected was 50 µL. The flow-rate was 0.4 mL/min and the column temperature was kept at 30°C.

A binary mobile phase with a gradient elution was used. Solvent A was acidified water with acetic acid (pH 2.8) and solvent B was acetonitrile. The gradient was initially 5% B, which was increased to 15% in 3.5 min, to 50% in 2.5 min, to 100% in 6 min, kept constant for 2 min and finally returned to 5% B in 1 min. All the compounds were eluted within 13 min.

The optimized conditions for the ESI interface in positive mode were: 45 psi nebulizer pressure, 12 L/min drying gas flow-rate, 350°C drying gas temperature and 3000 V spray potential. Cone voltage values and collision energy voltages were within 60-140 V and 15-60 V respectively. Two selective reaction monitoring (SRM) transitions for each compound were monitored

and the values are shown in Table 1. The most abundant transition was used for quantification, while the other

was used for confirmation. Relative ion intensities and retention time were also used as confirmation criteria.

Table 1. SRM conditions and ions selected for determination of drugs of abuse.

Compound	Precursor ion	Product ions		Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)
		Quan.	Qual.		
Nicotine (NIC)	163	130	117	60	15
Morphine (MOR)	286	152	128	100	60
Morphine-d6 (MOR-d6)	292	152	128	60	60
Dihydrocodeine (DIH)	302	141	165	100	60
Codeine (COD)	300	165	181	100	60
Codeine-d6 (COD-d6)	306	165	153	100	45
6-acetylmorphine (6-AM)	328	165	181	100	45
Benzoylcegonine (BE)	290	168	82	100	15
Cocaine (COC)	304	182	82	60	15
EDDP (EDDP)	278	234	186	140	30
EDDP-d3	281	234	249	140	30
Methadone (MET)	310	265	223	60	15

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 LC-(ESI)MS/MS

Chromatographic separation was performed on a C₁₈ column based on Fused-Core particle technology, which provides more than twice the speed and efficiency of traditional columns at half the backpressure of sub-2- μ m columns [23]. The binary gradient elution enabled the ten compounds to be separated in 13 min.

LC-(ESI)MS/MS conditions were based on a previous paper by Pedrouzo [24], in which these compounds were determined in water samples. EDDP-d₃, COD-d₆ and MOR-d₆ were used as surrogates to compensate the adverse ion suppression given in ESI. The surrogate used for each compound was chosen taking into account similar structure, proximity in retention time and similar behaviour with regard to ion suppression.

Due to the positive charge provided by the amino group

present in the analyte structure, the compounds were analysed in positive ionization mode producing abundant $[M+H]^+$ ion. Quantification was performed under SRM mode and two product ions were used for confirmation (Table 1).

Instrumental calibration curves were obtained by injection of a standard solution at concentration levels ranging from 0.5 to 50 $\mu\text{g/L}$, except for COD and DIC (1-50 $\mu\text{g/L}$). Determination coefficients (r^2) were higher than 0.9986.

The instrumental repeatability values, expressed as RSD% ($n=5$, 10 $\mu\text{g/L}$), were lower than 5% and the reproducibility values ($n=5$, 10 $\mu\text{g/L}$) were lower than 8%. The instrumental detection (LOD) and quantification limits (LOQ) were determined by direct injection of decreasing amounts of each substance.

The LODs were calculated as the concentrations where the signal-to-noise ratio (S/N) was 3 and were found between 0.01 and 0.5 $\mu\text{g/L}$; the LOQs were defined as the lowest concentration of the calibration curve and ranged from 0.5 to 1 $\mu\text{g/L}$.

3.2 PLE optimization

The lyophilized sludge was spiked with 125 $\mu\text{g/kg}$ (d.w.) of each compound to perform the PLE optimization. This concentration was selected due to the high concentration of some compounds in the sample. The four parameters that have the most influence on PLE were optimized: extraction solvent, extraction temperature, static time and number of cycles. Parameters such as pressure, preheating time, flush volume and purge time are usually minor variables and were not optimized. The initial conditions were taken in accordance with our previous experience [25-27]: 1500 psi pressure, 80°C temperature, 5 min preheat time, 5 min static extraction time, 60% flush volume, 120 s purge nitrogen, cell size 11 mL, 1 cycle and 1 g sample weight. In the PLE optimization, a non-spiked sample (blank) was analysed to test for the presence of these compounds in the sample.

The first parameter optimized was the extraction solvent, and water, methanol, water-methanol mixture (1:1 v/v), dichloromethane and acetone were tested. Extracts with dichloromethane and acetone were evaporated to

dryness under nitrogen and redissolved with 25 mL of water-methanol (1:1 v/v). Extracts of water, methanol or a mixture of the two were diluted to 25 mL with the appropriate solvent in order to obtain a solution of water-methanol (1:1 v/v). Table 2 shows the absolute recoveries of each compound. Dichloromethane provided the best recoveries for all compounds,

except BE (15%) and MET (16%). BE showed a better recovery when a polar solvent such as water (47%) was used, and MET was slightly better extracted with acetone. NIC and MOR were recovered lower than 10% with water, methanol or water:methanol (1:1 v/v). THC-COOH was barely extracted with any of the solvents tested.

Table 2. PLE absolute recoveries (n=3) using different solvents. For other conditions see text.

Compound	Water	Methanol	Water:Methanol (1:1)	Dichloromethane	Acetone
NIC	-	-	-	35	29
MOR	-	-	-	10	-
DIH	20	28	23	36	30
COD	18	16	20	40	32
6-AM	19	20	16	19	16
BE	47	40	33	15	18
COC	36	32	45	50	40
EDDP	16	-	13	19	-
MET	14	-	10	16	23
THC-COOH	-	-	-	-	-

- < 10%.

%RSD (n=3) < 12%.

Recoveries with acetone were quite similar to those obtained with dichloromethane except for NIC, MOR, COD, COC and EDDP, whose recoveries were higher with dichloromethane. Although dichloromethane did not extract all compounds quantitatively, it was selected as

the extracting solvent because it gave the best recoveries for most of the analytes. Previous studies have reported water-methanol adjusted to pH 2 as the optimum extracting solvent in PLE [11, 14, 20] for some drugs of abuse.

However, some of the drugs of abuse determined in this study (alkaloids) are weak bases poorly soluble in water but readily soluble in non-polar solvents.

The second parameter optimized was temperature. Three temperatures at 60°C, 80°C and 100°C were tested to improve the extraction while all other conditions were the same as the initial ones, but using

dichloromethane as the extracting solvent. As can be seen in Table 3, recoveries were similar at 60°C and 80°C and slightly better at 100°C, although for some compounds such as MOR, BE and COC the recoveries did not increase significantly. Therefore temperatures higher than 100°C were not tested, and 100°C was selected for further optimization.

Table 3. Absolute recoveries (n=3) using different temperatures, extraction times and number of cycles.

Compound	1 cycle. 5 min			100 °C. 1 cycle			15 min. 100°C 2 cycles
	60°C	80°C	100°C	10 min	15 min	20 min	
NIC	30	35	42	42	50	48	53
MOR	11	10	14	20	17	16	15
DIH	41	36	50	46	61	56	66
COD	38	41	53	58	63	65	64
6-AM	22	19	34	41	40	43	29
BE	12	15	17	13	25	30	25
COC	55	50	57	78	65	69	72
EDDP	19	19	28	24	36	19	26
MET	12	16	30	27	41	41	38
THC-COOH	11	-	-	-	-	10	-

- < 10%.

%RSD (n=3) < 9%.

Static time was the third parameter optimized. Four static times between 5 and 20 minutes were tested and the recovery results are summarized in Table 3. Although there are no significant differences between the results obtained, 15 minutes

was selected since this involves slightly higher recoveries for some compounds such as DIH and EDDP.

The last parameter optimized was the number of cycles. We tested two cycles with dichloromethane at 100°C and 15 min of static

time. Recovery values did not increase with two cycles and for this reason one cycle was selected, which decreased extraction time.

To summarize, the final conditions were: dichloromethane as extraction solvent, preheating period 5 min, extraction temperature 100°C, extraction pressure 1500 psi with a static period of 15 min in one cycle, flush volume 60% of cell volume, nitrogen purge time 120 s and 1 g of sample (d.w.). As shown in Table 3, absolute recoveries at optimum conditions were higher than 50% for DIH, COD, NIC and COC, between 36% and 41% for EDDP, 6-AM and MET, between 17% and 25 % for MOR and BE, and lower than 5% for THC-COOH.

As mentioned earlier, the PLE extract (about 15 mL) was evaporated to dryness and redissolved to 5 mL with methanol:water (1:1 v/v). The loss by evaporation was evaluated as follows: a mix of each compound at 25 µg/L was dissolved in dichloromethane, subsequently evaporated under N₂ stream and reconstituted with water:methanol (1:1 v/v). The response was compared with the signal of each compound at 25 µg/L dissolved in water:methanol

(1:1 v/v) without being subjected to evaporation. Loss by evaporation was not observed for any compound.

To exclude any possible causes of the low recoveries of some compounds, especially THC-COOH, the retention of the compounds in both nylon and polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane filters was evaluated by comparing the responses of unfiltered and filtered standard solution. Strong retention of THC-COOH (85%) was observed when using a nylon filter, which was used for PLE optimization (Tables 2 and 3), but this was substituted by PTFE since retention of THC-COOH in this filter was negligible.

The matrix effect was then studied by comparing the responses of analytes in spiked sludge samples after PLE extraction with the areas obtained with a direct injection of a standard solution in water:methanol (1:1 v/v) at a concentration of 25 µg/L. As can be seen in Table 4, the compounds least affected by ion suppression were COC, NIC, COD, DIH and 6-AM, with an ion suppression between 15-35%. The signal was suppressed by 53-61% for all other compounds except THC-COOH, whose

signal was suppressed by 91%. THC-COOH was then excluded from the study.

Relative recovery percentages (Table 4) for sample spiked at 125 µg/kg (d.w.) were calculated with calibration curves generated by spiking blank extracts of PLE with different amounts of each compound between 0.25 and 50 µg/L. Additional experiments at lower concentration (25 µg/kg (d.w.)) were done for those compounds present at low concentration in the sample and similar recoveries were obtained. Three isotopically labelled standards (MOR-d₆, COD-d₆ and EDDP-d₃) was used as surrogate to minimize matrix effects and compensate variations occurring during sample preparation, the deuterated compound assigned to each compound was selected according to three criteria: close elution, similar recoveries and similar behaviour in the source. Recoveries of each deuterated compound were similar to those corresponding to their analogue compounds. Thus recovery of MOR-d₆, COD-d₆ and EDDP-d₃ were 20%, 68% and 38% respectively.

3.3 Method validation

To validate the method calibration curves were generated by spiking sludge samples before PLE with 125 µg/kg (d.w.) of each surrogate and different amounts of each compound between 2.5 µg/kg (d.w.) and 500 µg/kg (d.w.). The value of signal generated by each compound present in the sample blank (NIC, COD, BE, COC, EDDP and MET) was subtracted to each point of the matrix-matched calibration curve. Determination coefficients (r^2) were higher than 0.994.

The labelled surrogate MOR-d₆ was used to quantify its corresponding analogue MOR; the surrogate COD-d₆ was used to quantify NIC, DIH, COD and COC; and lastly EDDP-d₃, was used to quantify EDDP, BE, 6-AM and MET. Table 4 shows the validation data obtained for the whole method. It can be seen that the use of deuterated compounds and matrix-matched calibration enables a good level of quantification.

Repeatability and reproducibility were evaluated by five replicate extractions of spiked sludge at a concentration of 125 µg/kg (d.w.) for NIC and EDDP and 25 µg/kg (d.w.) for the rest of compounds,

injected the same day and different days, respectively.

The repeatability RSD% values were lower than 14% and the reproducibility values were lower than 20%. Detection limits (LODs) were calculated by analysing a sludge sample spiked with decreasing concentrations of each compound. When the compounds were not found in the blank sample, the LODs were calculated as the concentrations giving peaks for which the signal-to-noise ratio was 3; when analytes were present in the sample, the LODs were estimated as the concentrations giving a signal average of plus three times

the standard deviation of the blank signal. For all compounds the LODs were between 0.5 and 10 µg/kg (d.w.). For some compounds, such as COC and BE, the LODs (0.5 µg/kg (d.w.)) were lower than those reported by Langford et al. [11] (20 µg/kg for COC and 5 µg/kg (d.w.) for BE), the extraction for which was carried out using PLE and determination by LC-(ESI)-MS/MS. LOQs were defined as the concentrations of the lowest point of the calibration curve and were between 2.5 and 25 µg/kg (d.w.).

Table 4. Method validation parameters.

Compound	Rel. Recovery (%)	Linear range (µg/kg)	LOD (µg/kg)	%RSD ^a	%RSD ^b	Ion Suppression (%)	SR ₂ /SR ₁ Spiked sample
NIC	77	5 - 500	2	14	20	35	40
MOR	44	25 - 500	10	7	16	61	19
DIH	84	10 - 500	5	12	19	27	87
COD	81	5 - 500	1	11	20	22	26
6-AM	59	5 - 500	1	7	18	32	28
BE	71	2.5 - 500	0.5	11	12	65	5
COC	76	2.5 - 500	0.5	8	14	15	7
EDDP	77	10 - 500	2.5	10	12	53	20
MET	95	2.5 - 500	0.5	12	17	57	18
THC-COOH	-	-	-	-	-	91	-

- Not calculated.

^a Repeatability (n=5)

^b Reproducibility between days (n=5)

SR₂/SR₁ Relative ion intensities (%)

3.4 Method application

The method was used to analyse different sewage sludge samples collected from two different treatment plants in the Tarragona region in Spain. The identification and confirmation criteria for each compound were based on retention time, presence of two transitions, and relative ion intensities between the signal (peak height) of the qualifier ion (SRM₂) and the quantifier ion (SRM₁). Table 4 also shows relative ion intensities of a sludge sample spiked at a concentration of 125 µg/kg (d.w.). Thus the maximum permitted tolerances obtained under the guidelines of Commission Decision 2002/657/EC [28] to confirm the presence of these compounds in the sample were +/- 20% for DIH, +/- 25% for NIC, COD and 6-AM, +/- 30% for MOR, EDDP and MET, and finally +/- 50% for BE and COC. The values of concentration and relative ion intensities of the positive results are shown in Table 5. MOR, DIH and 6-AM were not detected in any sample. For the other compounds detected, relative ion intensities were within the limits permitted by Commission Decision 2002/657/EC [28].

The highest levels in both STPs were observed for NIC and EDDP, with maximum values of 173 µg/kg (d.w.) and 232 µg/kg (d.w.) respectively. High values are expected for the stimulatory non-controlled drug nicotine due to the large, widespread consumption of tobacco. MET was found at lower concentrations (31.8 µg/kg (d.w.)) compared to its principal metabolite EDDP (232.2 µg/kg (d.w.)). According to the literature, 20-60% of the MET dose is excreted in urine in 24 h, with up to 33% as the uncharged drug and up to 43% as EDDP [29]. A similar metabolism and excretion pattern occurs when COC is consumed [30]. COC is extensively metabolized to its major metabolite BE. Hence COC is excreted without change in the urine at around 1-14% and BE is excreted at around 45% [30]. Our results showed lower but still significant levels of COC and its metabolite BE at concentrations ranging from 3.8-4.7 µg/kg (d.w.) and 3.5-19 µg/kg (d.w.) respectively. However, the degradation process during sewage treatment also needs to be taken into account. COD was found at below the LOQ in all samples except one, where it was found at

7.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.). Figure 1 is an SRM chromatogram of the compounds present in sewage sludge sample number 3. This shows that six of the nine drugs

of abuse monitored were determined. Their respective concentrations are shown in Table 5.

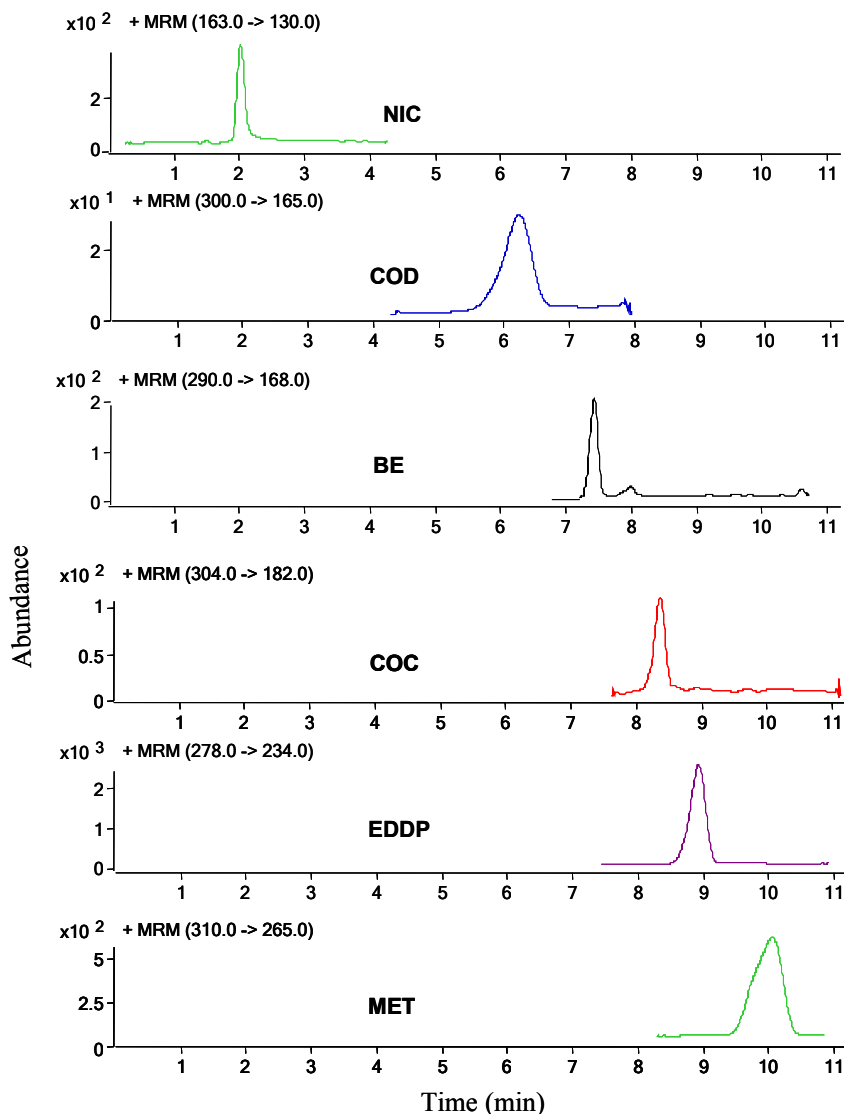


Figure 1. SRM chromatogram obtained by PLE/LC-MS/MS. For experimental conditions see text.

The occurrence of these contaminants in sludge depends on the concentration in influent water, removal efficiency of STPs and also their degradation. For instance in Pedrouzo's study [24], where sewage samples from the same STPs were analysed, COC and BE showed the highest values for influent samples, with maximum concentrations of 3300 ng/L and significant removal during treatment. However, these were not found at a higher concentration in the sludge. Partition coefficients for COC

and BE suggest that little will partition from the dissolved phase to the sludge [31]. Unlike our results with sludge, Pedrouzo detected MOR, 6-AM and DIH at low levels of ng/L in influent samples. With regard to effluent samples, the values reported by Pedrouzo show 99% removal for most compounds after tertiary treatment, although DIH, present at low concentrations, was not removed and was reported at constant values in all the sampling points between 9 and 14 ng/L.

Table 5. Results in µg/kg (d.w.) of sewage sludge samples analysed.

Compound	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4	
NIC	23.9	(46)	120	(37)	51.8	(39)	173.1	(45)
COD	< LOQ	(28)	< LOQ	(21)	7.9	(31)	< LOQ	(24)
BE	3.5	(6)	9.4	(6)	15.6	(5)	19	(4)
COC	4.7	(6)	3.9	(6)	4.2	(7)	3.8	(6)
EDDP	9.7	(25)	232.2	(21)	144.3	(24)	113.9	(18)
MET	7.7	(23)	31.8	(13)	14.7	(16)	21.3	(18)

% RSD (n=3) < 16.

Relative ion intensities in brackets (%)

In the only study [11] on the occurrence of COD, COC, and BE in sludge samples, from three STPs located in Scotland, none of these drugs were found. Amphetamine [10] and methamphetamine [12] were found in sludge, but these drugs of abuse were not included in this study.

When some drugs of abuse were analysed in SPM, which can provide information about their retention in solid particles, COC, BE and methamphetamine were those found at higher concentrations [8, 14]. In another study in Croatia [9], MOR, COD, BE, EDDP, COC, EDDP and MET were found in wastewater

samples at concentrations of between 5 and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.), with EDDP being the one with the highest concentration.

4. CONCLUSIONS

A method based on PLE and LC-MS/MS was developed for the determination of nicotine, 4 drugs of abuse and 4 metabolites in sewage sludge at low levels ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Although the method was suitable for the determination of all compounds, THC-COOH had to be excluded due to the high ion suppression observed. The use of a chromatographic column with Fused-Core particle technology gave us satisfactory separation of all compounds in 13 min. Significant PLE parameters such as solvent, temperature and number of extraction cycles was optimized in order to improve extraction efficiency for the simultaneous determination of target analytes from sludge samples. Extraction efficiency was improved with the use of non-polar solvent (dichloromethane) for most analytes. Matrix-matched calibration and deuterated compounds as surrogate were used to compensate matrix effect and ensure accurate quantification.

LOQs lower than 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) and %RSD ($n=5$) were found between 7% and 20%, these values being lower than others reported in the published literature concerning drugs of abuse in sewage sludge. The method was successfully applied to determine these compounds in two STPs. High levels of NIC and EDDP were found in sewage sludge. 6-AM, DIH and MOR were not detected in any samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financed support by Ministry of Science and Technology (CTM2008-06847-CO2-01) and the Department of Innovation, Universities and Enterprise (project 2009 SGR 223).

REFERENCES

- [1] E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, C. Chiabrando, P. Grassi, R. Fanelli, *Water Res.*, 42 (2008) 961-968.
- [2] S. Castiglioni, E. Zuccato, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 8421-8429.
- [3] M.R. Boleda, M.T. Galceran, F. Ventura,

- Water Res., 43 (2009) 1126-1136.
- [4] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, J. Chromatogr. A., 1161 (2007) 132-145.
- [5] M. Viana, C. Postigo, X. Querol, A. Alastuey, M.J. López de Alda, D. Barceló, B. Artíñano, P. López-Mahia, D. García Gacio, N. Cots, Environ. Int., 36 (2010) 527-534.
- [6] M. Viana, C. Postigo, X. Querol, A. Alastuey, M.J. López de Alda, D. Barceló, B. Artíñano, P. López-Mahia, D. García Gacio, N. Cots, Environ. Pollut., 159 (2011) 1241-1247.
- [7] A. Cecinato, C. Balducci, V. Budetta, A. Pasini, Atmos. Environ., 44 (2010) 2358-2363.
- [8] R. Baker, V. Ocenásková, M. Kvicalova, B. Kasprzyk-Hordern, Environ. Int., 48 (2012) 28-38.
- [9] I. Senta, I. Krizman, M. Abel, S. Terzic, Anal. Bioanal. Chem., 405 (2013) 3255-3268.
- [10] A. Kaleta, M. Ferdig, W. Buchberger, J. Sep. Sci., 29 (2006) 1662-1666.
- [11] K. Langford, M. Reid, K. Thomas, J. Environ. Monit., 13 (2011) 2284-2291.
- [12] T.L. Jones-Lepp, R. Stevens, Anal. Bioanal. Chem., 387 (2007) 1173-1183.
- [13] N. Mastroianni, C. Postigo, M.L. de Alda, D. Barcelo, J. Chromatogr. A., 1322 (2013) 29-37.
- [14] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, J. Chromatogr. A., 1218 (2011) 7901-7913.
- [15] A.L.N. van Nuijs, S. Castiglioni, I. Tarcomnicu, C. Postigo, M.L. de Alda, H. Neels, E. Zuccato, D. Barcelo, A. Covaci, Sci. Total Environ., 409 (2011) 3564-3577.
- [16] C. Postigo, M.J. Lopez de Alda, D. Barcelo, Trends Anal. Chem., 27 (2008) 1053-1069.
- [17] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, J. Chromatogr. A., 1217 (2010) 1748-1760.
- [18] S. Terzic, I. Senta, M. Ahel, Environ. Pollut., 158 (2010) 2686-2693.
- [19] J.D. Berset, R. Brenneisen, C. Mathieu, Chemosphere., 81 (2010) 859-866.
- [20] C. Metcalfe, K. Tindale, H. Li, A. Rodayan, V.

- Yargeau, Environ. Pollut., 158 (2010) 3179-3185.
- [21] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, Environ. Int., 36 (2010) 75-84.
- [22] F. Hernández, L. Bijlsma, J.V. Sancho, R. Díaz, M. Ibáñez, Anal. Chim Acta., 684 (2011) 96-106.
- [23] O. Nuñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martinez, P. Lucci, J. Chromatogr. A, 1228 (2012) 208-223.
- [24] M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, J. Sep. Sci., 34 (2011) 1091-1101.
- [25] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, Trends Anal. Chem., 29 (2010) 752-764.
- [26] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A, 1174 (2007) 125-131.
- [27] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 5619-5625.
- [28] Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002.
- [29] T. Kelly, P. Doble, M. Dawson, J. Chromatogr. B., 814 (2005) 315-323.
- [30] A.L.N. van Nuijs, B. Pecceub, L. Theunis, N. Dubois, C. Charlier, P.G. Jorens, L. Bervoets, R. Blust, H. Neels, A. Covaci, Water Res., 43 (2009) 1341-1349.
- [31] M. Petrovic, M.J.L. De Alda, S. Diaz-Cruz, C. Postigo, J. Radjenovic, M. Gros, D. Barceló, Phil. Trans. R. Soc.A, 367 (2009) 3979-4003.

3.1.2. Discusión de Resultados

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

En este estudio se selecciona PLE sobre otras técnicas de extracción existentes para muestras sólidas, ya que gracias a su funcionamiento con presiones altas, manteniendo el solvente de extracción en estado líquido a temperaturas por encima de su punto de ebullición, se mejora la solubilidad de los compuestos de interés. Así mismo, la cinética de desorción de la matriz sólida proporciona tiempos de extracción más cortos y gran reproducibilidad [1].

Conforme los resultados obtenidos evaluando diferentes solventes de extracción, el diclorometano fue el solvente que proporcionó relativamente las mejores recuperaciones. La razón se puede encontrar en que los alcaloides son compuestos de carácter básico, y su solubilidad en los diferentes solventes varía en función del pH, es decir según se encuentren en estado neutro o cargadas. En forma neutra, son solubles en solventes orgánicos no polares, y estado cargado, son solubles en solventes polares, soluciones ácidas e hidroalcohólicas [2]. Por lo que es posible que en los fangos de depuradora, los compuestos se encuentren en estado neutro, debido al pH que generalmente presentan los fangos (pH entre 5.5 -12). En estudios previos, el diclorometano nunca ha sido evaluado para la extracción de las drogas de abuso de los fangos utilizando PLE, comúnmente los solventes probados han sido metanol [3] o diferentes mezclas de metanol:agua [4] y en estudios muy recientes, pero utilizando UAE, estas mezclas de solventes han sido acidificadas [5, 6]. En el primer estudio mencionado utilizando PLE [3], extraen cocaína y benzoilecgonina y otros fármacos con metanol, obteniendo recuperaciones del método para estos dos compuestos de 144 y 130%, respectivamente, por lo que se puede observar que estos compuestos presentan incremento de la señal con el método desarrollado por los autores. En el segundo estudio citado utilizando PLE [4], extraen varias drogas de abuso, de las cuales seis de éstas son en común con nuestro estudio, y obtienen recuperaciones de extracción para estas seis drogas entre 18-90%, las cuales son ligeramente más bajas que en nuestro estudio (44-95%). Los estudios realizados posteriormente a nuestro trabajo han utilizado UAE

para extraer varios fármacos y drogas de abuso (siete son en común a nuestro estudio), obtenido recuperaciones similares a las nuestras [5, 6].

El método analítico desarrollado pudo ser aplicado eficazmente a la determinación de drogas de abuso en fangos de depuradoras de aguas residuales urbanas de la ciudad de Tarragona y Reus. Según los análisis, 6 de los 9 compuestos estudiados fueron detectados en todas las muestras analizadas, encontrándose nicotina y el metabolito de la metadona (EDDP) con las más altas concentraciones, de hasta 173 y 232 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.), respectivamente. De esta manera, los resultados obtenidos reflejan por primera vez la presencia de estos contaminantes de interés emergente en fangos de depuradora de esta zona geográfica.

Referencias

- [1] B. Subedi, L. Aguilar, E.M. Robinson, K.J. Hageman, E. Björklund, R.J. Sheesley, S. Usenko, *Trac-Trends Anal. Chem.* 68 (2015) 119.
- [2] A.R. Gennaro, Remington Farmacia, Editorial Médica Panamericana, Philadelphia, (2003), 1388 p.
- [3] K.H. Langford, M. Reid, K.V. Thomas, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 2284.
- [4] N. Mastroianni, C. Postigo, M.L. de Alda, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1322 (2013) 29.
- [5] P. Gago-Ferrero, V. Borova, M. Dasenaki, N. Thomaidis, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 4287.
- [6] R. Álvarez-Ruiz, M.J. Andrés-Costa, V. Andreu, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1405 (2015) 103.

3.2. Determinación de hipnótico-sedantes en muestras medioambientales

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Otra familia de compuestos centro de estudio en esta tesis es la de los fármacos hipnótico-sedantes, por lo que se han desarrollado dos métodos para su determinación principalmente de carbamazepina, benzodiazepinas y barbitúricos, en aguas de río, aguas residuales y fangos de depuradora. Esta sección se ha dividido en tres apartados: en el primero se presenta el artículo científico derivado del desarrollo de un método analítico para determinar hipnótico-sedantes en aguas de río y aguas residuales, utilizando como técnica de extracción SPE y como técnica de determinación LC-MS/MS. En el segundo apartado se presenta el artículo científico derivado del desarrollo de un método analítico para determinar este grupo de contaminantes en fangos de depuradora, utilizando como técnica de extracción PLE y para determinar los compuestos hemos aplicado el mismo método de determinación que en las muestras medioambientales líquidas. Y en el tercer apartado discutiremos los resultados más relevantes obtenidos de ambos estudios.

Según un informe reciente de la EMCDDA, los hipnótico-sedantes además de usarse con fines terapéuticos en Europa, también se usan con fines recreativos o ilegales, principalmente en jóvenes de entre 15 y 16 años [1]. Esta circunstancia además de ser un problema potencial en el tema de salud, también tiene implicaciones en el ámbito medioambiental, por su posible presencia en el medioambiente acuático o terrestre.

Los hipnótico-sedantes principalmente las benzodiazepinas, son sustancias que han sido relativamente bastante investigadas, sobre todo en el medioambiente acuático; no obstante, la mayoría de estos estudios son métodos multiresiduo en los cuales solo incluyen de entre 1 a 4 hipnótico-sedantes. Solo dos estudios se han limitado específicamente a la determinación de 23 benzodiazepinas [2] y 6 barbitúricos [3] en aguas de río y aguas residuales. En fangos de depuradora, se han encontrado pocos estudios en los cuales solo determinan carbamazepina y/o diazepam en esta matriz [4-8]. Solo en un estudio reciente, posterior al estudio presentado en esta Tesis, desarrollaron un método multiresiduo para determinar 148 fármacos en fangos de depuradora incluyendo tres

benzodiazepinas, 2 barbitúricos y carbamazepina como compuestos en común a nuestro estudio, pero utilizando como técnica de extracción UAE [9].

Ante lo recién comentado, es obvia la necesidad de desarrollar métodos específicos para determinar este grupo de contaminantes en muestras medioambientales líquidas y sólidas, las cuales han sido tomadas en una zona geográfica donde nunca han sido investigados.

Para los dos estudios presentados en esta sección, la separación cromatográfica se lleva a cabo con una columna *fused core* de fase inversa C_{18} , y la detección se realiza por medio de MS/MS equipado con QqQ y operando ESI en positivo para las benzodiazepinas y ESI negativo para los barbitúricos. Teniendo en cuenta estas condiciones de trabajo, en el primer estudio presentado a continuación, varias fases móviles fueron probadas con la finalidad de encontrar la que proporcionara mejor resolución y simetría cromatográfica, como también que favoreciera la ionización de los compuestos tanto en modo negativo como en positivo. En este estudio, también fueron evaluados varios parámetros que afectan la extracción de los compuestos de la matriz líquida con SPE. En el segundo estudio los principales parámetros operacionales del PLE fueron optimizados, para garantizar las mejores condiciones de extracción de los compuestos de los fangos de depuradora.

Ambos métodos analíticos fueron aplicados para determinar hipnótico-sedantes de muestras de agua tomadas de 3 ríos (Ebro, Ter y Llobregat), aguas residuales y fangos de depuradora tomados de dos EDARs localizadas en Tarragona y Reus, sirviendo una población aproximada de 120000 habitantes cada una.

Los resultados científicos obtenidos de desarrollar el método analítico para analizar muestras medioambientales líquidas han sido publicados en la revista *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 95 (2015) 669-684, mientras que los obtenidos de desarrollar el método para

analizar muestras de fangos han sido publicados en la revista *Journal of Separation Science* 37 (2014) 3481-3488.

Referencias

- [1] <http://www.emcdda.europa.eu/> , *European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction*, (Acceso junio 2015).
- [2] B. Subedi, K. Kannan, *Sci. Total Environ.* 514 (2015) 273.
- [3] M. Peschka, J. Eubeler, T. Knepper, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7200.
- [4] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 13321.
- [5] C.E. Rodríguez-Rodríguez, A. Jelić, M.A. Pereira, D.Z. Sousa, M. Petrović, M.M. Alves, D. Barceló, G. Caminal, T. Vicent, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 12012.
- [6] A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta.* 80 (2009) 363.
- [7] A. Jelić, M. Gros, A. Ginebreda, R. Céspedes-Sánchez, F. Ventura, M. Petrovic, D. Barceló, *Water Res.* 45 (2011) 1165.
- [8] P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2471.
- [9] P. Gago-Ferrero, V. Borova, M. Dasenaki, N. Thomaidis, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 4287.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

*3.2.1. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry to
determine sedative hypnotic drugs in river water
and wastewater*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY TO DETERMINE SEDATIVE HYPNOTIC DRUGS IN RIVER WATER AND WASTEWATER

Paula Arbeláez, Francesc Borrull, Eva Pocurull, Rosa Maria Marcé

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Universitat Rovira i Virgili, Sescelades Campus, Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

A method for simultaneous determination of 4 benzodiazepines (bromazepam, carbamazepine, diazepam and nordiazepam) and 4 barbiturates (barbital, pentobarbital, phenobarbital and secobarbital) in river water and wastewater using solid-phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography-(electrospray) tandem mass spectrometry (LC-(ESI)MS/MS) was developed. LC-(ESI)MS/MS analysis was performed in positive and negative modes for benzodiazepines and barbiturates, respectively, and in selected reaction monitoring (SRM).

Limits of detection were in the range of 0.2 to 5 ng/L for benzodiazepines and 2.5 to 50 ng/L for barbiturates. Precision (repeatability and reproducibility between days) expressed as %RSD (n=5) was lower than 17% for low concentration (depending on the matrix between 50 and 250 ng/L for barbiturates, and between 5 and 25 ng/L for benzodiazepines), and lower than 15% for high concentration (between 200 and 1250 ng/L for barbiturates, and between 20 and 125 ng/L for benzodiazepines). Low matrix effect was observed for all compounds, except for barbital (75%) and PTB (-48%) in wastewater.

The method was applied to water samples from two sewage treatment plants (STPs) and the rivers Ebre, Ter, and Llobregat, located in Catalonia. Carbamazepine was the target compound found at the highest concentration in river water (2.1-3.3 ng/L). In both influent and effluent wastewater samples, phenobarbital, bromazepam, carbamazepine, diazepam and nordiazepam were determined at concentration levels ranging from 5.0 to 2,337.3 ng/L.

Keywords: *Benzodiazepines, barbiturates, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Core-Shell particle, solid phase extraction, aquatic environment.*

1. INTRODUCTION

A huge amount of residues generated by the different activities involved in our daily lives enters sewage treatment plants (STPs). These residues may contain diverse group of organic contaminants, including a broad spectrum of pharmaceuticals, personal care products, illicit drugs, pesticides and veterinary products, among others [1, 2]. Despite the attempt by STPs to remove these contaminants from wastewater, their elimination by conventional designs is not always complete. Consequently, effluent discharges introduce the contaminants into the environment [2].

Psychiatric pharmaceuticals are among the most frequently used pharmaceuticals, and these include barbiturates and benzodiazepines. According to data provided by the Catalan Health Department, in 2012 were prescribed approximately 10 million prescriptions of sedative hypnotics in Catalonia [3].

Benzodiazepines are normally halogenated compounds, making them resistant to biodegradation [4]. Degradability studies of barbiturates under aerobic conditions and hydrolysis do not show any evidence of

degradation, underlining their high stability in the environment [5]. Once introduced into the environment, psychiatric pharmaceuticals may have unexpected pharmacological and biological activities on non-target organisms, as this group of pharmaceuticals acts on the endocrine and central nervous system, directly affecting the regulation of behavior and reproduction patterns [6].

Faced with this problem, the need arises to develop sensitive and selective analytical methods, to evaluate the incidence of these contaminants in the environment. In Table 1 some of the analytical methods published to determine sedative hypnotic in aqueous environmental samples are compiled.

The most widely reported technique for extracting psychiatric pharmaceutical compounds from aquatic environmental samples is solid-phase extraction (SPE) [7-11]. Even though the majority of the methods reported are based on the simultaneous extraction of pharmaceuticals belonging to different therapeutic groups, only three or four psychiatric pharmaceuticals have been included among the target compounds to be studied.

The most widely studied psychiatric compounds are carbamazepine, diazepam and phenobarbital. Four types of sorbents have been used to extract them: copolymer hydrophilic-lipophilic balanced Oasis HLB [5,8,12,13], mixed-mode polymeric sorbent Oasis MCX [7,14,15], mixed-anion exchange (MAX) [11] and strong cation-exchange Strata-XC [16]. In general, as can be seen in Table 1, acceptable recoveries were given for each type of sorbent when they were used to extract the compounds from wastewater.

Moreover, auto-mated methods based on on-line SPE coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) have also reported for determination of pharmaceuticals including some sedative hypnotics in environmental waters [17,18]. For instance, López-Serna et al. [18] reported recoveries for four sedative hypnotics spiked in effluent and influent wastewater between 25 and 78% using a HySphere Resin GP cartridge. Regarding to the determination of sedative hypnotic, several methods involving gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [4,5,7] or liquid chromatography-

tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [8,12,14,16,18] have been published, with successful application in environmental aquatic samples. In spite of the fact that many benzodiazepines are fairly polar and non-volatile compounds [19], for some of them the determination has been feasible by GC-MS using derivatisation of the active amide group of the benzodiazepines [4] or even without derivatisation [7]. Likewise, derivatisation of barbiturates is not required to be determined by GC-MS as was showed in a previous study by Peschka et al. [5], in which 6 barbiturates were determined in river water and wastewater from Germany.

LC-MS/MS methods have been successfully applied to determine benzodiazepines and barbiturates using either electrospray ionization (ESI) [14,18] or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [20]. As can be seen in Table 1 to date, methods based on a triple quadrupole (QqQ) mass analyser have been most widely developed for the determination of psychiatric pharmaceuticals [12,14-17,21], compared to other mass analysers such as ion trap (IT) [11,22] and quadrupole time-of-flight (Q-TOF) [10]. For

Table 1. Some examples of analytical methods reported in the literature to determine sedative hypnotic in environmental aquatic samples.

Country (Compounds Studied)	Compound	Extraction Technique	Instrumental Technique	River		Effluent ww		Influent ww		Ref	
				R %	LOD ng/L	Conc range ng/L	R %	LOD ng/L	Conc range ng/L		R %
Germany (6)	SCB	SPE with Oasis HLB	GC-MS	86 ^a	5	0.10	20	62 ^a	20	n.d	[5]
	PTB	Oasis HLB		103 ^a	1	<LOD-5.4	10	88 ^a	10	n.d	
	PNB			74 ^a	1	0.3-1.5	10	105 ^a	10	n.d	
France (17)	CBZ	SPE with Oasis MCX	GC-MS	120 ^b	1.4	n.d-56	22.3	120 ^b	22.3	157-295	[7]
	DZP	Oasis MCX		87 ^b	1.4	n.d	13.8	87 ^b	13.8	n.d	
	NDZ			101 ^b	1.4	n.d-2.4	13.8	101 ^b	13.8	n.d-8.3	
Slovenia (3)	BMZ	SPE sorbent n.r	GC-MS derivatisation	84-	<3 ^l	n.d	<3 ^l	84-	<3 ^l	<LOD-32	[4]
	DZP			101 ^b	<3 ^l	<LOD-69	<3 ^l	101 ^b	<3 ^l	21-18	
Spain (23)	BMZ	SPE with Oasis MCX	RPLC- (ESI)MS/MS	n.r	n.r	n.d	1.9	99 ^c	1.9	n.d	[14]
	NDZ			n.r	n.r	<LOQ	0.9	105 ^c	0.9	9.6-9.9	
United Kindon (65)	DZP	SPE with Oasis MCX	QqQ	n.r	n.r	n.d	0.3	108 ^c	0.3	2.2-3.2	[15]
	DZP			84 ^a	0.1	1.1	0.5	90 ^a	0.5	6.2	
Greece (68)	NDZ	SPE with Oasis MCX	(ESI)MS/MS	93 ^a	0.1	5.5	0.4	110 ^a	0.4	14.2	
	BMZ	SPE with Strata-XC	QqQ								
Greece (68)	DZP	SPE with Strata-XC	RPLC- (ESI)MS/MS				7.9	97 ^d	7.9	33-87	[16]
	NDZ						1.2	87 ^d	1.2	<LOD-1.8	
	CBZ						0.3	94 ^d	0.3	2.6-4.8	
	PTB						4.0	101 ^d	4.0	21.3-2200	
PNB	PTB						5.7	128 ^d	5.7	n.d	
	PNB						54	91 ^d	54	70-127	
							54	93 ^d	54	n.d	

Table 1. (Continue)

Country (Compounds Studied)	Compound	Extraction Technique	Instrumental Technique	River		Effluent ww			Influent ww			Ref	
				R %	LOD ng/L	Conc range ng/L	R %	LOD ng/L	Conc range ng/L	R %	LOD ng/L		Conc range ng/L
Spain (74)	DZP	SPE with Oasis HLB	RPLC- (ESI)MS/MS	98 ^c	0.3	<LOQ-2.7	101 ^c	0.4	n.r	101 ^c	2.9	n.r	[12]
	CBZ	Oasis HLB	(ESI)MS/MS	101 ^c	0.4	<LOQ-54	83 ^c	1.8	n.r	106 ^c	7.6	n.r	
	PTB		QqQ	65 ^c	0.9	<LOQ	57 ^c	4.4	n.r	39 ^c	4.2	n.r	
	PNB			67 ^c	4.7	<LOQ	24 ^c	12.5	n.r	42 ^c	15.4	n.r	
Spain (73)	DZP	SPE with Oasis HLB	RP-LC- (ESI)MS/MS	112 ^c	0.8	n.d	115 ^c	1.2	n.d	106 ^c	3	n.d	[8]
	CBZ	Oasis HLB	(ESI)MS/MS	72 ^c	0.3	1-60	73 ^c	2	114-277	99 ^c	2	37-277	
Serbia (81)	PBT		QqLIT	108 ^e	0.2	n.d	61 ^c	1	n.d	61 ^c	1	n.d	
	PTB			107 ^e	0.3	n.d	108 ^c	0.7	n.d	86 ^c	1	n.d	
Serbia (81)	CBZ	SPE with Oasis HLB	RP-LC- (ESI)MS/MS	108 ^e	0.7	<LOD-35.5	124 ^c	2.4	303	124 ^c	2.4	303	[13]
	DZP	Oasis HLB	(ESI)MS/MS	98 ^c	1.1		101 ^c	1.1		101 ^c	1.1		
China (22)	CBZ	On-line SPE	RPLC- (ESI)MS/MS										
		HLB disk	(ESI)MS/MS				95 ^d	0.3*	13-22	88 ^d	0.5*	19-23	[17]
			QqLIT IT										

Table 1. (Continue)

Country (Compounds Studied)	Compound	Extraction Technique	Instrumental Technique	River		Effluent ww			Influent ww			Ref	
				R %	LOD ng/L	Conc range ng/L	R %	LOD ng/L	Conc range ng/L	R %	LOD ng/L		Conc range ng/L
Spain (74)	DZP	On-line SPE	RPLC-(ESI)MS/MS	82 ^a	0.7	<LOD-6.5	72 ^a	0.5	18.9	42 ^a	3.5	n.r	[18]
	CBZ	Hysphere resine	QqLIT	59 ^a	0.3	31.2-58.4	50 ^a	38	156.8	25 ^a	32	n.r	
	PNB	GP		83 ^a	2.3	n.d	52 ^a	18	n.d	61 ^a	0.3	n.r	
Portugal (23)	PTB	cartridge SPE with Oasis	RPLC-(ESI)MS/MS	91 ^a	2.2	n.d	78 ^a	0.3	n.d	57 ^a	8.3	n.r	[11]
	BMZ	MAX	IT				63 ^a	2	n.d	68 ^a	2	n.d	
	DZP						92 ^a	1	n.d	145 ^a	1	n.d	

Abbreviations: **Conc:** Concentration, **GC-MS:** Gas chromatography-mass spectrometry, **RPLC-(ESI)MS/MS:** Reversed phase-liquid chromatography (Electrospray) tandem mass spectrometry, **QqQ:** triple quadrupole, **QqLIT:** quadrupole-linear ion trap, **IT:** ion trap. * Value correspond to LOQ. **Recovery calculation (Superscript):** **a:** matrix spiked before SPE against pure solvent standard, **b:** ultra pure water spiked before SPE against pure solvent standard, **c:** matrix spiked before SPE using internal standard calibration, **d:** matrix spiked before SPE against matrix spiked after SPE. **I:** instrumental LOD.

instance, Hernández et al. [10] used Q-TOF for qualitative screening of 76 illicit drugs including three sedative hypnotics. The identification of compounds was feasible in complex environmental samples, even without reference standards by means of the accurate mass, isotopic distribution and MS data provided by Q-TOF. Moreover, QqQ enable accurate quantification and high selectivity and sensitivity. In relating to this issue several multi-residue methods published (see Table 1) have reported low limits of detection (LODs) ranging from 0.1 and 54 ng/L depending on the matrix and the compound. Quadrupole-linear ion trap (Q-LIT) [8,9,13,18] mass spectrometer has also been used to determine psychiatric pharmaceuticals such as phenobarbital, pentobarbital, diazepam and carbamazepine in environmental samples. As Table 1 shows, the different reports using Q-LIT archived limits of detection (LODs) between 0.2 and 2.3 ng/L in river waters and between 0.3 and 38 ng/L in wastewater.

The purpose of this research is to develop a method based on SPE/LC-(ESI)MS/MS for the simultaneous determination of 4

benzodiazepines (diazepam, nordiazepam, bromazepam and carbamazepine) and 4 barbiturates (pentobarbital, secobarbital, barbital and phenobarbital) in river water and wastewater, and to evaluate their presence in different environmental samples from Catalonia. Target compounds were selected based on little information about the presence of sedative hypnotics in the aquatic environment in Catalonia and large increase of consumption in the last years [23].

2. EXPERIMENTAL

2.1 Reagents and standards

Diazepam (DZP), bromazepam (BMZ), carbamazepine (CBZ), barbital (BTL), pentobarbital (PTB), phenobarbital (PNB), and secobarbital (SCB) were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Nordiazepam (NDZ), DZP-d₅ and PTB-d₅ were acquired from Cerilliant (Round Rock, TX, USA) as solution of methanol at 1,000 mg/L. Purity of all standards was higher than 97%. Stock solutions of individual standards were prepared for each compound in methanol (MeOH) at 100 mg/L and stored at -18 °C in the dark.

Mixed working solutions were prepared daily by diluting the stock solutions with MeOH:water (50:50 v/v).

Ultrapure water was obtained with a Purelab ultra purification system (Veolia Water, Sant Cugat del Vallés, Spain). MeOH (HPLC-grade) was supplied by SDS (Peypin, France), and formic acid for LC-MS analysis was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and nitrogen was bought from Carburos Metálicos (Tarragona, Spain).

2.2 Collection of water samples

River water samples were collected from three rivers (Llobregat, Ter and Ebro) located in Catalonia (Spain). These rivers are sources of drinking water that supply a population of over four and a half million inhabitants with rather extensive farming and animal activity. The effluent and influent wastewater samples were collected at the same time from two STPs in Tarragona (STP 1) and Reus (STP 2). These STPs receive an average flow of 21,000 m³/day of wastewater from approximately 120,000 inhabitants and receive both urban wastewaters and some industrial discharges. In this case,

influent water was collected after mechanical treatment and effluent water was collected after secondary treatment, which involves primary settling, biological treatment and secondary sedimentation. One sample per month of river water and wastewater were taken during three and five months, respectively, between February 2013 and July 2013 by grab sample using pre-cleaned polyethylene bottles and stored at -18°C until analysis. Influent wastewater samples were centrifuged at 9,000 rpm for 7 min (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) and then filtered using a 0.22 µm nylon filter (Whatman, Maidstone, UK). Effluent wastewater and river water samples were directly filtered with a 0.22 nylon filter.

