



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA

**Utilización de la espectrometría de masas  
en la detección de metabolitos de  
fármacos en aguas residuales**

TRABAJO FIN DE GRADO BIBLIOGRÁFICO

presentado por

**Luis Ramón Medina Padrón**

para optar al

**GRADO EN FARMACIA**

Curso Académico 2020-2021

Tutor: José Luis Espartero Sánchez  
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Sevilla, julio 2021





**Utilización de la espectrometría de masas en la detección  
de metabolitos de fármacos en aguas residuales**

Luis Ramón Medina Padrón  
Trabajo Fin de Grado bibliográfico

Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla

Tutor: José Luis Espartero Sánchez  
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Sevilla, julio de 2021



## Resumen

La metodología del Análisis de Aguas Residuales con Fines Epidemiológicos (WBE, del inglés Wastewater Based Epidemiology) permite obtener datos objetivos y casi en tiempo real sobre consumo de sustancias en una población determinada, aunque no se puedan obtener datos de prevalencia. La WBE se apoya en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y en sus avances tecnológicos para lograr realizar la separación, análisis y detección de biomarcadores con una alta especificidad y selectividad. Estos biomarcadores deben ser específicos para el compuesto que se quiere cuantificar y por ello es necesario conocer sus rutas metabólicas, así como también el factor de excreción y el comportamiento del biomarcador desde que es excretado hasta su llegada a la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR). La concentración medida (MC) se calcula en base a la población servida por la EDAR y una vez hecho el cálculo retrospectivo y normalizados los datos, se pueden comparar poblaciones entre sí. Si la MC se corresponde con la concentración predicha basada en los datos de consumo (PC), estaremos en la situación donde todo lo vendido es consumido. Es la generalidad que siguen los medicamentos de prescripción como clindamicina, sulfametoxazol, claritromicina y metronidazol, que presentaron una relación  $MC=PC$  casi perfecta en un estudio en España. Si  $MC>PC$ , puede significar que existe otra fuente de nuestro biomarcador que no tomamos en cuenta, como el uso abusivo de medicamentos. Si  $MC<PC$ , es probable que el biomarcador escogido sufra algún tipo de degradación antes de llegar a la EDAR, por lo que sería conveniente escoger otro como, por ejemplo, la *O*-desmetil-venlafaxina, metabolito de venlafaxina que da mejores estimaciones.

**Palabras clave:** sewage, wastewater-based epidemiology (WBE), mass spectrometry, pharmaceutical consumption, drug consumption.

# Índice

<b>Glosario de abreviaturas.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
1.1. Metodología para un correcto análisis de aguas residuales .....	6
1.2. El análisis de aguas residuales en Europa y España .....	8
1.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas .....	8
1.4. Principales ventajas y desventajas de la WBE.....	13
1.5. Otros usos de la WBE .....	14
<b>2. Objetivo y metodología .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Resultados y discusión.....</b>	<b>16</b>
3.1. Métodos de recolección de información de consumo de medicamentos.....	16
3.2. Determinación de los biomarcadores más importantes .....	17
3.3. Importancia de la distinción entre enantiómeros .....	19
3.4. Caso práctico en Cataluña, España .....	21
3.5. Limitaciones y fuentes de incertidumbre que afectan a la WBE.....	23
3.6. Evaluación de riesgo medioambiental .....	26
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>27</b>
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>28</b>