2.3 Solid-Phase Extraction (SPE)

The cartridges tested for the SPE procedure were 500 mg Oasis HLB from Waters (Milford, MA, USA) and 200 mg Bond Elut Plexa from Varian (Middelburg, the Netherlands). 500 mg Oasis HLB cartridges were connected to an SPE manifold (Teknokroma, Barcelona, Spain), which was connected in turn to a vacuum pump. Cartridges were

conditioned with 5 mL of MeOH followed by 3 mL of Milli-Q water (pH = 7). Water samples (100 mL of influent wastewater, 250 mL of effluent wastewater and 500 mL of river water) were then passed through SPE-cartridges at a flow-rate of approximately 10 mL/min. The cartridges were then washed with 5 mL of 5% of MeOH in water (v/v) and completely dried under vacuum. After eluting the analytes with 5 mL of MeOH, the extracts were evaporated to dryness by nitrogen stream and were finally reconstituted with MeOH:water (50:50 v/v) to a volume of 1 mL in the case of river water and 5 mL in the case of wastewater.

2.4 Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Chromatographic separation was performed by reversed-phase liquid chromatography and detection was performed by tandem MS with a triple quadrupole and electrospray ionization (ESI). The LC instrument was an Agilent 1200 series (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, vacuum degasser, autosampler and a thermostatted column

compartment. The chromatographic column was a Kinetex C₁₈ (4.6 x 100 mm, 2.7 μm) with Core-Shell Technology from Phenomenex (Madrid, Spain) and a pre-column Krudkatcher™ Ultra column in-line filter, 0.5 μm porosity x 0.1 mm ID was also used. The binary mobile phase was: Milli-Q water with formic acid (pH 3) and MeOH. The gradient of elution was as follows: 45% of MeOH for 10 min, increased to 100% in 5 min, kept constant for 1 min and finally returned to 45% of MeOH in 2 min. All of the compounds were eluted within 18 min. The flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was kept at 25°C and the volume injected was 25 μL.

The triple quadrupole mass spectrometer (Agilent 6410 Triple Quad MS) operated in positive mode for benzodiazepines and negative mode for barbiturates. Data acquisition was performed in selected reaction monitoring (SRM) and the protonated [M+H]⁺ or deprotonated [M-H]⁻ pseudo-molecular ion of each compound was chosen as the precursor ion. Three SRM transitions were selected for BMZ, DZP and NDZ and only two transitions were possible to

select for CBZ and for all barbiturates (see supplementary information Table S1). The optimized conditions for the ESI were: high purity nitrogen (>98%) as the desolvation nebulizer, nebulizer pressure of 45 psi, drying gas flow-rate of 12 L/min, drying gas temperature of 350°C and spray potential of 3,500 V. Cone voltages and collision energy voltages were established for each compound (summarized in Table S1) and were from 90 to 150 V and from 5 to 35 V, respectively.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 LC-(ESI)MS/MS

A good chromatographic separation was obtained with the Kinetex C₁₈ (4.6 x 100 mm, 2.7 μm) with Core-Shell Technology, which allowed excellent resolution, efficiency and short retention times to be obtained for all compounds. A SRM chromatogram of the chromatographic separation in spiked influent sample is depicted in Figure S1 of the supplementary information. In order to reach a compromise between the chromatographic resolution of the analytes and

effective ESI performance in negative (barbiturates) and positive (benzodiazepines) ionization mode, different aqueous mobile phase compositions were tested in combination with MeOH. Aqueous mobile phases tested were: ultrapure water adjusted to pH 3 with formic acid, to pH 4.5 with acetic acid and to pH 8 with the buffer CH₃COONH₄/NH₄OH 10 mM. The signal intensities in ESI-MS for barbiturates were similar using any of the three compositions, although it is known that a basic mobile phase favors the deprotonation of analytes in negative ESI. On this point, a study conducted by Wang et al. [24] demonstrated poor sensitivity for barbiturates when neutral or basic eluent was used, because the analyte response in ESI depends on gas-phase deprotonation rather than solution-phase ionization equilibrium. Acid modifier in the aqueous mobile phase considerably enhanced the signal intensities for benzodiazepines. Meanwhile, in terms of chromatographic separation, the maximum resolution of the analytes, short run time and good peak shape were obtained with the aqueous phase at pH 3. Thus, the mobile phase chosen was

water at pH 3 and MeOH with the following gradient: from 60% to 100% of MeOH in 6 min, kept constant for 1 min and returned to 60% of MeOH in 2 min. However, the chromatographic separation was smoothed to avoid an isobaric interference observed at the same retention time of BTL when real samples were analysed. Therefore, the elution gradient was changed to the conditions described previously in Section 2.4 (chromatogram Figure S1).

The full-scan mass spectrum showed two protonated molecules for DZP (m/z 285 and 287), NDZ (m/z 271 and 273) and BMZ (m/z 316 and 318). This fact is due to the natural ratio of the isotopes of the halogen present in the molecules. For instance, both DZP and NDZ molecules contain chlorine and the natural ratio of their isotopes $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ is 1:3, so the relative intensities of the ions at m/z 285 (DZP) and m/z 271 (NDZ) were three times more abundant than those ions with m/z 287 (DZP) and 273 (NDZ), respectively. Therefore, the $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 285 and 271 were selected as the precursor ions of DZP and NDZ, respectively. In the case of BMZ, the relative intensities signal of the protonated molecules were

equal due to the natural ratio of the isotopes ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br} = 1:1$), and the $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 316 was selected as precursor ion, in accordance with the literature [22]. Cone voltages were optimized for each precursor ion and these were between 90 at 150 V (see supplementary information Table S1).

As can be seen in Figure 1, the benzodiazepines showed rich fragmentation spectra originated from the protonated molecular ion. The loss of CO and the halogen is a feature shared by all benzodiazepines to give product ions at m/z 209 for BMZ, 222 for DZP, and 208 for NDZ. In the case of BMZ, it showed a fragment at m/z 288 formed by the elimination of CO, resulting in the contraction of the seven-membered ring to a resonance stabilized six-membered ring [25]. In addition to the loss of CO and Br, the molecule of BMZ also presented neutral loss of HCN to give the major product ion at m/z 182.

DZP and NDZ showed product ions at m/z 154 and 140 respectively, which would correspond to the loss of benzene and HCN from the cation formed after the loss of CO. DZP gave the major product ion at m/z 193 and was interpreted as being

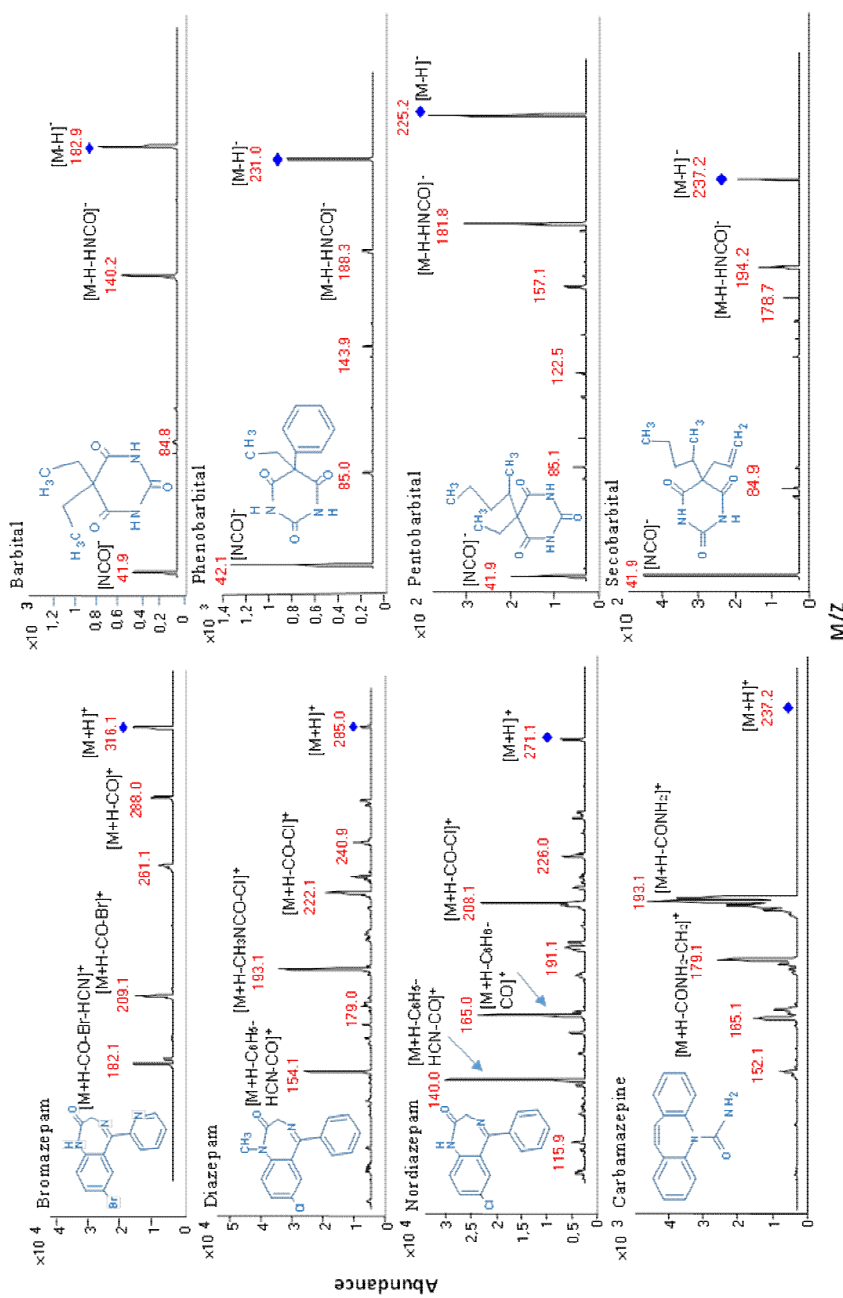


Figure 1. Structures and product ion spectrum of protonated benzodiazepines and deprotonated barbiturates. ◆ Precursor ion.

formed by the elimination of CH_3NCO and Cl .

The product ion mass spectrum of CBZ showed poor fragmentation and the predominant fragment at m/z 193 corresponds to the loss of CONH_2 .

Barbiturates shared similar fragmentation patterns with the formation of the most abundant product ion $[\text{M}-\text{H}-43]^-$ corresponding to a neutral loss of HNCO and the ion at m/z 42 [24]. Consequently, only one confirmation transition for each barbiturate and carbamazepine could be selected, while two transitions were selected for the rest of compounds.

3.2 SPE Optimization

One highly important aspect in SPE is the selection of the sorbent according to the chemical properties of the compounds of interest. Two copolymer sorbents based on polar and non-polar retention mechanisms (500 mg Oasis HLB and 200 mg Bond Elut Plexa) and three different sample pHs (not adjusted, 3 and 10) were tested. The experiments were conducted using 100 mL of ultrapure water spiked at 2.5 $\mu\text{g/L}$ (barbiturates) and 0.25 $\mu\text{g/L}$ (benzodiazepines) and eluting

with 5 mL of MeOH. All compounds showed SPE recoveries (Figure 2) between 89% and 105% using Oasis HLB and between 80% and 95% using Bond Elut Plexa at neutral pH and acidic pH. When the sample at pH 10 was passed through cartridges, recoveries decreased by 15% in the case of most of the compounds. Moreover, PNB showed the lowest recovery (37%) at basic pH when Oasis HLB was used and it was not recovered with Bond Elut Plexa. BTL was not retained in either of the two sorbents at basic pH. Since basic pH did not aid the retention of compounds, particularly in terms of the barbiturates which are weak acids, it was discarded. Therefore, the sample pH was not adjusted to avoid additional manipulation of the sample. Between the two copolymer sorbents tested, Oasis HLB was chosen because the recoveries were between 6%-18% higher than with Bond Elut Plexa.

The breakthrough volume was evaluated in order to select the appropriate loading volume for each matrix. Firstly, the breakthrough volume was examined by loading different volumes of spiked ultrapure water between 100 and 1,000 mL

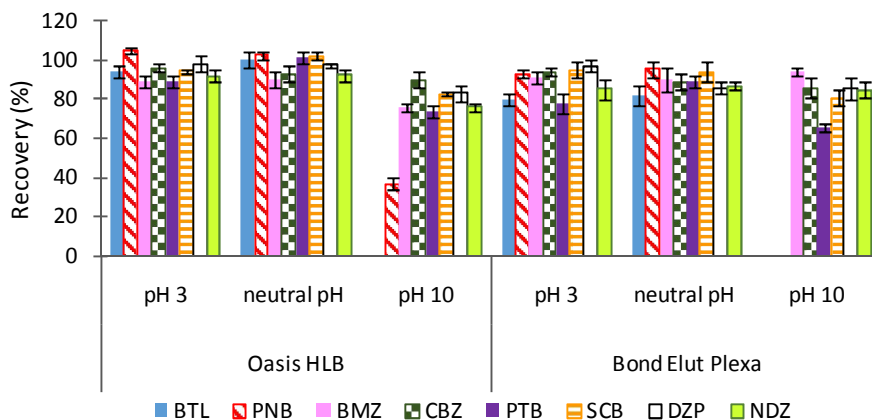


Figure 2. SPE recoveries in ultrapure water using Oasis HLB and Bond Elute Plexa at different pHs. For experimental conditions see text.

onto the cartridge and eluting with 5 mL of MeOH. Different concentration of analytes were added in order to obtain a concentration of 25 $\mu\text{g/L}$ in the 10 mL of redissolution volume. Results showed (data showed in supplementary information Figure S2) that up to 1,000 mL, recoveries of the analytes were not affected. Hence recoveries of each compound (81% to 103%) remained almost constant for all of the volumes tested. Subsequently, the breakthrough volume was evaluated with river water, and influent and effluent wastewater. It is well known that working with these types of matrices at large sample volumes may lead to breakthrough or severe matrix effect. Therefore,

taking into account the results from ultrapure water, matrix complexity and previous experience, the following sample volumes for each matrix were evaluated: 500 and 1,000 mL for river water, 250 and 500 mL for effluent wastewater and 100 and 250 mL for influent wastewater. In all cases, a non-spiked sample (blank) was analysed to subtract the compounds present in the sample. Recoveries involving matrix effect and SPE extraction are depicted in Figure S2. Most of barbiturates showed an increase in the recoveries (compared with ultra pure water results) ranging from 116% to 138% when the highest sample volume of each matrix was loaded into the cartridge,

contrary to benzodiazepines and BTL, recoveries decreased to 22%- 83%. The lowest recoveries were for BTL (22% in river water and 25% in wastewater), CBZ (59% in river water and 64% in wastewater) and DZP (47% in river water and 39% in wastewater). Thus, the sample volume chosen was 500 mL for river water, 250 mL for effluent and 100 mL for influent, since good results for most of compounds were obtained, with recoveries between 61% (DZP) and 125% (SCB) except for BTL (39%). In the optimization of the redissolution volume, blank sample extracts obtained in SPE were evaporated until dryness under nitrogen steam, then spiked at a concentration in the final redissolution volume of 25 µg/L for barbiturates and 2.5 µg/L for benzodiazepines and reconstituted with MeOH:water (50:50 v/v). Three different redissolution volumes were tested: 0.5, 1 and 10 mL for river water and 1, 5 and 10 mL for wastewater and matrix effect was evaluated in order to choose the appropriate redissolution volume. It was calculated by comparing the peak areas of compounds spiked in the SPE extract with the peaks areas

of a pure solvent standard solution at the same concentration. The matrix effect was expressed according to López-Serna et al. [12] and Tran et al. [26] as percentage of ion suppression (positive values) or ion enhancement (negative values). As can be seen in Table 2, the matrix effect increased considerably for all analytes in the three matrices when extracts were re-dissolved to the lower volume tested. In the case of extracts eluted from river water, the matrix effect at 10 mL was between -3% (BMZ) and 57% (BTL) and these values were between -55% and 75% when the re-dissolution volume was decreased from 10 to 0.5 mL. With 0.5 mL, BMZ (-55%), PTB (-45%) and SCB (-30%) were affected by ion enhancement. When the re-dissolution volume was 1 mL, the matrix effect was between -27% and 72%. With respect to influent and effluent wastewater, BTL was the compound most affected by ion suppression (64% to 86%) in the case of all of the re-dissolution volumes tested. In general, all compounds were affected by ion suppression (15% to 86%) when the re-dissolution volume was 1

Table 2. Matrix Effect (n=3) by using different re-dissolution volumes. For conditions see text.

Compound	River water			Influent wastewater			Effluent wastewater		
	10 mL	1 mL	0.5 mL	10 mL	5 mL	1 mL	10 mL	5 mL	1 mL
BTL	57	72	75	73	70	86	64	75	80
PNB	24	20	36	11	-36	35	10	-14	28
BMZ	-3	-27	-55	5	15	28	-2	21	20
CBZ	4	20	26	8	13	26	8	19	22
PTB	-10	-16	-45	4	-48	30	-12	-29	37
SCB	23	-11	-30	-2	-43	29	-24	-16	15
DZP	11	25	30	34	26	37	19	23	46
NDZ	-5	16	47	15	7	44	5	-1	26

mL. No significant differences were observed between 5 mL and 10 mL for BTL, CBZ, DZP and NDZ, and NDZ did not show any matrix effect in effluent wastewater. Only BMZ and PTB displayed an increase in ion suppression and ion enhancement, respectively, when the re-dissolution volume was decreased from 10 to 5 mL. So, according to the results and taking into account the method sensitivity the most suitable re-dissolution volumes for each matrix were: 1 mL for river water and 5 mL for effluent and influent wastewater.

3.3 Method Validation

For the validation of the optimized method, linear range, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), reproduci-

bility between days and repeatability (expressed as relative standard deviation (%RSD) and recoveries (including matrix effect and extraction) were evaluated for each matrix. A blank sample was analysed to subtract the compounds present in the sample and PNB, BMZ, CBZ, DZP and NDZ were determined.

The use of two isotope labelled compounds (PTB-d₅ and DZP-d₅) for the correction of the error caused by the matrix effect was evaluated. PTB-d₅ was tested to quantify barbiturates and DZP-d₅ was tested to quantify benzodiazepines. Nevertheless, the matrix effect for some compounds such as BTL (70% to 75%) and NDZ (-1% to 16%) were different to the isotope labelled compounds (PTB-d₅ 25% and DZP-d₅ 30%), which

led to an erroneous quantification. Therefore, isotopes labelled compounds were not used and the quantification for all compounds was carried out with matrix-matched calibration to compensate for the matrix effect. Calibration curves were generated with six samples spiked before SPE with increased amounts of each analyte. The linear range shown in Table 3 was found at two different levels due to benzodiazepines being about ten times more sensitive than barbiturates. Determination coefficients (R^2) were higher than 0.992 in all calibration curves. Limits of quantification (LOQs) were selected at the lowest point of the calibration curves (Table 2). BT presented the highest LOQs at 50, 100 and 125 ng/L in river water, and effluent and influent wastewater, respectively. Similar or higher LOQs for BMZ, DZP, NDZ and CBZ have been reported in previous studies (see comparative Table 1), which involved multi-residue methods based on SPE/LC-MS/MS [11,14,16] and SPE/GC-MS [7,27]. LODs were calculated as the concentrations giving peaks for which the signal-to-noise ratio was 3. For compounds that were

present in non-spiked samples, they were estimated from their recoveries and the LC-MS response. As can be seen in Table 3, LODs were lower in river water between 2.5 and 10 ng/L for barbiturates and between 0.2 and 0.5 ng/L for benzodiazepines. LODs of effluent wastewater were between 10 and 25 ng/L for barbiturates and 1 ng/L for all benzodiazepines, except for CBZ (5 ng/L). As expected, in influent wastewater, LODs were higher than the other matrices at 50 and 5 ng/L for all barbiturates and benzodiazepines, respectively.

The precision was expressed as the relative standard deviation (%RSD) obtained when the repeatability (intra-day) and reproducibility (inter-day) were assessed. Five blank samples were spiked at two levels of concentration before SPE as follows: low concentration of barbiturates at 50, 100 and 250 ng/L for river, effluent and influent samples, respectively, while the concentration of benzodiazepines was 5, 10, and 25 ng/L for river, effluent and influent samples, respectively. High concentration of barbiturates was 200, 1000 and 1250 ng/L for river, effluent and influent samples, respectively,

Table 3. Validation data for all different kinds of water.

Compound	Ratio range Permitted tolerances	River water			Influent wastewater			Effluent wastewater		
		L. Range (ng/L)	LOD (ng/L)	% R ^a % R ^b	L. Range (ng/L)	LOD (ng/L)	% R ^a % R ^b	L. Range (ng/L)	LOD (ng/L)	% R ^a % R ^b
BTL	35 - 58	50-400	10	33 38	12.5-2500	50	47 50	100-2000	25	39 44
PNB	32 - 54	10-400	5	58 64	12.5-2500	50	114 104	100-2000	25	119 108
BMZ	53 - 79	1.0-40	0.25	107 103	12.5-500	5	76 79	5-200	1	84 88
CBZ	11 - 20	1.0-40	0.5	77 79	12.5-2500	5	77 81	10-2500	5	71 74
PTB	48 - 72	10-400	2.5	110 102	12.5-2500	50	129 117	50-2000	10	136 122
SCB	61 - 91	10-400	2.5	91 95	12.5-2500	50	116 109	50-2000	10	131 119
DZP	61 - 92	2.0-40	0.5	57 62	12.5-500	5	73 77	5-200	1	64 68
NDZ	56 - 85	1.0-40	0.5	84 88	12.5-500	5	98 101	5-200	1	93 96

a. Recoveries (%R), river, effluent and influent wastewater at 50, 100 and 250 ng/L respectively for barbiturates and 5, 10 and 25 ng/L for benzodiazepines

b. Recoveries (%R), river, effluent and influent wastewater at 200, 1000 and 1250 ng/L respectively for barbiturates and 20, 100 and 125 ng/L for benzodiazepines

and the concentration of benzodiazepines was 20, 100, and 125 ng/L for river, effluent and influent samples, respectively. The repeatability RSD% (n=5) values at low level were <13% and the reproducibility values were <17%, while repeatability and reproducibility at high level were <10% and <15%, respectively.

The recoveries (including matrix effect and extraction), summarized in Table 3, were similar at the two levels of concentration tested, between 33% and 110% for river water, 47% and 129%, for influent water, and 39% and 136% for effluent wastewater.

The identification and confirmation criteria of each compound are based on retention time, presence of two transitions, and relative ion intensities between the signal of the qualifier ion (the second most abundant ion) and the quantifier ion. In accordance with the criteria set out in Commission Decision 2002/657/EC [28], the maximum permitted tolerances of relative ion intensities for each compound were: ± 20 for all analytes except for CBZ (± 30), BTL and PNB (± 25). Table 2 shows the range of maximum permitted tolerances or relative

ion intensities for each compound.

3.4 Analysis of river and wastewater samples

The method was applied to analyse wastewater samples from two different treatment plants in Tarragona and Reus, as well as river water samples from the rivers Ebro, Llobregat and Ter, all of which are located in Catalonia. In total 5 samples of influent and 5 samples of effluent wastewater were collected in each STP, and 3 samples of each river were collected in different months. The ranges of concentrations and relative ion intensities for each compound present in the samples are shown in brackets in Table 4 and these falls within the permitted tolerance levels. Concentration found in previous studies are summarized in Table 1.

As summarised in Table 4, PNB was determined in influent wastewater samples with concentrations up to 324.2 ng/L. Results obtained from effluent wastewater samples could indicate little or no removal of this compound, since only a decrease in the concentration between 5% and 30% was observed. The occurrence of

Table 4. Concentrations range (ng/L) found in River waters and wastewater samples.

Compound	River water		Ter	Influent wastewater		Effluent wastewater	
	Ebro	Llobregat		STP 1	STP 2	STP 1	STP 2
BTL	< LOQ	< LOQ	< LOQ				
		(37-41)	(44-49)				
PNB	< LOQ	15.6-15.9	< LOQ	266.5-324.2	313.8-320.3	110.0-308.4	170.3-223.0
	(40-45)	(42-44)	(41-44)	(38-46)	(42-49)	(39-48)	(35-42)
BMZ	< LOD	< LOD	< LOQ	70.7-94.2	57.0-68.5	22.1-37.8	12.2-25.8
			(66-69)	(65-71)	(60-71)	(59-70)	(59-68)
CBZ	2.6-3.3	2.1-2.5	2.3-2.4	1110.3-2238.1	870.1-2242.2	1137.6-2337.3	940.1-2020.5
	(13-15)	(13-16)	(12-14)	(13-18)	(12-19)	(12-17)	(13-18)
DZP	< LOQ	< LOQ	< LOQ	36.6-59.0	50.5-69.3	28.2-63.6	40.8-60.0
	(74-79)	(76-79)	(77-79)	(73-81)	(71-85)	(72-81)	(75-87)
NDZ	1.0-1.1	< LOQ	< LOQ	31.5-56.2	30.1-52.0	5.0-14.2	7.2-17.7
	(68-73)	(70-72)	(72-75)	(66-78)	(67-77)	(63-78)	(70-83)

n = 3, RSD (%) < 12.
 Relative ion intensities (%) in brackets.

PNB has only been reported in effluent wastewater from Greece [16] at levels ranging from 70.0 ng/L and 127.0 ng/L. Other studies have also monitored PNB and PTB in wastewater from Spain [8,10,18] and Germany [5], but the presence of these compounds was not reported in any sample.

All of the benzodiazepines were found in both influent and effluent wastewater. The highest concentration found was CBZ, with a maximum value of 2,337.3 ng/L. These concentrations are comparable in both influent and effluent samples. Several studies from China [17] and Spain [8] have also shown poor or no removal and even an increase of CBZ in effluent wastewater samples. As can be seen in Table 1, the reported concentrations were lower than those reported in this study, but high level up to 6822.0 ng/ of CBZ has been reported in Greece. The presence of CBZ can be due to high prescription volume as an anti-epileptic drug (770 mg person-year) in the European Union [29]. It should be noted that CBZ is excreted together with its metabolites. Some conjugated metabolites, such as CBZ glucuronide, are converted to the parent compound by enzymatic

processes that take place in the treatment plant [29].

The rest of the benzodiazepines analysed were found at similar concentration levels, between 30.1 and 94.2 ng/L in influent samples. Concentrations of BMZ and NDZ in effluent samples were about 70% lower than in influent samples. Similar values of NDZ were found by Baker et al. [15] in a STP from United Kingdom and Racamonde et al. [14] in Spain, with maximum concentrations of 51.5 ng/L for influent wastewater and 14.2 ng/L for effluent water. On the other hand, levels of BMZ slightly higher than those reported in this study were found by Borova et al. [16] in wastewater from Greece at concentrations ranging between 33.0 ng/L and 315.0 ng/L.

Some studies have shown that DZP is resistant to biodegradability during wastewater treatment and remains in the aquatic environment for relatively long periods of time [30]. As a result, the detected concentrations of DZP were similar in both influent and effluent samples, ranging between 28.2 and 69.3 ng/L. These findings were higher to those concentrations reported in other studies in Spain [14,18],

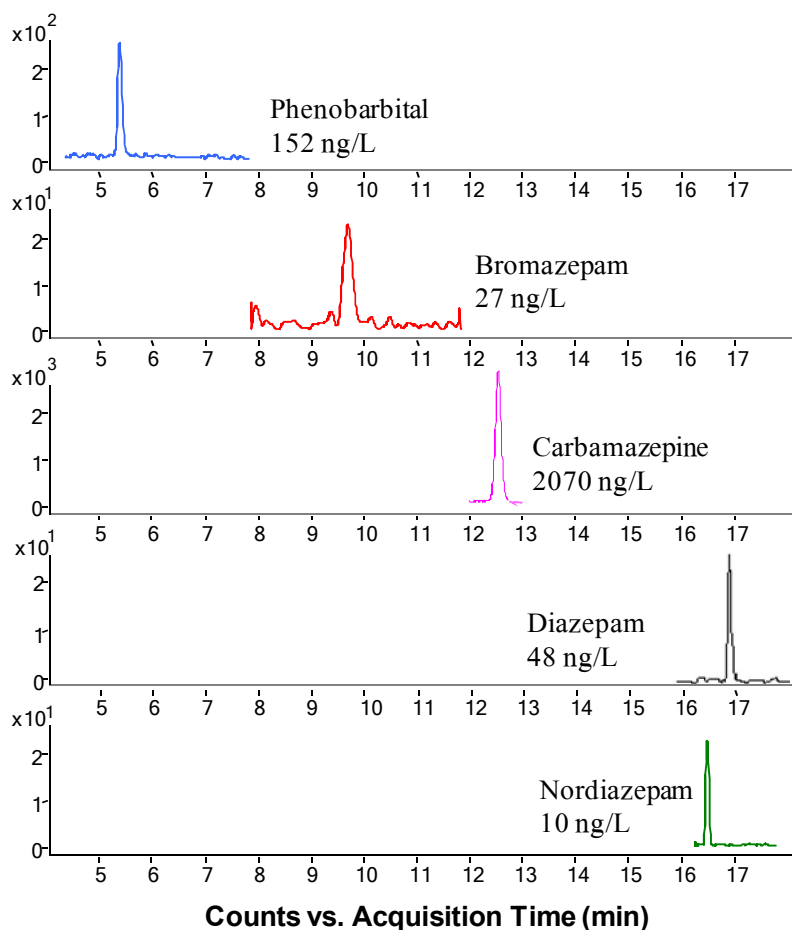


Figure 3. SRM chromatogram of effluent sample obtained by SPE/LC–MS/MS. For experimental conditions see text.

Slovenia [4] and Greece [11]. Moreover, Gros et al. [8] and Sousa et al. [11] did not detected DZP when wastewater samples from Spain and Portugal, respectively were analysed. In Figure 3, a SRM chromatogram is depicted, showing the presence of PNB, BMZ, CBZ, DZP and

NDZ, with their respective concentrations in an effluent wastewater sample, with CBZ being the most abundant compound.

Since wastewaters are discharged into the receiving environment, sedative hypnotics have also frequently been detected in

surface waters due to low elimination by STPs. Samples from three different rivers located in Catalonia were analysed: the Ebro, Llobregat and Ter. Results showed the presence of CBZ in all three rivers at concentrations between 2.1 and 3.3 ng/L. PNB was found below LOQ in all samples, except for the Llobregat River (15.6 ng/L). BMZ and DZP were detected below LOQ. The most commonly studied benzodiazepines have been CBZ and DZP and their occurrence in river water has been reported to similar concentrations levels. These compounds has been reported in surface water from Spain [9], Slovenia [4], United kind [15] and France [7] at concentrations from below LOQ to 69 ng/L, as reported in Table 1.

Only a few studies have reported the presence of barbiturates in river water. For instance, Peschka et al. [5] reported concentrations in Germany of 5.4 µg/L for PTB, 1.3 µg/L for PNB and 0.1 µg/L for SCB.

4. CONCLUSIONS

A method based on SPE and LC-MS/MS for the simultaneous determination of two groups of sedative hypnotics (4 barbiturates

and 4 benzodiazepines) was developed and validated in both river water and wastewater. The method enabled the compounds in the study to be determined at low ng/L levels, as SPE with Oasis HLB allowed large scale pre-concentration of samples and LC-MS/MS offered high sensitivity on detection.

To ensure the accurate identification of the compound in the samples, three SRM transitions were monitored for BMZ, DZP and NDZ and only two transitions were possible for CBZ and barbiturates. The matrix effect was corrected with the use of matrix-matched calibration. Acceptable values of validation parameters were obtained to ensure an accurate, sensitive and selective method. Recoveries for barbitals and benzodiazepines were between 43% and 130 % in all matrices. A slight matrix effect was observed for most of compounds, with BTL being the compound most affected by ion suppression (70% to 75%).

The method was successfully applied to determine these sedative hypnotics in three rivers and two STPs in Catalonia. The occurrence of benzodiazepines in environment samples and poor removal in STPs was more significant than in the case of

barbiturates, especially with respect to CBZ.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledged the financed support by Ministry of Economy and Competitiveness (CTM2011-28765-CO2-01) and the Department of Innovation, Universities and Enterprise (project 2014 SGR 934). P. Arbeláez would also like to thank the Ministry of Economy and Competitiveness for a grant (BES-2009-028157).

REFERENCES

- [1] D.J. Lapworth, N. Baran, M.E. Stuart, and R.S. Ward, *Environ. Pollut.* 163, 287 (2012).
- [2] P. Vazquez-Roig, C. Blasco, and Y. Picó, *TrAC-Trend Anal. Chem.* 50, 65 (2013).
- [3] J. Medrano, *Rev. Asoc. Esp. Neuropsiq.* 34, 175 (2014).
- [4] T. Kosjek, S. Perko, M. Zupanc, M. Zanoški Hren, T. Landeka Dragičević, D. Žigon, B. Kompare, and E. Heath, *Water Res.* 46, 355 (2012).
- [5] M. Peschka, J. Eubeler, and T. Knepper, *Environ. Sci. Technol.* 40, 7200 (2006).
- [6] V. Calisto, M.R.M. Domingues, and V.I. Esteves, *Water Res.* 45, 6097 (2011).
- [7] A. Togola, and H. Budzinski, *J. Chromatogr. A* 1177, 150 (2008).
- [8] M. Gros, M. Petrović, and D. Barceló, *Anal. Chem.* 81, 898 (2009).
- [9] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, and D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1248, 104 (2012).
- [10] F. Hernández, L. Bijlsma, J.V. Sancho, R. Díaz, and M. Ibáñez, *Anal. Chim. Acta.* 684, 96 (2011).
- [11] M.A. Sousa, C. Gonçalves, E. Cunha, J. Hajšlová, and M.F. Alpendurada, *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 807 (2011).
- [12] R. López-Serna, M. Petrović, and D. Barceló, *Chemosphere* 85, 1390 (2011).
- [13] M. Petrović, A. Biljana, B. Škrbić, L. Ferrando-Climent, and D. Barcelo, *Sci. Total Environ.* 468-469, 415 (2014).
- [14] I. Racamonde, R. Rodil, J.B. Quintana, E. Villaverde-de-Sáa, and R.

- Cela, J. *Chromatogr. A* 1352, 69 (2014).
- [15] D.R. Baker, and B. Kasprzyk-Hordern, *J.Chromatogr. A* 1218, 1620 (2011).
- [16] V. Borova, N. Maragou, P. Gago-Ferrero, C. Pistos, and N. Thomaidis, *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 4273 (2014).
- [17] S. Yuan, X. Jiang, X. Xia, H. Zhang, and S. Zheng, *Chemosphere* 90, 2520 (2013).
- [18] R. López-Serna, S. Péreza, A. Ginebreda, M. Petrović, and D. Barceló, *Talanta* 83, 410 (2010).
- [19] M. Nakamura, *Biomed. Chromatogr.* 25, 1283 (2011).
- [20] A. Bugey, S. Rudaz, and C. Staub, *J. Chromatogr. B* 832, 249 (2006).
- [21] K. Nodlera, T. Licha, K. Besterb, and M. Sautera, *J. Chromatogr. A* 1217, 6511 (2010).
- [22] S. Grujić, T. Vasiljević, and M. Laušević, *J. Chromatogr. A.* 1216, 4989 (2009).
- [23] Spanish Agency for Medicines and Health Products, 2014, p. 1.
- [24] M. Wang, B. Guo, Z. Huang, J. Duan, Z. Chen, B. Chen, and S. Yao, *J. Chromatogr. A* 1217, 2821 (2010).
- [25] A. Risoli, J.B.Y. Cheng, U.H. Verkerk, J. Zhao, G. Ragno, A.C. Hopkinson, and K.W.M. Siu, *Rapid Commun. Mass Sp.* 21, 2273 (2007).
- [26] N.H. Tran, J. Hu, and S.L. Ong, *Talanta* 113, 82 (2013).
- [27] M. Carballa, F. Omila, J.M. Lema, M. Llompарт, C. García-Jares, I. Rodríguez, M. Gómez, and T. Ternes, *Water Res.* 38, 2918 (2004).
- [28] Official Journal of the European Communities L221, Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Brussels, Belgium., (2002).
- [29] V.L. Cunningham, C. Perino, V.J. D'Aco, A. Hartmann, and R. Bechter, *Regul. Toxicol. Pharm* 56, 343 (2010).
- [30] V. Calisto, A. Bahlmann, R.J. Schneider, and V.I. Esteves, *Chemosphere.* 84, 1708 (2011).

Supplementary Information

Table S1. SRM conditions. Quantifier and confirmation ions for determination of benzodiazepines and barbiturates.

Compound	Precursor ion	Product ions				Cone Voltage (V)
		Quan.	Qual. 1	Qual. 2		
Barbital (BTL)	183	140 (5)	42 (15)			90
Phenobarbital (PNB)	231	42 (9)	188 (6)			90
Bromazepam (BMZ)	316	182 (35)	209 (25)	288 (18)		140
Carbamazepine (CBZ)	237	194 (15)	179 (35)			120
Pentobarbital (PTB)	225	182 (7)	42 (14)			100
Secobarbital (SCB)	237	194 (6)	42 (14)			90
Diazepam (DZP)	285	193 (35)	222 (27)	154 (25)		150
Nordiazepam (NDZ)	271	140 (25)	165 (30)	208 (30)		150

Collision Energy (eV) in brackets

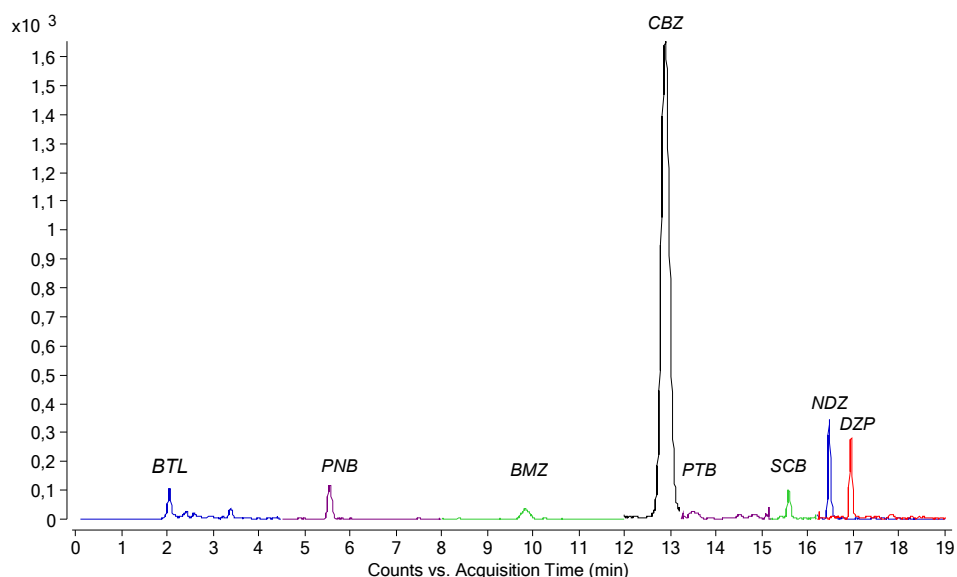


Figure S1. Chromatographic separation

Figure S1 shows the chromatographic separation in influent sample spiked at 250 ng/L for barbiturates and 25 ng/L for benzodiazepines. For the rest of the chromatographic conditions see the manuscript section 2.4.

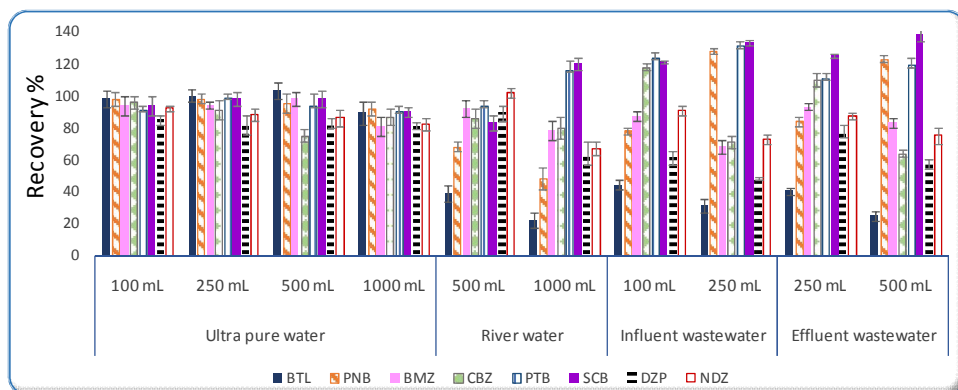


Figure S2. Breakthrough volume in the different matrices.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

*3.2.2. Determination of sedative hypnotics in sewage sludge by
pressurized liquid extraction with high-performance
liquid chromatography and tandem mass
spectrometry*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

DETERMINATION OF SEDATIVE HYPNOTICS IN SEWAGE SLUDGE BY PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION WITH HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY

Paula Arbeláez, Judith Granados, Francesc Borrull, Rosa Maria Marcé, Eva Pocurull

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Universitat Rovira i Virgili, Sescelades Campus, Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

This paper describes a method for the determination of eight sedative hypnotics (benzodiazepines and barbiturates) in sewage sludge using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Pressurized liquid extraction operating conditions were optimized and maximum recoveries were reached using methanol under the following operational conditions: 100°C, 1,500 psi, extraction time of 5 minutes, 1 extraction cycle, flush volume of 60% and purge time of 120 seconds. Pressurized liquid extraction recoveries were higher than 88% for all the compounds except for carbamazepine (55%). The repeatability and reproducibility between days, expressed as relative standard deviation (n=5), were lower than 6% and 10%, respectively. The detection limits for all compounds were lower than 12.5 µg/kg of dry weight. The method was applied to determine benzodiazepines and barbiturates in sewage sludge from urban sewage treatment plants, and carbamazepine showed the highest concentration (7.9-18.9 µg/kg dry weight).

Keywords: *benzodiazepines, barbiturates, liquid chromatography, Core-Shell particle column, tandem mass spectrometry, sewage sludge, pressurized liquid extraction.*

1. INTRODUCTION

The presence of pharmaceutical residues in the environment has become a major issue during recent years, due to their occurrence and potential negative effects in the environment [1, 2]. After being excreted by the human body, pharmaceuticals enter sewage treatment plants (STPs) and they may remain in effluent water or sludge after undergoing wastewater treatment processes [3]. Subsequently, sewage sludge is usually subjected to some kind of treatment, such as anaerobic digestion, thickening, dewatering, drying and lime/alkaline stabilization [4]. Although sludge treatments can effectively reduce their potential for putrefaction and pathogens, while decomposing the organic matter, the removal of pharmaceutical residues is often insufficient [5]. As a consequence, these residues enter the environment when sewage sludge is used as fertilizer, organic soil improver or landfill [5-8].

The pharmaceuticals that can be found in sewage sludge include barbiturates (BTs) and benzodiazepines (BZDs), among others. BTs act directly on the central nervous system,

producing different symptoms such as sedation or low grade anaesthesia. They have a small therapeutic range and high potential for being drugs of abuse. Therefore, the tendency is to substitute these pharmaceuticals with BZDs. However, certain BTs, such as phenobarbital, are still widely used as human pharmaceuticals and very common as veterinary drugs [9-11].

The environmental impact associated with the use of these pharmaceuticals has aroused interest in the development of analytical methods to determine their concentration in environmental samples such as sewage sludge [12, 13]. One aspect to keep in mind when developing an analytical method is the matrix complexity. Due to the presence in sewage sludge of a large number of organic contaminants, a matrix effect is usually observed, and even more so in liquid chromatography-mass spectrometry analysis [14]. Therefore, suitable sample preparation techniques for the extraction, clean-up, and concentration of analytes can effectively reduce the matrix effect, which has a significant impact on the accuracy, precision, robustness and

sensitivity of analytical methods. A few methods have been reported for determining BZDs in sewage sludge, and these are based on ultrasonic extraction (USE) [5] and pressurized liquid extraction (PLE) [6, 7, 15-17]. USE has been combined with solid-phase extraction (SPE) in a method developed by Carballa et al. [5] to study the fate of personal care products and pharmaceuticals (including the target compounds carbamazepine and diazepam) during anaerobic digestion of sewage sludge. With this method, authors reported recoveries of 58% and 96% for diazepam and carbamazepine, respectively.

PLE has proven to be an effective extraction technique for solid samples, since high temperatures can be applied, which improves the desorption of analytes and increases mass transfer rates [18]. Langford et al. [7] determined carbamazepine among 18 pharmaceuticals in sewage sludge from Scotland, using PLE as the extraction technique and methanol as the extraction solvent. Other methods include SPE of the PLE extract to minimize interferences and pre-concentrate target compounds [6,15-17]. For instance, Jelić et al. [6]

determined 43 pharmaceuticals in sewage sludge from several STPs in Spain, including butalbital, diazepam, lorazepam and carbamazepine. All compounds were extracted by PLE using methanol:water (1:2 v/v) at 100°C and then the PLE extract was purified and pre-concentrated by SPE using a hydrophilic-lipophilic balance polymer, Oasis HLB. The recoveries reported for butalbital, diazepam, lorazepam and carbamazepine were 45%, 97%, 70% and 134% respectively.

Due to the physico-chemical properties of BTs and BZDs, such as being thermally labile, polar and neutral compounds, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the most suitable technique for the determination of these types of pharmaceuticals. In recent years, chromatographic performance has evolved rapidly in terms of improving speed, resolution and sensitivity. Baker et al. [1] determined 65 compounds (including some BZDs and their metabolites) by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) in surface water and wastewater using a 1.7 µm particle size column with 1 mm i.d. for 23 min at very low flow rates (0.04

mL/min). High throughput analysis in LC can also be achieved with sub-3 μm superficially porous particles, also known as fused-core or core-shell technology. These columns are designed to provide rapid separations with modest operating pressures, which can be used in conventional LC equipment. A previous study of our group is the only known case of a fused-core column with 2.7 μm particle size being used to determine BTs and BZDs in aqueous environmental samples [19], and chromatographic separation was achieved in less than 18 min.

With respect to the determination of BTs and BZDs, different mass analysers have been used, such as ion trap (IT) [20], triple quadrupole (QqQ) [21, 22], hybrid triple quadrupole-linear ion trap (QqLIT) [23] and quadrupole time of flight (QTOF) [24].

The purpose of this research is to develop a method based on PLE/LC-(ESI)MS/MS for the simultaneous determination of 4 BTs (pentobarbital, secobarbital, barbital and phenobarbital) and 4 BZDs (diazepam, nordiazepam, bromazepam and carbamazepine), and its subsequent application to sewage sludge

samples. This is the first time that all of these compounds have been studied in sewage sludge, except in the case of diazepam and carbamazepine.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Reagents and standards

Diazepam (DZP), bromazepam (BMZ), carbamazepine (CBZ), barbital (BTL), pentobarbital (PTB), phenobarbital (FBT), and secobarbital (SCB), were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Nordiazepam (NDZ), DZP- d_5 and PTB- d_5 were acquired from Cerilliant (Round Rock, TX, USA) as a 1 mL of 1 mg/mL solution in methanol. Stock solutions of individual standards were prepared for each compound in methanol (MeOH) at 100 mg/L and stored at -20°C in the dark. Mixed working solutions were prepared daily by diluting the stock solution to the appropriate concentration with methanol:water (50:50 v/v).

Ultrapure water was obtained with a Purelab ultra purification system (Veolia water, Sant Cugat del Vallès, Spain). MeOH (HPLC-grade), dichloromethane (DCM) (pesticide residue analysis) and acetone were supplied by Prolabo (Llinars del

Vallès, Spain), formic acid 95% (eluent additive for LC-MS grade) was purchased from Sigma-Aldrich and nitrogen was supplied by Carbueros Metálicos (Tarragona, Spain).

2.2 Collection of sewage sludge samples

The sewage sludge samples were collected from two STPs located in Catalonia. STP1 receives an average flow of 24,000 m³/day of sewage water and STP2 receives an average flow of 18,000 m³/day of sewage water. The method used for sewage sludge sampling was spot sampling using pre-cleaned polyethylene bottles. In this case, sewage sludge was collected after anaerobic digestion following the dehydration process.

2.3 Sample pretreatment

The sewage sludge samples (about 150 g) were homogenized, frozen, lyophilized using the freeze-dry system (Labconco, Kansas City, MO, USA), sieved through a 125 µm screen and stored at room temperature.

To optimize and validate the method, 20 g of each pretreated sludge sample (8 samples in total) was mixed. Subsequently,

for each test, 1 g of this mixed sample was spiked with the compounds dissolved in acetone with sufficient volume to cover the entire sludge sample. It was then left for the solvent to evaporate inside a fume hood at room temperature, with frequent agitation for 12 hours.

2.4 Pressurized Liquid Extraction

Sludge samples were extracted by PLE using an ASE 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). 1 g of pretreated sludge was thoroughly mixed with 2 g of diatomaceous earth and then the mixture was transferred into the extraction cell (11 mL capacity). Whatman glass fibre filters were put at the top and bottom of the cell.

The extraction solvent and operational conditions were: methanol as the extraction solvent, 5 min preheating period, extraction temperature of 100°C, extraction pressure of 1,500 psi with a static period of 5 min in one cycle, flush volume of 60% of the cell volume and nitrogen purge time of 120 s. The final extraction volume was approximately 15 mL, which was evaporated under a nitrogen stream to dryness and redissolved in 5 mL of methanol:water

(50:50 v/v), filtered with a microfilter 0.22 μm nylon filter (Teknokroma, Barcelona, Spain), and then analysed by LC-MS/MS.

2.5 Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

LC-MS/MS conditions were based on a previous paper in which the presence of benzodiazepines and barbiturates was determined in waste and surface waters [19]. Chromatographic separation was performed by reversed-phase liquid chromatography (Agilent 1200 series,) and detection was performed by electrospray ionization (ESI) mass spectrometry with a triple quadrupole (Agilent 6410 Triple Quad MS, Waldbronn, Germany) MS-MS system. Chromatographic column was a fused core (Kinetex Core-Shell Technology) C_{18} (4.6 x 100 mm) with a 2.7 μm particle size (Phenomenex, Madrid, Spain). The binary mobile phase was ultrapure water with formic acid (pH 3) (A) and MeOH (B) and the gradient of elution was as follows: 45% B for 10 min, increased to 100% in 5 min, kept constant for 1 min and finally returned to 45% B in

2 min. All of the compounds were eluted within 18 min. The flow rate was 0.5 ml/min, the column temperature was kept at 25°C and the volume injected was 25 μL .

Data acquisition was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode and the protonated $[\text{M}+\text{H}]^+$ (BZDs) or deprotonated $[\text{M}-\text{H}]^-$ (BTs) molecular ion of each compound was chosen as the precursor ion. High purity nitrogen (>98%) was used as desolvation nebulizer. The optimized conditions for the ESI interface were: 45 psi nebulizer pressure, 12 L/min drying gas flow-rate, drying gas temperature of 350°C and 3,500 V spray potential. Fragmentation values and collision energy voltage established for each compound are shown in supporting information Table S1.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 LC-(ESI)MS/MS

As mentioned above, the LC-(ESI)MS/MS method for the determination of sedative hypnotics in sewage sludge samples is based on a previous study to determine these

compounds in water samples [19].

The Kinetex™ C₁₈ chromatographic column based on Core-Shell particle technology allowed the separation of the eight compounds in study in less than eighteen minutes. The mobile phase that favoured chromatographic separation and better ESI performance was ultrapure water with formic acid (pH 3) and MeOH. Data was acquired in SRM and [M+H]⁺ or [M-H]⁻ precursor ions were subjected to fragmentation and the most abundant fragment ion was chosen as the quantifier ion. To provide reliable confirmation, two transitions for each benzodiazepine were chosen, and only one transition for each barbiturate and carbamazepine was possible due to their poor fragmentation. The precursor ion and product ions are shown in supporting information Table S1, as well as the cone voltage and collision energy established for each compound.

3.2 Pressurized liquid extraction

Solvent, temperature and extraction time were the parameters optimized to achieve the maximum operational performance of PLE. For each

test, a non-spiked sludge sample (blank) was analysed in order to subtract the signal value of analytes present in the sample. Solvent extraction highly affects the efficiency of PLE. Therefore, several solvents such as DCM, acetone, MeOH and two mixtures of MeOH:water at 80:20 (v/v) and 60:40 (v/v) were tested under the following initial conditions: 1,500 psi of pressure, a temperature of 80°C, 5 min preheat time, 5 min static extraction time, 60% flush volume, 120 s of purge nitrogen, 1 cycle and cell size of 11 mL. 1 g of pretreated sludge was spiked at 20 µg/kg dry weight (d.w.). Blank analysis gave positive for CBZ and NDZ when any extraction solvent was used. BMZ and DZP were also found when MeOH or mixtures of MeOH-water were tested. In the PLE optimization, extracts obtained (approximately 15 mL) using DCM, acetone and MeOH were evaporated to dryness under a nitrogen stream and redissolved in 10 mL of methanol:water (50:50 v/v). Extracts in mixtures of MeOH-water were evaporated to 10 mL.

Firstly, MeOH and MeOH:water mixtures were tested. As shown in the results plotted in Figure 1A, MeOH 100% extracted all of

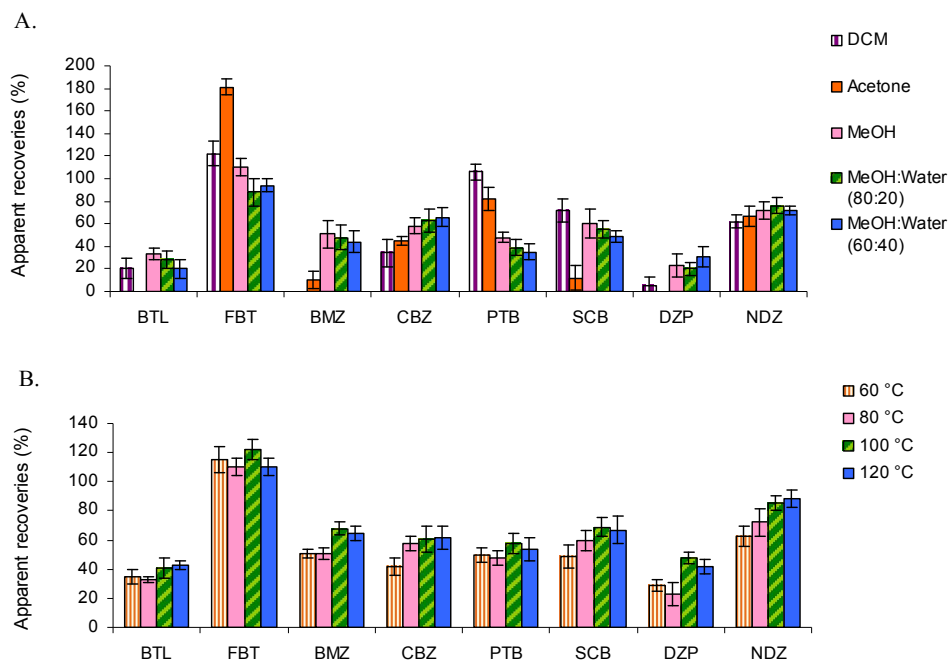


Figure 1. (a) Apparent recoveries (n=3) by using different solvents.
 (b) Apparent recoveries (n=3) by using different temperatures.

the compounds with apparent recoveries (which include PLE recoveries and matrix effect) above 48%, except for DZP (23%) and BTL (33%). Similar values were observed when the different mixtures of MeOH:water were used. Mixtures of MeOH:water have already been used to extract barbiturates and benzodiazepines in a number of studies [6, 15]. For instance, Jelic et al. [6] used MeOH:water (1:2 v/v) to extract 43 pharmaceutical compounds from sewage sludge, including

butalbital, DZP and CBZ, and the recoveries reported were 44%, 93% and 134%, respectively. Barron et al. [15] also quantitatively extracted CBZ using MeOH:water (50:50 v/v). In order to increase the extraction efficiency, less polar solvents such as acetone and DCM were tested. Although good recoveries were obtained for most BTs (> 70%) when DCM was used, it did not extract BMZ. Meanwhile, acetone did not extract two compounds (BTL and DZP). NDZ showed similar

recoveries with all of the solvents tested, ranging between 62% and 76%. Considering the results and time used to evaporate the solvent, MeOH was selected as the extraction solvent.

Another parameter optimized in the PLE was extraction temperature. This parameter also plays an important role in PLE in terms of the solubility and mass transfer effect, and disruption of surface equilibrium [25]. Four different extraction temperatures (60°C, 80°C, 100°C and 120°C) were selected to evaluate their influence on the extraction efficiency for these sedative hypnotics from sewage sludge. Apparent recoveries increased between 6% (FBT) and 40% (DZP) for all compounds when the temperature was increased from 60°C to 100°C (Figure 1B) and they slightly decreased at 120°C for some compounds. Therefore, 100°C was chosen as the extraction temperature.

In order to improve the extraction of the compounds, static times (5, 10 and 15 minutes) and up to two cycles were tested. The extraction efficiency was rather unaffected by increasing these two parameters (data not shown), so 5 minutes of static time and one cycle were selected in order to save time in the extraction

process. Comparing with published methods, between 5 and 10 min of static time and two [7] and three [6, 16] cycles were needed to extract the compounds from sewage sludge. It should be noted that these methods were developed to determine many compounds that belong to different therapeutic groups of pharmaceuticals with different chemical properties.

Previous studies [26, 27] have shown that PLE parameters such as pressure, purge time and flush volume have a negligible effect on extraction efficiency. Therefore, these parameters were not optimized. The final PLE optimal conditions for the extraction of these sedative hypnotics were: MeOH as the extraction solvent, 5 min preheating period, extraction temperature of 100°C, extraction pressure of 1,500 psi with a static period of 5 min in one cycle, flush volume of 60% of the cell volume and nitrogen purge time of 120 s.

A critical aspect in quantitative analysis with LC-MS/MS is the presence of matrix effect that can severely compromise the reliability of the analytical result. In order to decrease this effect, it was evaluated in three different redissolution volumes (2, 5 and

10 mL). The suitable volume was chosen as a compromise between the lowest limits of detection and the smallest matrix effect. To carry out the test, blanks were extracted, evaporated, spiked at

50 µg/L (BTs) and 5 µg/L (BZDs) and redissolved to the corresponding volume. The matrix effect was calculated with the equation (1):

$$\text{Matrix effect\%} = 100 \cdot \left(\frac{\text{Peak area spiked post-extraction} - \text{Peak area blank}}{\text{Peak area pure solvent standard}} \right) \times 100$$

Ecuacion (1)

Negative values indicate ion enhancement and positive values indicate ion suppression. As can be seen in Figure 2, all compounds were affected by ion suppression except FBT, which

showed signal enhancement. As expected, a decrease in redissolution volume caused an increase in the matrix effect for most of the compounds.

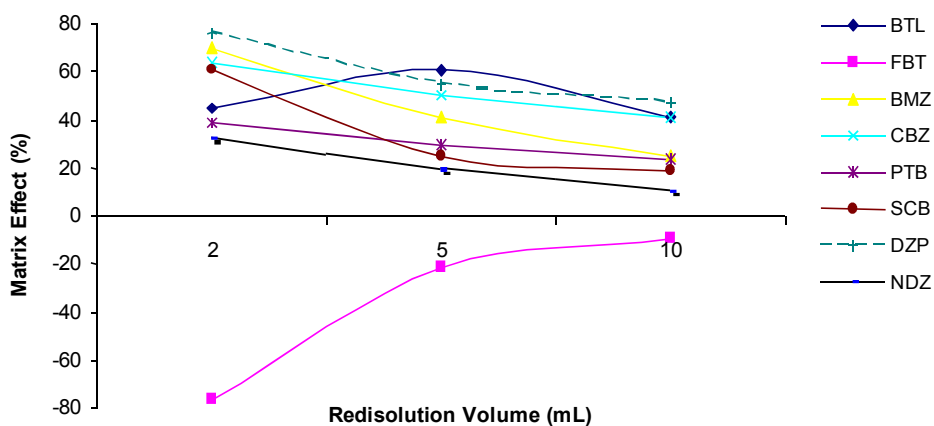


Figure 2. Matrix effect at different re-dissolution volumes

However, the matrix effect for BTL (45%) was similar when re-dissolving with 2 or 10 mL. A re-dissolution volume of 5 mL was found to be the point at which the matrix effect was reduced to an acceptable level while a good signal response was still maintained. Working with this volume, the matrix effect was between -22% and 61% for all compounds. FBT (-22%) and NDZ (19%) were the compounds least affected by matrix effect.

3.3 Method Validation

Quantification of sedative hypnotics with and without isotopic labelled compounds was evaluated. PTB-d₅ was used to quantify the four BTs and DZP-d₅ was used to quantify the four BZDs. As a result, the use of these labelled compounds did not compensate satisfactorily matrix effect for some compounds such as BTL, FBT and NDZ due to high differences of matrix effect present between these compounds and the isotopic labelled compounds (PTB-d₅ -31% and DZP-d₅ 55%). Thus in order to ensure accurate and reliable analytical results, all compounds were quantified with matrix-matched calibration curves.

Linear range, repeatability, reproducibility between days, recoveries, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for each compound were determined to validate the analytical method. Analyses of blanks were performed for all analytical validation parameters and these blanks gave positive results for all of the BZDs under study. Eight sludge samples were spiked before PLE extraction with increased amounts of each compound. Linear range was tested between 5 and 1000 µg/kg (d.w.) for BTs and 0.5 and 100 µg/kg (d.w.) for BZDs and the results for each compound are shown in Table 1. Determination coefficients (R^2) were higher than 0.9981 for all compounds.

LODs for compounds not present in non-spiked sludge samples (BTs) were calculated as the concentrations giving peaks for which the signal-to-noise ratio was 3. LODs for compounds present in the sample (BZDs) were estimated from their recoveries and the MS response. As can be seen in Table 1, LODs were between 2 and 12 µg/kg (d.w.) for BTs, and the highest LODs were found for PTB and BTL. With respect to the BZDs, LODs were between 0.2 and 2 µg/kg (d.w.) LOQs were set at

Table 1. Validation data for sewage sludge

Compound	Linear Range (µg/kg)	LOD (µg/kg)	RSD ^a (%) (n=5)	RSD ^b (%) (n=5)	PLE Recovery ^a (%) (n=5)	PLE Recovery ^b (%) (n=5)	Interval tolerance of relative ion intensitives ^c (%)
BTL	25-1000	12	6	8	102	108	24.8 - 41.3
FBT	5-1000	2	6	7	101	99	29.3 - 48.8
BMZ	0.5-100	0.2	8	10	89	92	49.6 - 74.4
CBZ	5-100	2	5	6	94	98	10.5 - 19.5
PTB	12-1000	5	4	6	106	112	44.8 - 67.2
SCB	5-1000	2	5	7	100	108	62.4 - 93.6
DZP	1.2-100	0.5	7	10	90	93	60.8 - 91.2
NDZ	0.5-100	0.2	5	8	90	88	53.6 - 80.4

Repeatability (RSD%, n=5) < 6%

^a Reproducibility (RSD%) and PLE recovery at 5 and 25 µg/kg for BZDs and BTs respectively.^b Reproducibility (RSD%) and PLE recovery at 25 and 250 µg/kg for BZDs and BTs respectively.^c Sludge sample spiked at 125 µg/kg d.w.

the lowest point on the calibration curve.

The precision and PLE recoveries were evaluated by spiking five sludge samples at two levels of concentration as following: 25 and 250 µg/kg (d.w.) for BTs and 5 and 25 µg/kg (d.w.) for BZDs. The precision was expressed as the relative standard deviation (%RSD) obtained when the repeatability (intra-day) and reproducibility (inter-day) were assessed. The repeatability %RSD (n=5) values were < 6% and the reproducibility values were <10% for all compounds at both levels, as shown in Table 1. PLE recoveries were calculated by comparing the peak area obtained from pre-extraction

spiked sample with the peak area from a post-extraction spiked sample. PLE recoveries were very similar at the two levels and were between 88% and 112% for all compounds (Table 1).

Apparent recoveries were calculated by comparing the peak area obtained from pre-extraction spiked sample with the peak area from a pure solvent standard solution. Apparent recoveries (data not shown) at the lowest level of concentration were between 50% and 111% for all compounds, except for BTL and DZP, whose recoveries were 33%. Apparent recoveries at the highest level of concentration were between 41% (BTL) and 122% (FBT) for all compounds.

The identification and confirmation of each compound were performed according to the requirements established by the Commission Decision 2002/657/EC for performance mass spectrometric detection [28]. The guidelines demand three conditions: the difference between the retention times of the analytes in the spiked-matrix samples and those of a pure standard should be less than 2.5%, four identification points that are earned by one precursor and two products ions, and relative ion intensities. Intervals of maximum permitted tolerances were determined from relative ion intensities of spiked sludge sample at 250 µg/kg (d.w.). The maximum permitted tolerances according to the guideline [28] were $\pm 20\%$ for most compounds except for BT, FBT (± 25) and CBZ (± 30). These tolerances are showed in Table 1.

3.4 Method application

The method developed was applied to the determination of the occurrence of 4 barbiturates and 4 benzodiazepines in sewage sludge from two STPs located in Catalonia (Spain). Table 2 summarizes the results of the average concentrations of

compounds found in each sludge samples (eight samples analysed in triplicate).

Confirmation of positive findings was carried out as described above in Section 3.3 for method validation. For all of the compounds detected, relative ion intensities (Table 2 in brackets) are within the limits permitted under Commission Decision 2002/657/EC [28].

BTs were not detected in any of the sludge samples analysed. Their absence in the sludge is in line with the results reported in a previous study [19] in which only FBT was found in wastewater at concentrations between 110 and 320 ng/L, while the rest of the BTs under study were not found.

The presence of four BZDs was determined in both STPs. Similar concentrations were observed in both samples, although for sludge samples from STP1, CBZ showed higher values (7.9-18.9 µg/kg (d.w.)) and DZP was found below the LOQ, except for one sample in which it was found at 4.6 µg/kg (d.w.). Figure 3 shows a chromatogram of a non-spiked sludge sample from STP2 where the presence of BMZ, CBZ, DZP and NDZ is shown. In sludge samples from both STPs, the concentration of BMZ ranged from 4.0 to 6.9 µg/kg (d.w.) and

Table 2. Results in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w) of sewage sludge samples analyzed ($n = 3$).

Compound	STP 1				STP 2			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8
BMZ	4.0 (39)	4.6 (50)	6.9 (62)	5.3 (52)	4.2 (58)	4.1 (59)	5.7 (63)	4.2 (65)
CBZ	10.3 (15)	18.4 (13)	8.6 (17)	18.9 (18)	9.0 (17)	7.9 (13)	11.1 (15)	14.1 (14)
DZP	4.6 (73)	n.q (69)	n.q (77)	n.q (70)	3.7 (71)	4.6 (73)	4.1 (71)	4.0 (79)
NDZ	2.9 (72)	2.8 (65)	3.8 (74)	3.3 (66)	4.9 (70)	4.8 (55)	8.1 (67)	7.4 (69)

Relative ion intensities (%) in brackets

n.q = < LOQ

NDZ was found between 2.8 and 8.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.). Results of previous studies to determine benzodiazepines in wastewater samples from these STPs showed similar trends in concentrations to the sludge samples [19]. For instance, the concentration of CBZ was the highest among the benzodiazepines under study (2,242 ng/L) and BMZ, DZP and NDZ ranged from 37 to 97 ng/L. Benzodiazepines are normally halogenated compounds, and it has been suggested that the presence of a halogen in their molecule significantly reduces its susceptibility to biodegradation [29]. Therefore, these compounds are expected to be found in both wastewater and sludge samples. In spite of the low elimination of CBZ in STPs, it is found in sewage sludge due to high levels of concentration present in wastewater.

In previous studies [6, 7, 15, 16], the presence of benzodiazepines in sewage sludge has been only limited to the determination of CBZ and DZP. Two of these studies were carried out in sludge samples from STPs located in Spain [6, 16]. CBZ was reported at concentrations from 1.43 to 12.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) and DZP was reported between 2.5 and 8.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) These values are

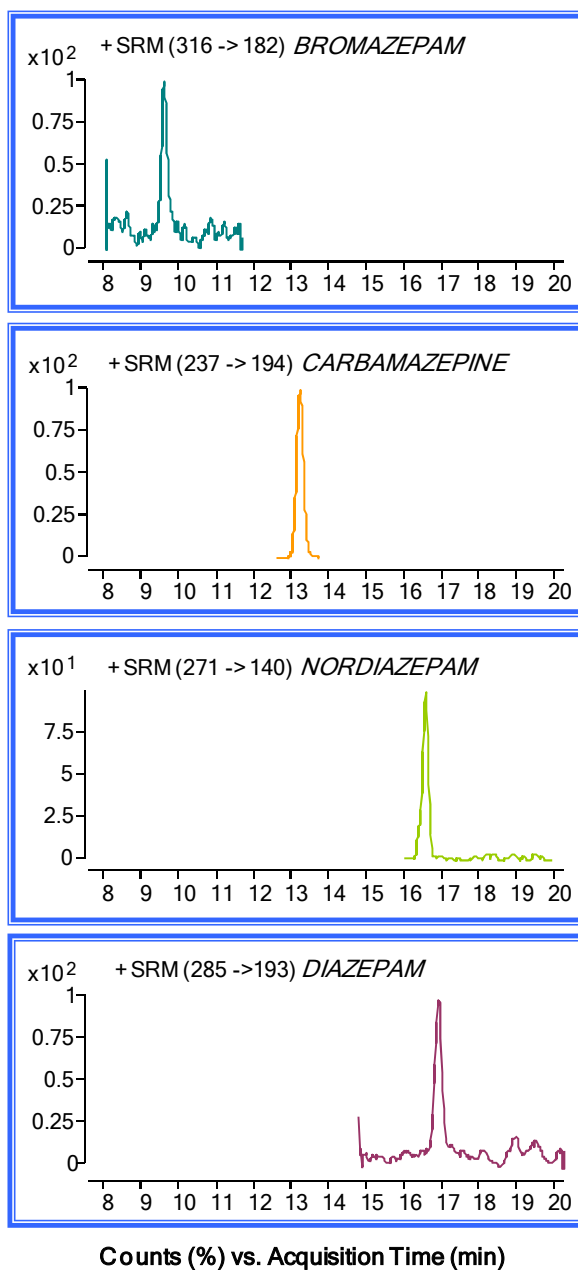


Figure 3. SRM chromatogram of a sludge sample from STP2 (sample 7). For experimental conditions see text.

similar to our results obtained. The presence of CBZ was also determined in sewage sludge from Scotland [7] and Ireland [15]. High concentrations ranging from 61.8 to 120 µg/kg (d.w.) were reported in these studies.

4. CONCLUSIONS

A method based on PLE and LC-MS/MS for the simultaneous determination of 4 barbiturates and 4 benzodiazepines in sewage sludge was developed and validated. This study shows the determination of BMZ, NDZ, BTL, FNB, PTB and SCB in sewage sludge for the first time. In the PLE, the use of MeOH as the extraction solvent, a single cycle and short static time were necessary to extract all barbiturates and benzodiazepines completely. Good PLE recoveries were achieved (88%-112%). The method proved to be ten times more sensitive for benzodiazepines than barbiturates, thus LODs ranged from 0.2 to 2 µg/kg (d.w.) for benzodiazepines and from 2 to 12 µg/kg (d.w.) for barbiturates. With regard to the matrix effect, BT, CBZ and DZP were the analytes most affected by ion suppression.

This effect was compensated by matrix-matched calibration.

When samples from two STPs were analysed, the occurrence of benzodiazepines was found in all samples, unlike in the case of barbiturates, which were not found in any sample. CBZ showed the highest concentration in all sewage sludge samples analysed (7.9-18.9 µg/kg (d.w.)).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support by Ministry of Science and Technology (BES-2009-028157) and the Department of Innovation, Universities and Enterprise (project 2009 SGR 223).

REFERENCES

- [1] Baker, D. R., Kasprzyk-Hordern, B., *J. Chromatogr. A* 2011, *1218*, 1620-1631.
- [2] Yuan, S., Jiang, X., Xia, X., Zhang, H., Zheng, S., *Chemosphere* 2013, *90*, 2520-2525.
- [3] Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D., *Water Res.* 2009, *43*, 831-841.

- [4] Kelessidis, A., Stasinakis, A. S., *Waste. Manage.* 2012, *32*, 1186-1195.
- [5] Carballa, M., Omil, F., Ternes, T., Lema, J. M., *Water Res.* 2007, *41*, 2139-2150.
- [6] Jelić, A., Petrović, M., Barceló, D., *Talanta.* 2009, *80*, 363-371.
- [7] Langford, K. H., Reid, M., Thomas, K. V., *J. Environ. Monit* 2011, *13*, 2284.
- [8] Esptein, E., *Land application of sewage sludge and biosolids*, Lewis publishers 2003.
- [9] Spell, J. C., Srinivasan, K., Stewart, J. T., Bartlett, M. G., *Rapid Commun. Mass Spectro.* 1998, *12*, 890-894.
- [10] Peschka, M., Eubeler, J. P., Knepper, T. P., *Environ. Sci. Technol.* 2006, *40*, 7200-7206.
- [11] Anderson, R. A., Ariffin, M. M., Cormack, P. A. G., Miller, E. I., *Forensic Sci. Int.* 2008, *174*, 40-46.
- [12] Wilga, J., Kot-Wasik, A., Namiesnik, J., *J. Chromatogr. Sci* 2008, *46*, 601-608.
- [13] Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R. M., *Trends Anal. Chem.* 2010, *29*, 752-764.
- [14] Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B., Lehane, M., *Talanta* 2013, *115*, 104-122.
- [15] Barron, L., Tobin, J., Brett, P., *J. Environ. Monit.* 2008, *10*, 353-361.
- [16] Vazquez-Roig, P., Segarra, R., Blasco, C., Andreu, V., Picó, Y., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 2471-2483.
- [17] Mastroianni, N., Postigo, C., de Alda, M. L., Barceló, D., *J. Chromatogr. A* 2013, *1322*, 29-37.
- [18] Runnqvist, H., Bak, S. A., Hansen, M., Styrihave, B., Halling-Sørensen., Björklund, E., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 2447-2470.
- [19] Arbeláez, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R. M., *(To be published)* 2014.
- [20] Grujić, S., Vasiljević, T., Laušević, M., *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 4989-5000.
- [21] Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnatir, R., Fanelli, R., *Environ. Sci. Technol.* 2003, *37*, 1241-1248.
- [22] Nodlera, K., Licha, T., Besterb, K., Sautera, M., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 6511-6521.

- [23] Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., *Anal. Chem.* 2009, *81*, 898-912.
- [24] Hernández, F., Bijlsma, L., Sancho, J. V., Díaz, R., Ibáñez, M., *Anal. Chim. Acta.* 2011, *684*, 96-106.
- [25] Masao, K., Tomonori, M., Hiroshi, B., *Anal. Chim. Acta* 2010, *659*, 186-193.
- [26] Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R. M., *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 979-984.
- [27] Herrero, P., Borrull, F., Marcé, R. M., Pocurull, E., *J. Chromatogr. A* 2013, *1285*, 31-39.
- [28] Official Journal of the European Communities L221, Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Brussels, Belgium., 2002.
- [29] Kosjek, T., Perko, S., Zupanc, M., Zanoški Hren, M., Landeka Dragičević, T., Žigon, D., Kompare, B., Heath, E., *Water Res.* 2012, *46*, 355-368.

Supplementary Information

Table S1. SRM conditions. Quantifier and confirmation ions for determination of benzodiazepines and barbiturates

Compound	Retention time	Precursor ion	Product Ions		Cone Voltage (V)
			Quant	Confr. 1	
Barbital (BTL)	3.5	183[M-H] ⁻	140 (5)	42 (15)	90
Phenobarbital (FBT)	5.8	231[M-H] ⁻	42 (9)	188 (6)	90
Bromazepam (BMZ)	9.9	316[M+H] ⁺	182 (35)	209 (25)	140
Carbamazepine (CBZ)	13.2	237[M+H] ⁺	194 (15)	179 (35)	120
Pentobarbital (PTB)	14.4	225[M-H] ⁻	182 (7)	42 (14)	100
Pentobarbital-d5	14.6	230[M-H] ⁻	187 (6)	42 (14)	100
Secobarbital (SCB)	15.9	237[M-H] ⁻	194 (6)	42 (14)	90
Nordiazepam (NDZ)	16.6	271[M+H] ⁺	140 (25)	165 (30)	150
Diazepam (DZP)	17	285[M+H] ⁺	193 (35)	222 (27)	150
Diazepam-d5	17.2	290[M+H] ⁺	227 (30)	198 (35)	150

Collision Energy (eV) in brackets

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

3.2.3. Discusión de Resultados

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Aunque los resultados obtenidos durante el desarrollo de los dos estudios ya han sido discutidos en profundidad en sus respectivas publicaciones, aquí destacaremos los más relevantes de ellos. Además algunas condiciones experimentales que no han sido especificadas dentro de las publicaciones, también serán comentadas.

La separación cromatográfica de los compuestos se ha realizado con una columna cromatográfica bajo el nombre comercial Kinetex C₁₈, la cual es una columna con tecnología de partícula *fused core*. Con esta columna y bajo las otras condiciones cromatográficas óptimas descritas en la primera publicación, se pudo obtener una completa resolución de todos los compuestos en tiempos de retención cortos menores a 6 minutos. No obstante, en el análisis de muestras de aguas residuales se presentó una interferencia isobárica que impedía la correcta cuantificación e identificación del barbital, y por tal motivo, el gradiente de separación se suavizó disminuyendo el porcentaje de metanol al inicio del gradiente y aumentando el tiempo en que éste llegara al 100%.

Referente a la fase móvil se observó que el pH de ésta solo afectaba a la ionización de las benzodiazepinas [1]. A causa de los diferentes grupos funcionales presentes en la estructura química de los hipnótico-sedantes, se observó que la ionización de las benzodiazepinas (compuestos neutros) se favorece en modo positivo y la ionización de los barbitúricos (compuestos ácidos débiles) en modo negativo. Cabe mencionar que los parámetros que afectan el funcionamiento de ESI y la disociación inducida por colisión (CID, *Collision Induced Dissociation*), fueron optimizados mediante análisis por inyección en flujo (FIA, *Flow Injection Analysis*) para cada compuesto individualmente a una concentración de 500 µg/L disuelto con metanol:agua (50:50, v/v).

En la optimización de la SPE para extraer los hipnótico-sedantes de la matriz líquida, dos sorbentes diferentes poliméricos con balance polar/no-polar fueron evaluados: Bond Elut Plexa (superficie hidroxilada y poliestireno-divinilbenzeno) y Oasis HLB (divinilbenzeno/n-

vinilpirrolidona). Comparando los resultados, Oasis HLB mostró mejores recuperaciones entre un 5-15% más altas que utilizando Bond Elut Plexa. Aunque en otros estudios recientes, sorbentes de modo mixto como Oasis MCX [2] y Strata-XC [3] han sido eficientemente aplicados en la extracción de benzodiazepinas, éstos no fueron probados en nuestro estudio por el carácter ácido que presentan los barbitúricos.

Después de conseguir las condiciones óptimas en la SPE, la técnica de extracción fue evaluada con muestras de agua de entrada de EDAR, por lo que las recuperaciones disminuyeron ligeramente para todos los compuestos, excepto para barbital y pentobarbital. El barbital presentó gran supresión iónica (75%) y el pentobarbital presentó ensalzamiento iónico (48%). Por eso, en la etapa de *clean-up* se probaron diferentes proporciones de metanol en agua (5-10-15 y 20%, v/v), pero no se observó que el efecto matriz disminuyera y a 20% de metanol en agua ya se empezó a observar elución de los compuestos.

En la extracción de los hipnótico-sedantes de los fangos de depuradora con PLE, varios parámetros del instrumento y el solvente de extracción fueron optimizados. Según los resultados experimentales, los únicos parámetros que muestran gran relevancia en el proceso de extracción son el solvente y la temperatura. En este estudio metanol proporcionó la mejor eficiencia de extracción de los hipnótico-sedantes bajo estudio. Sin embargo, otros estudios multiresiduo que han incluido carbamazepina y diazepam y que han utilizado como técnica de extracción PLE, han encontrado que la mezcla metanol:agua proporciona una eficiente extracción para estos dos compuestos [4-6]. Igualmente, muy recientemente en un estudio multiresiduo de 148 compuestos de los cuales 6 son hipnótico sedantes, encontraron como solvente óptimo metanol:agua con 0.1% de EDTA a pH 2.5 para ser extraídos de fangos de depuradora mediante UAE [7]. Los autores de ese estudio obtuvieron recuperaciones para los compuestos en común con los nuestros entre 42-119%.

En la aplicación de los métodos analíticos a muestras de agua de los ríos Ebro, Ter y Llobregat, la carbamazepina siempre fue detectada en todas las muestras de los tres ríos con concentraciones de hasta 3.3 ng/L y las benzodiazepinas fueron encontradas en su mayoría como < LOQ. Por otro lado, en la aplicación del método en muestras de agua residual tomadas en dos EDARs localizadas en Tarragona y Reus, la carbamazepina también presentó las mayores concentraciones y fue presente en todas las muestras analizadas, e incluso en las muestras de los afluentes la concentración fue mayor que en las aguas de entrada con concentraciones de hasta 1138 ng/L. Una posible explicación a este hecho, es que los metabolitos conjugados de la carbamazepina excretados junto con la carbamazepina, se pueden volver a convertir al compuesto precursor (carbamazepina) durante el tratamiento del agua residual en la EDAR.

La aplicación del método desarrollado en el segundo estudio en muestras de fangos de depuradora, tomadas de las mismas EDARs que las muestras de agua residual, carbamazepina y las tres benzodiazepinas fueron determinadas en todas las muestras analizadas en un intervalo de concentración entre < LOQ – 19 µg/kg (d.w.), siendo los valores más altos también para la carbamazepina.

Con los resultados obtenidos de la aplicabilidad de los dos métodos desarrollados se demuestra por primera vez la presencia de los hipnótico-sedantes en los diferentes compartimentos del medioambiente en la zona de la provincia de Tarragona.

Referencias

- [1] M. Wang, B. Guo, Z. Huang, J. Duan, Z. Chen, B. Chen, S. Yao, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2821.
- [2] I. Racamonde, R. Rodil, J.B. Quintana, E. Villaverde-de-Sáa, R. Cela, J. Chromatogr. A 1352 (2014) 69.
- [3] V. Borova, N. Maragou, P. Gago-Ferrero, C. Pistos, N. Thomaidis, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 4273.
- [4] C.E. Rodríguez-Rodríguez, A. Jelić, M.A. Pereira, D.Z. Sousa, M. Petrović, M.M. Alves, D. Barceló, G. Caminal, T. Vicent, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 12012.
- [5] A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, Talanta 80 (2009) 363.
- [6] A. Jelić, M. Gros, A. Ginebreda, R. Cespedes-Sánchez, F. Ventura, M. Petrovic, D. Barceló, Water Res. 45 (2011) 1165.
- [7] P. Gago-Ferrero, V. Borova, M. Dasenaki, N. Thomaidis, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 4287.

3.3. Determinación de edulcorantes de alta intensidad en muestras medioambientales

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Como ya se ha comentado en la introducción los edulcorantes son compuestos de interés reciente como contaminantes y por ello también se han incluido en esta tesis. Los dos estudios descritos en la sección 3.3.1 y 3.3.2 están enfocados en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de edulcorantes de alta intensidad en muestras de aguas de río, aguas residuales y fangos de depuradoras. El primer estudio se basa en la extracción de los edulcorantes de las muestras medioambientales líquidas mediante SPE y posterior determinación mediante LC-(ESI)MS/MS. El segundo estudio se basa en la extracción de los edulcorantes de las muestras de fangos de depuradora mediante SPLE y seguida de determinación con LC-(ESI)MS/MS.

Algunas condiciones experimentales que no han sido comentadas dentro de las publicaciones, debido a la extensión permitida de los artículos por las revistas científicas, se presentarán y discutirán en la sección 3.3.3.

Actualmente los edulcorantes son sustancias ampliamente consumidas a nivel mundial, ya que se utilizan como aditivos en una gran cantidad de productos alimenticios, bebidas, medicamentos, productos sanitarios y en piensos compuestos para animales [1]. Por lo tanto, cabe esperar que finalicen en el medioambiente, tal y como ha sido evidenciado en algunos estudios la presencia de los edulcorantes de alta intensidad en las aguas de río [2] y aguas residuales [3-8]. En fangos de depuradora, los estudios aún son muy pocos y han sido desarrollados muy recientemente [9-12].

Referente a la ecotoxicidad de los edulcorantes de alta intensidad, existe controversia acerca de los supuestos riesgos sobre el medioambiente; mientras algunas investigaciones han permitido concluir bajo riesgo, otros estudios han demostrado que algunas de estas sustancias pueden afectar los ecosistemas acuáticos, principalmente las funciones biológicas del zooplancton [13]. Otro aspecto que genera inquietud es que los edulcorantes son sustancias no degradables y extremadamente persistentes en el medio acuático y terrestre, por lo que si a bajos niveles

de concentración son inocuos, éstos podrían ya no serlo en un futuro próximo debido a la acumulación en el medioambiente con el paso del tiempo [14].

Por todos los aspectos anteriormente mencionados, se han seleccionado como centro de investigación los edulcorantes de alta intensidad, para aportar información científica sobre nuevos métodos analíticos para su determinación e informar sobre su presencia en aguas de río, aguas residuales y fangos de depuradora en una zona geográfica donde se han evaluado por primera vez.

Durante el desarrollo de la técnica de determinación, varias columnas cromatográficas con diferente selectividad fueron evaluadas, en busca de obtener excelente resolución y simetría de los picos cromatográficos en cortos tiempos de retención. Estas columnas son de tecnología *fused core* o sub 2 μm (UHPLC), cuyas ventajas de ambas tecnologías han sido especificadas en el capítulo 1. La ionización en ESI se realiza en modo negativo para todos los compuestos, y posterior detección con un analizador QqQ operando en modo SRM. Con la finalidad de obtener la máxima sensibilidad, los principales parámetros que afectan la ionización en ESI y fragmentación de los iones precursores en el QqQ fueron también optimizados.

Debido a que los edulcorantes de alta intensidad son compuestos muy afectados por el efecto matriz, tanto en las muestras líquidas como en las muestras sólidas, diferentes estrategias fueron evaluadas con la finalidad de eliminarlo y/o disminuirlo en ambas matrices. Por eso durante el desarrollo de la técnica de extracción utilizando SPE para muestras medioambientales líquidas en el primer estudio, varias estrategias como el solvente de *clean-up*, el solvente de elución, varios tipos de sorbentes con diferentes interacciones para ser utilizados *como clean-up*, volumen de muestra, modificación de las condiciones cromatográficas y diferentes enfoques de calibración fueron evaluadas [15].

El segundo estudio se basa en SPLE como técnica de extracción para muestras sólidas. SPLE incorpora sorbentes dentro de la celda de extracción (*in-cell clean-up*) para realizar la etapa de *clean-up* al mismo tiempo que los compuestos son extraídos. En este estudio se optimizan los principales parámetros que afectan la extracción en el PLE, además algunas estrategias para eliminar o minimizar el efecto matriz son también evaluadas como *in-cell clean-up* y *SPE clean-up*.

El método analítico descrito en la primera publicación es aplicado para determinar edulcorantes en los siguientes ríos: Ebro, Ter, Llobregat, Francolí y Segre. El método también es aplicado para determinar edulcorantes en aguas residuales de las EDARs de Tarragona y Reus. Por otro lado, el método analítico descrito en la segunda publicación es aplicado para determinar fangos producidos en tres EDARs de Tarragona, Reus y Blanes.

El primer estudio y sus respectivos resultados han sido publicados en la revista científica *Journal of Chromatography A 1393 (2015) 106-114*, y el segundo estudio y resultados han sido publicado en el *Journal of Chromatography A 1408 (2015) 15-21*.

Referencias

- [1] M.G. Kokotou, A.G. Asimakopoulos, N.S. Thomaidis, *Anal. Meth.* 4 (2012) 3057.
- [2] N. Perkola, P. Sainio, *Environ. Pollut.* 184 (2014) 391.
- [3] R. Loos, R. Carvalho, D.C. António, S. Comero, G. Locoro, S. Tavazzi, B. Paracchini, M. Ghiani, T. Lettieri, L. Blaha, B. Jarosova, S. Voorspoels, K. Servaes, P. Haglund, J. Fick, R.H. Lindberg, D. Schwesig, B.M. Gawlik, *Water Res.* 47 (2013) 6475.
- [4] T. Anumol, S. Wu, M. Marques dos Santos, K.D. Daniels, S.A. Snyder, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* (2015).
- [5] M.G. Kokotou, N.S. Thomaidis, *Anal. Meth.* 5 (2013) 3825.

- [6] D. Salas, F. Borrull, N. Fontanals, R. Marcé, *Anal. Bioanal. Chem.* (2014) 1.
- [7] E.Y. Ordóñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 197.
- [8] M. Scheurer, H.-J. Brauch, F. Lange, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1585.
- [9] B. Subedi, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 13668.
- [10] E.Y. Ordoñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1320 (2013) 10.
- [11] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, *Environ. Int.* 68 (2014) 33.
- [12] I.J. Buerge, M. Keller, H.-R. Buser, M.D. Müller, T. Poiger, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2010) 615.
- [13] D.R. Van Stempvoort, J.W. Roy, S.J. Brown, G. Bickerton, *J. Hydrol.* 401 (2011) 126.
- [14] S. Stolte, S. Steudte, N.H. Schebb, I. Willenberg, P. Stepnowski, *Environ. Int.* 60 (2013) 123.
- [15] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, *Talanta* 115 (2013) 104.

***3.3.1. Determination of high-intensity sweeteners in river water
and wastewater by solid-phase extraction and liquid
chromatography-tandem mass spectrometry***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

DETERMINATION OF HIGH-INTENSITY SWEETENERS IN RIVER WATER AND WASTEWATER BY SOLID-PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

Paula Arbeláez, Francesc Borrull, Eva Pocurull, Rosa Maria Marcé

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Universitat Rovira i Virgili, Sescelades Campus, Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

High-intensity sweeteners have been suggested as potential organic contaminants due to their widespread use in food, drugs and sanitary products. As a consequence, they are introduced into the environment by different pathways, affecting aquatic life. In this study, a method based on solid-phase extraction (SPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) has been developed and validated for the determination of eight sweeteners (saccharin, cyclamate, aspartame, acesulfame, neohesperidindihydrochalcone, sucralose, stevioside and glycyrrhizic acid) in river water and wastewater. To get the maximum recoveries in SPE, several commercial sorbents were tested and Oasis HLB gave the best results, with recoveries higher than 41% for all of the compounds in the different matrices. Method limits of detection were in the range of 0.001 to 0.04 $\mu\text{g/L}$ in river water and 0.01 to 0.5 $\mu\text{g/L}$ in influent and effluent wastewater. Method reproducibility between days ($n=5$) was below 15% for all compounds. The method was applied to the determination of sweeteners in various river waters and wastewaters in Catalonia. Cyclamate, aspartame, neohesperidindihydrochalcone, acesulfame and sucralose were found in river water, with the two last compounds being present at the highest values (1.62 $\mu\text{g/L}$ for acesulfame and 3.57 $\mu\text{g/L}$ for sucralose). In influent and effluent wastewater, all of the compounds were found at concentration levels ranging from 0.05 to 155 $\mu\text{g/L}$ except for stevioside and neohesperidindihydrochalcone, which were not detected.

Keywords: Sweeteners; liquid chromatography; tandem mass spectrometry; amide polar-embedded reversed-phase column; solid phase extraction; river water and wastewater

1. INTRODUCTION

Sweeteners are defined as food additives that are used or intended to be used either to impart a sweet taste to food or as a tabletop sweetener. High-intensity sweeteners (HIS) are mainly used as a treatment for obesity, body weight maintenance, management of diabetes and prevention and reduction of dental caries [1,2]. Currently, in the European Union, HIS such as acesulfame, aspartame, cyclamate, neohesperidindihydrochalcone, saccharin, sucralose and steviol glycosides (regulated since 2010) are permitted as food additives in foodstuffs[3-5].

Most HIS and their metabolites are rapidly absorbed in the gastrointestinal tract. For instance, acesulfame and saccharin are not metabolized and are excreted unchanged by the kidney. Sucralose, stevioside and cyclamate undergo degrees of metabolism, and their metabolites are also excreted [6]. Studies indicated the existence of 2 hydrolysis products of sucralose, 4-chloro-4-deoxy-D-galactose (4 CG) and 1,6-dichloro-1-6-dideoxy-D-fructose (1,6 DCF) [7]. Oral stevioside was completely degraded into

steviol in pigs [8] while cyclamate was metabolized up to 60% to cyclohexylamine in the human body [9]. After being excreted by the human body and/or discharged from households and industries, HIS reach sewage treatment plants (STPs), but they may resist conventional wastewater treatment processes because of their extreme stability under biological, physical and chemical exposure. Consequently, they are discharged into ground and river waters [10].

Reviews on the issue have highlighted the widespread distribution of HIS in different aquatic environmental matrices [11-13], with levels of acesulfame and sucralose being reported as the highest (up to hundreds of $\mu\text{g/L}$) [14-16]. The ecotoxicological impact of the presence of several HIS in the environment has been the focus of study in aquatic and terrestrial organisms, such as saccharine exposure in zebrafish embryos [17], and stevioside and aspartame exposure or dietary administration in rodents and salmonella [8,18]. Likewise, the toxicity of acesulfame, cyclamate, saccharine and sucralose in species such as the algae *Scenedesmus vacuolatus*,

water fleas *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor* [10,19] and in aquatic plants [20] has been evaluated, but all of the above experiments showed low hazard and risk potential towards these organisms. Nonetheless, other studies have concluded that HIS could produce potentially harmful effects on ecosystems and human health. Wiklund et al. [21] investigated the behavioural and physiological effects of sucralose on two crustaceans and their results showed alteration in swimming height, increased swimming speed and the time taken to reach food and shelter was prolonged. Reliable analytical methodologies are required to quantify low levels of HIS in a broad range of environmental matrices. Solid-phase extraction (SPE) (off-line SPE [16,22] and on-line SPE [23-25]) have been used to extract these compounds from environmental water samples. For these purposes, the copolymer sorbents Oasis HLB (lipophilic divinylbenzene-hydrophilic N-vinylpyrrolidone) [26-28], Isolute ENV+ (hydroxylated polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB)) [29], HR-X (hydrophobic PS-DVB) [14], Bakerbond SDB-1 (styrene-divinylbenzene (SDVB)) [30]

and PWAX (polymer weak anion exchange) [31] have been used to extract HIS from complex aqueous samples. Moreover, two SPE cartridges in tandem, Bond Elut PPL (SDVB) and Bond Elut NH₂ (weak anion exchange), were used for extracting and additional clean-up [32], but this method was only developed for sucralose.

Meanwhile, some studies avoided the use of any extraction technique. Samples were only filtered and then directly injected into the chromatographic system. However, higher detection limits (5 µg/L) were reported in those studies [19,20].

With regard to chromatographic techniques, gas chromatography [33], reversed-phase liquid chromatography [15,34-36], ion chromatography [19,37] and ion-pair chromatography [31] have been used to determine these compounds in several environmental matrices. Most of the published methods use reversed-phase columns such as C₁₈ [14,24,28,31] and C₈ [27,29,30], although other LC retention mechanisms for these polar compounds have been considered, such as hydrophilic interaction (HILIC) [22]. With respect to mass spectrometry, triple quadrupole (QqQ) has

widely been applied in quantitative trace analysis of HIS, hence the sensitivity and specificity of the analytical methods is increased [24-26,29]. Additionally, time of flight mass spectrometry has also been used in a previous study [27] in which aspartame, saccharine and sucralose were determined in different environmental water and beverage samples.

The objective of this work is the development and validation of a simple, reliable and sensitive analytical method for the simultaneous determination of eight HIS (acesulfame, saccharin, cyclamate, aspartame, sucralose, stevioside, neohesperidindihydrochalcone and glycyrrhizic acid) in river water and wastewater, using SPE and liquid chromatographic-(electrospray) tandem mass spectrometry (LC-(ESI)MS/MS). It should also be highlighted that a polar-embedded reversed-phase column with fused-core particles was used and several strategies for removing or reducing the matrix effect were studied. To the best of our knowledge, this is the first study where determination of stevioside and glycyrrhizic acid in environmental water samples is studied.

2. EXPERIMENTAL PART

2.1 Reagents and Standards

Acesulfame-K ((ACE) (6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-one-2,2-dioxide, potassium salt), saccharin-Na ((SAC) (1,2-benzisothiazol-3(2H)-one-1,1-dioxide, sodium salt), cyclamate-Na ((CYC) (Cyclohexylsulfamic acid, sodium salt), aspartame ((ASP) (N-L- α -aspartyl-L-phenylalanine-1-methyl ester), sucralose ((SUC) (1,6-dichloro-1,6-dideoxy- β -D-fructofuranosyl 4-chloro-4-deoxy- α -D-galactopyranoside), stevioside ((STV) (13-[(2-O- β -D-glucopyranosyl - α -D-glucopyranosyl)oxy]-kaur-16-en-18-oic acid-4 α - β -D-glucopyranosyl ester), neohesperidindihydrochalcone (NHDC) (3,5-dihydroxy-4-(3-hydroxy-4-methoxyhydrocinnamoyl) phenyl-2-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranoside) and glycyrrhizic acid ((GLY) (α -D-Glucopyranosiduronic acid,(3 β ,20 β)-20-carboxy-11-oxo-30-norolean-12-en-3-yl 2-O- β -D-glucopyranuronosyl) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All standards had a purity higher than 96% except for GLY (70%). Deuterated compounds sucralose- d_6 and aspartame- d_3 were purchased

from LGC Standards (Wesel, Germany), with an isotopic purity of 98% and were used as surrogates.

Stock solutions of individual standards and deuterated standards were prepared by dissolution of pure compound in methanol at a concentration of 1,000 mg/L and 100 mg/L of the neutral species, respectively, and then stored at -20°C in amber glass bottles. Mixed intermediate standard solutions were prepared every month by dilution of stock solutions in MeOH at a concentration of 2 mg/L and stored at 4°C . Mixed standard working solutions were prepared daily from intermediate standard solutions by appropriate dilution with water:MeOH (9:1 v/v).

Acetone, acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM), isopropyl alcohol (IPA), ethyl acetate (EtOAc), hexane, methanol (MeOH) and methyl tert-butyl ether (MTBE) were purchased from Prolabo (VWR, Llinars del Vallès, Spain). All reagents were HPLC grade. Formic acid (HCOOH) for LC-MS analysis was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and nitrogen gas was sourced from Carbuross Metàlics (Tarragona, Spain). Ultrapure water was obtained using an

ultrapure water purification system provided by Veolia Water (Sant Cugat del Vallès, Spain). Acetic acid (CH_3COOH), ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), ammonium formate (HCOONH_4), ammonium hydroxide (NH_4OH), Tris(hydroxymethyl) amino methano (TRIS) and hydrochloric acid (HCl), were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2 Water sampling and sample pre-treatment

Grab samples of influent and effluent wastewater were collected over five months from two sewage treatment plants (STPs) located in the area of Tarragona. Each STP receives between 18,000 and 24,000 m^3/day of urban wastewater and some industrial discharges. Wastewater treatment includes physical, chemical and biological processes. River water was collected from five rivers (Francolí, Ter, Llobregat, Segre and Ebre) located in Catalonia (Spain). These rivers empty into the Mediterranean Sea, except for the Segre river that empties into the Ebro river. The waters of these rivers are extensively used for household, industrial, irrigation and livestock uses. The

river waters were sampled at a depth of approximately 1.0 m below the surface.