## Glosario de abreviaturas

APCI: Ionización Química a Presión Atmosférica

APPI: Fotoionización a Presión Atmosférica

CI: Ionización Química

Código ATC: Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

EI: Ionización Electrónica

EMA: Agencia Europea del Medicamento

EMCDDA: Observatorio Europeo de la Drogas y las Toxicomanías

ESAR-Net: Red Española de Análisis de Aguas Residuales con Fines Epidemiológicos

ESI: Ionización por Electrospray

EF: Fracción Enantiomérica

GC: Cromatografía de Gases

HE: Alta Energía

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IT: Trampa de Iones

LC: Cromatografía Líquida

LC-MS: Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masa

LC-MS/MS: Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en tándem

LE: Baja Energía

LLE: Extracción Líquido-Líquido

LOD: Límite de Detección

LOQ: Límite de Cuantificación

MDA: 3,4-metilendioxfanfetamina

MDMA: 3,4-metilendioximetanfetamina

MC: Concentración Medida

MRM: Monitoreo de reacciones múltiples

MS: Espectrometría de Masas

m/z: Relación masa/carga

NPS: Nuevas Sustancias Psicoactivas

OTC: Medicamento de Venta Libre

PC: Concentración Predicha basada en los datos de consumo

Q: Cuadrupolo

QqQ: Triple cuadrupolo

SPE: Extracción en Fase Sólida

TOF: Tiempo de Vuelo

UHPLC: Cromatografía Líquida de Super Alta Resolución

WBE: Análisis de Aguas Residuales con Fines Epidemiológicos

## 1. Introducción

La utilización de métodos tradicionales para conocer y estimar el consumo de sustancias en la sociedad, tanto de medicamentos como de drogas de abuso, mediante el uso de, por ejemplo, encuestas y cuestionarios a los pacientes, no resultan ser completamente fiables pues son dependientes de la memoria de las personas. Estos cuestionarios suelen ser limitados a una investigación específica y resultan poco prácticos para conocer un uso más amplio y general del consumo de varios medicamentos (Escolà Casas et al., 2021), ni resultan muy honestos al hablar de drogas ilegales por la falsedad en las respuestas o baja participación por el estigma social asociado a ellas (Hernández et al., 2018). Además, estos métodos presentan el inconveniente que no permiten estimar el consumo en tiempo real (Escolà Casas et al., 2021), pues se necesita de tiempo para recabar suficiente cantidad de datos que sean representativos de la población (Pocurull et al., 2020), limitación que es determinante para una rápida intervención por parte de las autoridades competentes para regular las nuevas sustancias psicoactivas (NPS) por el riesgo a la salud que conllevan (Rice et al., 2020).

Como alternativa resolutive a estos problemas anteriormente expuestos de tiempo y fiabilidad, surge una propuesta por parte de Daughton en el año 2001, donde sugiere utilizar las aguas residuales para realizar estimaciones en el consumo de drogas en la población con fines epidemiológicos (Daughton, 2001), pero no fue sino hasta el 2005 cuando su idea fue puesta en práctica primeramente por Zuccato et al. para analizar el consumo de cocaína de algunas ciudades al norte de Italia (Zuccato et al., 2005).

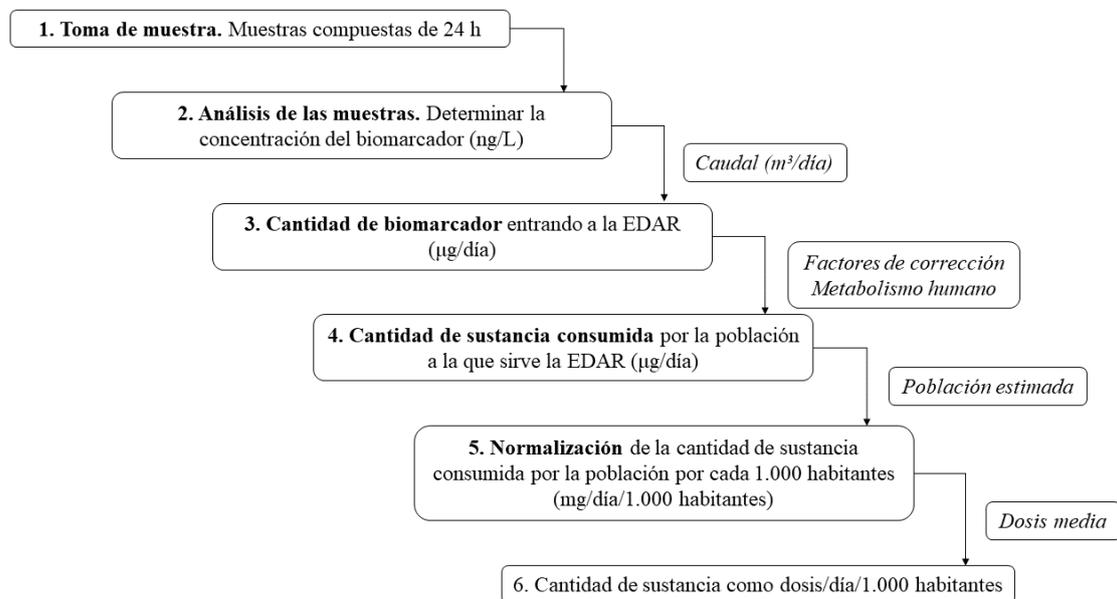
A través de los años esta metodología se consolida y es utilizada por los investigadores para estimar y analizar el consumo de drogas ilegales en primer lugar (Bijlsma et al., 2009; Castiglioni et al., 2006; Zuccato et al., 2008), así como cambios en los patrones de consumo de las mismas (Mastroianni et al., 2017; Zuccato et al., 2011), hasta llegar a hoy día donde se utiliza para analizar el consumo de sustancias de abuso como alcohol y tabaco (Rodríguez-Álvarez et al., 2014; Trowsdale et al., 2021) y de fármacos (objetivo de esta revisión).