All samples were collected using pre-cleaned polyethylene bottles, acidified to pH 3 with HCl and immediately stored until analysis at -20°C. Prior to SPE, samples were filtered using a 1.2 µm glass fibre filter (Fisherbrand, Loughborough, UK), except in the case of the influent sample, which was first centrifuged (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) at 9,000 rpm for 7 min before being filtered.

2.3 Sample extraction by SPE

The following SPE commercial cartridges were tested: Oasis HLB (500 mg) and Oasis MAX (150 mg) from Waters (Wexford, Ireland), Discovery DPA-6S (500 mg), Discovery DSC-Diol (500 mg) and Supelclean LC-SAX (200 mg) from Supelco (Bellefonte, USA), Bond ElutPlexa (200 mg) and Bond Elut SCX (200 mg) from Agilent (Santa Clara, USA). 6 cc SPE cartridges lab-packed with 500 mg of Florisil (bulk adsorbent from Sigma-Aldrich) were also used.

Under the optimal SPE conditions, Oasis HLB (500 mg) cartridges were connected to a

manifold (Teknokroma, San Cugat del Vallès, Spain) with a pump as a vacuum source. The cartridges were preconditioned with 5 mL of MeOH and 5 mL of ultrapure water. 50, 100 and 250 mL of influent, effluent and river water, respectively, were loaded into the cartridge at a flow-rate of 10-15 mL/min. Prior to SPE, river, influent and effluent samples were spiked with deuterated compounds at a concentration of 0.8, 10 and 5 µg/L, respectively.

Subsequently, the cartridges were cleaned up with 5 mL of water:MeOH (9:1 v/v) and completely dried under vacuum. Analytes were eluted from the cartridge with 2.5 mL of MeOH and 2.5 mL of MeOH:NH₄OH (95:5 v/v) and then the eluates were evaporated under a flow of nitrogen gas to dryness. The residues were redissolved with water:MeOH (9:1 v/v) to 2 mL for surface water and 5 mL for influent and effluent sewage. Prior to LC-MS/MS analysis, the extracts were filtered with a 0.22 µm membrane GH Polypro filter (GHP, hydrophilic polypropylene) and, finally, 6 µL of HCOOH was added to the injection vial.

2.4 LC-(ESI)MS/MS analysis

The LC-(ESI)MS/MS system was an Agilent 1200 series (Waldbronn, Germany) coupled to a triple quadrupole 6410 series mass spectrometer with an ESI interface (Agilent Technologies). In the optimization of chromatographic separation, several chromatographic columns were tested: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (50 mm x 4.6 mm, 1.8 μm) and Zorbax Eclipse XDB-C₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) from Agilent Technologies, Kinetex C₁₈ (100 mm x 4.6 mm, 2.6 μm) from Phenomenex, Ascentis Express C₁₈ (50 mm x 4.6 mm, 2.7 μm), Ascentis Express RP-Amide (100 mm x 2.1 mm, 2.7 μm) and Ascentis Express HILIC (100 mm x 4.6 mm, 2.6 μm) from Supelco (Sigma-Aldrich). The optimal chromatographic separation of eight HIS was achieved using Ascentis Express RP-amide (100×2.1 mm, 2.7 μm). The separation was performed in gradient elution with ultrapure water acidified with HCOOH to pH 2.5 (solvent A) and ACN (solvent B) as the mobile phase. The gradient started isocratically at 5% B for 3 min and then increased to 75% in 6 min, then increased to 100% in 1 min, remaining constant for 1 min and

finally returning to 5% B in 1 min. The oven temperature was 25°C and the flow rate was 0.4 mL/min. The injection volume was 50 μL. All of the compounds were eluted in less than 11 min. Individual standards without a column were injected to optimize the conditions of ESI-MS/MS. These conditions were as follows: nebulizer pressure of 45 psi, drying gas (N₂) flow rate of 11 L/min, drying gas temperature of 350°C and capillary voltage of 4,000 V. The ionization mode was negative for all compounds. The acquisition mode used was selected reaction monitoring (SRM) and the cone voltage and collision energies were then optimized in order to select three characteristic SRM transitions for each compound (shown in supplementary information Table S1). However, two SRM transitions for SUC and CYC were only possible due to their poor fragmentation.

2.5 Method validation

The analytical parameters evaluated during the validation process were: linear range, repeatability, reproducibility between days, method detection limit (MDL), method quantification limit (MQL),

recoveries (in terms of SPE recoveries, apparent and relative recoveries) and matrix effect. The method was validated for each kind of matrix (river, influent and effluent water) and using isotopically labelled standards as surrogates in order to compensate the matrix effect and loss of compounds during the SPE process. Apparent and SPE recoveries were the unique validation parameters calculated without isotopically labelled standards. In all cases, non-spiked samples (blank) were analysed to subtract the areas of the analytes present in the samples.

Apparent and SPE recoveries were carried out by previously spiking river water samples at 1.6 $\mu\text{g/L}$, influent wastewater samples at 20 $\mu\text{g/L}$ and effluent wastewater samples at 10 $\mu\text{g/L}$. Apparent recoveries were calculated by comparing the responses (area) of pre-spiked sample (spiked before SPE) with a pure solvent standard (direct injection) at the same concentration. SPE recoveries were calculated by comparing the responses of pre-spiked sample with the responses of a post-spiked sample (spiked after SPE) at the same concentration. Relative recoveries were

evaluated at the same concentration that apparent and SPE recoveries, but with addition of deuterated compounds prior to SPE process at a concentration of 0.8, 10 and 5 $\mu\text{g/L}$ for river, influent and effluent samples, respectively. Relative recoveries, were calculated by interpolation of the area ratio (compound/deuterated compound) of a pre-spiked sample into the matrix-matched calibration curve.

The matrix effect was evaluated by spiking the SPE extract of blanks at a concentration of 200 $\mu\text{g/L}$ in the final reconstituted volume (2 mL river water and 5 mL influent and effluent wastewater), and it was calculated by comparing the responses of post-spiked sample with a pure solvent standard at the same concentration.

The linear range of the method was evaluated by linear regression analysis of eight-point matrix-matched calibration curves. MDLs for analytes non-present in the sample were calculated as the minimum detectable amount of analyte with a signal-to-noise ratio of 3. MDLs for the analytes present in the samples, were estimated from the instrumental limits and taking into account the apparent

recoveries. MQLs were fixed as the lowest point in the matrix-matched calibration curves.

Repeatability and reproducibility between days (n=5) were calculated as the relative standard deviation (%RSD) at the same concentration levels than the recoveries.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 LC-(ESI)MS/MS analysis

Different chromatographic conditions such as chromatographic column, flow rate, temperature, elution gradient and mobile phase composition were tested in order to achieve good peak shape and resolution. Figure 1 shows the separation of the compounds at optimum conditions in each column tested and a comprehensive discussion of optimization of the chromatographic separation with the different columns tested is described in the supplementary information and Table S2 shows the optimal elution gradient used in each column. As can be seen in Figure 1, the use of an Ascentis Express RP-Amide (100 mm x 2.1 mm, 2.7 μ m) column

achieved the best resolution for all compounds at a reasonable time using water at pH 2.5 adjusted with HCOOH as the aqueous component of the mobile phase. Given the hydrophilicity of HIS, an embedded polar group in the stationary phase increased the selectivity of all of them. Meanwhile, working at low pH levels allowed the acid compounds such as ACE, SAC and CYC to keep their protonated form, thereby favouring the peak shape and retention in this stationary phase. The rest of optimal conditions of the chromatographic separation are described in Section 2.5 and, under these conditions, all compounds were separated in less than 11 min.

The full-scan mass spectra (ionization in negative) showed that the predominant precursor ions were $[M-H]^-$ (shown in supplementary information table S1) except for SUC and STV, since their adduct with Cl^- $[M+Cl_{35}]^-$ was the predominant precursor ion. In order to increase the sensitivity of SUC, a previous study reported the acetated adduct as predominant

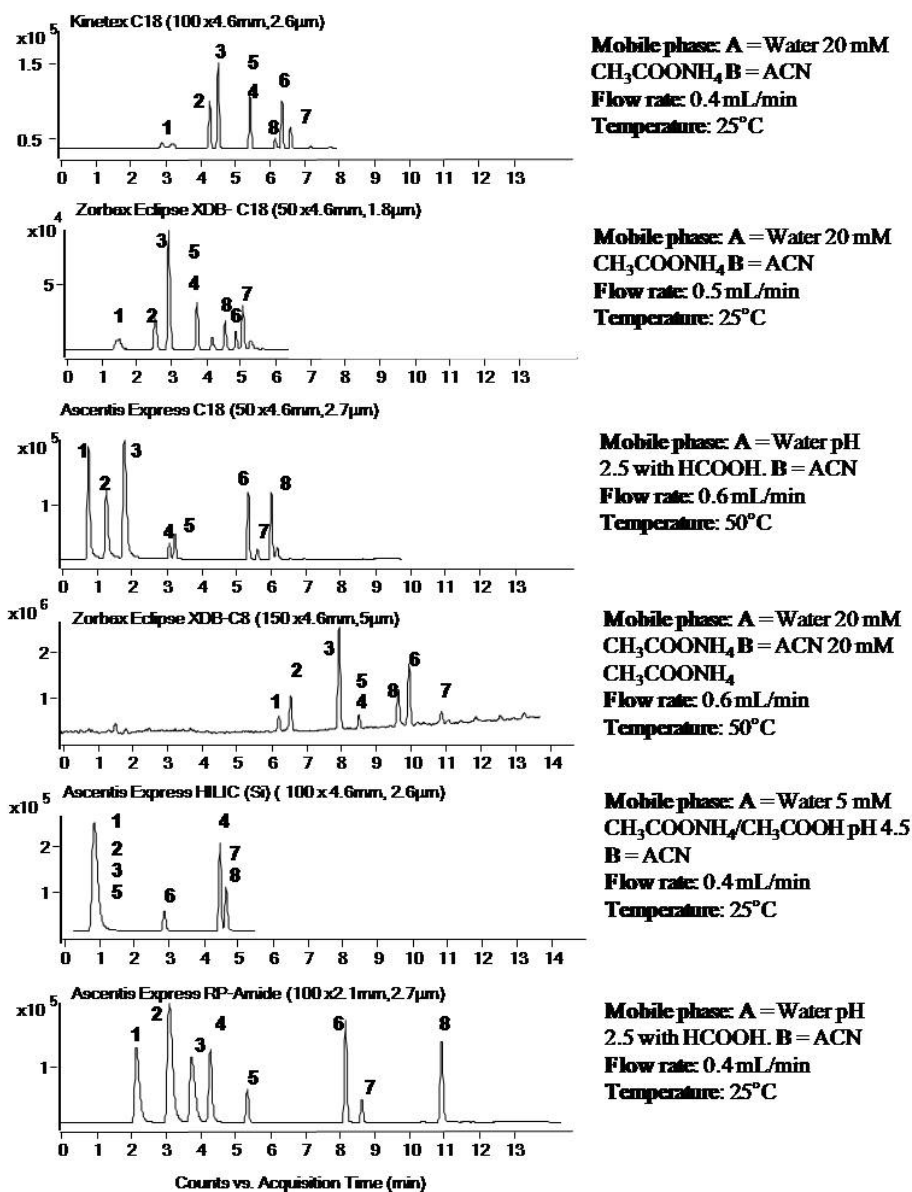


Figure 1. SIM chromatograms of chromatographic separation using different columns. Peak assignation: 1: Acesulfame; 2: Sacharine; 3: Cyclamate; 4: Aspartame; 5: Sucralose; 6: NHDC; 7: Stevia; 8: Glycyrrhizic acid.

precursor [38]. Moreover, Ferrer et al. [27] reported the sodium adduct as predominant precursor ion under positive ionization.

MS/MS fragmentation of the target compounds enabled the three most abundant product ions to be selected, one for quantification and two for confirmation (shown in supplementary information Table S1), except for SUC and CYC, which showed poor fragmentation and only two product ions could be monitored. Optimized values of cone voltages and collision energies for each compound are also shown in Table S1 in supplementary information. The other parameters of ESI source are described in Section 2.5.

Even though the MS/MS parameters were optimized, low ion intensity was observed for SUC and STV. Therefore, two additives in the mobile phase were tested: 0.1% of DCM added in the organic component of the mobile phase and 20 mM TRIS added in the aqueous component of the mobile phase [30]. However, the signal was not increased for any compound. Although it was not possible to increase the sensitivity for these compounds, their sensitivity was high enough for screening

purposes with pre-concentration of the sample.

HIS showed different fragmentation pathways. For instance the fragmentation of ACE showed the most intense product ion at m/z 82 generated by sulphur trioxide (SO_3) loss. Cyanate ion [NCO] with m/z 42 was the most intense mass fragment for SAC. Mass spectrum for ASP showed an intense ion at m/z 200 and it was tentatively attributed to the loss of methoxycarbonyl (CH_3OCO), amine (NH_2) and hydroxyl (OH) groups. In previous studies, ACE and ASP exhibited similar most intense product ions [15,22,31], but in the case of SAC the ion at m/z 62 was found as one of the most intensive mass fragments [15,22,23].

Fragmentation of the molecular ion adduct of SUC showed two ions at m/z 397 (the most abundant ion) and 357, which correspond to the loss of a chlorine (Cl_{35}) and two chlorines (Cl_{35}), respectively. Likewise, mass spectrum of CYC showed only two fragments, the most intense ion at m/z 80 and the ion at m/z 96, which corresponds to the sulphite radical [SO_3] and amidosulphonate [NH_2SO_3], respectively. Poor fragmentation of SUC and CYC has also been

reported in previous studies [23,30,31], in which a product ion of confirmation was not obtain for CYC. As regards SUC two precursor ions have been chosen to obtained the quantifier and qualifier transitions, thus low intensities precursor ions at m/z 395 and 397 have been subjected to fragmentation [23,30,31].

Moreover, glycosides such as NHDC, STV and GLY had common fragmentation pathways based on the loss of sugar moieties. In the case of NHDC, the aglycone fragment was the most intense ion at m/z 303, whilst the glycone fragment was the most intense product ion of GLY. The loss of a monosaccharide from the molecular ion of STV resulted in the highest product ion, with m/z 641 corresponding to the steviolbioside molecule. Similar fragment ions have been reported in published literature for NHDC [15,22,31] and STV [39].

3.2 SPE optimization

Taking into account the different physico-chemical characteristics of HIS (e.g. pK_a values from 1.6 to 12.5 and a wide range of polarities), initial experiments were carried out using two polymeric sorbent materials,

Oasis HLB and Bond Elut Plexa. The extraction efficiencies of these two sorbents were evaluated by loading 100 mL of ultrapure water at pH 3 and 7 spiked at 12.5 $\mu\text{g/L}$ into each cartridge and the elution was performed with 5 mL of MeOH. The extract was then completely evaporated and redissolved with 5 mL of water:MeOH (9:1 v/v). The results (data not shown) showed that Oasis HLB at pH 3 exhibited the best performance for all compounds, even for ACE, which was the compound with the lowest recovery (30% using Oasis HLB and 20% using Bond Elut Plexa). Therefore, Oasis HLB and sample load at pH 3 were selected. In order to improve the recoveries of some compounds, such as ACE and SAC, the compounds were eluted with 2.5 mL of MeOH and 2.5 mL of 5% NH_4OH in MeOH. In addition, A clean-up of 5 mL water:MeOH (9:1 v/v) was included since no decrease in recovery was observed. As a result, all recoveries were between 83% and 116%. As the SPE extract is basic, it was necessary to add 6 μL of HCOOH into the injecting vial because ACE, SAC and CYC suffered from peak splitting when basic extract was injected.

Table 1. Apparent recoveries obtained by using different strategies for reducing matrix effect.

Compound	ACE	SAC	CYC	ASP	SUC	STV	NHDC	GLY
Clean up solvent (5 mL)								
Water:MeOH (9:1)*	38	70	48	79	29	27	18	62
Water:Isopropanol (1:1)	37	34	10	3	12	28	30	41
Ethyl acetate	11	44	5	62	43	26	23	19
DCM	17	61	14	122	44	13	22	26
Hexane	7	55	9	64	50	14	21	26
Elution solvent (5 mL)								
MeOH+MeOH:NH ₄ OH (93:7)*	38	70	48	79	29	27	18	62
Acetonitrile	21	62	34	69	35	40	43	32
MeOH:TBME: NH ₄ OH (50:45:5)	97	95	1	55	62	20	0	32

100 mL of influent wastewater spiked at 12.5 µg/L. (n = 3)

* Initial conditions

%RSD < 8%

Extraction conditions are described in section 3.2.

Afterwards, the apparent recoveries (which include extraction recoveries and matrix effect), SPE recoveries and matrix effect were checked by analyzing influent wastewater samples under the optimal conditions described above. Peak areas of compounds present in the sample (ACE, SAC, CYC, SUC and GLY) were subtracted to calculate the recoveries and matrix effect. In general, the target compounds showed apparent recoveries (values with asterisk in Table 1) lower than those recoveries obtained with ultrapure water in the range of

18% (NHDC) and 79% (ASP), but the SPE recoveries (data not showed) were higher than 97% for all compounds except for ACE (61%) and CYC (69%), whose apparent recoveries were 38% and 48%, respectively. Low apparent recoveries are linked with the high matrix effect (values showed in the Figure 2 for Oasis HLB) present in the most of compounds. SUC, STV and NHDC were the compounds most affected by ion suppression (67%-78%). In the case of ACE and CYC another factors during SPE process influenced their low apparent recoveries, since these

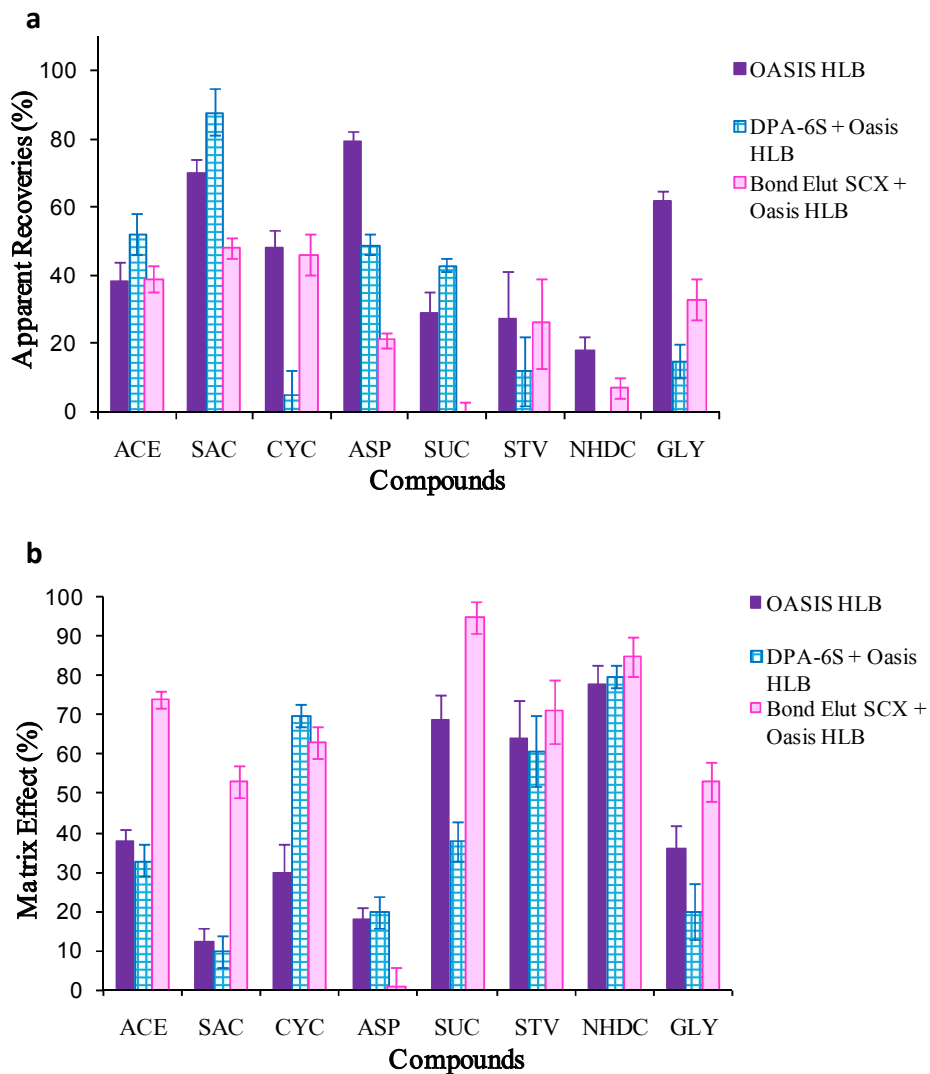


Figure 2. (a) Apparent recoveries (%) in influent wastewater with Oasis HLB and different sorbents in tandem.
(b) Matrix effect (%) with Oasis HLB and different SPE sorbents in tandem.

two compounds suffered an ion suppression of 38% and 30%, respectively. SPE recoveries for most of compounds are agreement with those reported by Ordoñez et al. [22], in which similar SPE conditions were used except the elution step which was carried out only with MeOH. Moreover, SPE recoveries in this study were higher than those reported by Gan et al. [31] (41%-69%) and Tran [14] (66%-98%), who used CNW poly-sery PWAX and Chromabond HR-X cartridges to extract several HIS from similar matrices, respectively.

3.3 Strategies to reduce matrix effect

In order to overcome the matrix effect, several strategies were evaluated, such as different clean-up solvents, different elution solvents, and different commercial SPE cartridges as well as sample volume.

3.3.1 Solvent clean-up

According with the previously results, solvents with different elution strengths were tested in order to reduce matrix effect. The solutions or solvents tested for clean-up were: water:IPA (1:1

v/v), EtOAc, DCM and hexane. In all cases, the clean-up volume was 5 mL. No improvement in the apparent recoveries was observed, as can be seen in Table 1, being the best results using the initial mixture water:MeOH (9:1 v/v) for most of the compounds. Working with less polar solvents such as DCM and hexane, apparent recoveries were increased only for ASP and SUC, from 79% to 122% and from 29% to 50%, respectively. NHDC was the only compound where recovery increased from 18% to 30% using water:IPA (1:1 v/v) as the clean-up solvent. In light of the above, the clean-up step was performed with water:MeOH (9:1 v/v).

3.3.2 Elution solvent

In order to reduce the amount of co-eluting interferences, two additional elution solvents were tested: ACN and a mixture solution consisting of MeOH:TBME:NH₄OH (50:45:5 v/v). TBME was added because it does not elute the humic acids present in the samples [40]. The results from ACN (Table 2) showed an increase of apparent recoveries for SUC, STV and NHDC, but for the rest of the compounds, recoveries signifi-

cantly decreased. Meanwhile, eluting with MeOH:TBME:NH₄OH, the apparent recoveries were near to 100% for ACE and SAC and it also increased for SUC from 29% to 62%, but CYC and NHDC were not eluted with this mixture. Therefore these elute solvents were discarded.

3.3.3 Clean-up SPE cartridge

Other SPE cartridges were tested as clean-up to be coupled with Oasis HLB. Firstly, the interaction of HIS with each sorbent material (listed in Section 2.4, sample extraction by SPE) was evaluated with spiked ultrapure water or DCM, depending on the recommended protocol (supplier information) for loading the sample onto the SPE cartridge. The protocols for each kind of cartridge are described in Figures S1 of the supplementary information. Apparent recoveries are presented in Figure S2 of the supplementary information.

Comparing results from all seven sorbents tested, Bond Elut-SCX and DPA-6S were the sorbents most suitable for further experiments to be coupled with Oasis HLB, although GLY was retained on both cartridges and ASP was also retained on Bond

Elut-SCX. The experiments with coupled cartridges (Coupling SPE protocols are described in Figure S3 of the supporting information) were evaluated on both ultrapure water (results in Figure S2) and influent water (apparent recoveries and matrix effect results are summarized in Figure 2a and Figure 2b, respectively). In ultrapure water, coupled cartridges resulted in slightly lower apparent recoveries than using single Oasis HLB. Moreover, in spiked influent water, apparent recoveries greatly decreased for most of the compounds, especially for CYC, STV and NHDC (apparent recoveries lower than 12%) working with DPA-6S + Oasis HLB and for SUC, STV and NHDC (apparent recoveries lower than 21%) working with Bond Elut-SCX + Oasis HLB. Moreover, matrix effect was similar or higher working with coupled cartridges than with working in single Oasis HLB cartridge for most of compounds, it only was lower for SUC (38%), GLY (20%) (Tandem with DPA-6S) and APS (1%) (Tandem with Bond Elut-SCX).

In light of the above, an effective sample clean-up by coupling the SPE cartridges was not achieved

for most of compounds, so this step was discarded.

3.3.4 Sample volume

Loading large volumes of sample entails low limits of detection, but when working with complex matrices such as environmental samples the co-extracted interferences are also pre-concentrated, affecting the extraction process or increasing the matrix effect. In light of the above, less volume of influent wastewater was tested (50 mL). Results from apparent recoveries (data not showed) increased between 15% and 65% for all of the compounds. Loading 50 mL of influent water was found to be the point at which suppression is reduced to an acceptable level while still maintaining a good signal response for the compounds. Taking into account the complexity of the other matrices in which the method was also applied, the sample volumes were set to 100 mL and 250 ml for effluent wastewater and river water, respectively, to obtain acceptable recoveries.

3.3.5 Calibration approach

Given that ion suppression could not be completely eliminated, two isotopically labelled standards (ASP-d₃ and SUC-d₆) were evaluated as surrogates to compensate for matrix effect. The extent of compensation of ion suppression using these two deuterated compounds was evaluated by comparing the calibration curves (area ratio versus concentration ratio between compound and deuterated compound) of pure solvent standards with that of the pre-spiked matrix. Plots showed that the slopes of both calibration curves were similar for all compounds. Moreover, knowing the recoveries and matrix effect for each compound, it was considered that using two deuterated compounds was sufficient to quantify the eight compounds, due to the high cost of these isotopically labelled standards.

3.4 Method Validation

The method was validated according to the parameters described in section 2.6 and the respective data are provided in Table 2. Results from matrix effect showed that ion

Table 2. Validation data for SPE/LC-MS/MS method.

	RIVER WATER ¹				INFLUENT WATER ²				EFFLUENT WATER ³						
	AR (%)	ER (%)	ME (%)	LR (µg/L)	MDL (µg/L)	AR (%)	ER (%)	ME (%)	LR (µg/L)	MDL (µg/L)	AR (%)	ER (%)	ME (%)	LR (µg/L)	MDL (µg/L)
ACE ^a	52	71	27	0.02-3.2	0.008	58	77	25	1-160	0.5	48	69	30	1-80	0.5
SAC ^b	78	96	19	0.02-3.2	0.008	90	100	9	0.25-160	0.12	85	102	17	0.12-80	0.05
CYC ^a	47	77	39	0.02-3.2	0.008	59	82	27	0.12-160	0.06	52	78	33	0.03-80	0.01
ASP ^b	89	95	6	0.002-3.2	0.001	84	99	14	0.06-160	0.03	81	96	16	0.03-80	0.01
SUC ^a	42	98	57	0.008-3.2	0.004	48	102	53	0.50-160	0.25	55	100	44	0.25-80	0.12
STV ^a	29	104	72	0.08-3.2	0.04	39	93	58	1.0-160	0.5	36	97	63	0.5	0.25
NHDC ^a	27	90	70	0.04-3.2	0.02	29	103	72	0.5-160	0.25	24	108	78	0.06-80	0.03
GLY ^b	73	103	29	0.008-3.2	0.004	70	97	28	0.25-160	0.12	63	99	37	0.12-80	0.05

Sample volume 1= 250 mL spiked at 1.6 µg/L (n=5) 2= 50 mL spiked at 20 µg/L (n=5) 3= 100 mL spiked at 10 µg/L (n=5)
AR= Apparent recoveries, **ER**= SPE recoveries, **ME**= Matrix effect, **LR**= Linear range.

suppression was present in all compounds and it was comparable between the three matrices, with STV (58-72%) and NHDC (70-78%) being the most affected. SPE recoveries (n=5) (Table 2) were between 90% and 104% in the three matrices except for ACE and CYC, the SPE recoveries of which were between 69% and 82%. Apparent recoveries ranged between 24% (NHDC) and 90% (SAC). Relative recoveries were between 95% and 102% for all compounds.

Repeatability and reproducibility between days (n=5) (%RSD) were less than 7% in all cases except for STV, for which the %RSD were 8% and 15%, respectively.

The determination coefficient (R^2) and it was higher than 0.98 for the three matrix-matched calibration curves. The concentration range studied (Table 2) were between 0.002 and 3.2 $\mu\text{g/L}$ for river water, between 0.06 and 160 $\mu\text{g/L}$ for influent water and between 0.03 and 80 $\mu\text{g/L}$ for effluent water.

MDL and MQLs values for each compound in the three matrices are given in Table 2 and these limits are similar to those reported in previous studies by using SPE with Isolute ENV+

[29] and Oasis WAX [34] and Oasis HLB [22] sorbents, and LC-MS/MS, and these limits were lower than those reported by using on-line SPE-LC-MS/MS [23]. Nevertheless, in the present study MDLs were slightly higher than those reported in other studies by using Chromabonds HR-X[14] and Poly-Sery PWAX [31] cartridges, but in those studies a complete separation of the compounds was not possible by using C_{18} chromatographic column and run times analysis were longer.

3.5 Method application to environmental samples

The method developed was applied to determine HIS in several water samples from five rivers and two STPs (influent and effluent). The presence of the compounds detected was confirmed in accordance with the guidelines of European Directive 2002/EC [41]. Identification criteria were established for each compound by monitoring the three most abundant SRM transitions, their retention time and relative ion intensities, determined from relative ion intensities in spiked samples of each kind of matrix.

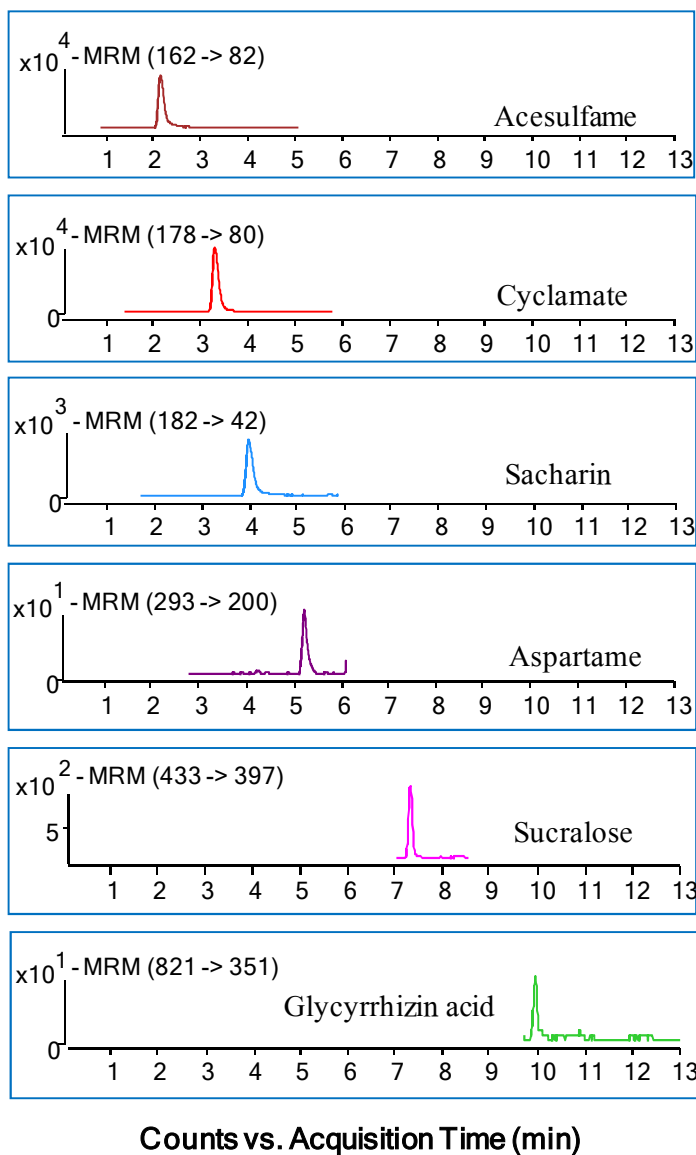


Figure 3. SRM chromatogram of an influent sample from STP2.

The SRM chromatogram of an influent wastewater sample from STP2 illustrated in Figure 3, which clearly shows the presence of ACE, CYC, SAC, ASP, SUC and GLY. The average concentrations (n=3) determined in all samples from the three matrices are summarized in Tables 3 and 4.

Influent samples from both STPs showed the presence of ACE, SAC, SUC and GLY. ACE was the compound with the highest concentration, ranging between 49 and 149 $\mu\text{g/L}$, followed by

SUC with a concentration between 12 and 60 $\mu\text{g/L}$. GLY was found at lower concentrations, ranging from 0.4 to 1.5 $\mu\text{g/L}$. SAC was found in some samples at high concentrations (155 $\mu\text{g/L}$) and in other samples at very low concentrations close to LOQ. CYC and ASP were found in same samples from both STPs at concentration lower than 3.7 $\mu\text{g/L}$. STV and NHDC were not found in any of the samples analysed.

Table 3. Minimum and maximum concentrations ($\mu\text{g/L}$) of sweeteners in four samples of different months from two STPs.

Compound	STP1		STP2	
	Influent	Effluent	Influent	Effluent
ACE	95-149	48-88	49-106	11-84
SAC	7.4-155	< LOQ-0.5	< LOQ-52	n.d-0.3
CYC	n.d-0.8	n.d-0.05	< LOQ-3.7	n.d-0.5
ASP	n.d-0.05	n.d	< LOQ-0.07	n.d
SUC	21-45	18-40	12-60	12-60
GLY	0.4-1.5	0.06-0.5	0.4-0.8	0.1-0.2

% RSD (n=3) <15%
n.d= not detected

All of the compounds found in influent samples were also determined in effluent samples, except ASP. SAC and CYC were determined in some effluent samples between <LOQ and 0.5 $\mu\text{g/L}$. The concentrations of

ACE, SUC and GLY in effluent water were lower than concentrations determined in influent samples (about 33%, 40% and 75%, respectively). It should be noted that results from effluent are not an evaluation of

the efficiency of the plant because influent and effluent samples were taken at the same time.

For river samples (Table 4), five of the eight compounds studied were determined in the five rivers, except for CYC that was detected but not quantified in the Llobregat and Ter rivers, and ASP which was not found in the Segre. As in the case of wastewater, ACE and SUC were the compounds with the highest

concentrations. The Francolí river had the highest concentration of ACE (1.62 µg/L) and CYC (0.08 µg/L), but the Segre showed the highest values for SUC (3.57 µg/L) and GLY (0.04 µg/L), while the Llobregat showed concentration of ASP (0.03 µg/L) higher than the other rivers studied. In the Ebro river, all of these compounds were found, ranging between 0.009 and 0.36 µg/L.

Table 4. Average concentration (µg/L) of sweeteners in river water.

Compound	Ebro	Francolí	Llobregat	Ter	Segre
ACE	0.36	1.62	0.54	0.18	0.12
CYC	0.02	0.08	< LOQ	< LOQ	0.02
ASP	0.01	0.01	0.03	0.01	n.d
SUC	0.15	1.09	0.34	0.04	3.6
GLY	0.009	0.012	0.009	0.014	0.04

% RSD (n=3)<13%

The presence of HIS in surface water confirms that STP processes are not sufficiently effective at eliminating these contaminants from water.

Several environmental studies on HIS are in agreement with respect to the distribution of these contaminants in the environment. This distribution exhibits different concentration values depending on the matrix, spatial locations and the weather

conditions, but it is worth noting that ACE is the HIS with the highest concentrations. For instance, Ordoñez et al. [22] determined six HIS in wastewater from STPs in north-western Spain, and they determined ACE, CYC, SAC and SUC. Concentrations in influent samples ranged between 3 and 31 µg/L for these compounds and little or no removal for ACE and CYC was reported. In fact, this

study reported higher values for SUC in effluent samples than in influent samples. Furthermore, Ordoñez et al. [22] detected all four HIS in river water at levels between 0.2 and 53 $\mu\text{g/L}$, with the highest value being found for ACE. More recently, Perkola et al. [34] developed an isotope-dilution mass spectrometry method for quantifying ACE, SAC, CYC and SUC in boreal lakes and rivers in Finland. The highest concentrations of these compounds were 9600, 490, 210 and 1000 ng/L , respectively. Berset et al. [15] determined seven HIS in environmental water samples from Switzerland and the highest concentrations were reported in effluent wastewater, with levels up to 61 $\mu\text{g/L}$ of ACE, 16.2 $\mu\text{g/L}$ of SAC, 0.01 $\mu\text{g/L}$ of ASP, 19.2 $\mu\text{g/L}$ of CYC and 7.6 $\mu\text{g/L}$ of SUC.

SUC has been studied in wastewater, surface water and drinking water from different cities in the USA [24,25,33], Sweden [32,36] and Canada [35]. SUC was reported between 0.1 and 18 $\mu\text{g/L}$ in effluent wastewater and between 5 and 465 ng/L in drinking water.

4. CONCLUSIONS

An analytical method has been developed based on solid-phase extraction followed by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for the determination of eight high-intensity sweeteners in environmental water samples and, for the first time, a method was developed to determine STV and GLY in environmental water. The different strategies tested for removing or reducing ion suppression were not completely effective, perhaps among other causes because of the different physico-chemical characteristics of HIS. However, the use of suitable calibration approach such as matrix-matched calibration in combination with isotopically labelled compounds were used to compensate the matrix effect.

All compounds were determined in environmental samples, except STV and NHDC. To date, this is the first study reporting the presence of GLY in the water environment. ACE and SUC were the compounds with the highest concentrations in both surface and wastewater. Although it was observed that ACE, SAC, CYC, SUC and GLY were found at lower

concentrations in effluent samples than in influent samples, the presence of these compounds in effluent wastewater indicates that STPs are significant contributors to these organic contaminants in environmental water.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledgement the financed support by Ministry of Economy and Competitiveness (CTM2011-28765-CO2-01) and the Department of Innovation, Universities and Enterprise (project 2014 SGR 934). P. Arbeláez would also like to thank the Ministry of Economy and Competitiveness for a grant (BES-2009-028157).

REFERENCES

- [1] M.C. Yebra-Biurrun, in: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Eds.), In Encyclopedia of Analytical Science, San Diego: Elsevier Academic, 2005, p. 562-572.
- [2] A. Bassoli, L. Merlini, in: B. Caballero (Ed.), Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Academic Press, Oxford, 2003, p. 5688-5695.
- [3] European Parliament and Council of the European Union, Regulation (EC) No 1333/2008 on food additives. (2008) L354/316-333.
- [4] European Commission, Commission regulation (EU) No 1129/2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives (2011) L295/291-177.
- [5] European Commission, Commission Regulation (EU) No 1131/2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council with regard to steviol glycosides. (2011) L 295/205-211.
- [6] G. M.B.A, in: B. Caballero (Ed.), Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Academic Press, Oxford, 2003, p. 5695.
- [7] A.B. Rodero, L. Rodero, R. Azoubel, Toxicity of sucralose in humans: a review, Int. J. Morphol. 27 (2009) 239-244.

- [8] J.M.C. Geuns, Stevioside, *Phytochemistry* 64 (2003) 913-921.
- [9] A.G. Renwick, J.P. Thompson, M. O'Shaughnessy, E.J. Walter, The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in humans during long-term administration, *Toxicol. Appl. Pharm.* 196 (2004) 367-380.
- [10] S. Stolte, S. Steudte, N.H. Schebb, I. Willenberg, P. Stepnowski, Ecotoxicity of artificial sweeteners and stevioside, *Environ. Int.* 60 (2013) 123-127.
- [11] M.G. Kokotou, A.G. Asimakopoulos, N.S. Thomaidis, Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact, *Anal. Methods* 4 (2012) 3057-3070.
- [12] F. Lange, M. Scheurer, H.-J. Brauch, Artificial sweeteners - a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2503-2518.
- [13] R. Lemus-Mondaca, A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, K. Ah-Hen, *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects, *Food Chem.* 132 (2012) 1121-1132.
- [14] N.H. Tran, J. Hu, S.L. Ong, Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC-MS/MS and isotope dilution, *Talanta* 113 (2013) 82-92.
- [15] J.-D. Berset, N. Ochsenbein, Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), *Chemosphere* 88 (2012) 563-569.
- [16] M. Alidina, C. Hoppe-Jones, M. Yoon, A.F. Hamadeh, D. Li, J.E. Drewes, The occurrence of emerging trace organic chemicals in wastewater effluents in Saudi Arabia,

- Sci.Total Environ. 478 (2014) 152-162.
- [17] S.A.B. Hermesen, T.E. Pronk, E.-J. van den Brandhof, L.T.M. van der Ven, A.H. Piersma, Transcriptomic analysis in the developing zebrafish embryo after compound exposure: Individual gene expression and pathway regulation, *Toxicol. Appl. Pharm.* 272 (2013) 161-171.
- [18] A. Otabe, T. Fujieda, T. Masuyama, A two-generation reproductive toxicity study of the high-intensity sweetener advantame in CD rats, *Food Chem. Toxicol.* 49, Supplement 1 (2011) S70-S76.
- [19] D.B. Huggett, K.I. Stoddard, Effects of the artificial sweetener sucralose on *Daphnia magna* and *Americamysis bahia* survival, growth and reproduction, *Food. Chem. Toxicol.* 49 (2011) 2575-2579.
- [20] N. Lubick, Artificial sweetener persists in the environment, *Environ. Sci. Tech.* 42 (2008) 3125-3125.
- [21] A.-K.E. Wiklund, M. Breitholtz, B.-E. Bengtsson, M. Adolfsson-Erici, Sucralose – An ecotoxicological challenger?, *Chemosphere* 86 (2012) 50-55.
- [22] E.Y. Ordóñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 197-205.
- [23] I.J. Buerge, H.-R. Buser, M. Kahle, M.D. Müller, T. Poiger, Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 4381-4385.
- [24] J. Oppenheimer, A. Eaton, M. Badruzzaman, A.W. Haghani, J.G. Jacangelo, Occurrence and suitability of sucralose as an indicator compound of wastewater loading to surface waters in urbanized regions, *Water Res.* 45 (2011) 4019-4027.

- [25] S. Batchu, N. Quinete, V. Panditi, P. Gardinali, On-line solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) method for the determination of sucralose in reclaimed and drinking waters and its photo degradation in natural waters from South Florida, *Chem. Central J.* 7 (2013) 1-16.
- [26] R. Loos, R. Carvalho, D.C. António, S. Comero, G. Locoro, S. Tavazzi, B. Paracchini, M. Ghiani, T. Lettieri, L. Blaha, B. Jarosova, S. Voorspoels, K. Servaes, P. Haglund, J. Fick, R.H. Lindberg, D. Schwesig, B.M. Gawlik, EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents, *Water Res.* 47 (2013) 6475-6487.
- [27] I. Ferrer, E.M. Thurman, Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 4127-4134.
- [28] R. Loos, B.M. Gawlik, K. Boettcher, G. Locoro, S. Contini, G. Bidoglio, Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1126-1131.
- [29] L. Wolf, C. Zwiener, M. Zemann, Tracking artificial sweeteners and pharmaceuticals introduced into urban groundwater by leaking sewer networks, *Sci.Total Environ.* 430 (2012) 8-19.
- [30] M.Scheurer, H.-J. Brauch, F. Lange, Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT), *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1585-1594.
- [31] Z. Gan, H. Sun, R. Wang, B. Feng, A novel solid-phase extraction for the concentration of sweeteners in water and analysis by ion-pair liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1274 (2013) 87-96.
- [32] G.E. Morlock, L. Schuele, S. Grashorn, Development

- of a quantitative high-performance thin-layer chromatographic method for sucralose in sewage effluent, surface water, and drinking water, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2745-2753.
- [33] R.N. Mead, J.B. Morgan, G.B. Avery Jr, R.J. Kieber, A.M. Kirk, S.A. Skrabal, J.D. Willey, Occurrence of the artificial sweetener sucralose in coastal and marine waters of the United States, *Mar. Chem.* 116 (2009) 13-17.
- [34] N. Perkola, P. Sainio, Quantification of four artificial sweeteners in Finnish surface waters with isotope-dilution mass spectrometry, *Environ. Pollut.* 184 (2014) 391-396.
- [35] M.E. Hoque, F. Cloutier, C. Arcieri, M. McInnes, T. Sultana, C. Murray, P.A. Vanrolleghem, C.D. Metcalfe, Removal of selected pharmaceuticals, personal care products and artificial sweetener in an aerated sewage lagoon, *Sci.Total Environ.* 487 (2014) 801-812.
- [36] T.-S.S. Neset, H. Singer, P. Longrée, H.-P. Bader, R. Scheidegger, A. Wittmer, J.C.M. Andersson, Understanding consumption-related sucralose emissions — A conceptual approach combining substance-flow analysis with sampling analysis, *Sci.Total Environ.* 408 (2010) 3261-3269.
- [37] J.W. Roy, D.R. Van Stempvoort, G. Bickerton, Artificial sweeteners as potential tracers of municipal landfill leachate, *Environ. Pollut.* 184 (2014) 89-93.
- [38] E.Y. Ordoñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Determination of artificial sweeteners in sewage sludge samples using pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1320 (2013) 10-16.
- [39] C. Gardana, M. Scaglianti, P. Simonetti, Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1463-1470.
- [40] P. Herrero, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull,

Determination of polyether ionophores in urban sewage sludge by pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Study of different clean-up strategies, *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 31-39.

[41] European Communities Commission, Decision 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002) L221/228-236.

Supplementary Information

Table S1. ESI-MS/MS acquisition parameters in SRM mode.

Compound	Precursor ion	Product ion				Cone Voltage (V)
		Quant.	Qual.1	Qual.2		
Acesulfame (ACE)	162	82 (13)	78 (34)	40 (30)	80	
Cyclamate (CYC)	178	80 (34)	96 (20)		140	
Saccharin (SAC)	182	42 (24)	106 (16)	62 (22)	140	
Aspartame (ASP)	293	200 (10)	261 (5)	217 (5)	100	
Sucralose (SUC)	433	397 (12)	359 (6)		140	
NHDC	611	303 (41)	166 (74)	125 (53)	280	
Stevioside (STV)	839	641 (35)	479 (63)	317 (90)	160	
Glycyrrhizic acid (GLY)	821	351 (50)	193 (54)	113 (56)	280	
Aspartame-d3	296	261 (5)	217 (5)	210 (10)	100	
Sucralose-d6	439	403 (12)	365 (14)		140	

Collision Energy (eV) in brackets

Chromatographic separation optimization

Optimization of the chromatographic separation involved six different columns at various flow rates (0.4 – 0.6 mL/min), temperatures (25 – 50 °C), elution gradients (Table S2) and mobile phase compositions.

Firstly, three octadecylsilyl reversed-phase columns were evaluated: Kinetex C₁₈ (100 mm x 4.6 mm, 2.6 μm), Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (50 mm x 4.6 mm, 1.8 μm) and Ascentis Express C₁₈ (50 mm x 4.6 mm, 2.7 μm). The aqueous component of the mobile phases tested were 20 mM CH₃COONH₄ in water, 5 mM HCOONH₄ in water and water with HCOOH at pH 2.5, and ACN was the organic component in all cases. As can be seen in Figure 1 in the manuscript, which shows the separation of the compounds at optimum conditions in each column, ASP and SUC coeluted when Kinetex C₁₈ and Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ were used. However, using Ascentis Express C₁₈ and water at pH 2.5 adjusted with HCOOH, it was possible to separate them, but the first compound (ACE) eluted very early.

Similar selectivity to Kinetex C₁₈ and Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ columns was exhibited when a C₈ bonded phase Zorbax Eclipse XDB-C₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) was used and, unlike the octadecylsilyl columns, the compounds were more retained. Gan et al. [1] also compared two columns to the separation of seven HIS, the Athenea C₁₈-WP and Zorbax Eclipse XDB-C₈ columns, their results showed that Athenea C₁₈-WP column exhibited better separation, although a complete separation was not achieved. In contrast with other studies in which a complete separation of six [2] and seven [3] HIS was achieved by using a Luna C₁₈ and an Atlantis dC18 columns, respectively.

Moreover, different retention mechanisms, such as hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) with silica stationary phase, were also evaluated. However, despite testing several buffers at different concentrations and pH levels (5, 10 and 20 mM of CH₃COONH₄, 5 and 10 mM of HCOONH₄, 10 mM CH₃COONH₄/CH₃COOH at pH 4.5, 10 mM HCOONH₄/HCOOH at pH 3, water with CH₃COOH at pH 5 and water with HCOOH at pH 2.5), poor separation for nearly all compounds was observed (Figure 1 in Manuscript). HILIC was also evaluated by Ordoñez et al. [2] without great successes in the separation of compounds. Recently our group reported better chromatographic separation of seven HIS was achieved using a HILIC column with zwitter ionic sulfoalkyl betaine stationary phase [4].