Esta metodología lleva por nombre Análisis de Aguas Residuales con Fines Epidemiológicos (wastewater-based epidemiology, WBE, en inglés) y se fundamenta en que toda sustancia que es introducida al organismo humano es posteriormente excretada,

pudiendo excretarse la sustancia, por heces u orina, sin sufrir modificación alguna y/o sus correspondientes metabolitos. Estos desechos son vertidos al sistema de alcantarillado y conducidos hasta la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) (Bishop et al., 2020; Pocurull et al., 2020). Aquellos compuestos que sean estables pueden ser utilizados como biomarcadores de consumo y se puede asumir que “la cantidad de compuesto excretada por una población en un intervalo de tiempo determinado corresponde a la carga total que recibe la EDAR” (Pocurull et al., 2020).

### 1.1. Metodología para un correcto análisis de aguas residuales

En la figura 1 se muestra un esquema con las etapas del proceso a seguir al usar la metodología WBE.



**Figura 1.** Principales etapas del Análisis de Aguas Residuales con Fines Epidemiológicos (Castiglioni et al., 2014)

Primero se debe recolectar la muestra de las aguas residuales de entrada a la EDAR, sin tratar. Esta muestra debe ser representativa, por lo que suelen ser muestras compuestas de 24 horas tomadas, generalmente, por un equipo automatizado para el proceso, que permite tomar un volumen específico cada intervalo de tiempo preprogramado. El método de la toma de muestra y la frecuencia de toma de esta es un paso importante en esta metodología, pues es una de las principales fuentes de incertidumbre, como se describirá más adelante. En el segundo paso se analizan las muestras para determinar la concentración del biomarcador. Debido a que las aguas residuales tienen muchos

elementos en ellas (se consideran matrices complejas) y dado que pueden encontrarse en concentraciones tan bajas como el rango de los ng/L, es necesario utilizar técnicas e instrumentos que posean una alta sensibilidad y selectividad y sean capaces de separar e identificar cada uno de los elementos, por lo que se suelen utilizar métodos basados en cromatografía (para la separación de los componentes de la muestra) y espectrometría de masas (para la detección y cuantificación). Además, se suele hacer un paso previo al análisis cromatográfico, que consiste, usualmente, en una extracción en fase sólida (SPE), para limpiar y/o preconcentrar la muestra. La elección del biomarcador es clave en esta metodología, ya que el mismo debe ser estable en las aguas residuales y sus vías metabólicas deben ser conocidas, ya que puede determinarse el compuesto original o algún metabolito (tabla 1).

**Tabla 1.** Principales drogas y biomarcadores utilizados en el Análisis de Aguas Residuales con Fines Epidemiológicos (Bijlsma et al., 2018; Pocurull et al., 2020)

Droga	Biomarcador de consumo
Cocaína	Benzoilecgonina
Anfetamina	Anfetamina
Metanfetamina	Metanfetamina
Éxtasis	3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA)
Heroína	6-acetilmorfina
Metadona	2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina
Cannabis (tetrahidrocannabinol)	11-nor-9-carboxi-tetrahidrocannabinol
Alcohol (etanol)	Sulfato de etilo
Tabaco (nicotina)	Cotinina e hidroxí-cotinina
Consumo simultáneo de alcohol y cocaína	Cocaetileno

El siguiente paso a seguir es calcular la cantidad (o carga) de biomarcador teniendo en cuenta el caudal de agua que entra en la EDAR (usualmente, en 24h). Posteriormente se pasa la cantidad de biomarcador a cantidad (o carga) de sustancia consumida considerando los factores de corrección que se tengan que aplicar, como el porcentaje medio de excreción (renal y/o fecal, como se detallará posteriormente) o la relación de masa molar entre la sustancia y su metabolito. El quinto paso consiste en normalizar los datos según la población total a los que sirve la EDAR y estimarlos por cada 1000 habitantes, para que sean comparables entre distintas poblaciones. El último paso consistiría en transformar el valor de cantidad (generalmente en miligramos) de sustancia

obtenida previamente en dosis; para ello debemos conocer la dosis media de consumo de la sustancia estudiada. Este último paso no es siempre calculado (Bijlsma et al., 2018; Castiglioni et al., 2014; Pocurull et al., 2020).

## **1.2. El análisis de aguas residuales en Europa y España**

En Europa, la WBE se consolida a partir de 2010 con la creación del grupo SCORE (Sewage analysis CORE group - Europe), apoyado por el Observatorio Europeo de la Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA), realizando ejercicios interlaboratorios para el control de calidad en los análisis (Hernández et al., 2018), publicando un protocolo de buenas prácticas para la toma de muestra, almacenamiento y procedimiento analítico acordado por el grupo, tomando en cuenta, por ejemplo, una temperatura menor a 4°C mientras esté almacenada la muestra (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2013). En 2016 publicó una guía ética para identificar el riesgo de estigmatizar un grupo dentro de una comunidad analizada y proponer estrategias de mitigación del mismo (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2016).