Moreover, when Ascentis Express RP-Amide (100 mm x 2.1 mm, 2.7 μm) column was tested it gave better separation for all compounds and the peaks were completely resolved.

Table S2. Optimal gradient elution for the different chromatographic columns tested.

Kinetex C ₁₈		Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈		Ascentis Express C ₁₈		Zorbax Eclipse XDB-C ₈		Ascentis Express HILIC		Ascentis Express RP-Amide	
Time (min)	B %	Time (min)	B %	Time (min)	B %	Time (min)	B %	Time (min)	B %	Time (min)	B %
0	2	0	2	0	5	0	2	0	98	0	5
6	75	6	75	2	20	10	60	15	0	3	5
8	75	8	75	3	20	12	60	17	98	9	75
9	10	9	10	4	50	13	10			10	100
	0		0				0				
10	10	10	10	5	50	14	10			11	100
	0		0				0				
11	2	11	2	7	10	15	2			12	5
					0						
				8	10						
					0						
				9	5						

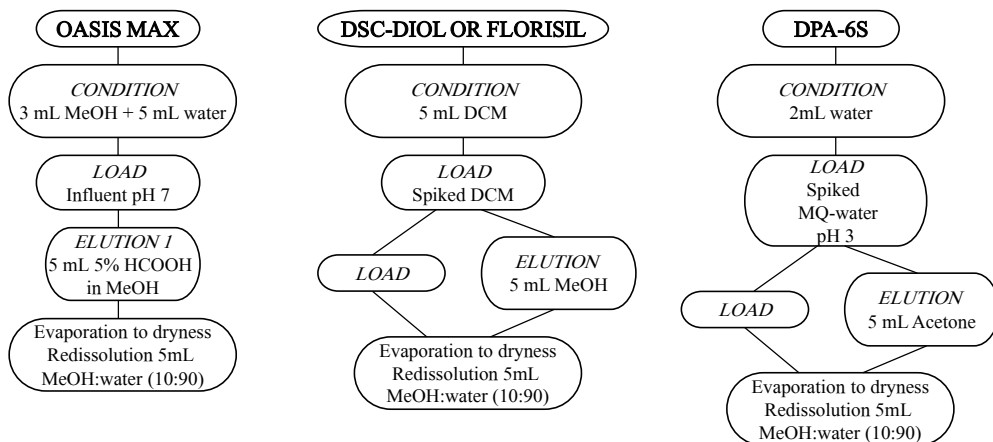


Figure S1. Scheme of the flow chart for extraction of sweeteners using different SPE sorbents tested for the clean-up step.

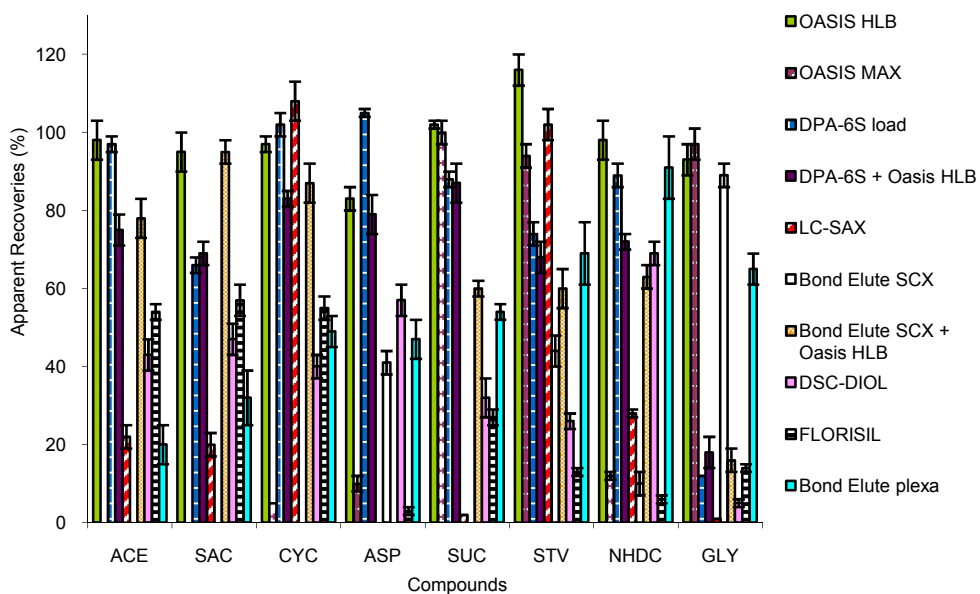


Figure S2. Apparent recoveries (%) in ultrapure water with different sorbents.

Apparent recoveries of the eluting fraction except for data related to Discovery DPA-6S, the data of which correspond to the loading fraction because the compounds were not retained in the sorbent and remained in the loading fraction.

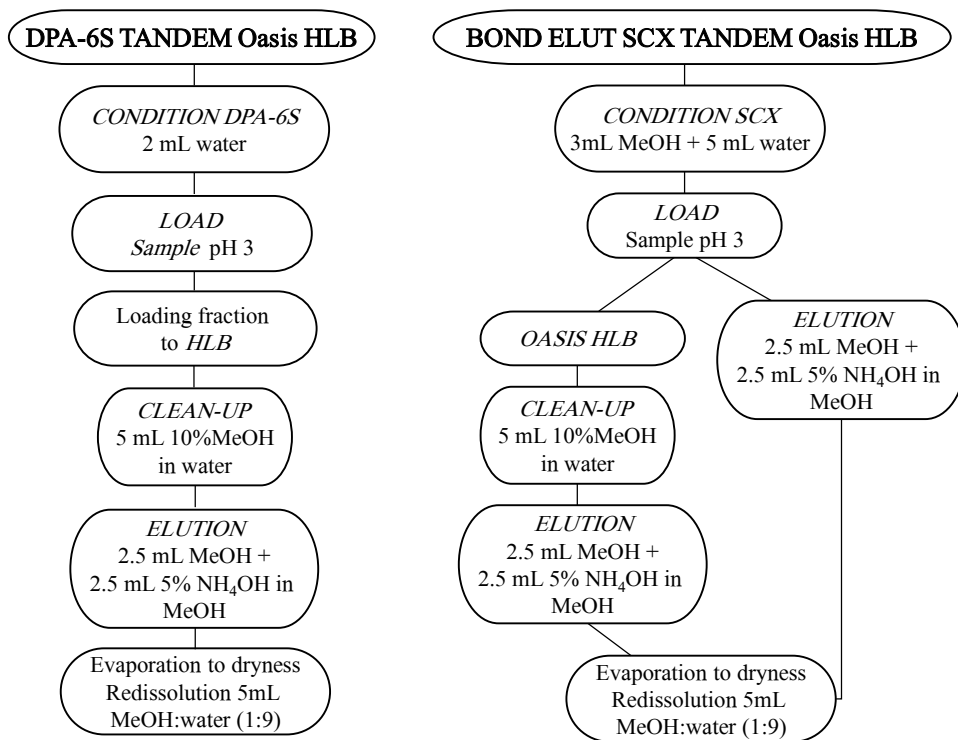


Figure S3. Scheme of the flow chart for extraction of sweeteners using different SPE sorbents in tandem.

REFERENCES

- [1] Z. Gan, H. Sun, R. Wang, B. Feng, A novel solid-phase extraction for the concentration of sweeteners in water and analysis by ion-pair liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1274 (2013) 87-96.
- [2] E.Y. Ordóñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 197-205.
- [3] J.-D. Berset, N. Ochsenbein, Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using

- high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS), *Chemosphere* 88 (2012) 563-569.
- [4] D. Salas, F. Borrull, N. Fontanals, R. Marcé, Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry to determine artificial sweeteners in environmental waters, *Anal. Bioanal. Chem.* (2014) 1-9.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

***3.3.2. Trace-level determination of sweeteners in sewage sludge
using selective pressurized liquid extraction and liquid
chromatography-tandem mass spectrometry***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

TRACE-LEVEL DETERMINATION OF SWEETENERS IN SEWAGE SLUDGE USING SELECTIVE PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

Paula Arbeláez, Francesc Borrull, Rosa Maria Marcé, Eva Pocurull

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Universitat Rovira i Virgili, Sescelades Campus, Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

The occurrence of sweeteners in the environment has become a matter of concern due to the possibility of adverse effects on human health and wildlife species. One of the routes by which sweeteners enter the environment is through sewage sludge. Therefore, a method was developed with a selective-pressurized liquid extraction (S-PLE) followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of eight sweeteners in sewage sludge. The chromatographic separation was achieved in less than ten minutes using an amide polar-embedded reversed-phase column. Due to the high matrix effect present in the sample, an extensive study was conducted in order to overcome this issue, with C_{18} in-cell and solid-phase extraction (Oasis HLB) as a clean-up method. S-PLE/SPE recoveries at two levels of concentration (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in dry weight (d.w.), $n=5$) were higher than 61%. Repeatability and reproducibility at the same concentrations (%RSD, $n=5$) were lower than 11% and 16%, respectively. The limits of detection were 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) for all compounds, except for cyclamate (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.)). The method was successfully applied to sewage sludge samples from three sewage treatment plants located in Catalonia (Spain). Of the eight compounds, five were determined in all of the samples analysed, with acesulfame and saccharine being recorded at the highest concentrations of up to 481 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 591 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.), respectively.

Keywords: *Sweeteners, liquid chromatography, tandem mass spectrometry, sewage sludge, selective pressurized liquid extraction, in-cell clean-up, matrix effect*

1. INTRODUCTION

Sewage sludge is the solid or semi-solid that results from the treatment of domestic and/or industry wastewater in sewage treatment plants (STPs). Sewage sludge is an important source of organic matter, nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, sulphur and magnesium, which is suitable for use in agriculture, but it can also contain contaminants such as pathogens, heavy metals and organic contaminants [1, 2]. Although the European Union regulates the use of sewage sludge to prevent harmful effects on land, vegetation, animals and humans under the directive 86/278/EEC [3], its scope is only limited to establishing the maximum limits of concentration of heavy metals in sludge for land application. Organic contaminants are not regulated and they may be adsorbed by crop plants or plants used for feed production and grazing purposes, resulting in animal and human exposure to the contaminants through feed or food [2].

Of the various groups of organic contaminants, concern about high intensity sweeteners (HIS) has grown in recent years as they have been identified as emerging

organic contaminants, due to their large-scale occurrence in the aquatic environment, extreme persistence and low degradability [4]. It is still unclear to what extent HIS negatively affect the environment. While some studies suggest that HIS have low toxicity [5-7], negative effects have recently been shown with respect to the behavioural and physiological functions of certain organisms [8, 9]. There is therefore a need to monitor HIS in the environment. The quest for faster, more selective and sensitive methods of analysis is one of the key objectives of researchers.

Several analytical methods have been developed for the determination of HIS in environmental matrices such as river water [10, 11] and wastewater [12-14], with high concentrations having been reported. However, to date, few methods have been published for the determination of HIS in sewage sludge [15-17].

HIS have been extracted from sewage sludge by using pressurized liquid extraction (PLE) [15], ultrasonic solvent extraction (USE) [16] and liquid-solid extraction [17]. Furthermore, all of these extraction techniques have been

combined with solid-phase extraction (SPE) to pre-concentrate and clean up the extract. For instance, Ordoñez et al. [15] extracted acesulfame, aspartame, cyclamate, NHDC, saccharine and sucralose by PLE with water 500 mM formate buffer (pH 3.5) at 80°C for a single static cycle of 21 min, with subsequent SPE clean-up with Oasis HLB. PLE recoveries reported were between 87% and 105% [15]. Meanwhile, Subedi et al. [16] showed that USE followed by SPE is also a suitable technique for extracting HIS (sucralose, aspartame, saccharine, acesulfame and cyclamate) from sewage sludge, with good extraction recoveries being obtained when MeOH:water (5:3 v/v) was used as the extraction solvent for 30 min.

For determination purposes, liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-(ESI)MS/MS) is the technique established as the best choice for determining HIS in either water and/or sludge. The ionization of most HIS occurs best with ESI operating in negative mode [18-20]. In fact, the two methods mentioned above [15, 16] determined HIS in sludge using a triple quadrupole

mass spectrometer and the authors reported higher sensitivity working in negative ionization. However, others studies have obtained more fragments under positive ionization in the case of aspartame, saccharine and sucralose [21].

The present research focuses on the determination of the most common HIS in sewage sludge, namely acesulfame, saccharin, cyclamate, aspartame, sucralose, stevioside, neohesperidinedihydrochalcone and glycyrrhizic acid [22]. For the purposes of the study, an analytical method was developed based on selective pressurized liquid extraction (S-PLE) and SPE followed by LC-MS/MS and subsequently validated for reliable and sensitive quantification. To date, there is little information available on the prevalence of HIS in sewage sludge and some of them such as glycyrrhizic acid and stevioside have not been studied yet.

2. EXPERIMENTAL PART

2.1 Reagents and Standards

Acesulfame-K (ACE), saccharin-Na (SAC), cyclamate-Na (CYC), aspartame (ASP), sucralose

(SUC), stevioside (STV), neohesperidinedihydrochalcone (NHDC) and glycyrrhizic acid (GLY), aspartame- d_3 (ASP- d_3), sucralose- d_6 (SUC- d_6) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Stock solutions of individual standards and deuterated standards were prepared by dissolution of pure compound in MeOH at a concentration of 1,000 mg/L, and then stored at -20°C in amber glass bottles. Mixed intermediate standard solutions were prepared every month by diluting stock solutions in MeOH at a concentration of 4 mg/L and stored at 4°C . Mixed standard working solutions were prepared daily from intermediate standard solutions by diluting appropriately with water:MeOH (9:1 v/v). Deuterated compounds were tested as surrogates.

The following HPLC grade reagents were tested as extraction solvent: acetone, dichloromethane (DCM), isopropyl alcohol (IPA), ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH). These were purchased from Prolabo (VWR, Llinars del Vallès, Spain). Formic acid (HCOOH) for LC-MS analysis was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), acetonitrile (ACN) from Prolabo, and

ammonium hydroxide (NH_4OH) from Sigma-Aldrich. Ultrapure water was obtained using an ultrapure water purification system supplied by Veolia Water (Sant Cugat del Vallès, Spain). Nitrogen gas was sourced from Carburos Metálicos (Tarragona, Spain). In-cell sorbents used in PLE (Florisil, C_{18} , alumina, and silica), as well as diatomaceous earth, were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2 Sludge sampling and sample pre-treatment

For three consecutive months, sewage sludge samples were collected from three STPs located in Catalonia (Spain). These STPs mostly receive urban sewage along with some industrial discharges. The STPs have a design flow between 18,000 m^3/day and 35,000 m^3/day , with a total capacity between 156,450 and 200,000 equivalent inhabitants.

Dewatered sludge samples were taken after anaerobic sludge digestion treatment by grab sampling using polyethylene bottles. They were then stored in the freezer at -20°C until being lyophilized with the freeze dry system (Labconco, Kansas City, MO, USA). The lyophilized

samples were homogenized by mortar and pestle, sieved through a 125 μm screen and stored at room temperature.

In order to optimize and validate the method, the sludge samples were spiked by adding the stock mixture of standards in acetone (~8 mL of acetone was necessary to cover 1 g of sludge sample). The solvent was slowly evaporated inside a fume hood at room temperature with frequent homogenization.

2.3 S-PLE and clean-up procedure

Extraction of HIS from sludge samples was carried out by PLE using an ASE 2000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). The stainless steel extraction cell (11 mL capacity) was filled with 1 g of C_{18} adsorbent in the bottom of the cell, followed by a second layer of 1 g of pre-treated sludge thoroughly mixed with 2 g of C_{18} and, finally, a third layer of 1 g of diatomaceous earth. Whatman glass fibre filters were put at the top and bottom of the cell.

The PLE method resulted in the following optimal conditions: MeOH:water (1:1 v/v) as the extraction solvent, 5 min preheating period, extraction temperature of 40°C, extraction

pressure of 1,500 psi with a static period of 5 min in one cycle, flush volume of 40% of the cell volume and nitrogen purge time of 90 s. PLE extract (~15 mL) was evaporated under a nitrogen stream approximately to 5 mL and then it was re-dissolved to 25 mL in water. Subsequently, this extract was loaded into the 500 mg Oasis HLB cartridge previously preconditioned with 5 mL of MeOH followed by 5 mL of ultrapure water. Then, the cartridges were cleaned up with 5 mL of water:MeOH (9:1 v/v) and completely dried under vacuum. The compounds were eluted with 2.5 mL of MeOH followed by 2.5 mL of a solution containing 5% of NH_4OH in MeOH. The eluate was evaporated to dryness and re-dissolved to 10 mL with MeOH:water (1:9 v/v), before being filtered with a 0.22 μm polypropylene membrane filters (GHP) prior to analysis by LC-(ESI)MS/MS.

2.4 Determination by LC-(ESI)MS/MS

The LC-(ESI)MS/MS method was adapted from our analytical method previously developed for the determination of HIS in environmental aqueous samples [23]. The LC-(ESI)MS/MS

system was an Agilent 1200 series (Waldbronn, Germany) coupled to a triple quadrupole 6410 series mass spectrometer with an ESI interface (Agilent Technologies). The LC conditions were: Ascentis Express RP-amide (100×2.1 mm, 2.7 μm) as the chromatographic column; the mobile phase was ultrapure water acidified with HCOOH to pH 2.5 (solvent A) and ACN (Solvent B); the elution gradient started isocratically at 5% B for 3 min and then increased to 75% B in 6 min, then increased to 100% B in 1 min, remaining constant for 1 min and finally returning to 5% B in 1 min.; the oven temperature was 25°C; the flow rate was 0.4

mL/min and the injection volume was 50 μL.

The ESI-MS/MS conditions were as follows: nebulizer pressure of 45 psi, drying gas (N₂) flow rate of 11 L/min, drying gas temperature of 350°C and capillary voltage of 4,000 V. The ionization mode was negative for all compounds. The acquisition mode used was selected reaction monitoring (SRM) and the most abundant SRM transition was used for quantification, while the second and third most abundant SRM transitions were used for confirmation, except in the case of SUC and CYC (one transition for confirmation). Cone voltage and collision energy for each SRM transition are given in Table 1.

Table 1. ESI-MS/MS acquisition parameters in SRM mode and retention time.

Compound	Ret. time (min)	Precursor ion	Cone Voltage (V)	Product ions		
				Quant.	Qual.1	Qual.2
Acesulfame (ACE)	2.2	162	80	82 (13)	78 (34)	40 (30)
Cyclamate (CYC)	3.1	178	140	80 (34)	96 (20)	
Saccharin (SAC)	4.2	182	140	42 (24)	106 (16)	62 (22)
Aspartame (ASP)	6.6	293	100	200 (10)	261 (5)	217 (5)
Sucralose (SUC)	7.4	433	140	397 (12)	359 (6)	
NHDC	8.8	611	280	303 (41)	166 (74)	125 (53)
Stevioside (STV)	9.1	839	160	641 (35)	479 (63)	317 (90)
Glycyrrhizic acid (GLY)	10.1	821	280	351 (50)	193 (54)	113 (56)

Collision energies are in brackets (eV)

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Separation and detection by LC-(ESI)MS/MS

An exhaustive discussion about LC-(ESI)MS/MS method optimization was presented in a previous paper in which HIS were determined in river water and wastewaters [23]. Therefore, in this paper, the most relevant parameters are discussed. The chromatographic column used was an Ascentis Express RP-Amide (100 mm x 2.1 mm, 2.7 μm) with fused core technology. The use of this column and the binary mobile phase water/HCOOH at pH 2.5 and ACN allowed the separation of all of the compounds with good resolution in less than 11 min. Furthermore, the chromatographic separation protocol enabled the chromatographic run to be divided into four segments, which, in turn, allowed the application of longer dwell times for each transition with a concomitant increase in sensitivity. Electrospray ionization in negative mode was selected because positive ionization provided lower overall sensitivity. Despite higher

sensitivity and more fragments being obtained for ASP under positive ionization, this mode was not selected because chromatographic separation between ASP and SAC (negative ionization) was very close and this fact did not allow the product ions of ASP to be acquired in a single segment in positive ionization.

The predominant precursor ions [M-H] for each compound were subjected to MS/MS fragmentation, except for SUC and STV, in which case the predominant precursor ions were their adduct with Cl, [M+Cl₃₅].

3.2 Optimization of PLE

During PLE optimization, several operational parameters were evaluated, including solvent extraction, number of cycles, static time, temperature and flush volume, in order to determine the best conditions for the extraction of HIS. Likewise, in-cell clean-up with several sorbents was also tested to reduce the matrix effect present in the samples.

PLE optimization was carried out with pre-treated sludge spiked at 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) before extraction and, for each test, a non-spiked pre-treated sludge (blank) was also analysed to

subtract the area signal, if any compound was present. In most cases, ACE, SAC and SUC were present in the blank. Apparent recoveries during PLE optimization were calculated by comparing the responses (area) of the sample spiked before SPE with a pure solvent standard (direct injection) at the same concentration.

Extraction solvent was the first parameter evaluated. Bearing in mind that HIS are polar compounds, polar protic solvents were tested, such as water (at pH 3, 9 and neutral), MeOH, a mixture of MeOH:water (1:1) and IPA, as well as some polar aprotic solvents, such as acetone, EtOAC, and DCM.

The initial operational PLE conditions were: 5 min preheating time, extraction temperature of 60°C, extraction pressure of 1,500 psi with a static time of 10 min in one cycle, flush volume of 40% of the cell volume and nitrogen purge time of 90 s. Sample weight was 1 g and the dispersing agent was diatomaceous earth. Extracts of water, MeOH or mixtures of both solvents were diluted to 25 mL with the appropriate solvent in order to obtain a solution of MeOH:water (1:9 v/v). For the rest of solvents tested, extracts were evaporated under a nitrogen stream to dryness and re-dissolved in 25 mL of MeOH:water (1:9 v/v).

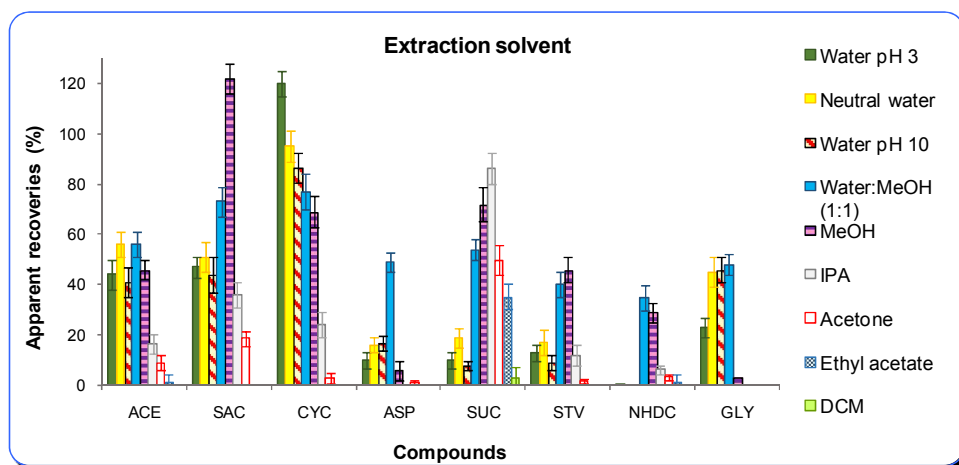


Figure 1. Apparent recoveries (%) (n=3) using different extraction solvents.

Comparing the apparent recoveries calculated for each solvent extraction (Figure 1), the interactions of each solvent with each analyte were different, probably because the compounds under study belong to different classes of chemicals (peptides, sulphamates, glycosides and carbohydrate derivatives) and present different chemical characteristics. For instance, working with water at the three pH levels tested, similar apparent recoveries were obtained for all of the compounds and its use only enhanced the extraction of CYC (87% to 120%). However, most of compounds were poorly or not recovered, as in the case of NHDC. Likewise, the use of MeOH favoured the extraction of SAC (122%) and STV (46%), but it did not extract either ASP or GLY.

Moreover, polar aprotic solvents such as acetone and EtOAc only partially recovered SUC (50% and 35%, respectively) and DCM did not extract any compound. The mixture of MeOH: water (1:1) gave relatively better results for most of the compounds than using a pure solvent. Almost 75% was the apparent recovery for SAC and CYC, while, for the rest of compounds, these

recoveries were between 35% (NHDC) and 56% (ACE).

In view of the above, a mixture of MeOH:water (1:1) was selected for further testing. Other studies which include the extraction of some of the HIS studied in the present paper selected 500 mM formate buffer at pH 3.5 (method by PLE) [15], MeOH:water (5:3 v/v) (method by USE) [16] and water 10 mM HAc/NaAc at pH 4 (method by liquid-solid extraction) [17] as suitable solvent extraction.

Once the solvent extraction had been established, the temperature was tested at 40°C, 60°C, 80°C and 100°C. Although the temperature is a highly influential parameter in the extraction process, in our case, this parameter did not show significant differences.

As can be seen in Table 2, apparent recoveries were similar at the four temperatures tested. Therefore, 40°C was chosen as extraction temperature to avoid possible co-extracting undesired matrix interfering components.

Similar behaviour was reported by Ordoñez et al. [15], with no differences being observed at the different temperatures tested, with the exception of ASP, for which 80°C was selected as the

best extraction was recorded at this temperature.

Thereafter, static times of 5, 10, 15 and 20 min were evaluated, followed by the number of cycles (up to 3 cycles) (Table 2) and four flush volumes (30%, 40%, 60% and 100% -values not showed) also being tested. As a

result, the increase of each of these parameters had a negligible effect on the extraction efficiency, thus, a flush volume of 40%, 5 min static time and 1 cycle were selected as the optimal conditions for decreasing the total sample extraction time by PLE.

Table 2. Apparent recoveries (%) (n=3) by using different PLE conditions.

PLE Conditions	ACE	SAC	CYC	ASP	SUC	STV	NHDC	GLY
Temperature								
40 °C	64	77	82	54	49	43	41	54
60 °C	58	63	83	51	44	38	37	60
80 °C	50	68	87	45	56	33	33	49
100 °C	39	77	79	41	39	28	28	55
Static Time								
5 min	53	83	85	48	51	43	37	56
10 min	39	75	90	52	64	41	35	45
15 min	34	89	83	44	60	40	31	51
20 min	48	101	93	39	56	40	29	52
Numer of cycles								
1 cycle	61	74	78	57	50	38	34	51
2 cycles	41	62	76	53	53	37	34	46
3 cycles	37	55	68	51	44	36	33	43

Sewage sludge spiked at 500 µg/kg (d.w.). For other conditions see the text in section 3.2
 RSD% (n=3) <11%

Under the optimal PLE conditions described above, the recoveries resulting from the extraction process alone (PLE extraction) were evaluated by comparing the responses of a sample spiked before PLE with the responses of a sample spiked after PLE at the same concentration (500 µg/kg (d.w.)). The PLE extraction yield was

close to 100% (data not shown) for half of the compounds (CYC, SAC, SUC, NHDC and STV) under study. It may therefore be inferred that the decrease in apparent recoveries (see Table 2, static time at 5 min), particularly in the case of STV (43%) and NHDC (37%), is only due to ion suppression. Meanwhile, ACE, ASP and GLY showed the lowest

PLE recoveries, between 64 and 83%, which indicates that these compounds were incompletely extracted and were also affected by ion suppression. Given that all of the compounds were affected by ion suppression in the LC-(ESI)MS/MS determination, two approaches were studied to eliminate and/or reduce this effect: in-cell and solid-phase extraction (SPE) clean-up.

In-cell clean-up entailed the study of several kinds of sorbents such as Florisil, C₁₈, alumina, and silica. Results of apparent recoveries are shown in Figure 2a and it can be seen that alumina slightly increased the recoveries for most of the compounds compared to the other adsorbents tested. However, GLY was completely adsorbed by alumina. Moreover, the use of the other three sorbents did not show adsorption of undesirable interferences, since the apparent recoveries were similar to the recoveries using only diatomaceous earth, except for SUC, in which case the recovery increased from 48% to 62% using the C₁₈ sorbent. Therefore, in-cell clean-up was carried out with C₁₈ sorbent.

A second alternative evaluated was subjecting the S-PLE extracts to SPE in order to clean

up the matrix. To carry out this step, a method previously developed to extract HIS from environmental water samples was applied to the aqueous S-PLE extract [23]. The experiments were performed as described in Section 2.3. The apparent recoveries, S-PLE/SPE recoveries and matrix effect were evaluated and values were compared with those obtained in the case of S-PLE without an SPE clean-up step, in order to evaluate the effectiveness of the SPE clean-up (Figure 2b). The matrix effect was evaluated by spiking the S-PLE and/or S-PLE/SPE extract of blanks at a concentration of 20 µg/L in the final reconstituted volume (25 mL), and it was calculated by comparing the responses (peak areas) of spiked S-PLE and/or S-PLE/SPE extract samples (A_{sample}) with those from a pure solvent standard (A_{standard}) at the same concentration with the following equation: $100 - (((A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{standard}}) \times 100)$, (A_{blank} is non-spiked sludge) [24]. According to the equation used, positive values indicate ion suppression and negative values indicate ion enhancement, thereby values close to zero indicate the absence of matrix effects. Results with

respect to the matrix effect indicated that ion suppression was completely eliminated for ACE, SAC and CYC using the SPE clean-up, as the matrix effect was close to zero. Consequently, apparent recoveries increased from 58% to 74% for ACE, from 77% to 96% for SAC and from 75% to 96% for CYC, while the rest of the compounds did not exhibit significant changes. In view of this, it was decided to also use SPE as the clean-up step in order to improve the quantification of these three compounds.

for SAC and from 75% to 91% for CYC, while the rest of the compounds did not exhibit significant changes. In view of this, it was decided to also use SPE as the clean-up step in order to improve the quantification of these three compounds.

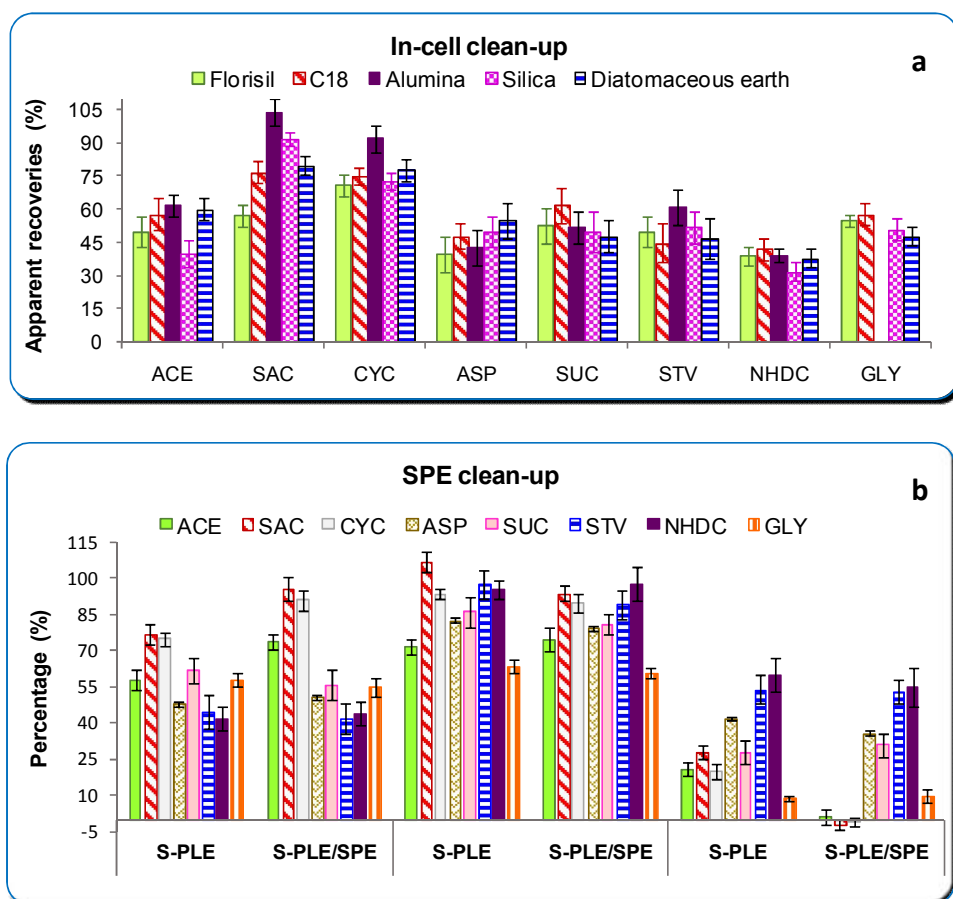


Figure 2. (a) Apparent recoveries for in-cell clean-up using different sorbents. (b) Apparent recoveries, extraction recoveries and matrix effect by using SPE.

As mentioned previously, the optimization was carried out diluting the extracts to 25 mL. Therefore, in order to achieve the lowest limits of detection, four re-dissolution volumes were tested. The criterions to choose the suitable re-dissolution volume were the sensitivity and matrix effect displayed at 2 mL,

5 mL, 10 mL and 25 mL. As expected, compounds at the highest re-dissolution volume were less affected by ion suppression (Figure 3) because the concentration of interfering compounds is reduced and, therefore, the competition for ionization is also minimized.

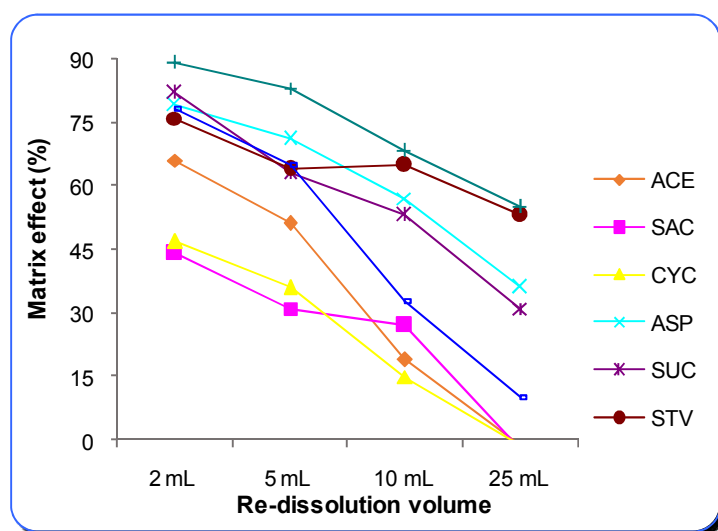


Figure 3. Matrix effect in different re-dissolution volume.

However, the sensitivity of the method is affected. At the other end of the scale, working with 2 mL, it can be seen that ion suppression almost doubles for most of the compounds, between 44% (SAC) and 89% (NHDC). Sample re-dissolution to 10 mL was selected, since ion

suppression was reduced to an acceptable level while still maintaining a good signal response for most of the compounds. Indeed, ion suppression was between 15% and 68%, with CYC displaying the lowest ion suppression and NHDC the highest.

3.4 Method validation

S-PLE/SPE/LC-MS/MS method was validated with spiked sewage sludge samples before PLE and subjecting them to the overall method. Linear range, method detection limit (MDL), method quantification limit (MQL), recoveries, repeatability, reproducibility and matrix effect were evaluated for quantitative purposes.

The last four validation parameters were evaluated at 50 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) and method validation data are provided in Table 3. Matrix effect results at 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) were in good agreement with those results obtained at 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) As shown in Table 3, the LC-MS signal was suppressed between 13% (CYC) and 69% (STV). Given that ion suppression cannot be eliminated for most of the compounds, matrix-matched calibration was used to compensate this effect, and thereby ensure the reliability of the analytical method. In addition, for the same purpose, two isotopically labelled compounds (ASP- d_5 and SUC- d_5) were tested as surrogates, but they were unable to compensate ion suppression of most of the compounds, probably due to

difference in the matrix effect between them and the non-analogues compounds. Therefore, deuterated compounds were not used. Matrix-matched calibration curves (eight concentration levels) were linear in the concentration range tested between 10 or 25 to 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) and provided determination coefficients (R^2) between 0.9938 and 0.9987.

MDLs for compounds not present in sludge samples, such as CYC, STV and NHDC, were calculated as the concentrations giving peaks for which the signal-to-noise ratio was at least 3 and the relative ion intensities between the qualifier ions and the quantifier ion were within the maximum permitted tolerances established by the Commission Decision 2002/657/EC [25]. MDLs for the rest of compounds that were present in the sample were estimated from their apparent recoveries and the LC-MS response following the same criteria. MDLs were 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) for all compounds except for CYC, which had the lowest MDL at 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) MQLs were set at the lowest point on the calibration curve. Similar MQLs were reported by Ordoñez et al. [15] and Subedi et al. [16].

Table 3. Validation data for S-PLE/SPE/LC-(ESI)MS/MS method.

Compound	Maximum permitted tolerances	Linear range (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Spiked sample at 50 µg/kg				Spiked sample at 1000 µg/kg			
				ER %	ME %	AR %	RSD ^a %	ER %	ME %	AR %	RSD ^a %
ACE	54-81	25-2000	10	79	25	59	7	77	19	62	5
SAC	29-48	25-2000	10	97	27	71	7	104	28	75	4
CYC	1-3	10-2000	5	94	13	82	5	102	15	87	7
ASP	72-108	25-2000	10	75	61	29	14	79	57	34	11
SUC	9-16	25-2000	10	87	62	33	13	83	53	39	12
STV	10-18	25-2000	10	97	69	30	16	94	65	33	12
NHDC	28-47	25-2000	10	99	65	35	7	91	68	29	6
GLY	32-54	25-2000	10	63	49	32	6	66	33	44	5

ER = S-PLE/SPE recoveries, **ME** = Matrix effect, **AR** = Apparent recoveries (n=5). **a** = Reproducibility between days (n=5)

As can be seen in Table 3, apparent recoveries were similar at 50 µg/kg than 1000 µg/kg (d.w.). The highest apparent recoveries were observed for SAC and CYC with 71% and 82%, respectively, at the lowest level of concentration. For the rest of compounds, apparent recoveries at two levels were between 24% (NHDC) and 62% (ACE). Meanwhile, extraction recoveries at two levels were between 63% and 104% for all of the compounds, with GLY displaying the lowest extraction recovery. Relative standard deviation (%RSD) were calculated in order to evaluate the repeatability and reproducibility between days, respectively. ASP, SUC and STV showed the highest %RSD values, with repeatability values (data not shown) between 3% and 11% for all of the compounds at both levels. Reproducibility between days (%RSD) were between 4% and 16% for all compounds, as shown in Table 3. Identification of compounds and confirmation results criteria were conducted in accordance with the requirements stipulated in Commission Decision 2002/657/EC [25]. Maximum permitted tolerances are given in Table 3, determined from relative confirmation ion

abundances with respect to quantification ion of matrix-matched calibrations. Compounds such as ACE and ASP permitted a tolerance of $\pm 20\%$, for SAC, NHDC, and GLY the tolerance was $\pm 25\%$, for SUC and STV was $\pm 30\%$ and for CYC was $\pm 50\%$.

3.5. Occurrence of sweeteners in sewage sludge

The PLE/SPE/LC-MS/MS method developed was applied to determine HIS in nine sewage sludge samples collected over three months from three different STPs. Table 4 summarizes the concentration of the compounds found in the samples with their respective relative ion abundance in brackets. Figure 4 shows a chromatogram obtained from sample 1 at STP 1. The chromatogram shows the presence of ACE (315 µg/kg (d.w.)), SAC (130 µg/kg (d.w.)), ASP (<LOQ), SUC (60 µg/kg (d.w.)) and GLY (<LOQ). In general, the occurrence of these compounds displayed a similar trend in all of the samples analysed, with ACE and SAC having the highest concentrations, ranging from 26 to 481

Tabla 4. Results in µg/kg d.w. of sewage sludge samples analyzed (n=3)

Compound	STP 1			STP 2			STP 3		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 1	Sample 2	Sample 3
ACE	315 (69)	174 (67)	26 (62)	117 (59)	96 (58)	115 (52)	481 (68)	167 (59)	223 (52)
SAC	130 (35)	203 (33)	105 (37)	263 (40)	324 (33)	364 (45)	591 (37)	524 (43)	260 (35)
ASP	<LOQ (73)	<LOQ (79)	<LOQ (77)	<LOQ (81)	<LOQ (84)	<LOQ (88)	<LOQ (86)	<LOQ (83)	<LOQ (76)
SUC	60 (12)	57 (15)	48 (14)	174 (10)	107 (16)	133 (16)	122 (10)	86 (15)	101 (13)
GLY	<LOQ (43)	n.d	n.d	<LOQ (44)	<LOQ (39)	<LOQ (48)	<LOQ (36)	<LOQ (46)	<LOQ (42)

%RSD= lower than 9%

Relative ion intensities in samples are in brackets.

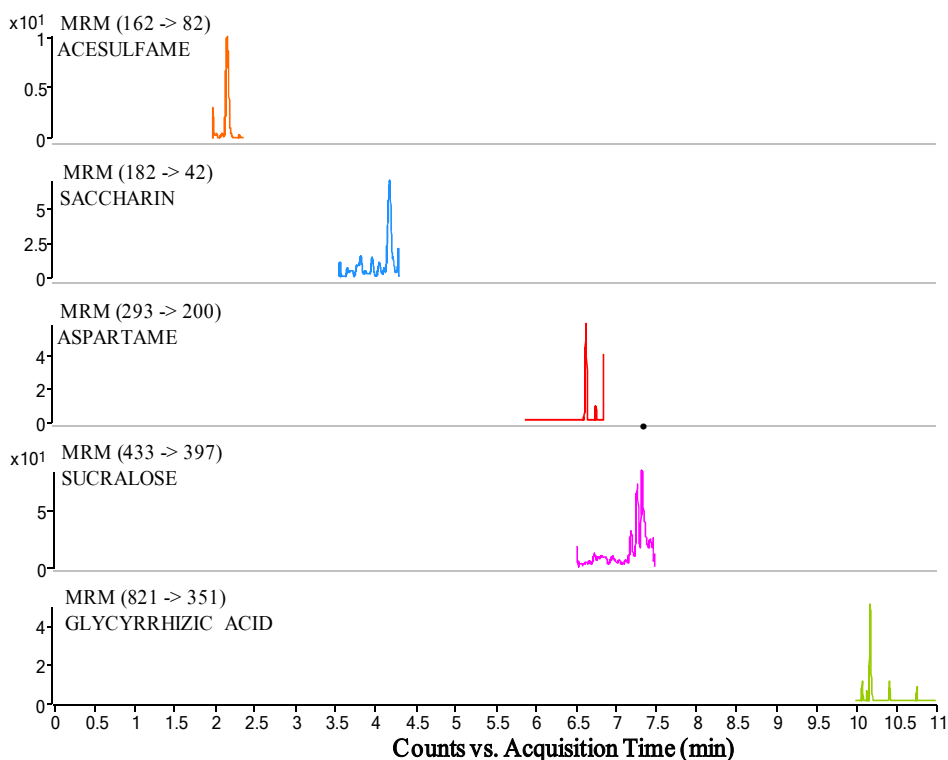
µg/kg (d.w.) and between 105 and 591 µg/kg (d.w.), respectively. Similar concentrations were found by Ordoñez et al. [15] in the case of ACE (between 32 and 151 µg/kg), while they reported lower concentrations than our study in the case of SAC (between not detected and 255 µg/kg (d.w.)). In contrast, Subedi et al. [16] found SAC at higher concentrations, up to 3,240 µg/kg in sewage sludge from STPs in Korea.

SUC was found in all of the samples at concentrations between 48 and 174 µg/kg (d.w.), which were very similar to levels reported in the literature [15, 16]. Meanwhile, ASP and GLY were detected as <LOQ. In the case of ASP, the values reported in the literature are very different. While Subedi et al. [16] determined it at concentrations between 28 and 5,220 µg/kg, Ordoñez et al. [15] did not report its presence in any sample. To date, GLY has not been determined in sewage sludge.

CYC, STV and NHDC were not detected in any sample. NHDC was determined in sewage sludge by Ordoñez et al. [15], but it neither was found in their analysed samples. STV has been studied for the first time in the

present study and, although it was not found in any sample, according to Spanish association of stevia rebaudiana [26] its consumption in Spain has increased considerably in recent years. As a result, the concentration of STV is set to increase in the near future.

In our previously study conducted on wastewater [23], the same trend in terms of the compounds found was observed as in our work on sludge, with ACE and SAC being the HIS determined at the highest concentrations in influent wastewater.



4. CONCLUSIONS

A S-PLE/SPE/LC-(ESI)MS/MS analytical method with triple quadrupole was developed to

determine the eight most commonly consumed HIS in sewage sludge. To the best of our knowledge, this is the first time

that STV and GLY have been studied in sewage sludge.

All of the compounds were successfully separated in less than 11 min using an amide polar-embedded reversed-phase column with fused-core technology. In-cell clean-up with C₁₈ sorbent and subsequent S-PLE extract clean-up with SPE using Oasis HLB enabled reduced ion suppression for some compounds and, in addition, matrix-matched calibration was used to compensate the matrix effect. In general, the extraction time with PLE was short in comparison to other reported methods, with just 5 minutes static time and 1 cycle being necessary to extract all of the compounds.

The present method proved to be suitable for application to several sewage sludge samples from three STPs, with all of the compounds being present in the samples, with the exception of CYC, STV and NHDC.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financed support by Ministry of Science and Technology (CTM2011-28765-CO2-01) and the Department of Innovation,

Universities and Enterprise (project 2014 SGR 223). P. Arbeláez would also like to thank the Ministry of Economy and Competitiveness for a grant (BES-2009-028157).

REFERENCES

- [1] European Commission DG Environment-B2 Disposal and Recycling Routes for Sewage Sludge Scientific and technical sub-component report, (2001) 1-70.
- [2] R.P. Singh, M. Agrawal, Potential benefits and risks of land application of sewage sludge, *Waste Manage.*, 28 (2008) 347-358.
- [3] Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture (86/ 278/EEC), (1986) L 181/186-112.
- [4] S.D. Richardson, T.A. Ternes, Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues, *Anal. Chem.*, 86 (2014) 2813-2848.
- [5] S.A.B. Hermsen, T.E. Pronk, E.-J. van den Brandhof, L.T.M. van der

- Ven, A.H. Piersma, Transcriptomic analysis in the developing zebrafish embryo after compound exposure: Individual gene expression and pathway regulation, *Toxicol. Appl. Pharm.*, 272 (2013) 161-171.
- [6] J.M.C. Geuns, Stevioside, *Phytochemistry*, 64 (2003) 913-921.
- [7] S. Stolte, S. Steudte, N.H. Schebb, I. Willenberg, P. Stepnowski, Ecotoxicity of artificial sweeteners and stevioside, *Environ. Int.*, 60 (2013) 123-127.
- [8] A.-K.E. Wiklund, M. Breitholtz, B.-E. Bengtsson, M. Adolfsson-Erici, Sucralose – An ecotoxicological challenger?, *Chemosphere*, 86 (2012) 50-55.
- [9] R.A. Giacaman, P. Campos, C. Muñoz-Sandoval, R.J. Castro, Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel, *Arch. Oral Biol.*, 58 (2013) 1116-1122.
- [10] N. Perkola, P. Sainio, Quantification of four artificial sweeteners in Finnish surface waters with isotope-dilution mass spectrometry, *Environ. Pollut.*, 184 (2014) 391-396.
- [11] R. Loos, B.M. Gawlik, K. Boettcher, G. Locoro, S. Contini, G. Bidoglio, Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 1126-1131.
- [12] R. Loos, R. Carvalho, D.C. António, S. Comero, G. Locoro, S. Tavazzi, B. Paracchini, M. Ghiani, T. Lettieri, L. Blaha, B. Jarosova, S. Voorspoels, K. Servaes, P. Haglund, J. Fick, R.H. Lindberg, D. Schwesig, B.M. Gawlik, EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents, *Water Res.*, 47 (2013) 6475-6487.
- [13] M. Scheurer, H.-J. Brauch, F. Lange, Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT),

- Anal. Bioanal. Chem., 394 (2009) 1585-1594.
- [14] J.-D. Berset, N. Ochsenbein, Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS), *Chemosphere*, 88 (2012) 563-569.
- [15] E.Y. Ordoñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Determination of artificial sweeteners in sewage sludge samples using pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1320 (2013) 10-16.
- [16] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage sludge from wastewater treatment plants in Korea, *Environ. Int.*, 68 (2014) 33-40.
- [17] Z. Gan, H. Sun, Y. Yao, Y. Zhao, Y. Li, Y. Zhang, H. Hu, R. Wang, Distribution of artificial sweeteners in dust and soil in China and their seasonal variations in the environment of Tianjin, *Sci. Total Environ.*, 488–489 (2014) 168-175.
- [18] L. Wolf, C. Zwiener, M. Zemann, Tracking artificial sweeteners and pharmaceuticals introduced into urban groundwater by leaking sewer networks, *Sci. Total Environ.*, 430 (2012) 8-19.
- [19] N.H. Tran, J. Hu, S.L. Ong, Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC–MS/MS and isotope dilution, *Talanta*, 113 (2013) 82-92.
- [20] D.R. Van Stempvoort, J.W. Roy, S.J. Brown, G. Bickerton, Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments, *J. Hydrol.*, 401 (2011) 126-133.
- [21] I. Ferrer, E.M. Thurman, Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *J.*

- Chromatogr. A, 1217 (2010) 4127-4134.
- [22] J.M. García-Almeida, G.M. Casado Fdez, J. García Alemán, Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación, Nutr. Hosp., 28 (2013) 17-31.
- [23] P. Arbeláez, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography– tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 1393 (2015) 106-114.
- [24] P. Arbeláez, J. Granados, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, Determination of sedative hypnotics in sewage sludge by pressurized liquid extraction with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry, J. Sep. Sci., 37 (2014) 3481-3488.
- [25] European Communities Commission, Decision 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, (2002) L221/228-236.
- [26] <http://www.stevia-asociacion.com/> Asociación Española de Stevia Rebaudiana, accessed on 21/01/2015

3.3.3. Discusión de Resultados

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

En la optimización de la separación cromatográfica se evaluaron 6 columnas analíticas ofreciendo diferente selectividad: tres columnas de fase inversa C_{18} bajo el nombre comercial Ascentis Express (*fused core*, 50 x 4.6 mm, 2.7 μm), Kinetex (*fused core*, 100 x 4.6 mm, 2.6 μm) y Zorbax Eclipse XDB (UHPLC, 100 x 4.6 mm, 1.8 μm); una columna de fase inversa C_8 bajo el nombre comercial Zorbax Eclipse XDB (150 x 4.6 mm, 5 μm), otra columna de fase inversa con grupos amida comercializada como Ascentis Express RP-Amide (*fused core*, 100 x 2.1 mm, 2.7 μm) y una HILIC bajo el nombre comercial Ascentis Express HILIC (*fused core*, 100 x 2.1 mm, 2.7 μm).

Como era de esperar las columnas de fase inversa C_{18} y C_8 exhibieron similar selectividad de manera que, la mayoría de compuestos fueron completamente resueltos menos aspartamo y sucralosa, y utilizando la columna C_8 los compuestos fueron más retenidos, incrementando los tiempos de retención. No obstante, la columna Ascentis Express C_{18} presentó una ligera mejoría de la resolución para estos dos compuestos utilizando como fase móvil agua ajustada con HCOOH a pH 2.5 y acetonitrilo como fase orgánica. Por otro lado, HILIC de fase estacionaria únicamente conteniendo sílica presentó una selectividad y retención muy baja para los edulcorantes. Sin embargo, en un estudio para determinar 8 edulcorantes de alta intensidad en aguas residuales, seleccionaron una columna HILIC con características similares a la evaluada en esta tesis, sin obtener una buena resolución de los compuestos de los cuales 5 de los compuestos presentan tiempos de retención muy cercanos entre 2 y 2.5 minutos [1]. Aunque una completa resolución cromatográfica no es absolutamente imprescindible para la detección con MS/MS, una mala resolución de los compuestos si puede afectar la sensibilidad. Por eso en nuestro estudio seleccionamos la columna Ascentis Express RP-Amide, ya que el grupo amida enlazado en la fase estacionaria incrementó la selectividad hacia estos compuestos muy polares permitiendo una completa separación de todos los compuestos.

Debido a que los edulcorantes de alta intensidad presentaron un efecto matriz muy fuerte, diferentes estrategias para reducirlo fueron planteadas. Como ya se ha señalado en la primera publicación de esta sección, las estrategias evaluadas fueron el solvente de *clean-up*, el solvente de elución, diferentes sorbentes utilizados como *clean-up*, volumen de muestra y diferentes tipos de calibración. Además de éstas, otras estrategias no mencionadas dentro del manuscrito también fueron evaluadas, tales son un pretratamiento de la muestra con carbón activado y modificación de las condiciones cromatográficas [2]. En esta sección describiremos el desarrollo experimental de estas dos estrategias, y además profundizaremos en los resultados obtenidos al evaluar los diferentes sorbentes utilizados como *clean-up*.

El pretratamiento de la muestra consistió en adicionar aproximadamente 5 mg de carbón activado a 100 mL de muestra de agua de entrada. Luego la muestra fue filtrada y fortificada a una concentración de 10 µg/L, para después ser sometida al proceso de extracción bajo las condiciones óptimas de SPE con Oasis HLB descritos en el primer artículo. Por otro lado, para comprobar que los compuestos no eran retenidos en el carbón activado, otra muestra de agua de entrada conteniendo carbón activado fue fortificada a la misma concentración, y luego la muestra fue filtrada para su posterior extracción mediante SPE. Los resultados de analizar el primer extracto de SPE (muestra filtrada y luego fortificada), mostraron que el efecto matriz es eliminado en su gran mayoría, ya que se obtuvieron recuperaciones aparentes muy cercanas a las conseguidas con agua ultrapura, entre 65-105%. No obstante, los resultados de analizar el segundo extracto (fortificando la muestra conteniendo carbón activado) muestran que tanto las interferencias como los compuestos objeto de estudio son retenidos, por lo que esta estrategia no fue adecuada para la determinación de los edulcorantes de alta intensidad.

La estrategia basada en modificar las condiciones cromatográficas consistió en cambiar la columna cromatográfica, el gradiente de elución y

la temperatura. La columna para esta prueba fue seleccionada teniendo en cuenta las columnas anteriormente ya evaluadas al inicio de la optimización de la separación cromatográfica, por lo que se seleccionó la columna Ascentis Express C₁₈ que fue la que proporcionó mejor resolución de los compuestos después de la RP-Amide. La fase móvil fue la misma que la utilizada con la columna RP-Amide, y la temperatura se estableció en 50 °C. El gradiente de elución fue suavizado tanto como fue posible para incrementar la separación entre los compuestos y las interferencias menos retenidas; sin embargo, las recuperaciones aparentes fueron similares a las obtenidas con el método cromatográfico establecido con la columna RP-Amide, por lo que esta estrategia no pudo ser adaptada.

Como ha sido señalado dentro de la primera publicación, a pesar de que varios sorbentes con diferentes mecanismos de interacción fueron evaluados para utilizarse como una etapa previa de *clean-up* antes de ser extraídos con Oasis HLB, ninguno de éstos fue adecuado para tales fines. La razón principal es que el grupo de contaminantes de los edulcorantes de alta intensidad son compuestos con diferentes propiedades físico-químicas con un amplio intervalo de polaridad y pK_a , y que son compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas, tales como dipéptidos, sulfamates, saponinas, glicósidos y derivados de carbohidratos. Sin embargo en esta sección se discutirán también algunos resultados no incluidos en el artículo.

Utilizando el sorbente de intercambio aniónico LC-SAX y el de modo mixto aniónico Oasis MAX, algunos compuestos exhibieron un mecanismo de retención diferente. Por ejemplo, con LC-SAX todos los compuestos son retenidos excepto aspartame, sucralosa y NHDC. En la elución utilizando 5 mL de 5% HCOOH en metanol, solo son eluidos completamente ciclamato y stevia y parcialmente acesulfamo, sacarina y NHDC. Por otro lado, Oasis MAX retiene completamente todos los compuestos, pero solo son eluidos en su totalidad sucralosa, stevia y el ácido glicirricínico con 5 mL de 5% HCOOH en metanol, y el resto de compuestos con carácter más ácido presentaron una interacción muy

fuerte con la parte de intercambio aniónico, no siendo eluidos con este solvente. Resultados similares fueron encontrados por Sheurer et al. [3] y Ordoñez et al. [4] utilizando Oasis MAX.

Utilizando sorbentes de fase normal DSC-Diol y Florisil, los resultados muestran que la mayoría de compuestos son parcialmente retenidos en estos sorbentes, ya que los analitos se encuentran distribuidos entre el sorbente y en las fracciones de la carga y elución. En el caso de Florisil, compuestos como aspartame, sucralosa, stevia, NHDC y el ácido glicirricínico (recuperaciones <27% en ambas fracciones), fueron más retenidos por la gran cantidad de grupos hidroxilos presente en sus estructuras, los cuales interaccionan con los átomos de oxígeno de la superficie del sorbente mediante formación de puentes de hidrógeno. Ante estos resultados los sorbentes de fase normal no fueron adecuados como sorbentes de *clean-up*.

La retención de los compuestos en el sorbente polimérico de modo mixto catiónico Bond Elut SCX fue muy baja o no fueron retenidos, principalmente esto se observó en los compuestos más ácidos como acesulfamo, ciclamato y sacarina. Así, todos los compuestos permanecieron en la fracción de carga, excepto aspartamo y ácido glicirricínico los cuales fueron retenidos por el sorbente, y eluidos con 2.5 mL de metanol + 2.5 mL 5% NH₄OH en metanol obteniendo recuperaciones de 41% y 89%, respectivamente. Aunque estos dos compuestos son retenidos, Bond Elut SCX se seleccionó como sorbente de *clean-up* para experimentos posteriores con Oasis HLB.

Por último, el sorbente poliamida de fase inversa DPA-6S solo retuvo al ácido glicirricínico y el resto de compuestos se eluyeron durante la carga, por lo que este sorbente también fue seleccionado para el *clean-up*.

Ante los resultados obtenidos, los sorbentes Bond Elut SCX y DPA-6S fueron seleccionados para trabajar en acoplamiento con Oasis HLB. De este modo se busca que las interferencias queden retenidas en los sorbentes

usados como *clean-up* mientras que los compuestos objeto de estudio pasan hacia el siguiente sorbente que es Oasis HLB. Sin embargo, tal y como se explica en la primera publicación, cuando los experimentos se realizan con muestras de agua de entrada, el acoplamiento de los sorbentes con Oasis HLB resulta en recuperaciones aparentes mucho menores que las obtenidas utilizando solo Oasis HLB. Por otro lado, utilizando Bond Elut SCX + Oasis HLB se observó mayor efecto matriz (53-95%) que utilizando DPA-6S + Oasis HLB, y con este último acoplamiento el efecto matriz es similar que utilizando solo el Oasis HLB, excepto para la sucralosa que disminuye de 50% hasta 38% de efecto matriz, pero para algunos compuestos se observa aumento como es el caso de CYC (de 40% a 70%) y ASP (de 2% a 20%). Por todo lo acabado de exponer, una estrategia de *clean-up* con sorbentes no fue posible realizarse.

En el segundo estudio se establecieron las condiciones óptimas operacionales del PLE para conseguir el mayor rendimiento en extraer los edulcorantes de alta intensidad de los fangos de depuradora. Como muestran los resultados recogidos en la segunda publicación, solo el solvente de extracción presenta gran efecto sobre la desorción de los compuestos de la matriz sólida, siendo una mezcla de metanol:agua (1:1, v/v) el solvente que proporcionó mejores resultados en conjunto de todos los compuestos. Otros parámetros como temperatura, tiempo de extracción y número de ciclos no influyeron en absoluto en las recuperaciones aparentes de los compuestos. Por otro lado, los edulcorantes de alta intensidad fueron afectados por las interferencias presentes en la matriz, por lo que fue necesaria la adición de un sorbente en la celda de extracción para que actuara como *clean-up* reteniendo los compuestos interferentes, siendo el sorbente C₁₈ el que presentó una mejor recuperación solo para sucralosa, manteniendo los demás compuestos sin cambio alguno de las recuperaciones. La segunda alternativa considerada fue someter los extractos del PLE a un *clean-up* con SPE utilizando Oasis HLB, por lo que los resultados obtenidos solo mostraron una gran mejoría de las recuperaciones para acesulfamo, sacarina y ciclamato. Esta estrategia también fue adoptada recientemente por Ordoñez et al. [5] en su estudio,

obteniendo excelentes resultados para los 6 edulcorantes estudiados con recuperaciones > 94%. Ese estudio es el único que se conoce hasta el momento que haya desarrollado un método para determinar edulcorantes de alta intensidad en fangos de depuradora, utilizando también como técnica de extracción PLE. Subedí et al. [6, 7] recientemente también desarrollaron un método para determinar edulcorantes en fangos de depuradora localizadas en dos zonas geográficas diferentes Korea [6] y Estados Unidos [7], pero la técnica de extracción se basa en UAE utilizando como solvente de extracción metanol:agua (5:3, v/v), y obtuvieron recuperaciones entre 42-124%.

La aplicación del primer método analítico en determinar edulcorantes de alta intensidad en aguas de 5 ríos localizados en Cataluña, permitió demostrar por primera vez la presencia de acesulfamo, sucralosa, ciclamato y ácido glicirricínico en todas las muestras analizadas; aspartamo también fue detectado en todos los ríos excepto en el Segre, y los compuestos con mayor abundancia de concentración fueron acesulfamo y sucralosa, con concentraciones de hasta 1.6 µg/L. Así mismo, en las aguas residuales estos mismos compuestos fueron detectados junto con sacarina en ambas aguas de depuradoras evaluadas en Tarragona y Reus. En estas depuradoras se observa poca o ninguna eliminación de sucralosa, mientras que otros compuestos como acesulfamo, sacarina y el ácido glicirricínico presentaron una mediana eliminación. El hecho de la baja eliminación de estas sustancias en las EDARs justifica que se encuentren en los ríos.

La aplicación del segundo método analítico permitió determinar edulcorantes en fangos de depuradora por primera vez en tres EDARs localizadas en Tarragona, Reus y Blanes. Los resultados demuestran la presencia de 5 de los 8 edulcorantes estudiados, siendo acesulfamo y sacarina encontrados con las más altas concentraciones de hasta 481 µg/kg y 591 µg/kg (d.w.), respectivamente.

Referencias

- [1] M.G. Kokotou, N.S. Thomaidis, *Anal. Meth.* 5 (2013) 3825.
- [2] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, *Talanta* 115 (2013) 104.
- [3] M. Scheurer, H.-J. Brauch, F. Lange, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1585.
- [4] E.Y. Ordóñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 197.
- [5] E.Y. Ordoñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1320 (2013) 10.
- [6] B. Subedi, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 13668.
- [7] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, *Environ. Int.* 68 (2014) 33.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

3.4. Monitorización de productos del cuidado personal, drogas de abuso e hipnótico- sedantes en muestras medioambientales

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Se ha realizado un estudio de monitorización durante 1 año para evaluar la presencia de PCPs, drogas de abuso e hipnótico-sedantes en aguas de entrada, efluentes y fangos de 5 EDARs ubicadas en Cataluña. Para este propósito, se aplicaron los métodos analíticos presentados en secciones previas, para la determinación de drogas de abuso en fangos de depuradora (sección 3.1.1), hipnótico-sedantes en aguas medioambientales (sección 3.2.1) e hipnótico-sedantes en fangos de depuradora (sección 3.2.2). También fueron aplicados otros tres métodos desarrollados previamente en nuestro grupo de investigación, para determinar drogas de abuso [1] y PCPs en aguas medioambientales [2] y en fangos de depuradora [3].

La selección de los compuestos determinados en este estudio de monitorización vino determinada por los proyectos del plan nacional CTM 2011-28765-CO2-01, y por ello se han evaluado algunos de los contaminantes de interés emergente, para los cuales ya había sido desarrollado el método analítico correspondiente.

Como ya se comentó en la introducción PCPs, drogas de abuso e hipnótico-sedantes son compuestos biológicamente activos que se detectan de forma rutinaria en las aguas residuales y consecuentemente en las aguas de río. Las consecuencias ambientales de estos contaminantes en los ecosistemas son aún muy inciertas a falta de estudios exhaustivos en este tema, puesto que hasta muy recientemente, la mayoría de estudios solo se limitan a evaluar la presencia de éstos en los diferentes compartimentos del medioambiente. Algunas investigaciones toxicológicas recientes demuestran que los tres grupos de contaminantes de interés emergente estudiados en esta sección pueden influir y alterar la estructura de las comunidades acuáticas, así como el comportamiento de los organismos acuáticos. Además, PCPs tienen el potencial de influir en las funciones del ecosistema, como la producción primaria y la respiración microbiana y la producción secundaria de invertebrados [4].

Por otro lado, existe una controversia en curso dentro de la comunidad científica sobre los posibles riesgos ambientales por utilizar los fangos de depuradora en prácticas agrícolas, debido a la presencia de sustancias tóxicas y persistentes en éstos, y que se pueden transferir a la cadena alimentaria. Se ha llegado a estimar que la carga de algunos contaminantes de interés emergente puede alcanzar concentraciones similares a la de los pesticidas [5].

Con los valores de concentración obtenidos del análisis de las muestras, otros aspectos de interés medioambiental también fueron estimados. Así, con los valores de concentración de las muestras de entrada y efluentes se estima la eficacia de las EDARs en eliminar estos contaminantes [6, 7]; con los valores de concentración de las muestras de los efluentes y fangos se realiza una estimación preliminar del riesgo medioambiental de los contaminantes sobre el medioambiente acuático y terrestre [8-11]; y con los valores de concentración de las drogas de abuso encontradas en las muestras de entrada de agua residual se realiza un estudio epidemiológico de las aguas residuales para estimar la prevalencia del consumo de algunas drogas de abuso en una determinada comunidad [10, 12, 13]. Este último enfoque proporciona de forma objetiva, cuantitativa y casi en tiempo real los perfiles de consumo de las drogas de abuso mediante el control del metabolito excretado que entra en la red del sistema de depuración del agua residual [13].

Como ya se ha indicado, el estudio de monitorización se llevó a cabo en 5 EDARs localizadas en Tarragona, Reus, Blanes, Castell-Platja d'Aro y Palamós, las cuales cuentan con diferentes procesos de depuración del agua residual. Mientras que las depuradoras de Tarragona y Reus solo cuentan con tratamiento secundario aplicando tratamiento convencional con lodos activados, el resto de depuradoras aplican tratamientos terciarios con radiación ultravioleta, cloración o ambos. Cabe destacar que este es el primer estudio exhaustivo que se realiza para evaluar el patrón de contaminación de los PCPs, drogas de abuso e hipnótico-sedantes en estas dos zonas geográficas, y además, estimando el riesgo ecotoxicológico

potencial de estos contaminantes hacia los organismos acuáticos y terrestres. Además, para la mayoría de los contaminantes estudiados en esta tesis, el riesgo que representan estos contaminantes presentes en fangos de depuradora hacia los organismos terrestres nunca ha sido estimado en otros estudios a nivel mundial. En estas zonas donde se centra el estudio de monitorización, parte del agua depurada y los fangos son reutilizados con diferentes fines, la principal para fines agrarios, por lo tanto, el conocimiento sobre la situación actual con respecto a la presencia y el riesgo medioambiental que conllevan los PCPs, drogas de abuso e hipnótico-sedantes en los efluentes y fangos es de particular interés. Por otro lado, estudios utilizando la epidemiología de las drogas de abuso en aguas residuales nunca ha sido utilizada como herramienta para estimar el patrón de consumo de las drogas de abuso principalmente en la provincia de Tarragona.

El estudio de monitorización con sus respectivos resultados está en proceso de preparación y revisión, para su posterior publicación en una revista científica.

Referencias

- [1] M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, J. Sep. Sci. 34 (2011) 1091.
- [2] M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6994.
- [3] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5619.
- [4] E.J. Rosi-Marshall, D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, A. Paspalof, J.L. Tank, J. Hazard. Mat. 282 (2015) 18.
- [5] P. Verlicchi, E. Zambello, Sci. Total Environ. 538 (2015) 750.
- [6] P. Verlicchi, A. Galletti, M. Petrovic, D. Barceló, M. Al Aukidy, E. Zambello, Sci. Total Environ. 454–455 (2013) 411.
- [7] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, Environ. Int. 36 (2010) 75.

- [8] M. Gros, M. Petrović, A. Ginebreda, D. Barceló, *Environ. Internat.* 36 (2010) 15.
- [9] B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, *Water Res.* 72 (2015) 3.
- [10] M.J. Andrés-Costa, N. Rubio-López, M. Morales Suárez-Varela, Y. Pico, *Environ. Pollut.* 194 (2014) 152.
- [11] Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, Part II, (2003).
- [12] S. Castiglioni, K.V. Thomas, B. Kasprzyk-Hordern, L. Vandam, P. Griffiths, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 613.
- [13] A.L.N. van Nuijs, S. Castiglioni, I. Tarcomnicu, C. Postigo, M.L. de Alda, H. Neels, E. Zuccato, D. Barcelo, A. Covaci, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 3564.

***3.4.1. Contaminants of emerging concern: occurrence in
wastewater and sewage sludge, removal, sewage
epidemiology and environmental risk
assessment***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

CONTAMINANTS OF EMERGING CONCERN: OCCURRENCE IN WASTEWATER AND SEWAGE SLUDGE, REMOVAL, SEWAGE EPIDEMIOLOGY AND ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT

Paula Arbeláez, Francesc Borrull, Eva Pocurull, Rosa Maria Marcé

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Universitat
Rovira i Virgili, Sescelades Campus, Marcel·lí Domingo, s/n,
43007 Tarragona, Spain

Abstract

Personal care products, drugs of abuse and sedative hypnotics are among substances most consumed worldwide and they have emerged as organic contaminants because of their bioaccumulation, transformation and toxicity in the environment. The present manuscript reports the occurrence during one year of 10 personal care products, 9 drugs of abuse and 8 sedative hypnotics in wastewater and sewage sludge from 5 sewage treatment plants with different treatment process located in Catalonia. In addition the removal efficiencies, environmental risk assessment and sewage epidemiology were estimated. Target compounds were determined by solid-phase extraction or pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The most abundant compounds with 100% of detection frequency in wastewater influent samples were methyl paraben, propyl paraben, nicotine, phenobarbital and carbamazepine with mean concentrations ranging from 135 to 8478 ng/L. While the highest concentrations in wastewater effluents were for 2,4-dihydroxybenzophenone, benzophenone-3, nicotine, codeine, carbamazepine and pentobarbital with mean concentrations ranging from 46 to 2015 ng/L. The compounds frequently detected with the highest median concentrations in sewage sludge were octocrylene (10196 µg/kg dry weight (d.w.)), nicotine (156.8 µg/kg (d.w.)), carbamazepine (18.3 µg/kg (d.w.)) and pentobarbital (75.3 µg/kg (d.w.)). Removal efficiencies for some of compounds varied depending on the treatment process applied at the different sewage treatment plants under study. Propyl paraben,

nicotine, 6-acetyl morphine, bezoilecgonine and cocaine showed the highest removal rates between 70 and 100%. Hazard quotients for benzophenone-3, EDDP and barbital indicated an environmental risk to aquatic organisms arising from wastewater effluent, whereas compounds such as methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben, octocrilene, EDDP, methadone, pentobarbital and nordiazepam indicated an environmental risk to terrestrial organism arising from sewage sludge. Sewage epidemiology back-calculation showed the consumption of codeína, cocaína, metadona and heroin with a maximum consumption of 278, 459, 373 and 178 mg/day per 1000 inhabitants, respectively.

Keywords: *Emerging contaminants, PCPs, drugs of abuse, sedative hypnotics, monitoring, wastewater, sewage sludge, risk assessment, sewage epidemiology.*

1. INTRODUCTION

Over time, the presence of emerging contaminants in the environment is increasing as a consequence of anthropogenic activities carried out in our everyday life. Emerging contaminants are being released into the environment mainly through effluent and sludge from sewage treatment plants (STPs), and consequently they have been detected in surface water, ground water, air, sediment, soil, food and biota [1].

Removal rate of emerging contaminants in STPs depends on several factors such as physicochemical properties of the contaminant, sewage matrix, level of treatment applied, hydraulic retention time, pH, temperature, among others. Some contaminants pass through STPs with only a minor reduction in concentrations even after advanced wastewater treatment is applied [2]. Others are removed from water but remain in the treated sewage sludge produced as a result of the wastewater treatment [3].

In general, emerging contaminants have biological activity, lipophilic nature, and resistance to biodegradation and hence they are bio accumulated and

persistent in the environment [4, 5].

Impact of the emerging contaminants on the environment is nearly always negative with effects such as acute and chronic toxicity to aquatic and terrestrial organisms, losses of habitats and biodiversity, as well as threats to human health. For instance, recent research has demonstrated that pharmaceuticals and personal care products (PCPs), which are the group of emerging contaminants the present study has been focused on, have the potential to influence ecosystem functions such as primary production and microbial respiration and invertebrate secondary production [6]. Likewise, drugs of abuse such as cocaine and its metabolites can cause DNA damage, inactivation of defensive compounds and oxidative stress. Exposure of the aquatic mussel *Elliptio complanata* to morphine resulted in physiological changes in tissues (e.g. reduced serotonin and increased dopamine) and may be indicative of inducing a "relaxation state". In addition, *Drosophila melanogaster* displays the same responses to cocaine exposure as humans and rats, with increased multiple reflexive motor responses [6].

Therefore, it is important to evaluate the potential impact of contaminants on the environment through environmental risk assessment approaches. It is worth nothing that in sludge and air less attention has been placed on determining the toxicity of contaminants to exposed terrestrial organisms. The technical guidance document on risk assessment by European Commission [7] suggests the following approaches for risk assessment: first, the quantitative risk quotient (RQ) estimation from predicted or measured environmental concentration (PEC or MEC) and predicted no effect concentration (PNEC), second the qualitative approach for those contaminants where a quantitative assessment of the exposure and/or effects is not possible and third the persistent, bioaccumulation, toxicity (PBT) assessment of contaminants identified as persistent in the environment, accumulate in biota and be toxic combined with an evaluation of sources and major emissions [7].

Personal care products (PCPs), sedative hypnotics and drugs of abuse are among emerging contaminants that attract a broad scientific interest, because of frequent occurrence and negative

effects, as was mentioned above, once they are excreted or discharged [8]. In this context, several studies have confirmed the occurrence of these three groups of contaminants in the different environmental compartments, with levels up to thousands of ng/L in aquatic environmental samples [1, 6, 9-11] and hundreds of µg/kg in sewage sludge [11, 12]. PCPs such as benzophenone-3 [13] and triclosan [14] have been frequently detected in wastewater effluent at concentrations (541 ng/L and 452 ng/L, respectively) that entails a significant risk to aquatic organisms with RQ values reported greater than 1.

Drugs of abuse have been found in the aquatic environment at high levels of ng/L [15-18]. Pedrouzo et al. [16] found benzoylecgonine (metabolite of cocaine) as the maximum concentration up 3336 ng/L over other drugs of abuse determined in wastewater influent from STPs of Spain. Sometimes their concentration (parent compounds or metabolites) in wastewater influent has been used to estimate drug consumption at a community level [18-20]; this approach is now referred to sewage epidemiology which the mass loads is back-calculated with

knowledge of the drug metabolism and excretion patterns [21].

Regarding environmental legislation, a broad range of inorganic and organic contaminants are controlled in surface waters by legislation outline by the European Commission [22]. However, legislation is expected to broaden to encompass a greater number of municipal contaminants following the recent proposal of the pharmaceuticals 17 β -estradiol (E2), 17 α -ethinyles-tradiol (EE2) and diclofenac as priority hazardous substances [9, 23].

The objectives of the present paper is (i) to monitor during 1 year the occurrence of PCPs (preservatives, UV filters and antimicrobials), nicotine, drugs of abuse and some of their metabolites and sedative hypnotics (benzodiazepines and barbiturates) in wastewater and sewage sludge from five STPs, (ii) to estimate the removal efficiencies of each STPs, which have different treatment levels, (iii) to estimate the possible ecological risk posed by these contaminants to different aquatic and terrestrial organisms, and (iv) to estimate drug consumption at the community level.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents and standards

Information supplier of reagents, standards and stock solutions preparations can be found in the supplementary information (section 1). Three mixed working solutions (PCPs, drugs of abuse and sedative hypnotics) were prepared in order to carry out the determination by the different analytical methods previously developed in our research group [16, 24-28]. Table 1 shows the compounds of each group under study and some of their physicochemical properties.

2.2. Sampling and sample pre-treatment

Wastewater and sewage sludge samples were collected from five STPs in Catalonia (Spain) located in Tarragona (STP 1), Reus (STP 2), Blanes (STP 3), Castell-Platja d'Aro (STP 4) and Palamós (STP 5). Table 2 summarizes the main characteristics of the STPs monitored. These STPs receive mostly urban wastewater and some industrial discharges. All of them use biological treatment with activate

Table 1. Physicochemical properties of the target compounds (Chemical book,2014; ChemSpider 2014; DrugBank, 2015).

Compound	Abbreviation	Log K _{ow}	Sw (mg/L)	Log K _{oc}
PCPs				
Methylparaben	MPB	1,97	2500	2,09
Ethylparaben	EPB	2,4	885	2,36
Propylparaben	PPB	2,9	500	2,63
2,4-Dihydroxybenzophenone	DHB	2,96	235	3,46
2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone	DHMB	3,82	162	3,32
Benzylparaben	BPB	3,7	122	3,7
Benzophenone-3	BP-3	3,52	192	3,1
Triclocarban	TCC	4,9	0,023	3,73
Triclosan	TCS	4,66	10	4,26
Octocrylene	OC	6,88	0,0038	5,6
Drugs of abuse				
Nicotine	NIC	0,99	1E 006	3,37
Morphine	MOR	0,71	200	3,47
Dihidrocodeine	DIH	1,49	6712	3,11
Codeine	COD	1,27	9000	3,11
6-acetyl morphine	6-AM	1,94	1888	4,42
Benzoylcegonine	BE	-1,31	1605	2,54
Cocaine	COC	2,1	1800	3,2
2-ethylidene-1,5 dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine	EDDP	4,9	10,24	5,6
methadone	MET	4,1	39,06	4,8
Sedative hypnotics				
Barbital	BT	0,6	7460	1,3
Phenobarbital	PNB	1,3	1110	2,39
Bromazepam	BMZ	2,05	175	3,9
Carbamazepine	CBZ	2,25	112	3,5
Pentobarbital	PTB	2,004	679	2,05
Secobarbital	SCB	2,35	550	2,32
Diazepam	DZP	2,7	50	4,05
Nordiazepam	NDZ	2,8	5,02	4,38

Log K_{ow}, octanol-water coefficient; **Sw**, water solubility; **Log K_{oc}**, soil adsorption coefficient

sludge and the anaerobic digestion except for STP 4 which apply aerobic digestion. Additionally, STPs 3, 4 and 5 apply a tertiary treatment, which encompasses coagulation, flocculation, filtration and disinfection with UV and chlorination.

After wastewater treatment, the water is discharged into the Francolí river (STP 1), the Tordera river (STP 3), Ridaura river (STP 4) and Mediterranean sea (STP 2 and 5). Furthermore part of treated water is used for irrigation of agricultural land and golf courses as well as for industrial and municipal uses [29].

Moreover, sewage sludge is subjected to anaerobic digestion and then dehydrated. Dehydrated sludge is post-treated in a composting plant or it is directly apply to agriculture [29].

Influent, effluent wastewater and sludge samples were collected from STP 1 and STP 2 every two months between October 2011 and October 2012. Samples from STP 3 (after primary, secondary and tertiary treatments) were collected on October 2011, December 2011, May 2012 and July 2012. Samples from SPT 4 and 5 were collected on October

2011, December 2011 and May 2012.

All samples were collected by using pre-cleaned amber glass bottles and stored at -20 °C until analysis. Wastewater samples were centrifuged at 9.000 rpm for 7 min (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) and then filtered using 0.22 µm nylon filter (Whatman, Maidstone, UK).

Sewage sludge samples were lyophilized before being analysed using the freeze-dry system (Labconco). They were then homogenized with a mortar and pestle and sieved to obtain particles with a diameter less than 125 µm.

2.3. Analytical methods

Analysis were performed following previously reported validated analytical methods for the determination of PCPs in wastewater [25] and sludge [24], drugs of abuse in wastewater [16] and sludge [26] and sedative hypnotics in wastewater [28] and sludge [27].

The analytical methods are based on solid-phase extraction (SPE) or pressurized liquid extraction (PLE) followed by liquid chromatography -(electrospray)-

Table 2. Main characteristics of the STPs monitored.

STP	Population served	Mean flow (m ³ /day)	Wastewater treatment			Discharging points	Sludge	
			Primary	Secondary	Tertiary		Dewatering Sludge	Final disposal
Tarragona (STP 1)	175000	25571	settling	Activated sludge		Francolí river	centrifugal	gardening farming
Reus (STP 2)	195833	17714	settling	Activated sludge		Barrancde mas calbó	filter presses	Farming
Bianes (STP 3)	109985	10250	settling	Activated sludge	Ultraviolet Chlorination	Tordera river mediterranea sea	centrifugal	gardening
Castell-platja d'aro (STP 4)	175000	14667	settling	Activated sludge	Chlorination	Ridaura river mediterranean sea	centrifugal	gardening
Palamós (STP 5)	165450	17833	settling	Activated sludge	Chlorination	mediterranean sea	centrifugal	farming

tandem mass spectrometry (LC-(ESI)MS/MS). Optimal parameters of SPE, PLE and LC-(ESI)MS/MS are provided in the supporting information (Section 2).

2.4. Quality control and quality assurance

To ensure the quality of results, every batch of 10 samples, a spiked quality control sample, spiked matrix quality control sample and blank sample were analysed. Spiked quality control sample involved spiking ultra-pure water (100 or 250 mL depending on sample) with target compounds. Spiked matrix quality control involved spiking 100 mL of influent or 250 mL of effluent wastewater or 1 g of sewage sludge with target compounds. Blank sample was ultra-pure water without target compounds. Deuterated compounds (used as surrogates in same method) were also added into quality control samples (spiked ultra-pure water, spiked matrix sample and blank samples) when drugs of abuse were determined. All quality control samples were analysed in the same way as the environmental samples by the corresponding method.

Matrix-matched calibration curves were used to quantify the target compounds. In the case of the drugs of abuse they were quantified with matrix-matched calibration curves and deuterated compounds.

Identification of compounds and confirmation results criteria were conducted in accordance with the requirements stipulated in Commission Decision 2002/657/EC [30].

All methods were re-validated in influent, effluent wastewater and sewage sludge as was described in previously studies [16, 26-28]. All methods were twice re-validated according to the matrix origin, thus, a re-validation was carried out with a composition of samples from STP 1 and STP 2 which applied secondary treatment, and other re-validation was carried out with a composition of samples from STP 3- STP 5 which applied tertiary treatment.

Linear range, extraction recoveries, reproducibility between days (expressed as relative standard deviations (%RSD), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were evaluated. Validation data for each compound are given in supplementary information (Table S3 and S4).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Occurrence and detection frequency

3.1.1 Wastewater

Table 3 summarises the maximum, minimum, mean concentration and detection frequency of each compound in the different analysed samples, which were collected during one year as was mentioned in the section 2.2 from five different STPs located in Catalonia. PCPs such as MPB, EPB, PPB, DHB, BP-3 and TCC were always detected in all of the analysed influent wastewater samples. Among this group, MPB was the compound with the highest maximum concentrations between 1125 ng/L (STP 4) and 6978 ng/L (STP 3) in all of the STPs studied, whereas TCC was the compound with the lowest maximum concentrations between lower of limit of quantification (<LOQ) (STP 1 and 2) and 900 ng/L (STP 4). High levels of MPB are not surprising since it is the most commonly used PCP in cosmetics and is typically co-applied to increase preservative effects [4]. DHMB was only

present in the STPs 1 and STP 5 with a frequency of 43% and 67%, respectively and this compound reached a maximum concentration of 9.7 ng/L in STP 1 and 5.0 ng/L in STP 5. OC was not found in any analysed samples.

In effluent wastewater, MPB, PPB and BP-3 were detected in all of the samples analysed from all STPs except in samples from STP 4 wherein detection frequency for these compounds was 67%. Worth noting that STP 4 and 5 are equipped with tertiary treatment. BP-3 showed the highest maximum concentrations ranging from 125.1 ng/L (STP 1) to 666.8 ng/L (STP 3). EPB maximum concentrations were between 9.7 ng/L (STP 1) and 110.7 ng/L (STP 3) with 100% of detection frequency except in STP 1 where EPB was detected in 43% of the samples. DHMB and TCS were infrequently detected at <LOQ, in the case of DHMB only was detected in 14% of the samples from STP 1, and in the case of TCS was detected in 57 % of the samples from STP 1 and STP 2. Concentration levels in both influent and effluent wastewater of some PCPs such as MPB, EPB and TCC are in agreement with a previous study [25],

Table 3. Concentration levels (Maximum, minimum and mean) and detection frequency %.

Compound	TARRAGONA STP 1											
	INFLUENT ng/L						EFFLUENT ng/L					
	MAX	MIN	MEAN	D.F.%	MAX	MIN	MEAN	D.F.%	MAX	MIN	MEAN	D.F.%
PCBs												
MPB	3857.5	3.6	871.1	100	3.2	< LOQ	0.8	100	1038.0	554.5	777.6	100
EPB	992.6	6.7	506.2	100	9.7	3.2	6.9	43	50.3	29.4	39.5	100
PPB	4678.3	30.4	2542.9	100	53.9	< LOQ	10.4	100	276.2	153.4	212.3	100
DHB	401.9	35.9	332.7	100	184.2	< LOQ	39.4	100	96.7	7.8	56.2	100
DHMB	9.7	n.d	3.3	43	< LOQ	< LOQ	< LOQ	14	n.d	n.d	n.d	0
BPB	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BP-3	453.2	> LOQ	188.1	100	125.1	< LOQ	46.6	100	210.4	51.8	122.6	100
TCC	< LOQ	< LOQ	< LOQ	100	< LOQ	< LOQ	< LOQ	100	n.d	n.d	n.d	0
TCS	< LOQ	< LOQ	< LOQ	57	< LOQ	< LOQ	< LOQ	57	n.d	n.d	n.d	0
OC	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	17752.7	209.0	5120.2	100
Drugs of abuse												
NIC	14353	1300.7	6185.1	100	128.6	60.4	82.9	100	66.3	47.3	56.7	100
MOR	180.9	121.9	147.9	100	204.1	< LOQ	97.3	57	n.d	n.d	n.d	0
DIH	30.4	25	27.7	28	< LOQ	< LOQ	< LOQ	57	n.d	n.d	n.d	0
COD	595.8	137.5	385.1	100	382.4	60.9	227.8	100	30.4	11.0	18.2	100
6-AM	46.9	< LOQ	14	86	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BE	3536.5	1193.0	1948.9	100	184.2	26.7	64.0	100	18.4	9.3	13.9	100
COC	692.1	155.1	288.1	100	157.8	5.4	26.0	100	6.1	1.4	3.4	100
EDDP	136.3	88.1	110.9	57	111.8	45.6	74.2	100	61.0	23.0	43.3	100
MET	103.6	18.9	49.7	100	124.8	21.2	53.7	100	112.7	11.9	46.9	100
Sedative hypnotics												
BT	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
PNB	435.2	131.1	276.6	100	296.6	110.9	204.1	100	n.d	n.d	n.d	0
BMZ	144.1	44.8	79.0	100	54.6	11.5	32.9	100	5.7	3.5	4.1	100
CBZ	3143.1	1143.9	2156.3	100	2382.8	1114	2015.1	100	24.2	7.9	18.3	100
PTB	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
SCB	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
DZP	81.5	41.4	60.4	100	128.3	52.9	82.9	100	4.6	2.8	3.2	100
NDZ	130.4	42.6	85.2	100	33.7	9.4	21.2	100	8.1	4.1	4.3	100

Table 3. (Cont.)

Compound	REUS STP 2											
	INFLUENT ng/L				EFFLUENT ng/L				SLUDGE µg/Kg			
	MAX	MIN	MEAN	D.F.%	MAX	MIN	MEAN	D.F.%	MAX	MIN	MEAN	D.F.%
PCPs												
MPB	2195.2	18.9	476.8	100	0.6	<LOQ	0.1	100	1449.5	618.2	1075.2	100
EPB	571.8	27.2	260.2	100	11.2	<LOQ	4.4	100	97.0	25.9	50.3	100
PPB	3271.8	218.9	1693	100	17.3	0.1	3.6	100	160.9	112.7	143.4	100
DHB	800.6	8.1	353.4	100	600	<LOQ	260.4	100	98.4	8.9	47.3	100
DHMB	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BPB	<LOQ	<LOQ	<LOQ	28	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BP-3	1667.7	>LOQ	778.2	100	150	<LOQ	61.4	100	117.3	58.8	81.2	100
TCC	<LOQ	<LOQ	<LOQ	43	<LOQ	<LOQ	<LOQ	43	n.d	n.d	n.d	0
TCS	<LOQ	<LOQ	<LOQ	57	<LOQ	<LOQ	<LOQ	57	n.d	n.d	n.d	0
OC	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	19592.4	322.1	8508.1	100
Drugs of abuse												
NIC	22789.8	1652.35	7286	100	327	96.9	204.6	100	188.0	70.9	156.8	100
MOR	243.1	92.1986	168.8	100	351	84.2	236.8	86	n.d	n.d	n.d	0
DIH	26.5	21.7	24.6	43	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
COD	510.1	142.6	330.9	100	484	230.8	357.6	100	38.0	25.2	30.3	100
6-AM	68.4	>LOQ	19.8	100	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BE	5086.5	1217.12	3043	100	494	199.7	349.4	100	9.3	8	8.8	100
COC	850.9	89.3	83.5	100	160	10.7	55.9	100	3.2	0.5	1.6	100
EDDP	107.9	57.5	83.5	100	103	29.9	66.9	100	109.2	52.4	79.8	100
MET	193.3	40.6	95.6	100	125	12.1	50.5	100	84.6	23.3	48.7	100
Sedative hypnotics												
BT	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
PNB	431.7	72.7	292.5	100	284	170.7	214.3	100	n.d	n.d	n.d	0
BMZ	128.1	31.3	69.46	100	32.9	15.6	25.35	100	6.9	1.7	2.0	100
CBZ	45665	1801.1	8478	100	2900	84	1918	100	18.9	8.6	12.7	100
PTB	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
SCB	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
DZP	131.3	46.1	90	100	167	53.1	112.7	100	4.6	>LOQ	3.0	100
NDZ	115.5	53.6	82.53	100	42.3	18.7	34.03	100	8.9	2.8	8.5	100

Table 3. (Cont.)

Compound	BLANES STP 3											
	INFLUENT ng/L				EFFLUENT ng/L				SLUDGE µg/Kg			
	MAX	MIN	MEAN	D.F.%	MAX	MIN	MEAN	D.F.%	MAX	MIN	MEAN	D.F.%
PCPs												
MPB	6978.2	355.6	3833.3	100	78.2	28.3	55.914	100	4663.6	2140.8	3210.3	100
EPB	1431.8	322.7	837.8	100	110.7	31.2	55.564	100	48.7	33.9	40.8	100
PPB	4770.9	1177.6	3141.2	100	43.7	12.6	28.206	100	202.5	120.6	171.2	100
DHB	2724.8	787.9	1643.3	100	68.8	27.5	48.266	100	42.4	5.2	18.4	100
DHMB	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BPB	7.4	5.3	6.3	50	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BP-3	2853.9	1477.1	2223.8	100	666.8	298.5	533.75	100	141.9	22.3	89.2	100
TCC	459.9	364.1	428.0	100	299	<LOQ	178.51	100	n.d	n.d	n.d	0
TCS	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
OC	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	8850.3	64.3	4777.6	75
Drugs of abuse												
NIC	5744.2	674.0	2877.5	100	494.6	79.0	194.5	100	2.8	1	1.9	50
MOR	118.9	45.8	69.8	100	14.9	8.7	13.1	100	n.d	n.d	n.d	0
DIH	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
COD	268.2	129.4	203.1	100	212.6	63.8	139.6	100	n.d	n.d	n.d	0
6-AM	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BE	2283.5	898.5	1411.3	100	21.7	10.3	16.5	100	1.2	0.5	0.9	100
COC	230.8	62.6	139.7	100	6.9	0.6	3.8	50	1.6	1.3	1.4	100
EDDP	48.3	28.0	40.0	100	70.7	44.5	57.2	100	71.5	4.1	34.4	100
MET	74.7	38.0	54.5	100	62.9	22.2	38.2	100	31.5	2.3	11.4	100
Sedative hypnotics												
BT	n.d	n.d	n.d	0	119.5	60.8	82.049	100	n.d	n.d	n.d	0
PNB	177.5	134.6	146.6	100	197.3	165.5	178.4	100	n.d	n.d	n.d	0
BMZ	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	0.6	0.6	0.6	50
CBZ	329.8	117.9	225.1	100	292.7	226.8	270.7	100	0.5	0.5	0.5	100
PTB	22.0	20.0	21.0	50	n.d	n.d	n.d	0	115.9	47.8	75.3	100
SCB	56.3	49.4	52.72	100	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
DZP	12.7	9.2	10.4	100	7.0	5.6	6.4	100	1.4	1.1	1.2	100
NDZ	35.5	31.4	30.2	100	67.9	50.3	57.8	100	1.7	1.2	1.4	100

Table 3. (Cont.)

Compound	CASTELL PLATJA D'ARO STP4															
	INFLUENT ng/L				EFFLUENT ng/L				TERTIARY ng/L				SLUDGE µg/Kg			
	MAX	MIN	MEAN	D.F.%	MAX	MIN	MEAN	D.F.%	MAX	MIN	MEAN	D.F.%	MAX	MIN	MEAN	D.F.%
PCPS																
MPB	1258.3	309.8	716.8	100	368.5	25.8	148.0	100	46.1	32.4	39.3	67	4557.6	1920.3	3270.1	100
EPB	676.9	470.8	600.2	100	18.2	7.829	12.4	100	21.5	14.8	18.1	67	58.8	45.4	52.9	100
PPB	3114.5	2144.1	2495.4	100	74.8	11.1	36.4	100	27.1	21.0	24.0	67	171.8	109.5	139.4	100
DHB	2670.2	582.8	1796.7	100	76.2	29.4	46.2	100	47.9	47.9	47.9	33	146.6	2.4	52.6	100
DHMB	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	38.9	38.9	38.9	33
BPB	10.8	10.8	10.8	33	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
BP-3	2166.2	1812.4	2046.1	100	2180	408.7	1008.3	100	523.6	458.8	491.2	67	79.9	62.4	73.0	100
TCC	900.9	459.9	702.8	100	337.4	337.4	360.4	67	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
TCS	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
OC	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	9293.0	393.0	4243.6	100
Drugs of abuse																
NIC	7078.9	778.6	4630.3	100	179.4	54.8	111.8	100	161.8	58.3	110.1	100	8.0	2.3	4.9	100
MOR	63.7	<LOQ	36.6	100	7.6	3.0	5.3	67	7.9	0.8	4.4	100	n.d.	n.d.	n.d.	0
DIH	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
COD	208.5	53.2	112.5	100	175.1	62.0	105.3	100	169.5	52.7	111.1	100	28.1	21.9	25.6	100
6-AM	29.4	18.3	23.85	67	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
BE	2459.3	644.1	1306.5	100	107.6	12.1	54.5	100	87.5	45.2	66.4	100	2.4	0.9	1.4	100
COC	136.7	111.3	124.9	100	0.9	0.6	0.8	67	2.8	<LOQ	2.8	100	6.6	3.8	4.9	100
EDDP	24.3	5.6	14.733	100	17.4	7.9	12.9	100	23.9	<LOQ	11.9	100	21.9	4.1	11.2	100
MET	30.1	12.8	21.7	100	7.4	1.8	4.3	100	19.5	1.0	10.3	100	2.2	0.8	1.3	100
Sedative hypnotics																
BT	n.d.	n.d.	n.d.	0	99.2	50.2	114.9	66	71.9	71.9	71.9	33	n.d.	n.d.	n.d.	0
PNB	164.7	116.9	135.9	100	154.1	75.6	123.3	100	129.4	117.2	123.3	100	n.d.	n.d.	n.d.	0
BMZ	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	1.3	0.9	1.0	100
CBZ	155.8	62.3	104.8	100	294.1	79.0	183.8	100	179.8	152.4	166.1	100	0.6	0.5	0.6	100
PTB	28.6	28.6	28.6	33	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	26.1	8.5	15.6	100
SCB	53.7	45.8	49.75	66	n.d.	n.d.	n.d.	0	11.6	11.6	11.6	33	n.d.	n.d.	n.d.	0
DZP	8.7	5.3	7.4	100	13.3	2.0	6.8	100	4.5	4.3	4.4	100	2.1	0.6	1.2	100
NDZ	24.1	17.5	19.9	100	45.1	14.4	32.9	100	42.8	25.3	34.1	100	3.4	2.6	3.0	100

Table 3. (Cont.)