En España, se crea en 2017 la Red Española de Análisis de Aguas Residuales con Fines Epidemiológicos (ESAR-Net) con el objetivo principal de contribuir al avance científico de la WBE y aplicar esta metodología en el país, fomentando la comunicación entre grupos investigadores e investigando el consumo ilegal de drogas, tabaco y alcohol en todo el territorio, entre otros aspectos (Bijlsma et al., 2018). Como ejemplos se pueden citar: un estudio del consumo de alcohol durante la festividad de Las Fallas en Valencia (Andrés-Costa et al., 2016), uno elaborado en la provincia de Castellón para medir la presencia de sustancias ilícitas durante un festival internacional de música (Bijlsma et al., 2014), otro para determinar el consumo de drogas dentro de una prisión en Cataluña (Postigo et al., 2011) y un estudio reciente, que es el primero realizado en España, para evaluar el consumo de alcohol a nivel nacional usando la WBE (López-García et al., 2020).

## **1.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas**

Para poder realizar un correcto análisis de las aguas residuales, la información obtenida debe ser fiable para que así sea usada con fines epidemiológicos, tales como la planificación de políticas e implementación de nuevas leyes reguladoras, basándose en la

evidencia encontrada (Banta-Green et al., 2016; Hernández et al., 2018; Rice et al., 2020). Por ello y debido a la complejidad de las muestras a analizar (muchos interferentes) y las bajas concentraciones en las que suelen estar los biomarcadores (generalmente ng/L), es imprescindible usar metodologías altamente sensibles y selectivas, así como realizar una preparación previa de la muestra. Cumpliendo estos requerimientos y tratando de determinar de manera simultánea una amplia cantidad de biomarcadores en una única serie analítica, se escoge la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa (LC-MS) como la técnica más apropiada para lograrlo (Tarcomnicu et al., 2011).

Primeramente, deben eliminarse de la muestra las partículas sólidas que pudiesen encontrarse en suspensión, para lo que se puede filtrar, por ejemplo, con un filtro de microfibra de vidrio (Tarcomnicu et al., 2011) o centrifugarse (Hernández et al., 2018). A pesar de la alta especificidad de la técnica a utilizar, la muestra debe ser preconcentrada para evitar interferencias por parte de compuestos presentes en la matriz que puedan ser coeluidos con el analito de interés (Beccaria and Cabooter, 2020), *“sin embargo, algunos instrumentos analíticos modernos permiten la inyección directa de aguas residuales filtradas o centrifugadas debido a la alta sensibilidad proporcionada”* (Hernández et al., 2018). Los métodos más usados para ello son la extracción en fase sólida (SPE), tanto on-line como off-line, y la extracción líquido-líquido (LLE) (Beccaria and Cabooter, 2020), superando la SPE a la LLE por presentar mejor porcentaje de recuperación (Campíns-Falcó et al., 2012). También se ha reportado el uso de micro extracción en fase sólida (Koller et al., 2019).

Después de este paso previo, se procede a separar los analitos mediante una técnica cromatográfica, pudiendo usarse la cromatografía de gases o la cromatografía líquida (GC o LC, respectivamente). Aunque ambas técnicas proporcionan buenos resultados al acoplarse a la espectrometría de masas, debido a que: (a) la GC usualmente requiere la derivatización de los compuestos para que sean compatibles con la técnica, (b) la mayoría de los biomarcadores son polares y poco o muy poco volatilizables, y (c) la GC no es compatible con compuestos termolábiles, la más utilizada es la LC ya que ofrece mayor versatilidad y menor tiempo de análisis al no tener que derivatizar (Hernández et al., 2018; Tarcomnicu et al., 2011). Más aún, el avance de la tecnología ha permitido desarrollar la cromatografía líquida de alta resolución a ultra alta resolución (HPLC a UHPLC, respectivamente), gracias al desarrollo de columnas de fase estacionaria con un diámetro de partícula menor a 2  $\mu\text{m}$ , disminuyendo el tiempo del análisis, facilitando la asignación

de picos al ser más estrechos, lo que mejora la resolución, y minimizando la coelución de compuestos con valores de relación masa/carga ( $m/z$ ) cercanos (Hernández et al., 2014) sin alterar la eficiencia (Beccaria and Cabooter, 2020).

Después de separados los biomarcadores, estos serán analizados mediante espectrometría de masas (MS) para su posterior identificación, ya que esta técnica presenta una alta especificidad molecular y gran sensibilidad (Beccaria and Cabooter, 2020).