Compound	PALAMÓS STP 5															
	INFLUENT ng/L				EFFLUENT ng/L				TERTIARY ng/L				SLUDGE µg/Kg			
	MAX	MIN	MEAN	D.F. %	MAX	MIN	MEAN	D.F. %	MAX	MIN	MEAN	D.F. %	MAX	MIN	MEAN	D.F. %
PCPs																
MPB	1125	116.4	492.2	100	72.3	34.1	46.8	100	47.8	38.7	43.3	100	6148.3	3209.6	4359.4	100
EPB	696.7	53.6	286.7	100	20.5	13.5	16.0	100	18.2	17.4	17.8	100	60.2	47.8	49.2	100
PPB	1545.4	68.2	1036.2	100	34.8	18.6	26.3	100	20.3	20.3	20.3	100	203.9	110.0	172.4	100
DHB	862.0	510.5	708.8	100	355.2	37.7	154.4	100	n.d	n.d	n.d	0	16.5	15.1	15.9	100
DHMB	5.0	4.6	4.8	67	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BPB	48.1	16.4	32.3	67	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BP-3	1939.0	1094.4	1538	100	488.8	185.8	374.4	100	309.5	230.7	270.1	100	92.8	74.2	74.4	100
TCC	440.8	268.2	354.5	67	383.4	184.0	283.7	67	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
TCS	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
OC	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	13003.6	8713.4	10196.7	100
Drugs of abuse																
NIC	5338.6	623.48	2957.6	100	199.0	70.0	131.6	100	165.7	57.9	111.8	100	2.3	0.5	1.2	100
MOR	52.4	24.792	39.3	100	24.7	5.6	12.1	100	n.d	n.d	n.d	0	7.1	7.1	7.1	33
DIH	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
COD	255.4	106.7	173.7	100	243.8	128.1	186.1	100	155.9	11.6	83.8	100	19.0	15.5	17.3	67
6-AM	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
BE	1450	140.5	879.9	100	95.9	23.5	64.1	100	133.8	42.3	88.1	100	21.0	3.8	13.7	100
COC	146.4	24.27	67.8	100	0.9	0.5	0.7	67	n.d	n.d	n.d	0	5.9	2.5	3.7	100
EDDP	25.5	16.139	19.9	100	28.4	10.2	20.2	100	4.1	<LOQ	2.1	100	20.4	9.5	13.2	100
MET	251.4	35.2	113.8	100	7.4	3.9	6.0	100	8.1	6.3	7.2	100	4.0	2.7	3.2	100
Sedative/hypnotics																
BT	n.d	n.d	n.d	0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	67	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0
PNB	232.1	153	181.9	100	141.5	96.5	116.5	100	145.2	144.2	144.7	100	n.d	n.d	n.d	0
BMZ	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	2.2	0.9	1.4	100
CBZ	212.5	111.2	152.9	100	181.1	122.4	144.9	100	184.1	178.0	181.1	100	1.1	0.6	0.9	100
PTB	25.5	25.5	25.4	33	n.d	n.d	n.d	0	n.d	n.d	n.d	0	20.3	6.9	12.2	100
SCB	57.3	52.9	55.1	67	n.d	n.d	n.d	0	15.3	15.3	15.3	33	n.d	n.d	n.d	0
DZP	15.6	10.2	13.2	100	4.4	3.6	4.1	100	13.3	4.0	8.7	100	0.8	0.7	0.8	100
NDZ	32.9	20.2	25.9	100	40.6	23.3	32.3	100	40.4	38.6	39.5	100	5.2	2.2	3.9	100

whereas other PCPs such as PPB, DHB and BP-3 concentration levels were lower than those reported in this study, between <LOQ (BP-3) and 1945 ng/L (PPB) in influent wastewater and between <LOQ (PPB, DHB and BP-3) and 100 ng/L (BP-3) [25]. Tsui et al. [13] found in influent wastewater BP-3 and DHB at concentrations up 577 ng/L and 281 ng/L, respectively. In effluent wastewater they reported concentrations up 541 ng/L for BP-3 and 155 ng/L for DHB [13]. Petrie et al. [9] discuss in their review that antimicrobials, sunscreen agents and preservatives are often observed in influent wastewater from UK at maximum concentrations from 306 ng/L (DHB) to 11601 ng/L (MPB) and in effluent wastewater from <1 (BPB) to 200 ng/L (TCS).

The abundance order of the parabens found in this study is in agreement with that recently reviewed by Haman et al. [31], where MPB and PPB have been the most abundant parabens reported in the literature, with values of up to 30000 ng/L and 20000 ng/L, respectively. EPB has been also consistently detected, but at lower concentration ranges, from a few ng/L to a few hundred ng/L. BPB

has been detected at very low frequencies and concentrations do not exceed several tens of ng/L [31].

Concerning drugs of abuse and their metabolites, similar tendency in concentration levels was observed in influent wastewater samples from the five investigated STPs. NIC, MOR, COD, COC, BE and MET were detected in 100% of the analysed samples. EDDP was also detected in all influent samples except STP 1 which was detected in 57% of the samples. The higher concentrations correspond to NIC and BE at concentrations from 623.5 ng/L (STP 5) to 22789.8 ng/L (STP 2) and from 140.5 ng/L (STP 5) to 5086.5 ng/L (STP 2), respectively. In influent samples from STP 1 and STP 2 all drugs of abuse were present with DIH being the compound with lower detection frequency of 28% and 43%, respectively and at maximum concentration of 30.4 ng/L and 26.5 ng/L, respectively.

When effluent wastewater samples were analysed, 2 of the 9 drugs of abuse were not detected in any sample. These compounds were 6-AM and DIH (detected only in STP 1 in 57% of the samples). The most ubiquitous compounds were NIC, COD, BE,

EDDP and MET, present in 100% of the treated samples, followed by MOR and COC, whose detection frequency was variable in the different STPs under study. For example, COC was always detected in effluent samples from STP 1, STP 2 and STP 3, detected in 50% of the samples from STP 4 and not detected in any sample from STP 5. The most abundant compounds were NIC and COD with maximum concentrations ranging from 127 ng/L (STP 1) to 495 ng/L (STP 3) and from 175 ng/L (STP 4) to 484 ng/L (STP 2), respectively. For some drugs of abuse similar or even highest concentrations were found in the most of effluent samples than influent samples, such is the case of MOR, EDDP and MET.

Broadly speaking, the concentration levels observed in the present study are in the same order of those reported by other authors in Spain [16, 17, 32] and in Canada [18]. Among these studies, NIC was only reported by Pedrouzo et al. [16] at lower levels than in our study, with concentrations up to 1105 ng/L and 15 ng/L in influent and effluent wastewater, respectively. Likewise, in the studies by Barker in Czech Republic [19] and UK [33] different tendency

on concentrations was observed. Meanwhile, in Czech Republic [19] COC, BE, MOR and MET were found at concentrations much lower than in our study (between not detected (MOR) and 302 ng/L (BE)), in UK [33] COD, MOR, DIH and EDDP were found at higher concentrations, from 526 ng/L (DIH) to 2700 ng/L (COD) in influent wastewater.

As regards sedative hypnotics, CBZ 3 benzodiazepines and 4 barbiturates were evaluated. Benzodiazepines were most frequently found in influent wastewater than barbiturates. Although, CBZ as detected in all of the analysed samples, they were at highest concentrations in samples from STP 1 and STP 2. Thus, CBZ, being the compound most abundant in all samples, was found between 62.3 ng/L and 329.8 ng/L in influent samples from STPs 3, 4 and 5, whilst in samples from STPs 1 and 2 it was found between 1143 ng/L and 45665 ng/L. BMZ only was detected in samples from STP 1 and STP 2 at concentrations between 11.5 ng/L and 54.6 ng/L. Among barbiturates, FBT was widely present in influent samples from all of the STPs under study with the highest concentrations,

ranging from 72.7 ng/L to 435.2 ng/L. BT was not detected in any analysed samples and the rest of barbiturates (PTB and SCB) only were detected in samples from STPs 3, 4 and 5.

Generally, for most of sedative hypnotics similar or even higher concentrations were found in effluent than influent wastewater. This is the case of FBT, CBZ, DZP and NDZ. Also, we could observe the presence of BT in effluent samples from STPs 3, 4 and 5, which it was not detected in any sample of influent wastewater. Worth noting that BT was detected in 67% of secondary treatment samples from STP 5 at < LOQ, but in tertiary treatment samples it was no longer detected. PTB and SCB were not detected in any of analysed effluent samples.

Among sedative hypnotics, benzodiazepines (with special relevance to CBZ and DZP) are the compounds most extensively studied in different European countries as Spain [28, 34], UK [9], Czech Republic [19], Serbia [35], Greece [36] and Italy [37]. Drawing a comparison between the concentration levels of some of those studies and our study, they are in agreement with the levels found in the analysed samples from most of STPs

under investigation. For instance, the study of DZP and NDZ in Spain [34] and UK [9] reported similar concentrations ranging from <0.2 ng/L to 7.9 ng/L and from 5 ng/L to 25 ng/L, respectively, in influent wastewater and from 2.2 ng/L to 5.1 ng/L and from 5.8 ng/L to 9.9 ng/L, respectively, in effluent wastewater, values in agreement with our results from STP 3-STP 5. However these levels are far lower than our levels found in STP 1 and STP 2. Similar tendency was also observed for CBZ in the STPs from Italy [37] and Serbia [35], where the authors reported concentrations of up to 348 ng/L in both influent and effluent wastewater, being similar concentrations with STPs 3, 4 and 5 but lower than STP 1 and STP 2.

The other referred sedative hypnotic group, the barbiturates has been reported mostly as not detected [36, 38-40]. PTB and PNB are among barbiturates most studied and they have been only found in few studies at concentrations slightly lower than in the present study ranging from < LOQ and 210 ng/L in influent and effluent wastewater [36, 41], being the concentrations of PNB higher in effluent wastewater.

Although the four barbiturates under study were present in some of analysed samples, their absence in other studies is not surprising since, with the exception of some specific usages, barbiturates have been replaced by benzodiazepines and their usage is mainly as veterinary drugs [10].

3.1.2 Sewage sludge

The detection frequency, the mean and the concentration levels (maximum and minimum) of PCPs, drugs of abuse and sedative hypnotics in sewage sludge samples from the five STPs are summarized in Table 3. Worth noting that concentration levels found in sewage sludge, mainly depend on two factors: the concentration present in influent wastewater and the physic-chemical characteristics of compounds (water solubility and octanol-water partition coefficient ($\log k_{ow}$)) [42].

Among PCPs, three UV filters (DHB, BP-3 and OC) and three parabens (MPB, EPB and PPB) were detected in all the analysed samples from STP 1 to STP 5. Mostly, similar levels of mean, maximum and minimum concentrations of each compound was observed in all of the STPs,

although some compounds were found in a wide range of concentration in samples of the same STP. For example, OC was the compound with the highest maximum levels, being at concentrations ranging from 209.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 17752.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dry weight (d.w.) in sewage sludge samples from STP 1. This tendency and similar minimum and maximum concentrations were also observed for the rest of STPs, except for STP 5, where the range of concentrations was smaller, from 8713 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 13003 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.). Worth noting that OC was not detected in any of the analysed wastewater samples in this study. This behaviour was reported on previous papers where samples from STP 1 and STP 2 were also analysed, reporting OC in sewage sludge at concentrations ranging from 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 1842 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) [24], and it was not detected in wastewater [25].

Recently, Tsui et al. [13] confirm the low detection frequency (6%) of OC in wastewater samples from five STPs in Hong Kong, whereas other studies in Switzerland [43] and Spain [44] confirm its presence in sewage sludge at concentrations well comparable to our study between 320 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 18740 $\mu\text{g}/\text{kg}$

(d.w.) The relatively higher log K_{ow} value of OC (Table 1) likely explains its occurrence in the solid phase rather than aqueous phase, and also reflected by their high solid adsorption (log K_{oc}) and low water solubility (Table 1) [13].

The other two UV filters, DHB and BP-3 were found at concentrations ranging from 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (STP 4) to 98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 2) and from 22.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (STP 3) to 210 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 1), respectively, in the present study. BP-3 has been reported to occur in sewage sludge from Spain [24, 44] and Australia [45] at concentrations up to 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.), whilst DHB was neither detected on previous studies in Spain [24, 44] nor in China [46]. Parabens, MPB, EPB and PPB were found at concentrations up to 6148 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 5), 97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 2) and 276 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 1), respectively. These results show higher concentrations in sewage sludge compared to the concentrations in effluent wastewater. An explanation of this behaviour is the solubility of the compound and the values of log K_{ow} determining affinity to organic matter indicate that the possibility of accumulation of parabens in sludge increases

proportionally to chain length of alkyl substituent [42]. Several studies have reported the occurrence of parabens in sewage sludge, being MPB and PPB the parabens most detected at levels between 5-202 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) and 4-44 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.), respectively [24, 47, 48].

TCC and TCS were not detected in any of the analysed sludge samples, unlike others studies that reported concentrations up to 6930 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1188 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.), respectively [24, 48, 49].

Concerning drugs of abuse, the most ubiquitous were COC and MET as well as their corresponding metabolites BE and EDDP, which were detected in all sludge samples from the five STPs, followed by NIC and COD which were detected in most of the STPs. DIH and 6-AM were not detected in any sample and MOR only was infrequently detected in STP 5 (7.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.)). The low log K_{ow} value of MOR could indicate affinity to remain in the water as show the results from effluent wastewater. The most of compounds showed concentration levels varying in the samples from the different STPs, i.e. NIC and MET were found at maximum concentrations of 188 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 2) and 113 $\mu\text{g}/\text{kg}$

(d.w.) (STP 1), respectively, and these compounds were also found at low levels with maximum concentration of 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 4) and 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 5), respectively. EDDP was found at highest concentrations than their parent compound (MET) in all analysed samples, except in samples from STP 1 where concentrations were higher for MET. EDDP levels were between 4.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 3-4) and 109 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 2). COC was found at lower concentrations than their metabolite BE in most of analysed samples; both compounds presented the lowest concentration among the drugs of abuse under study between, 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (STP 2) and 6.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 4) for COC and between 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (STP 4) and 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 5) for BE. COD showed similar concentrations in all samples analysed from all STPs with a maximum concentration up to 38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 2), except in STP 3 where it was not detected. Little information about the occurrence of drugs of abuse in sewage sludge is available in the literature, the most abundant compounds reported have been MET and their main metabolite EDDP at concentrations ranging

from 6.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 111 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) and from 6.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 279 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.), respectively in sewage sludge samples from Spain [26, 50] and Croatia [51]. Secondly, the most abundant compounds reported were COC and BE at concentrations up to 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.), respectively [26, 50, 51], although these compounds were reported as not detected by Langford et al. in Scotland [52]. Although MOR and 6-AM has been evaluated in different studies [26, 50, 51], MOR only was detected by Senta et al. in Croatia at concentrations between 6.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) [51]. 6-AM metabolite of heroine (widely used as prescription or recreational) outwardly undergoes to degradation in wastewaters, and this could explain its absence in effluents wastewater and sludge [37].

As far as sedative hypnotics are concerned, the four benzodiazepines were detected in 100% of the analysed sewage sludge samples from all of the STPs. In addition, PTB was the only barbiturate detected in 100% of the samples from STP 3 to STP 5 and with the highest concentrations among the sedative hypnotics between 6.9

$\mu\text{g}/\text{kg}$ (STP 5) and $116 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 3). Levels of benzodiazepines were slightly higher in STP 1 and STP 2 than STPs 3, 4 and 5. Concentrations up to $6.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 2), $24.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 1), $4.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 2), and $8.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) (STP 2) were determined for BMZ, CBZ, NDZ and NDZ, respectively. In view of the results from influent, effluent wastewater and sludge we can observe that CBZ, DZP and NDZ passed through STPs most often unchanged, indicating low sorption to sludge.

In previous studies [50, 52-56], the presence of benzodiazepines in sewage sludge has been mainly related to the determination of CBZ and DZP. Three of these studies were carried out in sludge samples from STPs located in Spain [50, 53, 55]. CBZ was reported at concentrations from 1.43 to $13.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) and DZP was reported between $0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ and $8.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) Values of CBZ are similar to our results contrary to those found in sewage sludge from Scotland [52], Ireland [54] and Korea [56] at high concentrations ranging from 62 to $120 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) As already stated in the evidence, carbamazepine has been largely

investigated and concentration data are spread on a wide range of values, as highlighted in a recent review by Petrie et al. [9], who cited 7 publications reporting concentrations from $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ to $260 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) in sewage sludge. NDZ was found in Spain [27] and Korea [56] at levels well comparable to the present study between $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ and $8.7 \mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.).

A comparison about the occurrence of barbiturates in sewage sludge with other studies could not be established since information in this topic is limited to one study [27], where barbiturates investigated were not detected.

3.2 Removal efficiency

An estimation of removal efficiency of the target compounds from the aqueous phase was carried out for the five STPs investigated, which employ different treatment processes, e.g. secondary and tertiary treatments. Several factors can influence the removal efficiency in the STPs as compound characteristics: biodegradability, physicochemical properties, tendency to adsorb into activated sludge and volatilization. In addition the treatment processes

conditions such as: temperature, redox conditions (anaerobic, anoxic and aerobic conditions) pH, hydraulic retention time and sludge retention time [14, 57]. Removal efficiency was estimated as in previous studies [13, 58]: $((\text{influent concentration} - \text{effluent concentration}) / \text{influent concentration}) \times 100$.

Range of removal efficiencies of each compound in the different STPs under investigation are given in Figure 1a, 1b and 1c, all with their average removal efficiency. When a compound was detected in influent wastewater but not in the corresponding effluent wastewater, it was considered a 100% in elimination, and when a compound was detected at highest concentration in effluent wastewater than in influent wastewater was considered a 0% in elimination.

In general, removal efficiencies of each compound varied in the different STPs under study, therefore it is difficult to establish a trend for each one of the contaminants group, but in most of the cases, results indicate that elimination of most of the compounds is incomplete. As it can be seen in figures 1b and 1c, the STP 4 and STP 5 with tertiary treatment (chlorination) achieve

highest removal efficiencies rates for more compounds than other STPs. For example, removal efficiency of DHB, BPB, TCC, NIC, MOR, COC and PTB were between 90% and 100% in both SPTs. In addition other compounds such as DHMB and MET in the SPT 5 and MPB, EPB, PPB, 6-AM and BE in the STP 4 also showed high removal rates, although in the case of DHMB and 6-AM were rarely detected in influent wastewater at low concentrations and absent in effluent wastewater. Although, the rest of STPs sometimes presented high removal efficiency for some of the mentioned compounds above (mainly parabens), the removal efficiency range for those were wider between 40% and 100%. BP-3, MET, BMZ and SCB presented medium removal in most of the STPs, with mean removal efficiencies ranging from 73% (STP 3) to 78% (STP 5), from 40% (STP 1) to 65% (STP 4), from 54% (STP 1) to 59% (STP 2) and from 71% (STP 5) to 75% (STP 4), respectively. COD, EDDP, PNB, CBZ and DZP showed either poor or no elimination in all STPs investigated and these compounds presented sometime higher concentrations in effluents

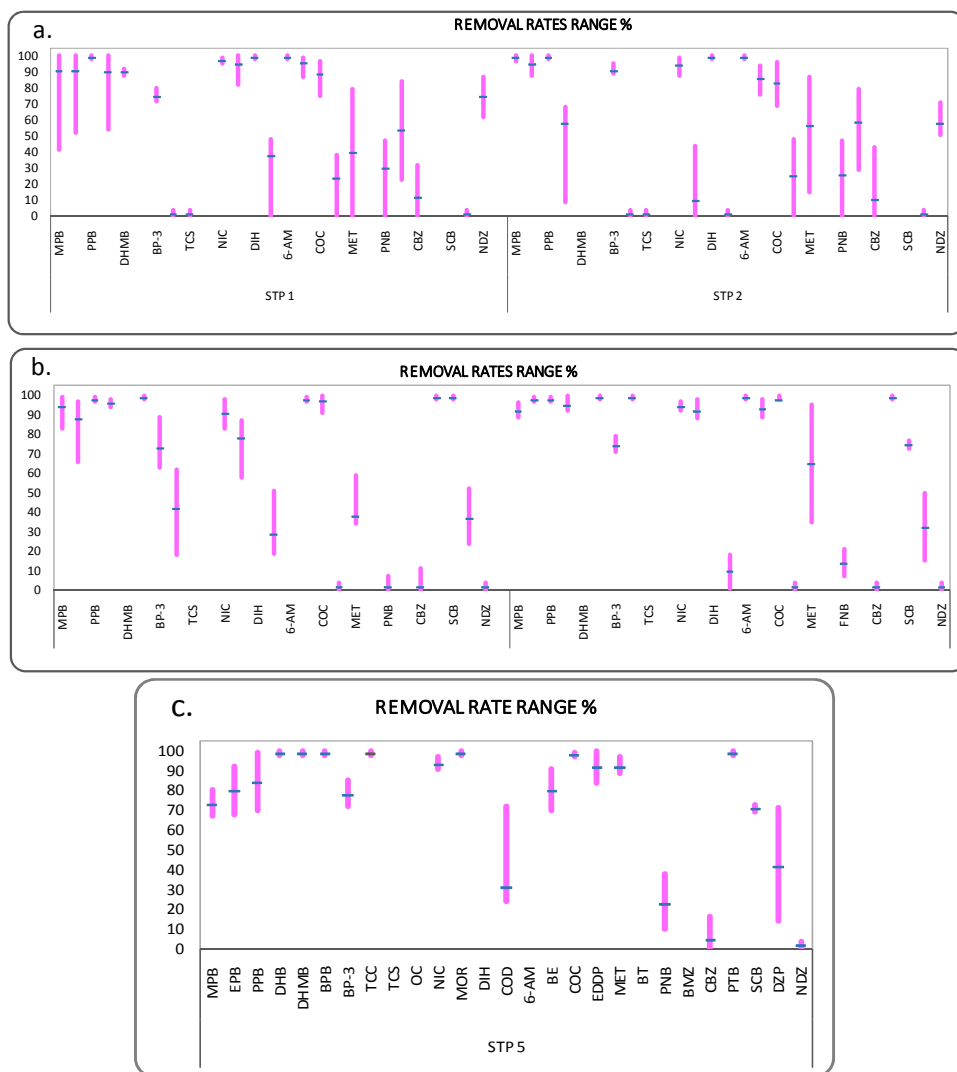


Figure 1. Removal efficiencies range %:
 (a). Removal efficiencies range % in STP 1 and STP 2.
 (b). Removal efficiencies range % in STP 3 and STP 4.
 (c). Removal efficiencies range % in STP 5.

wastewater, the maximum mean removal efficiencies were 38%, 24%, 30%, 12% (STP 1) and 40% (STP 3 – STP 5), respectively. Although NDZ presented

high mean removal efficiencies in STP 1 (75%) and STP 2 (58%), in the rest of STPs it was not removed.

In summary, ultraviolet/chlorination as tertiary treatment on the STPs 3-5 was quite effective to remove or archive highest removal efficiencies for more compounds than STP 1 and STP 2 with conventional activated sludge treatment. Mostly parabens and UV filters showed the best removal rates, whilst benzodiazepines showed the lowest removal rates in all of the investigated STPs.

These results are consistent with previous studies. Tsui et al. [13] and Liu et al. [45] reported removal efficiencies $\geq 60\%$ for some UV filters after secondary treatment. Concerning parabens, a STPs from China with UV disinfection presented similar removal efficiencies range of PPB and MPB as our study, between 63% and 98% and 81% and 91%, respectively [59]. On the other hand, sedative hypnotics such as CBZ and DZP have showed either poor or no elimination in previous studies [11, 57, 60]. Increased concentration of CBZ in effluent wastewater has been attributed to enzymatic processes during water treatment can cause the cleavage of its glucuronide conjugate and the consequent release in the effluent of the parent compound [57]. As to drugs of abuse,

greatly elimination of COC, BE and 6-AM after conventional activated sludge secondary treatment [32] and coagulation/flocculation tertiary treatment [17] have been reported in other studies.

3.3 Preliminary environmental risk assessment

Environmental risk analysis considers the risk to human health, welfare and ecosystems that are the result of adverse developmental impacts on the natural environment. For the purpose of risk assessment, different environmental compartments are treated somewhat separately, often with an emphasis on the aquatic and terrestrial environments [7]. The potential environmental risks of the detected target compounds in each STP under study were assessed based on the risk quotient calculated according to the Technical Guidance Document on Risk Assessment from the European Commission [7].

Hazard quotient results should be taken with caution. The exposure data used for the calculation are based on a punctual sampling event, and even though they represent the reality of the

sampling moment they do not give a real picture of the long-term exposure of organisms present in the ecosystems.

3.3.1 Risk quotient estimated in effluent wastewater

Risk quotients for aquatic organisms were calculated from the measured environmental concentration (MEC) and the predicted no effect concentration (PNEC) of the target compounds. MEC corresponds to the concentration found in effluent wastewater. PNEC is the concentration for which no adverse effect is suspected to occur. PNEC is calculated using toxicity test data available of either half maximal effective concentration (EC_{50}), half maximal lethal concentration (LC_{50}), no observed effect concentration (NOEC) or lowest observed effect concentration (LOEC) and dividing it by an appropriate assessment factor. Toxicity data (Table S5) were obtained from literature on aquatic organism at different trophic level including algae, crustaceans and fish. When no experimental data were available, toxicity data were estimated with the Ecological Structure Activity Relationships (ECOSAR) [7]. An

assessment factor of 10, 50 or 1000 was applied if was used NOEC, LOEC or EC_{50}/LC_{50} , respectively [58]. In order to assess the worst-case scenario, the highest MECs of each compound in each STP and the lowest toxicity test data of the aquatic organism were applied in the risk quotient calculation [14, 17, 58]. The concentration that was below the LOQ was substituted with $\frac{1}{2}$ LOQ for MECs.

Ecological risk were classified according to Tsui et al. [13] in which hazard quotient < 0.01 : “Unlikely to pose risk” (Figure 2a); $0.01 \leq$ hazard quotient < 0.1 : “Low risk” (Figure 2b); $0.1 \leq$ hazard quotient < 1 : “Medium risk (Figure 2c)” and hazard quotient ≥ 1 : “High risk” (Figure 2d). Results indicate that no risk or low risk could be associated to the presence of parabens, benzodiazepines and drugs of abuse (except MET and EDDP) in most of SPTs. These results are consistent with those reported in previous studies, where CBZ, DZP [57, 60] and BE [17] did not present risk to algae, daphnids or fish. The hazard quotients of DHB (STP 2), TCC (STP 1-2), TCS (STP 1-2), EDDP (STP 4-5), MET (STP1-4), PBT (STP 1-5) and

SCB (STP 4-5) showed medium risk. Unlike TCS has been reported with hazard quotients >1 , indicating high risk mainly to algae [14]. Moreover, high risk to

aquatic organisms could be observed of BP-3 (STP 1-5), EDDP (STP 1-3) and BT (STP 3-4) in the present study.

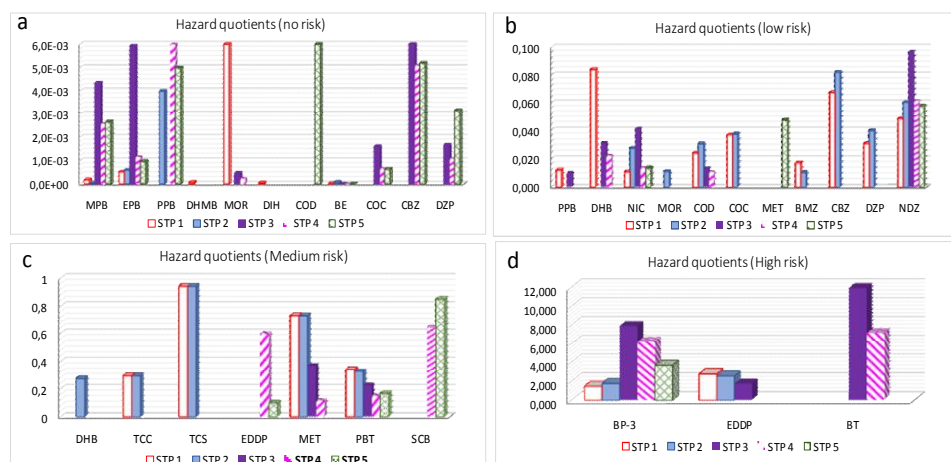


Figure 2. Environmental risk assessment for aquatic organisms:
 (a). Hazard quotient < 0.01 , not risk.
 (b). $0.01 \leq$ Hazard quotient < 0.1 , low risk.
 (c). $0.1 \leq$ Hazard quotient < 1 , medium risk;
 (d). Hazard quotient ≥ 1 , high risk.

Preliminary environmental risk assessment in other studies have also showed that UV filters may pose a risk to the local environment [13].

3.3.2 Risk quotient estimated in sewage sludge

To estimate PNEC in sludge, Technical Guidance Document on Risk Assessment [7] suggests

to apply the same assessment factors used for the aquatic compartment, when toxicity data in soil organisms are available. Despite the scarce toxicological data of pharmaceutically active compounds in the terrestrial compartment, for the most of compounds under study toxicological data was found in the literature [4] or using ECOSAR software program.

Thus, risk quotient in sludge were estimated by dividing the MEC_{sludge} by $PNEC_{terrestrial\ organisms}$. MEC was the highest compound concentration found in sludge from each STP and PNEC was derived from the available

terrestrial toxicity for a producer (plants), a consumer (earthworm) and/or a decomposer (soil microorganisms) and applying the pertinent assessment factors as stated on aquatic compartments above.

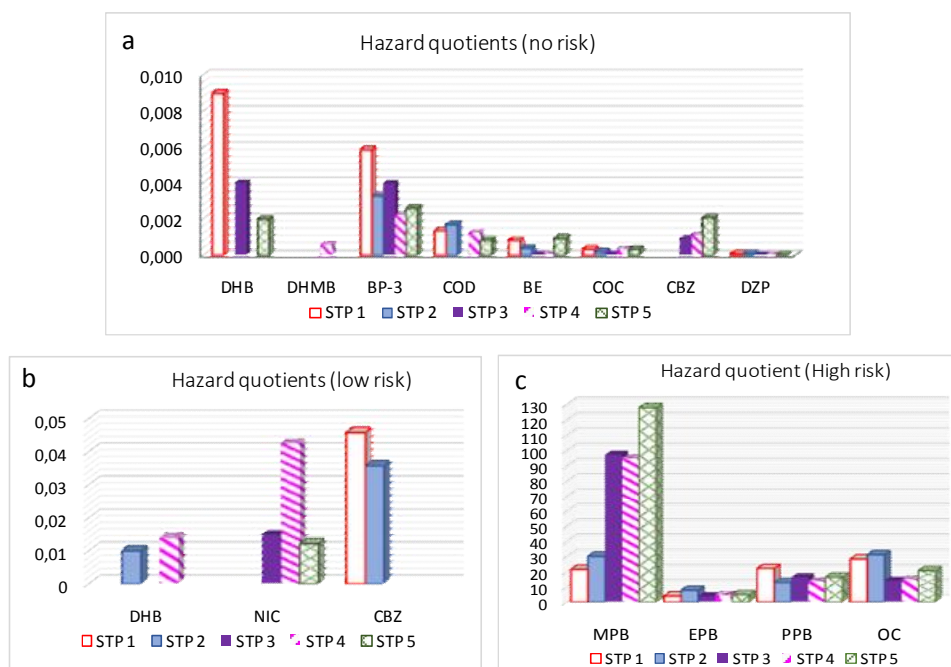


Figure 3. Environmental risk assessment for terrestrial organisms:
 (a). Hazard quotient < 0.01, not risk.
 (b). $0.01 \leq$ Hazard quotient < 0.1, low risk;
 (c). Hazard quotient ≥ 1 , high risk.

For EDDP, MET, BMZ, PTB, and NDZ hazard quotients were not estimated due to absence of toxicological data for them. Figures 3a, 3b and 3c showed the compounds with not risk, low

risk and high risk, respectively. Medium risk was not graphed because only NIC presented hazard quotients of 0.35 and 0.99 from SPT 1 and STP 2, respectively. Parabens and OC

yielded hazard quotients values ranging from 3.89 (EPB, STP 3) to 128 (MPB, STP 5), thus indicating that some adverse effect or moderate risk is probable on terrestrial organism. This do not agree to Albero et al. [47] who found that parabens in

sewage sludge from STPs in Spain were at concentrations which do not pose the toxicological risk for humans or the environment when the sludge is applied as fertilizer or amendment in agricultural soil.

Table 4. Parameters used in sewage epidemiology back-calculation.

Compound	Metabolite Residue (MR)	Excretion MR %	Molar ratio Comp/MR	Correction Factor
Heroine	MOR	42 ^a	1.29	3.1
COC	BE	45 ^a	1.05	2.3
MET	EDDP	31 ^b	1.06	3.4
COD	COD	64 ^c	1.0	1.6

a. [32] b. [19]. c. [9].

3.4 Sewage epidemiology

Estimation of drug usage in five cities of Catalonia (Spain) whose STPs were monitored was back-calculated according to sewage epidemiology strategy described by Van Nuijs [21]. For this propose, the concentrations of some selected compounds (the unchanged parent drugs, or metabolites) in influent wastewater were used. Table 4 shows the compounds selected as consumption indicators for the various drugs monitored.

The influent wastewater concentrations were normalized cross

Table 5. Adult population served by STPs (date of 2012) [61].

Population from 16 to 65 year	
STP 1	95018
STP 2	74518
STP 3	26762
STP 4	25366
STP 5	38954

the adult population, aged 16 -65, served by the SPTs (Table 5) [61] and the water flow entering the plant (Table 4), and corrected by a factor that takes into account the metabolite excretion data

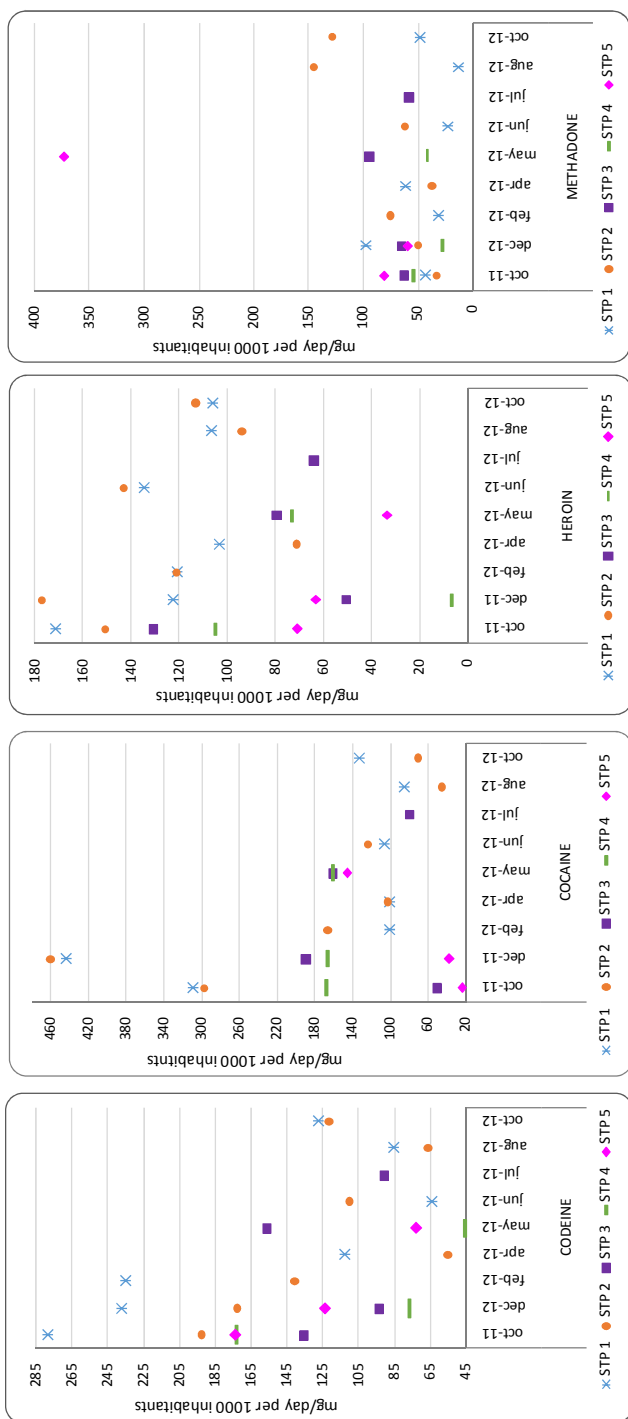


Figure 4. Drug consumption at the community served by studied STPs

of each drug residue and the molar mass ratio between the consumed active parent drug and the drug residue (Table 4). Although heroin was not including among target compound in this study, MOR has been used as metabolite residue to estimate heroin consumption.

Consumption during one year estimated at the five studied STPs of COD, COC, heroin and MET expressed as mg/day per 1000 inhabitants is showed in Figure 4. The five STPs have in common that serve population of cities with greatly tourist interest with many leisure places and an intensive night live.

In general, the consumption levels of the four drugs of abuse back-calculated were at similar levels in the five STPs during all year, ranging from 46 (STP 4) to 278 (STP 1) mg/day per 1000 inhabitants for COD, from 24 (STP 5) to 459 (STP 2) mg/day per 1000 inhabitants for COC, from 7 (STP 4) to 177 (STP 2) mg/day per 1000 inhabitants for heroin and from 14 (STP 1) to 373 (STP 5) mg/day per 1000 inhabitants for MET. Although for the last drug only a punctual month presented a high consumption level in STP 5, for the rest of months in all STPs

consumption was lower than 150 mg/day per 1000 inhabitants. Worth noting that heroin consumption is back-calculated from their main metabolite MOR, which is also a therapeutic drug widely used in clinical medicine, therefore heroin consumption could be overestimated [18]. While consumption of heroin was reported in Canada at lower values (up to 67 mg/day per 1000 inhabitants) [18] than reported by us, in Belgium [20] and Spain [32] it was reported at higher values with maximum consumption of 415 and 1920 mg/day per 1000 inhabitants, respectively. Results of COC consumption were similar to other sewage epidemiology studies in Czech republic [19] and Belgium [20], but significant lower than other reported in Spain [17, 32] and Canada [18], where consumption up to 1600, 3100 and 3800 mg/day per 1000 inhabitants were reported, respectively. MET that is mainly indicated for the maintenance treatment of opioid dependency, was reported at similar [19] and/or slightly higher consumption [20] than in the present study with 138 mg/day per 1000 inhabitants.

4. CONCLUSIONS

Three groups of emerging contaminants (PCPs, drugs of abuse and sedative hypnotics) were monitored during one year in wastewater and sewage sludge from five STPs located in different cities in Catalonia (Spain). Results allow concluding that most of these contaminants are ubiquitous in influent, effluent wastewater and sewage sludge and their prevalence in effluent wastewater and sludge lead to the continuous exposure of the aquatic and terrestrial wildlife to these contaminants.

Among PCPs, parabens and BP-3 were the compounds always detected in influent wastewater, and, although they were nearly always detected in effluent wastewater, these compounds presented the highest removal rates. Largely the elimination of parabens from wastewater can be attributed to adsorption to activated sludge, since they were found in sludge samples. Moreover, all of the drugs of abuse studied were always detected in wastewater and sludge, except DIH and 6-AM which were infrequently detected in wastewater and MOR in sewage sludge. Concern sedative

hypnotics, all benzodiazepines were always present in wastewater and sludge, but poorly removed from wastewater with ultraviolet/chlorination as tertiary treatment in STP 3, 4 and 5 were quite effective to remove or archive highest removal efficiencies for more compounds than STP 1 and STP 2 with conventional activated sludge treatment.

The worst case scenario environmental risk assessment suggest that BP-3, EDDP and BT could have a potential risks for aquatic organisms, whilst MPB, EPB, PPB and OC could have a potential risks for terrestrial organisms.

COD, COC, MET and heroin consumption in the community served by studied STPs was back-calculated from drug influent wastewater concentration following sewage epidemiological approach. The range consumption levels of these drugs were similar in the five cities during the monitored year, between 7 (heroin) and 459 (COC) mg/day per 1000 inhabitants.

REFERENCES

- [1] K. Kümmerer, 3.04 - Emerging Contaminants, Elsevier, Oxford, (2011), 69 p.
- [2] Y. Cabeza, L. Candela, D. Ronen, G. Teijon, J. Hazard. Mater. 239–240 (2012) 32.
- [3] E.F. Davis, S.L. Klosterhaus, H.M. Stapleton, Environ. Int. 40 (2012) 1.
- [4] J.M. Brausch, G.M. Rand, Chemosphere 82 (2011) 1518.
- [5] S. Ortiz de García, G.P. Pinto, P.A. García-Encina, R.I. Mata, J. Environ. Man. 129 (2013) 384.
- [6] E.J. Rosi-Marshall, D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, A. Paspalof, J.L. Tank, J. Hazard. Mater. 282 (2015) 18.
- [7] Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, Part II, (2003).
- [8] E.N. Evgenidou, I.K. Konstantinou, D.A. Lambropoulou, Sci. Total Environ. 505 (2015) 905.
- [9] B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, Water Res. (2014).
- [10] V. Calisto, V.I. Esteves, Chemosphere 77 (2009) 1257.
- [11] J.-L. Liu, M.-H. Wong, Environ. Int. 59 (2013) 208.
- [12] M.S. Díaz-Cruz, M.J. García-Galán, P. Guerra, A. Jelic, C. Postigo, E. Eljarrat, M. Farré, M.J. López de Alda, M. Petrovic, D. Barceló, M. Petrovic, D. Barceló, TrAC-Trend Anal. Chem. 28 (2009) 1263.
- [13] M.M.P. Tsui, H.W. Leung, P.K.S. Lam, M.B. Murphy, Water Res. 53 (2014) 58.
- [14] C.I. Kosma, D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Sci. Total Environ. 466–467 (2014) 421.

- [15] A. Mendoza, J.L. Rodríguez-Gil, S. González-Alonso, N. Mastroianni, M. López de Alda, D. Barceló, Y. Valcárcel, *Environ. Int.* 70 (2014) 76.
- [16] M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1091.
- [17] M.J. Andrés-Costa, N. Rubio-López, M. Morales Suárez-Varela, Y. Pico, *Environ. Pollut.* 194 (2014) 152.
- [18] V. Yargeau, B. Taylor, H. Li, A. Rodayan, C.D. Metcalfe, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 722.
- [19] D.R. Baker, V. Očenášková, M. Kvicalova, B. Kasprzyk-Hordern, *Environ. Int.* 48 (2012) 28.
- [20] A.L.N. van Nuijs, J.-F. Mougel, I. Tarcomnicu, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, *Environ. Int.* 37 (2011) 612.
- [21] A.L.N. van Nuijs, S. Castiglioni, I. Tarcomnicu, C. Postigo, M.L. de Alda, H. Neels, E. Zuccato, D. Barcelo, A. Covaci, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 3564.
- [22] Priority Substances Daughter Directive-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., (2008).
- [23] Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council Amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy., (2012).
- [24] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5619.
- [25] M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6994.
- [26] P. Arbeláez, F. Borrull, R. M. Marcé, E. Pocurull, *Talanta* 125 (2014) 65.
- [27] P. Arbeláez, J. Granados, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3481.
- [28] P. Arbeláez, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé,

- Int. J. Environ. Anal. chem. 95 (2015) 669.
- [29] <https://web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca/>.
- [30] European Communities Commission, Decision 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, (2002).
- [31] C. Haman, X. Dauchy, C. Rosin, J.-F. Munoz, Water Res. 68 (2015) 1.
- [32] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, Environ. Int. 36 (2010) 75.
- [33] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1620.
- [34] I. Racamonde, R. Rodil, J.B. Quintana, E. Villaverde-de-Sáa, R. Cela, J. Chromatogr. A 1352 (2014) 69.
- [35] M. Petrović, B. Škrbić, J. Živančev, L. Ferrando-Climent, D. Barcelo, Sci. Total Environ. 468–469 (2014) 415.
- [36] V. Borova, N. Maragou, P. Gago-Ferrero, C. Pistos, N. Thomaidis, Anal. Bio. Chem. 406 (2014) 4273.
- [37] C. Repice, M.D. Grande, R. Maggi, R. Pedrazzani, Sci. Total Environ. 463–464 (2013) 27.
- [38] S. Terzić, I. Senta, M. Ahel, M. Gros, M. Petrović, D. Barcelo, J. Müller, T. Knepper, I. Martí, F. Ventura, P. Jovančić, D. Jabučar, Sci. Total Environ. 399 (2008) 66.
- [39] R. López-Serna, S. Pérez, A. Ginebreda, M. Petrović, D. Barceló, Talanta 83 (2010) 410.
- [40] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, Anal. Chem. 81 (2008) 898.
- [41] U. Hass, U. Duennbier, G. Massmann, Water Research 46 (2012) 6013.
- [42] D. Błędzka, J. Gromadzińska, W. Wąsowicz, Environ. Int. 67 (2014) 27.
- [43] C. Plagellat, T. Kupper, R. Furrer, L.F. de Alencastro, D. Grandjean, J. Tarradellas, Chemosphere 62 (2006) 915.
- [44] P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Chemosphere 84 (2011) 1158.
- [45] Y.-S. Liu, G.-G. Ying, A. Shareef, R.S. Kookana,

- Environ. Pollut. 165 (2012) 225.
- [46] Z. Zhang, N. Ren, Y.-F. Li, T. Kunisue, D. Gao, K. Kannan, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 3909.
- [47] B. Albero, R.A. Pérez, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, J. Hazard. Mat. 239–240 (2012) 48.
- [48] Y. Yu, Q. Huang, Z. Wang, K. Zhang, C. Tang, J. Cui, J. Feng, X. Peng, J. Environ. Monit 13 (2011) 871.
- [49] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, Environ. Int. 68 (2014) 33.
- [50] N. Mastroianni, C. Postigo, M.L. de Alda, D. Barcelo, J. Chromatogr. A 1322 (2013) 29.
- [51] I. Senta, I. Krizman, M. Ahel, S. Terzic, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 3255.
- [52] K. Langford, M. Reid, K. Thomas, J. Environ. Monit. 13 (2011) 2284.
- [53] A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, Talanta. 80 (2009) 363.
- [54] L. Barron, J. Tobin, P. Brett, J. Environ. Monit. 10 (2008) 353.
- [55] P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Picó, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2471.
- [56] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, Environ. Sci. Technol. 47 (2013) 13321.
- [57] M. Gros, M. Petrović, A. Ginebreda, D. Barceló, Environ. Int. 36 (2010) 15.
- [58] A.M.P.T. Pereira, L.J.G. Silva, L.M. Meisel, C.M. Lino, A. Pena, Environ. Res. 136 (2015) 108.
- [59] Q. Sun, M. Lv, A. Hu, X. Yang, C.-P. Yu, Journal of Hazardous Materials 277 (2014) 69.
- [60] J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, Environ. Int. 33 (2007) 596.
- [61] Institut d' Estadística de Catalunya (Idescat).

Supplementary Information

1. Reagents, standards and materials

Analytical standards of methyl paraben (MPB), ethyl paraben (EPB), propyl paraben (PPB), benzyl paraben (BPB), benzophenone-3 (BP-3), 2,4 dihydroxybenzophenone (DHB), 2,2-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (DHMB) and octocrylene (OC), triclosan (TCS) and triclocarban (TCB), diazepam (DZP), bromazepam (BMZ), carbamazepine (CBZ), barbital (BTL), pentobarbital (PTB), phenobarbital (FBT), and secobarbital (SCB) were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Nordiazepam (NDZ), nicotine (NIC), codeine (COD), dihydrocodeine (DIC), 6-acetylmorphine (6-AM), cocaine (COC), benzoylecgonine (BE), 2-ethylidene-1,5 dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), methadone (MTD), morphine (MOR), 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) and the surrogates EDDP-d₃, COD-d₆, MOR-d₆, DZP-d₅ and PTB-d₅, were acquired from Cerilliant (Round Rock, TX, USA), available as solution in 1 mL of methanol or acetonitrile at 1 mg/mL. Purity of all of the standards was $\geq 95\%$. Stock solutions of individual standards were prepared by dissolving each compound in methanol at a concentration of 1000 mg/L for PCPs and 100 mg/L for drugs of abuse and sedative hypnotics. Stock solutions were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark. Mixed working solutions of each group of compounds were prepared daily by diluting the stock solution to the appropriate concentration with methanol:water (1:1 v/v).

Ultrapure water was obtained with a Purelab ultra purification system (Veolia water, Sant Cugat del Vallès, Spain). Methanol, acetonitrile (HPLC-grade), dichloromethane (pesticide residue analysis) and acetone were supplied by Prolabo (Llinars del Vallès, Spain) and acid acetic, formic acid, ammonium hydroxide (LC-MS grade) and diatomaceous earth were purchased from Sigma-Aldrich. Nitrogen was supplied by Carburos Metálicos (Tarragona, Spain).

SPE cartridges, Oasis HLB (500 mg) and Oasis MCX (200 mg) were purchased from waters (Milford, MA, USA).

2. Analytical methods

2.1. PCPs

2.1.1 Sample preparation

The analytical method of PCPs in wastewater was described in detail by Pedrouzo et al. [1]. In brief, sample was extracted by solid-phase extraction (SPE) with 500 mg Oasis HLB. Cartridges were conditioned with 5 mL of methanol and 2 mL of ultra-pure water. 100 mL of influent and/or 250 mL of effluent were passed through the cartridge. Clean-up was with 5 mL of 15% methanol in water. Elution was with 5 mL of methanol and 5 mL of dichloromethane. Extracts were reduced under a gentle flow of nitrogen gas to approximately 3 mL and the final extracts were diluted to 5 mL with ultra-pure water. The extracts were filtered with a 0.22 µm nylon syringe filter (Scharlab, Barcelona, Spain) and analysed by liquid chromatography-(electrospray) tandem mass spectrometry (LC-(ESI)MS/MS).

The analytical method of PCPs in sewage sludge was described in detail by Nieto et al. [2]. In brief, target compounds were extracted by pressurized liquid extraction (PLE). The extracting solvents were methanol and a mixture of water (pH 7) and methanol (1:1). The operating conditions were: extraction temperature of 100 °C, extraction pressure of 1500 psi, preheating period of 5 min, 2 cycles of 5 min with methanol followed by 2 cycles of 5 min with water (neutral pH):methanol (1:1), flush volume of 30% of the cell volume and nitrogen purge of 90 s. PLE extracts were approximately 33 mL which were reduced to approximately 20 mL under gentle flow of nitrogen gas and re-dissolved to 25 mL with ultra-pure water. The extracts were filtered with a 0.22 µm nylon syringe filter and analysed by liquid chromatography-(electrospray) tandem mass spectrometry (LC-(ESI)-MS/MS).

2.1.2 LC-(ESI)-MS/MS analysis.

Chromatographic separation was performed using a Zorbax Eclipse XDB C₁₈ column (4.6 mm x 50 mm) with a 1.8 µm particle size (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The binary mobile phase was ultra-pure water with acetic acid (pH 3) and methanol. The gradient elution was

initially 60% B, which increased to 100% in 6 min, kept constant for 4 min and finally returned to 60% B in 3 min. All the compounds eluted within 9 min. The flow-rate was 0.6 mL/min, the column temperature was kept at 50 °C and the injected volume was 50 µL.

The optimum triple quadrupole mass spectrometer conditions were: capillary voltage 4000 V, nebulizer gas (N₂) 45 psi, source temperature 350 °C, gas flow (N₂) 12 L/min. Nitrogen was used as collision gas, and MS-MS was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode. MS/MS acquisition parameters in SRM mode for each compound are shown in Table S1.