Un **espectrómetro de masas** está compuesto, al menos, por una fuente de ionización, un analizador y un detector, todo ello dentro de un sistema de alto vacío (entre  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  Torr). Al introducir la muestra, en nuestro caso de forma indirecta ya que los compuestos separados en el cromatógrafo pasan directamente al MS, esta entrará a la cámara de ionización, donde el compuesto será ionizado, convirtiéndolo en un ión.

La **fuente de ionización** varía en función de si la muestra que llega es gaseosa o líquida: si se ha utilizado una GC, será gaseosa y puede usarse la ionización electrónica (EI) o la ionización química (CI). Si se ha utilizado una LC (que es la más utilizada como se indicó anteriormente), la muestra será líquida y se puede utilizar la ionización por electrospray (ESI), que consiste en aplicar una diferencia de potencial a la salida del tubo capilar de la columna HPLC, lo que produce la ionización de las gotas del efluente, que se van haciendo más pequeñas por evaporación y dejando finalmente las moléculas del analito multicargadas, que pasan posteriormente al analizador. Este método permite estimar la masa de la molécula, pues esta no se fragmenta, dado que es una ionización suave. Otras fuentes de ionización son la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI) (Akash and Rehman, 2020). El método más usado al hacer un análisis farmacéutico de compuestos termolábiles, polares y no volátiles es ESI, seguido de APCI y por último APPI para moléculas poco o nada polares y de bajo peso molecular (Beccaria and Cabooter, 2020).

Luego, estos iones pasarán al **analizador**, que actúa como un separador de iones. Los más usados en nuestra área son la trampa de iones (IT), cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF) y Orbitrap, así como una mezcla entre ellos para aumentar la sensibilidad y precisión, como el triple cuadrupolo (QqQ) y cuadrupolo-TOF (Q-TOF) (Beccaria and Cabooter, 2020). Los analizadores TOF son muy rápidos y de gran resolución, permitiendo en poco tiempo, almacenar los espectros de masas exactas de todos los analitos presentes en una mezcla, información que posteriormente puede ser de utilidad,

sin tener que almacenar la muestra. Dichas masas exactamente medidas (hasta la quinta cifra decimal) nos permiten discriminar entre sustancias que presentan la misma masa nominal (expresada en números enteros). La sensibilidad es otro parámetro altamente dependiente del tipo de analizador utilizado, caracterizada por los límites de detección (LOD, de Limit of Detection) y de cuantificación (LOQ, de Limit of Quantification). En general, los niveles de concentración encontrados en las aguas residuales varían entre los ng/L y los µg/L, dependiendo del compuesto y tipo de muestra (Gros et al., 2006). Mediante la utilización de un equipo LC-QqQ, en modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM)<sup>1</sup>, los LOD no superan los 50 ng/L para la mayoría de fármacos analizados, e incluso bajan por debajo de 1 ng/L para muchos de ellos (López Serna, 2013).

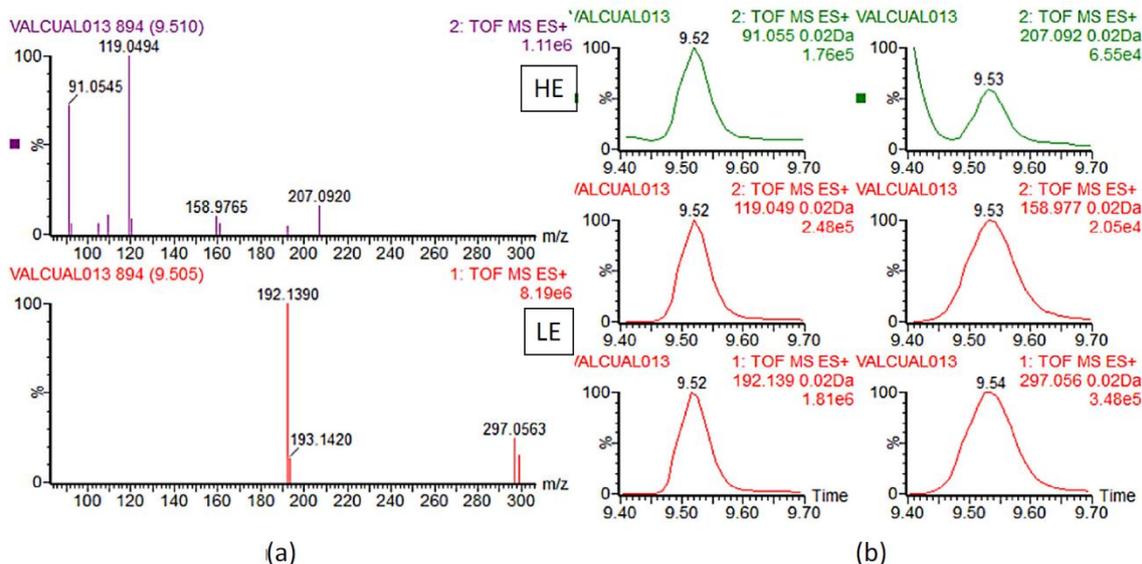
Finalmente, los iones llegan al **detector**, donde la señal recibida es procesada por un ordenador que genera los espectros de masas (Akash and Rehman, 2020).

Para ilustrar el potencial de esta técnica, se pueden observar en la figura 2a los espectros de masas de una muestra de agua residual, donde se muestran los iones fragmentos (arriba) de los que pueden ser sus iones precursores (abajo). Para poder relacionarlos se toman los cromatogramas de todos los iones (figura 2b) y en base al tiempo de retención y la forma de los picos, se puede asignar cada fragmento a su ión original. Gracias a la UHPLC, se ha logrado obtener estos cromatogramas, donde se pueden diferenciar a dos compuestos que han sido coeluidos, asignándoles a cada uno sus correspondientes fragmentos: los iones observados a m/z 119 y m/z 91 son producidos por el precursor m/z 192, mientras que el precursor a m/z 297 generó los iones a m/z 159 y m/z 207 (Hernández et al., 2014).

Además, la técnica tiene un gran alcance, ya que puede detectar sustancias que en principio no eran buscadas, cuyo espectro queda registrado y que puede ser consultado de manera retrospectiva, para encontrar nuevos compuestos o metabolitos sin tener que realizar nuevos análisis (ya que a veces la muestra puede haberse deteriorado o descartado), simplemente analizando los datos sin procesar (Hernández et al., 2018).

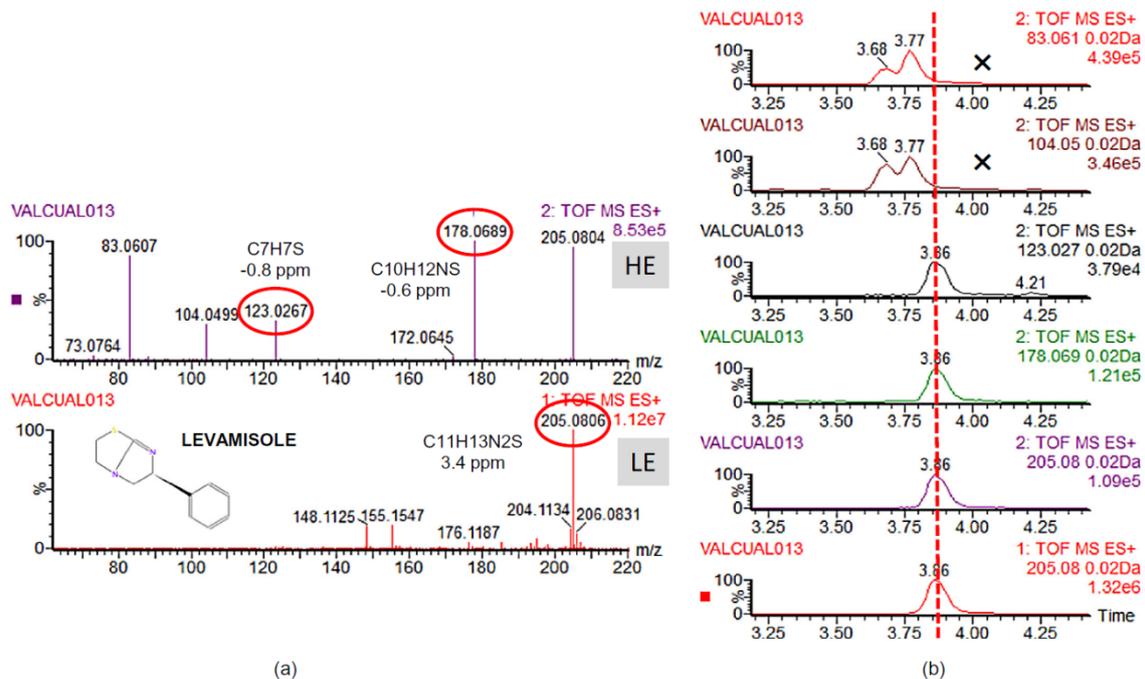
---

<sup>1</sup> El modo de escaneo MRM en espectrómetros LC-QqQ permite seleccionar tanto el ión precursor como el ión producto de una determinada fragmentación producida en la celda de colisión, o segundo cuadrupolo. De esta forma se consigue una alta sensibilidad y selectividad en el análisis (Stashenko and Martínez, 2010).