2.2 Drugs of abuse

2.2.1 Sample preparation

The analytical method of drugs of abuse in wastewater was described in detail by Pedrouzo et al. [3]. In brief, target compounds were extracted from wastewater by SPE with Oasis MCX cartridges. Prior to extraction, deuterated compounds (EDDP-d₃, COD-d₆, and MOR-d₃) were added. Cartridges were preconditioned with 5 mL of MeOH and 2 mL of water. 100 mL of influent and/or 250 mL of effluent were passed through the cartridge. Clean-up was with 5 mL H₂O (2% NH₄OH). After being vacuum dried for 5 min, the cartridges were eluted with 8 mL of MeOH (5% NH₄OH). The extracts were evaporated under a nitrogen stream to dryness, reconstituted with 500 mL H₂O (1% MeOH) and filtered with 0.22 µm PTFE syringe filters (Scharlab, Barcelona, Spain).

The method for drugs of abuse in sewage sludge was described in detail by Arbeláez et al. [4]. In brief, target compounds were extracted from sewage sludge by PLE. Prior to extraction, deuterated compounds (EDDP-d₃, COD-d₆, and MOR-d₃) at a concentration of 125 µg/kg (d.w.) were added to 1 g of pre-treated sludge. The extraction solvent was dichloromethane and the operating conditions were: preheating period 5 min, extraction temperature 100 °C, extraction pressure 1500 psi with a static period of 15 min in one cycle, flush volume 60% of cell volume and nitrogen purge time 120 s. The final extraction volume was approximately 15 mL, which was evaporated to dryness under a nitrogen stream and redissolved in 5 mL of methanol:water (1:1 v/v), filtered with a microfilter of 0.22 µm and then analyzed by LC-(ESI)MS/MS.

2.2.2 LC-(ESI)MS/MS analysis.

Chromatographic separation was performed using an Ascentis Express C18 column (4.6x50 mm) with a 2.7 μm particle size (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). A binary mobile phase with a gradient elution was used. Solvent A was acidified water with acetic acid (pH 2.8) and solvent B was acetonitrile. The gradient was initially 5% B, which was increased to 15% in 3.5 min, to 50% in 2.5 min, to 100% in 6 min, kept constant for 2 min and finally returned to 5% B in 1 min. The flow-rate was 0.4 mL/min, the column temperature was kept at 30 °C and the volume injected was 50 μL . The optimized conditions for the ESI interface in positive mode were: 45 psi nebulizer pressure, 12 L/min drying gas flow-rate, 350 °C drying gas temperature and 3000 V spray potential. MS/MS acquisition parameters in SRM mode for each compound are shown in Table S1.

2.3 Sedative hypnotics

2.3.1 Sample extraction

The analytical method of sedative hypnotics in wastewater was described in detail by Arbeláez et al. [5]. In brief, target compounds were extracted from wastewater by SPE with 500 mg Oasis HLB. Cartridges were conditioned with 5 mL of methanol and 2 mL of ultra-pure water. 100 mL of influent and 250 mL of effluent were passed through the cartridge. The cartridges were then washed with 5 mL of 5% of methanol in water (v/v) and completely dried under vacuum. After eluting the analytes twice with 2.5 mL of Methanol, the extracts were evaporated to dryness by nitrogen stream and were finally reconstituted with methanol:water (50:50 v/v) to a volume of 5 mL. Extracts were filtered with a microfilter of 0.22 μm PTFE and then analyzed by LC-(ESI)-MS/MS.

The method of sedative hypnotics in sewage sludge was described in detail by Arbeláez et al. [6]. In brief, target compounds were extracted from sewage sludge by PLE. The extraction solvent and operational conditions were: methanol as the extraction solvent, 5 min preheating period, extraction temperature of 100 °C, extraction pressure of 1500 psi with a static period of 5 min in one cycle, flush volume of 60% of the cell volume, and nitrogen purge time of 120 s. The final extraction was evaporated under a nitrogen stream to dryness and re-dissolved in 5mL of

methanol/water (1:1 v/v), filtered with a microfilter 0.22 μm PTFE filter (Teknokroma, Barcelona, Spain), and then analyzed by LC-(ESI)MS/MS.

2.3.2 LC-(ESI)MS/MS analysis.

Chromatographic separation was performed using a fused-core column (Kinetex Core-shell Technology) C18 (4.6 \times 100 mm) with a 2.7 μm particle size (Phenomenex, Madrid, Spain). The binary mobile phase was ultrapure water with formic acid (pH 3) (A) and MeOH (B) and the gradient of elution was as follows: 45% B for 10 min, increased to 100% in 5 min, kept constant for 1 min and finally returned to 45% B in 2 min. The flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was kept at 25°C and the volume injected was 25 μL .

Data acquisition was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode. High-purity nitrogen was used as the desolvation nebulizer. The optimized conditions for the ESI interface were: 45 psi nebulizer pressure, 12 L/min drying gas flow rate, drying gas temperature of 350 °C, and 3500 V spray potential. MS/MS acquisition parameters in SRM mode for each compound are shown in Table S1.

Table S1. LC-MS/MS acquisition parameters in SRM mode.

Compound PCPs	Retention time (min)	Precursor ion	Cone Voltage (V)	Product ions			
				Quantification		Confirmation	
MPB	1.5	151	80	92	(15)	136	(5)
EPB	1.9	165	100	136	(15)	92	(5)
PPB	2.5	179	100	92	(15)	136	(5)
DHB	2.9	213	130	135	(5)	169	(15)
DHMB	3.5	243	80	93	(15)	123	(5)
BPB	3.5	227	100	92	(15)	136	(5)
BP-3	4.8	229	130	151	(15)	105	(15)
TCC	5.7	313	130	160	(5)	126	(15)
TCS	5.9	287	18	35	(8)	35	(8)
OC	7.5	384	130	272	(5)	228	(5)
Drugs of abuse							
NIC	2.1	163	60	130	(15)	117	(15)
MOR	2.5	286	100	152	(60)	128	(60)
DIH	5.3	302	100	141	(60)	165	(60)
COD	5.6	300	100	165	(60)	181	(60)
6-AM	6.7	328	100	165	(45)	181	(45)
BE	8.0	290	100	168	(15)	82	(15)
COC	8.4	304	60	182	(15)	82	(15)
EDDP	9.1	278	140	234	(30)	186	(30)
MET	9.4	310	60	265	(15)	223	(15)
MOR-d6	2.5	292	60	152	(60)	128	(60)
COD-d6	5.7	306	100	165	(45)	153	(45)
EDDP-d3	9.2	281	140	234	(30)	249	(30)
Sedative hypnotics							
BT	3.5	183	90	140	(5)	42	(15)
FNB	5.8	231	90	42	(9)	188	(6)
BMZ	9.9	316	140	182	(35)	209	(25)
CBZ	13.2	237	120	194	(15)	179	(35)
PTB	14.4	225	100	182	(7)	42	(14)
SCB	15.9	237	90	194	(6)	42	(14)
DZP	17.0	285	150	193	(35)	222	(27)
NDZ	16.6	271	150	140	(25)	165	(30)

Collision Energy (eV) in brackets

3. Methods Validation

All methods were twice re-validated according to the matrix origin, thus, a re-validation was carried out with a matrix composition from STPs 1 and 2 which applied secondary treatment, and other re-validation was carried out with a matrix composition from STPs 2, 4 and 5 which applied tertiary treatment. Linear range, limit of detection (MDL), limit of quantification (MQL), SPE and/or PLE recoveries, repeatability and reproducibility (expressed as %RSD) were evaluated for quantitative purposes as was described in previous papers [4-6]. In order to calculate the extraction recoveries and %RSD samples were spiked before extraction at low and high concentration levels as described in Table S2:

Table S2. Spiked concentrations for methods validation.

Group of compounds	Influent wastewater ng/L		Effluent wastewater ng/L		Sewage sludge µg/kg	
	Low level	High level	Low level	High level	Low level	High level
PCPs	50	2500	25	1000	625	12500
Drugs of abuse	500	15000	25	250	25	250
Benzodiazepines	12.5	500	25	200	1.2	50
Barbiturates	125	1250	100	1000	25	500

Methods validation data for PCPs, drugs of abuse and sedative hypnotics in the different environmental samples from STPs 1 and 2 are showed in Table S3, and for environmental samples from STPs 3, 4 and 5 are showed in Table S4.

Table S3. Validation data for different environmental samples from STP 1 and STP 2.

Compound	Influent wastewater				Effluent wastewater				Sewage sludge			
	L.Range (ng/L)	MDL (ng/L)	SPE R % ^a	SPE R % ^b	L.Range (ng/L)	MDL (ng/L)	SPE R % ^a	SPE R % ^b	L.Range (µg/kg)	MDL (µg/kg)	PLE R % ^a	PLE R % ^b
PCPs	50-5000	20	93	95	0.5-2000	0.1	90	94	250-25000	12.5	72	75
MPB	2.5-5000	10	92	95	1-2000	0.2	93	95	25-25000	10	80	83
EPB	50-5000	20	99	100	0.1-2000	0.02	97	101	25-25000	10	102	99
PPB	10-5000	5	77	83	0.5-2000	0.1	75	74	5-25000	2	89	94
DHB	2.5-5000	1	95	96	2-2000	0.05	90	95	25-25000	10	54	58
DHMB	1-5000	0.2	82	85	0.2-2000	0.05	84	84	10-25000	5	106	102
BPB	50-5000	20	79	83	12-2000	5	80	79	25-25000	10	79	85
BP-3	12-5000	5	65	67	5-2000	2	68	69	625-25000	250	77	79
TCC	12-5000	5	76	76	5-2000	2	73	77	625-25000	250	61	64
TCS	12-5000	5	76	76	5-2000	2	73	77	625-25000	250	61	64
OC	50-5000	20	63	66	20-2000	10	68	69	250-25000	12.5	104	123
Drugs of abuse												
NIC	500-30000	200	86	92	5-500	2	81	79	25-500	10	70	76
MOR	25-30000	10	65	69	2.5-500	1	70	76	25-500	10	58	61
DIH	10-30000	2.5	81	86	1-500	0.2	75	78	10-500	2.5	80	86
COD	25-30000	10	91	95	5-500	2	93	94	10-500	2.5	77	80
6-AM	25-30000	10	88	93	2.5-500	1	90	92	5-500	1	53	60
BE	250-30000	100	78	82	10-500	2.5	81	85	5-500	1	73	74
COC	25-30000	10	80	82	2.5-500	1	85	90	0.5-500	0.2	79	85
EDDP	25-30000	10	78	82	5-500	2	80	81	10-500	2.5	84	83
MET	10-30000	2.5	71	75	5-500	2	74	73	10-500	2.5	88	90
Sedative/hypnotics												
BT	125-2500	50	93	97	100-2000	25	95	94	25-1000	12	102	108
FNB	50-2500	25	96	97	25-2000	5	100	100	5-1000	1	101	99
BMZ	12.5-500	5	94	94	5-200	1	98	100	0.5-100	0.1	89	92
CBZ	50-5000	25	91	95	25-4000	5	102	100	5-100	2	94	98
PTB	50-2500	25	97	102	50-2000	10	99	101	12-1000	5	106	112
SCB	12.5-2500	50	100	98	50-2000	10	101	103	5-1000	1	100	108
DZP	12.5-500	5	101	100	5-200	1	97	98	1.2-100	0.5	90	93
NDZ	12.5-500	5	100	103	5-200	1	102	102	0.5-100	0.1	90	88

a. SPE and/or PLE recoveries low concentration level (see text). RSD% ≤ 14 (n=3)
b. SPE and/or PLE recoveries high concentration level (see text). RSD% ≤ 10 (n=3)

Table S4. Validation data for different environmental samples from STP 3, STP 4 and STP 5.

Compound	Influent wastewater				Effluent wastewater				Sewage sludge																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	L.Range (ng/L)	MDL (ng/L)	SPE R % ^a	SPE R % ^b	L.Range (ng/L)	MDL (ng/L)	SPE R % ^a	SPE R % ^b	L.Range (µg/kg)	MDL (µg/kg)	PLE R % ^a	PLE R % ^b																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
PCPs													MPB	2.5-10000	12	89	93	5-2000	2	87	89	2.50-25000	12.5	68	71	EPB	12-10000	5	94	95	5-2000	2	90	94	2.5-25000	10	78	81	PPB	12-10000	5	96	99	5-2000	2	98	100	2.5-25000	10	94	96	DHB	12-10000	5	74	76	5-2000	2	78	76	5-25000	2	87	91	DHMB	2.5-10000	1	97	100	2-2000	0.5	93	94	10-25000	5	62	58	BPB	2.5-10000	1	86	87	1-2000	0.2	80	84	10-25000	5	93	98	BP-3	2.5-10000	12	70	71	10-2000	5	75	76	10-25000	5	81	81	TCC	2.5-10000	12	58	60	10-2000	5	63	65	2.50-25000	12.5	72	70	TCS	12-10000	5	82	80	5-2000	2	77	81	2.50-25000	12.5	69	73	OC	50-10000	20	60	60	20-2000	10	64	66	12.5-25000	50	89	93	Drugs of abuse													NIC	2.50-15000	100	98	102	20-200	10	94	94	0.5-500	0.1	64	68	MOR	10-15000	2.5	73	76	0.5-200	0.1	75	78	5-500	2	53	52	DH	5-15000	1	88	89	0.25-200	0.05	80	81	5-500	2	98	101	COD	10-15000	2.5	95	99	10-200	4	92	91	2.5-500	1	99	104	6-AM	5-15000	1	95	97	2-200	0.5	97	99	10-500	5	50	51	BE	2.5-15000	10	70	74	10-200	4	78	83	0.5-500	0.1	77	77	COC	10-15000	2.5	77	78	0.5-200	0.1	71	72	1-500	0.5	96	98	EDDP	5-15000	1	73	74	4-200	1	68	74	2.5-500	1	78	80	MET	2.5-15000	0.5	76	79	1-200	0.2	73	77	0.5-500	0.1	81	82	Sedative hypnotics													BT	2.50-2500	100	100	100	50-1000	25	103	101	1.25-250	0.5	82	85	FNB	12.5-2500	50	104	102	20-1000	10	99	100	2.5-250	1	84	86	BMZ	5-250	1	86	90	1-100	0.2	89	94	0.25-25	0.1	98	100	CBZ	2.5-500	12.5	97	101	20-500	10	102	99	0.5-25	0.2	103	106	PTB	12.5-2500	5	105	101	5-1000	2	103	102	5-250	2	91	92	SCB	2.5-2500	12.5	104	103	10-1000	5	97	99	5-250	2	83	85	DZP	5-250	1	89	93	2-100	0.5	84	85	0.25-25	0.1	89	92	NDZ	5-250	1	91	95	2-100	0.5	93	92	0.25-25	0.1	93	95
MPB	2.5-10000	12	89	93	5-2000	2	87	89	2.50-25000	12.5	68	71																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
EPB	12-10000	5	94	95	5-2000	2	90	94	2.5-25000	10	78	81																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
PPB	12-10000	5	96	99	5-2000	2	98	100	2.5-25000	10	94	96																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
DHB	12-10000	5	74	76	5-2000	2	78	76	5-25000	2	87	91																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
DHMB	2.5-10000	1	97	100	2-2000	0.5	93	94	10-25000	5	62	58																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
BPB	2.5-10000	1	86	87	1-2000	0.2	80	84	10-25000	5	93	98																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
BP-3	2.5-10000	12	70	71	10-2000	5	75	76	10-25000	5	81	81																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
TCC	2.5-10000	12	58	60	10-2000	5	63	65	2.50-25000	12.5	72	70																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
TCS	12-10000	5	82	80	5-2000	2	77	81	2.50-25000	12.5	69	73																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
OC	50-10000	20	60	60	20-2000	10	64	66	12.5-25000	50	89	93																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
Drugs of abuse																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
NIC	2.50-15000	100	98	102	20-200	10	94	94	0.5-500	0.1	64	68																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
MOR	10-15000	2.5	73	76	0.5-200	0.1	75	78	5-500	2	53	52																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
DH	5-15000	1	88	89	0.25-200	0.05	80	81	5-500	2	98	101																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
COD	10-15000	2.5	95	99	10-200	4	92	91	2.5-500	1	99	104																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
6-AM	5-15000	1	95	97	2-200	0.5	97	99	10-500	5	50	51																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
BE	2.5-15000	10	70	74	10-200	4	78	83	0.5-500	0.1	77	77																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
COC	10-15000	2.5	77	78	0.5-200	0.1	71	72	1-500	0.5	96	98																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
EDDP	5-15000	1	73	74	4-200	1	68	74	2.5-500	1	78	80																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
MET	2.5-15000	0.5	76	79	1-200	0.2	73	77	0.5-500	0.1	81	82																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
Sedative hypnotics																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
BT	2.50-2500	100	100	100	50-1000	25	103	101	1.25-250	0.5	82	85																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
FNB	12.5-2500	50	104	102	20-1000	10	99	100	2.5-250	1	84	86																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
BMZ	5-250	1	86	90	1-100	0.2	89	94	0.25-25	0.1	98	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
CBZ	2.5-500	12.5	97	101	20-500	10	102	99	0.5-25	0.2	103	106																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
PTB	12.5-2500	5	105	101	5-1000	2	103	102	5-250	2	91	92																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
SCB	2.5-2500	12.5	104	103	10-1000	5	97	99	5-250	2	83	85																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
DZP	5-250	1	89	93	2-100	0.5	84	85	0.25-25	0.1	89	92																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
NDZ	5-250	1	91	95	2-100	0.5	93	92	0.25-25	0.1	93	95																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

a. SPE and/or PLE recoveries low concentration level (see text). RSD% ≤ 12 (n=3)

b. SPE and/or PLE recoveries high concentration level (see text). RSD% ≤ 9 (n=3)

Table S5. Ecotoxicological data of PCPs, drugs of abuse and sedative hypnotics for aquatic and terrestrial organisms

Compound	Daphnia mg/L	Toxicological endpoint	Fish mg/L	Toxicological endpoint	Algae mg/L	Toxicological endpoint	Terrestrial organisms mg/L	Toxicological endpoint
PCPs								
MPB	21	LC50 (48h) Mobility ^a	20.4	EC50 ^c	18*	EC50 ^c	9.6	LC 50 (15 MIN) Illuminescence ^a
EPB	18.7*	LC50 (48h) Mobility ^a	34.3	LC50 (48h) Mortality ^a	20.1	EC50 ^c	2.5	LC 50 (15 MIN) Illuminescence ^a
PPB	7	LC50 (48h) Mobility ^a	9.7	LC50 (48h) Mortality ^a	4.4*	EC50 ^c	2.5	LC 50 (15 MIN) Illuminescence ^a
DHB	16.3	LC50 (48h) ^k	2.6	EC (14d) Estrogenic activity ^d	2.2*	LC50 (96h) ^k	102	LOEC (SOS/umu) genotoxicity ^m
DHMB	0.7*	LC50 (48h) ^k	3.5	LC50 (96h) ^k	15.7	LC50 (96h) ^k	625	LOEC (SOS/umu) genotoxicity ^m
BPB	4	LC50 (48h) Mobility ^a	3.3	LC50 (48h) Mortality ^a	1.7*	EC50 ^c	0.11	LC 50 (15 MIN) Illuminescence ^a
BP-3	1.9	LC50 (48h) Immobility ^a	0.08*	EC50 (14d) Hormonal ^d	0.56	IC10 Growth inhibition ^d	357	LOEC (SOS/umu) genotoxicity ^m
TCC	0.01	LC50 (48h) Mobility ^a	0.1	LC50 (96h) Mortality ^a	0.000017*	LC50 (72h) Growth ^a		
TCS	0.4	LC50 (48h) Mobility ^a	0.26	LC50 (96h) Mortality ^a	0.00053*	LC50 (72h) Growth ^a	0.01	LOEC PLANT (28d) Morphology ^k
OC	100	EC50 (48h) ^b	0.7	LC50 (96h) ^b	0.015*	EC50 (96h) ^b	125.7	LC50 (14d) earthworm ^L
Drugs of abuse								
NIC	0.1*	NOEC (16h) Growth ^c	29	LC50 (72h) Embryo developed ^b	15.6	EC50 (96h) ^k	37.6	EC50 (15min) bioluminescence inhibition ^L
MOR	32*	EC50 ^f	257	EC50 ^f	39	EC50 ^f		
DIH	14	LC50 (48h) ^k	124.9	LC50 (96h) ^k	13*	EC50 (96h) ^k		
COD	16*	EC50 ^f	238	LC50 ^f	24	EC50 ^f	4451	LC50 (14d) earthworm ^K
6-AM	8.1	LC50 (48h) ^k	2.4*	LC50 (96h) ^k	5.9	EC50 (96h) ^k		
BE	6805*	LC50 (48h) ^k	33458	LC50 (96h) ^k	12041	EC50 (96h) ^k	4.4 E005	LC50 (14d) earthworm ^K
COC	5.4	LC50 (48h) ^k	32.8	LC50 (96h) ^k	4.3*	EC50 (96h) ^k	3487	LC50 (14d) earthworm ^K
EDDP	0.1	LC50 (48h) ^k	0.6	LC50 (96h) ^k	0.04*	EC50 (96h) ^k		
MET	83.5*	IC50 (15d) Motility ^g	2.2	LC50 (96h) ^k	0.2*	EC50 (96h) ^k		
Sedative hypnotics								
BT	156.5	LC50 (48h) ^k	3902	LC50 (96h) Embryo developed ^h	0.01*	EC50 (96h) ^k		
FNB	0.9*	EC50 (48h) Immobilization ^L	58.7	LC50 (96h) ^k	0.01	EC50 (96h) ^k	0.95	EC50 (5min) luminescence inhibition ^L
BMZ	120.5	LC50 (48h) ^k	93.5	LC50 (96h) ^k	3.2*	EC50 (96h) ^k		
CBZ	76.3	EC50 (96h) Immobilization ⁱ	35.4*	LC50 (48h) ^j	36.6	EC50 (48h) Growth inhibition ^L	105.6	EC50 (72h) allium cepa, root growth ^L
PTB	7.1	LC50 (48h) ^k	24.1	LC50 (96h) ^k	0.02*	EC50 (96h) ^k		
SCB	3.5	LC50 (48h) ^k	16.1	LC50 (96h) ^k	0.02*	EC50 (96h) ^k		
DZP	4.2*	EC50 (24h) Immobilization ^j	12.7	LC50 (96h) Mortality ^j	16.5	IC50 (96h) Growth inhibition ^j	9965.9	EC50 (15min) bioluminescence inhibition ^L
NDZ	14.1	LC50 (48h) ^k	17.1	LC50 (96h) ^k	0.7*	EC50 (96h) ^k		

*values used in the preliminary risk assessment.

a. [7], **b.** [8], **c.** [9], **d.** [10], **e.** [11], **f.** [12], **g.** [13], **h.** [14], **i.** [15], **j.** [16], **k.** (ECOSAR), **L.** (wikipharm), **m.** [17]

REFERENCES

- [1] M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6994.
- [2] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5619.
- [3] M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, J. Sep. Sci. 34 (2011) 1091.
- [4] P. Arbeláez, F. Borrull, R. Maria Marcé, E. Pocurull, Talanta 125 (2014) 65.
- [5] P. Arbeláez, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, Int. J. Environ. Anal. Chem. 95 (2015) 669.
- [6] P. Arbeláez, J. Granados, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Sep. Sci. 37 (2014) 3481.
- [7] J.M. Brausch, G.M. Rand, Chemosphere 82 (2011) 1518.
- [8] D.N. Brooke, J.S. Burns, M.J. Crookes, UV-filters in cosmetics – prioritisation for environmental assessment, Environment Agency, Bristol, (2008)
- [9] M. Kuzmanović, A. Ginebreda, M. Petrović, D. Barceló, Sci. Total Environ. 503–504 (2015) 289.
- [10] M.M.P. Tsui, H.W. Leung, P.K.S. Lam, M.B. Murphy, Water Res. 53 (2014) 58.
- [11] Y. Valcárcel, S. González Alonso, J.L. Rodríguez-Gil, A. Gil, M. Catalá, Chemosphere 84 (2011) 1336.
- [12] R.F. Mankes, C.D. Silver, Sci. Total Environ. 444 (2013) 298.
- [13] C. Wu, C.H. Fry, J.A. Henry, Toxicology 117 (1997) 35.
- [14] S. Ali, D.L. Champagne, M.K. Richardson, Behav. Brain Res. 228 (2012) 272.
- [15] L.H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, J. Hazard. Mate. 175 (2010) 45.
- [16] B.I. Escher, R. Baumgartner, M. Koller, K. Treyer, J. Lienert, C.S. McArdell, Water Res. 45 (2011) 75.
- [17] H. Zhao, D. Wei, M. Li, Y. Du, Ecotox. Environ. Safe. 95 (2013) 241.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

3.4.2. Discusión de Resultados

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Aunque en la bibliografía se encuentran estudios aplicando un solo método multiresiduo para determinar un gran número de contaminantes de interés emergente [1-3], desarrollar un solo método multiresiduo para determinar PCPs, drogas de abuso e hipnótico-sedantes resultó muy complejo de llevar a cabo, debido a que cada familia de compuestos presenta propiedades físico-químicas muy diferentes entre ellos, por lo que encontrar unas condiciones de extracción y separación cromatográfica óptimas para todos los compuestos conllevó cierta dificultad.

Como ya se ha indicado en previas secciones, el estudio de monitorización se realizó durante un periodo de 1 año, tomando muestras de agua de entrada, efluente y fangos de dos EDARs ubicadas en la provincia de Tarragona (Tarragona y Reus), y de tres EDARs ubicadas en la provincia de Girona (Blanes, Castell Platja d'Aro y Palamós).

Entre todos los compuestos determinados de cada grupo de contaminantes, metilparabeno y propilparabeno fueron los PCPs presentes en todas las muestras con las concentraciones más altas. Entre las drogas de abuso fueron nicotina y benzoilecgonina, y en los hipnótico-sedantes fueron carbamazepina y fenobarbital.

En general, de los resultados obtenidos de analizar las aguas de entrada en las cinco EDARs se puede observar cierta variación de los niveles de concentración de los compuestos detectados entre los diferentes puntos geográficos. Esta tendencia se observa principalmente en los hipnótico-sedantes. Por ejemplo, la carbamazepina es el compuesto que presenta una variación más significativa entre la provincia de Tarragona y de Girona. Tal y como demuestran los resultados, la carbamazepina se encuentra a concentraciones superiores en las muestras de agua de entrada de las EDARs de la provincia de Tarragona (concentración máxima de 45665 ng/L) que en las muestras de las EDARs de la provincia de Girona (concentración máxima 329 ng/L). Otro hipnótico-sedante encontrado solo en las muestras de la provincia de Tarragona es bromazepam, sin embargo, pentobarbital y secobarbital solo han sido detectados en las

EDARs de la provincia de Girona. Entre las drogas de abuso, la nicotina también presenta cierta variación entre estos dos puntos geográficos de toma de muestra, puesto que en las EDARs de la provincia de Tarragona fue encontrado a mayor concentración (concentración máxima de 22789 ng/L) que en las EDARs de Girona (concentración máxima de 7078 ng/L). Por otro lado, triclocarban también presenta variación entre estas dos provincias, mientras que en la provincia de Tarragona se encuentra a niveles < LOQ, en la provincia de Girona se encuentran con una máxima concentración de hasta 900 ng/L.

Referente a la eliminación de los PCPs, drogas de abuso e hipnótico-sedantes en las EDARs, los PCPs son los compuestos que presentaron mayor grado de eliminación, mientras que los hipnótico-sedantes (principalmente las benzodiacepinas) presentaron muy baja o ninguna eliminación. En ambos casos esta tendencia se observó en todas las EDARs evaluadas, independientemente del tipo de tratamiento que éstas aplican para depurar el agua. En este aspecto, las propiedades físico-químicas de los compuestos como pK_a , coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$), solubilidad en agua o el coeficiente de adsorción en el suelo ($\log k_{oc}$), también pueden afectar el grado de eliminación de los contaminantes dentro de las EDARs en función del pH en el que se genera el proceso de depuración [4]. En el caso de los PCPs son compuestos que tienen valores relativamente altos de K_{ow} (2-7), por lo que tienden a adsorberse en las partículas en suspensión. Los datos estimados en la eliminación de los filtros UV evaluados en este estudio coinciden con un estudio publicado recientemente, en el cual evalúan la eficiencia de eliminación de algunos filtros UV y triclocarban en EDARs de Italia, presentando una eliminación muy alta (> 80%) por el tratamiento del agua residual con lodos activados [5]. Varios estudios también han evidenciado el alto grado de eliminación que presenta el triclosan en EDARs aplicando tratamientos terciarios (99%) e incluso en EDARs con tratamientos convencionales con lodos activados (76%) [6-8].

En el caso de los hipnótico-sedantes y de la mayoría de drogas de abuso los valores de K_{ow} son menores de 2, por lo que tienden a permanecer en las aguas o distribuirse entre el agua y las partículas en suspensión, descargándose al medioambiente acuático mediante los afluentes. Algunos hipnótico-sedantes como la carbamazepina y el diazepam presentaron valores negativos de eliminación, como también lo han demostrado varios estudios [9-13]. Este hecho posiblemente se puede atribuir a la formación de compuestos conjugados durante el tratamiento del agua residual [14]. Así, al igual que nuestro estudio de monitorización, muchos otros estudios recientes han confirmado la presencia de algunas drogas de abuso en los efluentes de las EDARs en España [15, 16], Chipre [13], Grecia [17] y en Estados Unidos [9] a niveles de concentración entre LOQ y 1864 ng/L, siendo benzoilecgonina y codeína las más frecuentemente detectadas y con las más altas concentraciones. Los hipnótico-sedantes siendo los compuestos menos eliminados durante los tratamientos de depuración del agua, su presencia también ha sido detectada recientemente en los afluentes en varios países como España [10], Grecia [18], Estados Unidos [19] y China [20] en un intervalo de concentración de 2-34 ng/L.

En conformidad con lo mencionado anteriormente que compuestos con mayor $\log k_{ow}$ tienden a adsorberse en las partículas en suspensión, los PCPs presentan con gran diferencia las concentraciones más altas entre los tres grupos de contaminantes de interés emergente evaluados en los fangos de depuradora. Octocrileno se detectó a más altas concentraciones en todas las muestras de las 5 EDARs, con valores de concentraciones promedio de cada EDAR entre 4243-10196 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.). Estos niveles de concentración son similares a los encontrados en estudios previos realizados en EDARs de Cataluña [21, 22]. Otros estudios recopilados en la publicación de Ramos et al. [23] también han encontrado octocrileno en frecuencias altas de detección y representando el filtro UV con las más altas concentraciones en muestras medioambientales sólidas (79-2400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.)). Este compuesto tiende a adsorberse con facilidad a la materia orgánica sedimentable, porque es altamente lipofílico con $\log k_{ow}$

de 6.9, baja solubilidad en agua de 0.0038 mg/L a 25 °C y muy estable y resistente a la degradación solar [23].

Los parabenos también fueron frecuentemente encontrados en todas las muestras analizadas, siendo metilparaben y propilparaben detectados a los más altos niveles, presentando concentraciones promedio de cada EDAR entre 777-4359 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) para el metilparaben y entre 139-172 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w. para propilparaben. Un estudio muy reciente realizado en China encontraron valores de concentración de parabenos mucho menores que los encontrados por nosotros, informando valores de metilparaben de 407 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) y de propilparaben de 27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.) [24].

Variaciones significativas no se observan para ninguna de las muestras de fangos tomadas en los diferentes puntos geográficos, entre los niveles de concentración encontradas para cada compuesto objeto de estudio en esta monitorización. No obstante, solo en las EDARs de la provincia de Girona se detecta pentobarbital, y además presentando las más altas concentraciones promedio entre los hipnótico-sedantes (15-75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (d.w.)).

En la estimación del riesgo medioambiental asociado con las concentraciones más altas detectadas en los efluentes, solo se encuentra que tres compuestos representan un posible riesgo hacia los organismos acuáticos, los cuales son benzofenona-3, EDDP y barbital. Benzofenona-3 es encontrado en las cinco EDARs a concentraciones que pueden llegar a representar un riesgo para los organismos acuáticos. Para el EDDP el riesgo existe en las EDARs de Tarragona, Reus y Blanes; y para el barbital el riesgo está presente en los afluentes de las EDARs de Blanes y Castell Platja d'Aro. En una publicación muy reciente, realizaron una búsqueda exhaustiva en la literatura para recopilar datos de concentraciones de 208 contaminantes de interés emergente en afluentes de EDARs en Grecia [25]. Con estos datos los autores calcularon los coeficientes de riesgo (Q) para estimar el posible riesgo de estos contaminantes hacia los organismos acuáticos. Según los resultados, las concentraciones a las que son

detectados triclosan en los afluentes representan un riesgo muy alto para los tres organismos acuáticos sobre los que fueron calculados (peces, daphnia y algas), encontrando valores de Q de hasta 4914 en algas. En este mismo estudio pentobarbital y fenobarbital también representaron un riesgo para las algas con valores de Q de 38 y 18, respectivamente. En otros estudios que estiman el riesgo medioambiental que pueden conllevar los contaminantes de interés emergente a las concentraciones detectadas en los afluentes de las EDARs, han encontrado que compuestos como diazepam, triclosan, codeína, morfina, carbamazepina, fenobarbital y pentobarbital representan algún riesgo hacia los organismos acuáticos [6-8]. Por otro lado, otros estudios no han encontrado riesgo por carbamazepina y diazepam a las concentraciones que han sido detectadas en los efluentes de las EDARs [7, 26, 27]. Así mismo, en un estudio reciente tampoco encontraron riesgo de parabeno hacia los organismos acuáticos a las concentraciones detectadas en los afluentes de EDARs en China [24], resultados que coinciden con los encontrados en nuestro estudio de monitorización.

Sin embargo, la evaluación del riesgo medioambiental asociado con las concentraciones encontradas en fangos de depuradora, demostró que los parabenos y octocrileno presenta un riesgo alto para los organismos terrestres. En este aspecto, investigaciones sobre la evaluación del riesgo ambiental en fangos de depuradora es demasiado limitada. Muy recientemente, Verlicchi et al [28], recopilaron datos de concentración de varios contaminantes de interés emergente en fangos de depuradora publicados en diferentes estudios, con la finalidad de evaluar el riesgo medioambiental que supone la utilización de los fangos en agricultura. De los tres grupos de contaminantes evaluados en esta sección, solo se encontraron datos de Q para triclosan, triclocarban y carbamazepina en la publicación antes mencionada, presentando riesgo triclosan y triclocarban hacia los organismos terrestres a las concentraciones detectadas [28].

Con los datos obtenidos de monitorizar las drogas de abuso en las aguas de entrada de las cinco EDARs bajo estudio, se realizó una

estimación del consumo de drogas de abuso en las poblaciones de Tarragona, Reus, Blanes, Castell Platja d'Aro y Palamós. De esta manera se pueden establecer las diferencias espaciales en consumo de cocaína, heroína, metadona y codeína en estas cinco zonas. En general, los datos estimados indican mayor prevalencia de consumo de estas sustancias en la provincia de Tarragona, y menos prevalencia de consumo se observa en Palamós (provincia de Girona). No obstante, la tendencia de consumo de metadona fue similar en las cinco poblaciones, fluctuando los valores entre 14 y 150 mg/día por 1000 habitantes, excepto en un mes puntual en el que el consumo de metadona fue significativamente más alto en Palamós con un consumo estimado de 373 mg/día por 1000 habitantes. Por otro lado, mientras que en la ciudad de Tarragona se presenta un mayor consumo de codeína (máximo encontrado de 278 mg/día por 1000 habitantes), en Reus se presenta un mayor consumo de cocaína (máximo encontrado de 460 mg/día por 1000 habitantes) entre las zonas geográficas estudiadas. Este enfoque epidemiológico ha sido utilizado muy recientemente en varios estudios para estimar el consumo de drogas de abuso en algunas poblaciones de Canada [29], Estados Unidos [9, 30], República Eslovaca [31], Korea [32] y China [33].

El estudio de monitorización llevado a cabo durante 1 año en cinco EDARs localizadas en diferentes zonas geográficas, aporta información relevante sobre la presencia, comportamiento y tendencia en consumo de los PCPs, drogas de abuso e hipnótico-sedantes en zonas geográficas donde no se han realizado estudios de monitorización por periodos largos de tiempo. Por primera vez se estima el riesgo medioambiental que conllevan estos contaminantes al ser liberados al medioambiente acuático y terrestre en esta zona geográfica. Además, cabe destacar que según la bibliografía consultada, se han llevado a cabo muy pocos estudios de riesgo medioambiental en fangos de depuradora limitándose solo a tres investigaciones. Así mismo, por primera vez se realiza un estudio epidemiológico de las drogas de abuso a partir del análisis de las aguas de entrada de EDAR en estas cinco poblaciones.

Referencias

- [1] R. Álvarez-Ruiz, M.J. Andrés-Costa, V. Andreu, Y. Picó, J. Chromatogr. A 1405 (2015) 103.
- [2] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1620.
- [3] P. Gago-Ferrero, V. Borova, M. Dasenaki, N. Thomaidis, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 4287.
- [4] N. Ratola, A. Cincinelli, A. Alves, A. Katsoyiannis, J. Hazard. Mat. 239–240 (2012) 1.
- [5] R. Celano, A.L. Piccinelli, L. Campone, L. Rastrelli, J. Chromatogr. A 1355 (2014) 26.
- [6] P. Verlicchi, M. Al Aukidy, E. Zambello, Sci. Total Environ. 429 (2012) 123.
- [7] C.I. Kosma, D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Sci. Total Environ. 466–467 (2014) 421.
- [8] T.S. Oliveira, M. Murphy, N. Mendola, V. Wong, D. Carlson, L. Waring, Sci. Total Environ. 518–519 (2015) 459.
- [9] B. Subedi, K. Kannan, Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 6661.
- [10] I. Racamonde, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Microchem. J. 119 (2015) 58.
- [11] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1248 (2012) 104.
- [12] T. Kosjek, S. Perko, M. Zupanc, M. Zanoški Hren, T. Landeka Dragičević, D. Žigon, B. Kompare, E. Heath, Water Res. 46 (2012) 355.
- [13] E. Hapeshi, M. Gros, R. Lopez-Serna, M.-R. Boleda, F. Ventura, M. Petrovic, D. Barceló, D. Fatta-Kassinos, Clean – Soil, Air, Water 43 (2015) 1272.
- [14] E.N. Evgenidou, I.K. Konstantinou, D.A. Lambropoulou, Sci. Total Environ. 505 (2015) 905.
- [15] C. Boix, M. Ibáñez, J.V. Sancho, J. Rambla, J.L. Aranda, S. Ballester, F. Hernández, Talanta 131 (2015) 719.
- [16] M.J. Andrés-Costa, N. Rubio-López, M. Morales Suárez-Varela, Y. Pico, Environ. Pollut. 194 (2014) 152.

- [17] V. Borova, N. Maragou, P. Gago-Ferrero, C. Pistos, N. Thomaidis, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4273.
- [18] R. López-Serna, M. Petrović, D. Barceló, *Chemosphere* 85 (2011) 1390.
- [19] B. Subedi, K. Kannan, *Sci. Total Environ.* 514 (2015) 273.
- [20] M. Wu, J. Xiang, C. Que, F. Chen, G. Xu, *Chemosphere* 138 (2015) 486.
- [21] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5619.
- [22] P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *Chemosphere* 84 (2011) 1158.
- [23] S. Ramos, V. Homem, A. Alves, L. Santos, *Sci. Total Environ.* 526 (2015) 278.
- [24] W. Li, Y. Shi, L. Gao, J. Liu, Y. Cai, *J. Hazard. Mat.* 300 (2015) 29.
- [25] V.S. Thomaidi, A.S. Stasinakis, V.L. Borova, N.S. Thomaidis, *J. Hazard. Mat.* 283 (2015) 740.
- [26] M. Gros, M. Petrović, A. Ginebreda, D. Barceló, *Environ. Internat.* 36 (2010) 15.
- [27] J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, *Environ. Int.* 33 (2007) 596.
- [28] P. Verlicchi, E. Zambello, *Sci. Total Environ.* 538 (2015) 750.
- [29] V. Yargeau, B. Taylor, H. Li, A. Rodayan, C.D. Metcalfe, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 722.
- [30] N.V. Heuett, C.E. Ramirez, A. Fernandez, P.R. Gardinali, *Sci. Total Environ.* 511 (2015) 319.
- [31] T. Mackuřak, J. Škubák, R. Grabic, J. Ryba, L. Birořová, G. Fedorova, V. řpalková, I. Bodík, *Sci. Total Environ.* 494–495 (2014) 158.
- [32] K.Y. Kim, F.Y. Lai, H.-Y. Kim, P.K. Thai, J.F. Mueller, J.-E. Oh, *Sci. Total Environ.* 524–525 (2015) 440.
- [33] U. Khan, A.L.N. van Nuijs, J. Li, W. Maho, P. Du, K. Li, L. Hou, J. Zhang, X. Meng, X. Li, A. Covaci, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 710.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

Conclusiones

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Las principales conclusiones derivadas de los estudios presentados en esta tesis doctoral son las siguientes:

1. Los métodos desarrollados en esta tesis para determinar drogas de abuso, hipnótico-sedantes y edulcorantes de alta intensidad presentan límites de cuantificación suficientemente bajos para su determinación en muestras de aguas de río, aguas residuales y lodos de depuradora.
2. El uso de columnas cromatográficas con partículas superficialmente porosas (*fused-core*) permitió alcanzar tiempos de análisis cortos, buena resolución y alta eficacia bajo las condiciones optimizadas.
3. La espectrometría de masas en tándem utilizando el analizador de masas de triple cuadrupolo ha demostrado ser una herramienta altamente sensible para la cuantificación de contaminantes de interés emergente, los cuales se encuentran usualmente a muy bajos niveles de concentración en las muestras ambientales.
4. La extracción en fase sólida (SPE) proporcionó porcentajes de recuperación adecuados para todos los compuestos estudiados en esta tesis. Diferentes sorbentes poliméricos con balance hidrofílico/lipofílico y modo mixto fueron evaluados durante el desarrollo de los métodos, obteniéndose para todos los estudios las mejores recuperaciones con el sorbente Oasis HLB con balance hidrofílico/lipofílico.
5. Diferentes estrategias para eliminar o reducir el efecto matriz fueron evaluadas durante el desarrollo del método analítico para determinar edulcorantes de alta intensidad en aguas de río y aguas residuales de EDARs, pero ninguna fue completamente efectiva principalmente por las diferentes características físico-químicas que presentan los edulcorantes de alta intensidad.

6. La extracción con líquidos presurizados (PLE) fue una técnica de extracción eficiente para la extracción de los contaminantes de interés emergente incluidos en esta tesis en muestras de fangos.
7. En el desarrollo del método analítico para determinar edulcorantes de alta intensidad en lodos de depuradora, el efecto matriz fue reducido ligeramente mediante *clean-up* en celda con sorbente C₁₈ y posterior *clean-up* de los extractos del PLE utilizando SPE con el sorbente polimérico Oasis HLB.
8. La aplicación de los métodos desarrollados para determinar hipnótico-sedantes y edulcorantes, demuestra la ubicuidad de carbamazepina, diazepam, nordiazepam, acesulfamo, sucralosa y ácido glicirricínico en las aguas de río y en las aguas residuales de depuradora, siendo la carbamazepina y el acesulfamo los compuestos encontrados con las más altas concentraciones.
9. Las drogas de abuso nicotina y EDDP, el hipnótico-sedante carbamazepina y los edulcorantes acesulfamo y sacarina fueron los compuestos que presentaron los más altos niveles de concentración en fangos de depuradora.
10. En la monitorización de drogas de abuso, hipnótico-sedantes y productos del cuidado personal (PCPs) durante un año en las cinco EDARs, los compuestos siempre detectados fueron metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, benzofenona-3, nicotina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, metadona, EDDP, carbamazepina, diazepam y nordiazepam en muestras de agua de entrada, efluentes y lodos de depuradora, reflejando la exposición continua de estos contaminantes en la fauna acuática y terrestre.
11. Las EDARs con tratamientos terciarios con ultravioleta y cloración aplicados en algunas de las EDARs estudiadas en esta tesis mostraron mayor efectividad en eliminar algunos de los

contaminantes estudiados que en las EDARs que aplican tratamientos convencionales con lodos activados.

12. La evaluación preliminar del riesgo ambiental sugiere que benzofenona-3, EDDP, y barbital podrían tener un riesgo potencial para los organismos acuáticos, mientras que metilparaben, etilparaben, propilparaben y octocrileno podrían tener un riesgo potencial para los organismos terrestres.
13. La epidemiología de las aguas residuales muestra la prevalencia de consumo de heroína, cocaína, metadona y codeína en las cinco ciudades monitorizadas. El intervalo de los niveles de consumo en las cinco ciudades es entre 7 (heroína) y 459 (cocaína) mg/día por 1000 habitantes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

ANEXOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y DE RÍO Y FANGOS DE DEPURADORA.

Paula Andrea Arbeláez Salazar

Dipòsit Legal: T 63-2016

Anexo I. Abreviaciones

6-AM	6- acetilmorfina
AEMPS	Agencia española de medicamentos y productos sanitarios
APCI	Ionización química a presión atmosférica
BE	Benzoilecgonina
BMZ	Bromazepam
BP-3	Benzofenona-3
BPB	Bencil parabeno
BT	Barbital
CAE	Concentración ambiental medida
CBZ	Carbamazepina
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CL ₅₀	Concentración letal media
COC	Cocaína
COD	Codeína
CPE	Extracción en punto de enturbiamiento
DDD	Dosis diaria definida
DHB	2,4-Dihidroxibenzofenona
DHMB	2.2`-Dihidroxi-4-metoxibenzofenona
DIH	Dihidrocodeína
DL ₅₀	Dosis letal media
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DMSPE	Microextracción en fase sólida dispesiva
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
DZP	Diazepam
ECOSAR	Relación estructura-actividad ecológica
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDDP	2-Etilideno-1,5 dimetil-3,3-difenilpirrolidina
EFSA	Autoridad europea de seguridad alimentaria
EPA	Agencia de protección del medio ambiente
EPB	Etilparabeno
ERA	Evaluación del riesgo ambiental
ESI	Ionización electrospray
FID	Detector de ionización de llama
GC	Cromatografía de gases

HESI	Ionización electrospray en caliente
HF-LPME	Microextracción líquida en fibra hueca
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
IDA	Ingesta diaria admitida
IT	Trampa iónica
JECFA	Comité de expertos OAA/OMS en aditivos alimentarios
JIFE	Junta internacional de fiscalización de estupefacientes
LC	Cromatografía de líquidos
LOD	Límite de detección
LOEL	Menor nivel de efecto observable
Log k_{oc}	Coefficiente de adsorción de carbón orgánico
Log k_{ow}	Coefficiente de reparto octanol-agua
LOQ	Límite de cuantificación
LPME	Microextracción en fase líquida
LTQFT	Transformación de Fourier trampa iónica lineal
LTQ	Cuadrupolo de trampa lineal
MALLE	Extracción líquido-líquido con membrana asistida
MEPS	Microextracción mediante sorbentes empaquetados
MET	Metadona
MIP	Polímero de impresión molecular
MISPE	Extracción en fase sólida con impresión molecular
MOR	Morfina
MPB	Metilparabeno
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSD	Detector selectivo de masas
NDZ	Nordiazepam
NIC	Nicotina
NOEL	Nivel sin efecto observable
OAA	Organización de las naciones unidas para alimentación y la agricultura
OMS	Organización mundial de la salud
ONU	Organización de las naciones unidas
PCPs	Productos del cuidado personal
PLE	Extracción con líquidos presurizados

PNB	Fenobarbital
PNEC	Concentración sin efecto ecológico
PPB	Propilparaben
PTB	Pentobarbital
Q	Cuadripolar
QIT	Trampa de iones cuadripolares
Qq-LIT	Cuadripolo-trampa lineal de iones
QqQ	Triple cuadripolo
QTOF	Cuadripolo tiempo de vuelo
RAM	Material de acceso restringido
SBSE	Extracción por sorción en barra agitadora
SCB	Secobarbital
SCF	Comité científico de la UE sobre la alimentación
SDME	Microextracción en gota
SPE	Extracción en fase-sólida
SPLE	Selectiva extracción con líquidos presurizados
SPME	Microextracción en fase sólida
TCC	Triclocarban
TCS	Triclosan
TD	Desorción térmica
TOF	Tiempo de vuelo
UAE	Extracción asistida con ultrasonidos
UNODC	Naciones unidas contra la droga y el delito
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta presión

Anexo II. Publicaciones

- **Arbeláez, P.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; Pocurull, E.** Simultaneous determination of drugs of abuse and their main metabolites using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 125 (2014) 65-71 (sección 3.1.1).
- **Arbeláez, P.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R.M.** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine sedative hypnotic drugs in river water and wastewater. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 95 (2015) 669-684 (Sección 3.2.1)
- **Arbeláez, P.; Granados, J.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; Pocurull, E.** Determination of sedative hypnotics in sewage sludge by pressurized liquid extraction with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3481-3488 (sección 3.2.2)
- **Arbeláez, P.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R.M.** Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1393 (2015) 106-114 (sección 3.3.1)
- **Arbeláez, P.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; Pocurull, E.** Trace-level determination of sweeteners in sewage sludge using selective pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1408 (2015) 15-21. (sección 3.3.2)
- **Arbeláez, P.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R.M.** Personal care products, drugs of abuse and sedative hypnotics environmental impact from sewage treatment plants: occurrence in wastewater

and sewage sludge, removal, sewage epidemiology and environmental risk assessment. (En preparación) (sección 3.4.1)