**Figura 2.** (a) Espectro de masas de baja energía (LE) y alta energía (HE); (b) Cromatograma de iones: LE, los dos inferiores y HE, los 4 superiores (Hernández et al., 2014)

Inclusive, si no se dispone de los estándares de referencia en un momento determinado, esta técnica permite identificar los compuestos con una alta probabilidad, dando una identificación tentativa gracias a los espectros de masas y softwares especializados, que posteriormente puede ser corroborada al conseguir el estándar de referencia correspondiente. A manera de ejemplo se muestra la identificación tentativa del levamisol, cuyo estándar no se disponía en ese momento en el laboratorio, mediante el espectro de masas a LE (figura 3a). Con la ayuda del software MassFragment se dedujeron las masas de los iones fragmentos y con la UHPLC se pudieron asignar perfectamente a los iones que coeluyeron, por los picos cromatográficos encontrados en el tiempo de retención de 3,86 minutos (figura 3b). Quedando entonces el ion precursor con m/z 205, y sus iones fragmentos con m/z 178 y m/z 123, y descartando m/z 104 y m/z 83. Posteriormente, consultando con la literatura, se corroboró que dos iones fragmentos a m/z 178 y m/z 123 habían sido previamente encontrados para el levamisol. Finalmente, con la adquisición del estándar se determinó sin lugar a dudas que la identificación tentativa era correcta (Hernández et al., 2014).



**Figura 3.** Detección e identificación de levamisol en aguas residuales. (a) Espectro de masas LE y HE de los compuestos eluyendo a los 3,86 minutos. (b) Cromatogramas de iones: LE, abajo y HE, los cinco primeros (Hernández et al., 2014)

#### 1.4. Principales ventajas y desventajas de la WBE

##### *Desventajas*

- No se pueden obtener datos de prevalencia (número de dosis y frecuencia), pureza de la droga, número de usuarios de drogas (Rice et al., 2020).
- No se pueden diferenciar ni el tipo de consumidor ni la vía de administración (Bijlsma et al., 2018; Pocurull et al., 2020).
- Puede causar sesgo de segregación en una comunidad (Pocurull et al., 2020).

##### *Ventajas*

- Obtención de datos objetivos de consumo (Bijlsma et al., 2018) y prácticamente en tiempo real (Rice et al., 2020), respetando la privacidad.
- Permite monitorizar cambios de consumo en el tiempo y/o entre poblaciones (Pocurull et al., 2020).
- Puede detectar sustancias que tienen poca prevalencia de consumo o que están siendo recientemente introducidas en la población, es decir, cambios en los hábitos de consumo en el tiempo (Pocurull et al., 2020).
- Permite monitorizar tendencias de consumo en poblaciones pequeñas (como centros penitenciarios o vecindarios específicos) o grandes (como ciudades o países) (Pocurull et al., 2020), así como en eventos específicos tales como festividades y conciertos (Andrés-Costa et al., 2016; Bijlsma et al., 2014).

- Pone en evidencia los co-consumos de sustancias a través del biomarcador específico para ello (Pocurull et al., 2020).

### **1.5. Otros usos de la WBE**

Adicionalmente al uso principal del análisis de drogas y medicamentos, cabe resaltar la posibilidad de medir los niveles de exposición a contaminantes como pesticidas y análisis de biomarcadores de estrés oxidativo o asociados a procesos carcinogénicos (Bijlsma et al., 2018), así como la identificación y control de NPS, que suelen presentar una prevalencia de consumo muy baja, con la dificultad de que a veces no se conoce el biomarcador por falta de estudios y se suelen encontrar en concentraciones extremadamente bajas en comparación a las drogas de abuso clásicas (Pocurull et al., 2020).

Recientemente, grupos de investigación han determinado marcadores potenciales del SARS-CoV-2 para poder reconocer posibles brotes antes que las personas muestren síntomas y aplicar las medidas de restricción rápidamente, lo que junto con la vacunación, disminuiría el número de contagios (Anand et al., 2021).

## 2. Objetivo y metodología

El presente trabajo tiene por **objetivo** realizar una investigación en la que se refleje la importancia del análisis de aguas residuales con fines epidemiológicos en la detección de fármacos y/o sus metabolitos en los últimos diez años utilizando para ello la espectrometría de masas.

En cuanto a la **metodología** seguida para la recolección de información para esta revisión bibliográfica se utilizó el motor de búsqueda PubMed, que utiliza la base de datos MEDLINE. Se realizó una primera investigación general sobre el tema a estudiar que nos sirviese de guía sobre qué palabras clave acotar así como los autores más citados en el área, para luego utilizarlas en una segunda búsqueda más específica que nos permitiese encontrar las publicaciones más acorde para satisfacer los objetivos de la revisión, con el criterio de selección de que fuesen publicaciones y/o artículos de revisión, con una antigüedad de publicación inferior a diez años, con excepción de algunos de mayor antigüedad debido a su relevancia para el desarrollo de la WBE. Además, se consultaron las web de la Red Española de Análisis de Aguas Residuales con Fines Epidemiológicos (ESAR-Net) y la del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA).

De todos los artículos encontrados, se seleccionaron aquellos cuyos resúmenes, metodologías y conclusiones se ajustaban al objetivo de esta revisión.

Las palabras claves usadas (en inglés) fueron sewage, wastewater-based epidemiology (WBE), mass spectrometry, pharmaceutical consumption y drug consumption.

## 3. Resultados y discusión

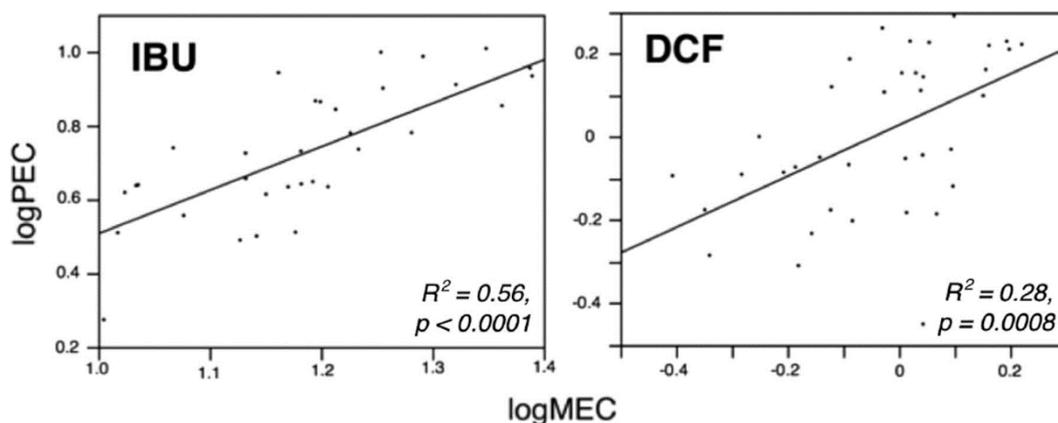
### 3.1. Métodos de recolección de información de consumo de medicamentos

La recolección de datos a gran escala referente al consumo de medicamentos no es tarea sencilla ni tampoco es de fácil acceso; sin embargo, es fundamental para comprender cómo se ve afectada una comunidad en “*términos médicos, sociales y económicos*” (Escolà Casas et al., 2021). La principal limitación es la disponibilidad de estos datos, ya que pueden provenir del sistema de salud público y/o privado, así como de clínicas y hospitales, además de aportar información de una o varias vías de administración. Según los datos con los que se trabajen, se hacen unas presunciones que pueden contribuir a errores en los cálculos y, por tanto, a interpretaciones erróneas, como por ejemplo el uso de consumo per cápita anual, que asume que no hay diferencias significativas entre los hábitos de consumo local y nacional ni a través de todo el año (Escolà Casas et al., 2021; Saunders et al., 2016) y que “*la gente consume y excreta la mayoría de los medicamentos comprados en una farmacia cercana a donde la prescripción fue realizada*” (Saunders et al., 2016). Además, diferencias demográficas pueden ser determinantes en los medicamentos que son más específicos para un grupo de edad o género (Saunders et al., 2016).

A partir de estos datos, se puede calcular la concentración predicha basada en los datos de consumo (PC) que permite hacer una comparación directa con la concentración medioambiental medida (MC) en las muestras y saber si las concentraciones se encuentran dentro de los rangos esperados (Escolà Casas et al., 2021), como se demuestra en la figura 4, donde tanto ibuprofeno como diclofenaco mostraron que la regresión es estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ), pero la relación es débil ( $R^2 = 0,56$  y  $0,28$ , respectivamente) lo que evidencia que hay otros factores que afectan la MC y no solo la información obtenida por los datos de consumo (Saunders et al., 2016).

En la tabla 2 se muestran dos métodos para obtener estos datos junto con sus ventajas y limitaciones. Ambos tienen en común que no todos los medicamentos (prescritos o comprados) serán consumidos, bien dentro del tiempo estipulado en la prescripción, o porque son medicamentos de consumo ocasional. La principal ventaja de los datos de ventas es que toma en cuenta los medicamentos de venta libre (OTC) además de las prescripciones, disminuyendo los errores por fuentes externas que pudiesen aumentar la

MC. En contra tiene que si los datos de venta disponibles son de laboratorios a farmacias, el stock comprado en un mismo mes puede ser vendido a través de varios meses, dificultando el análisis temporal, por lo que es mejor trabajar con los datos de ventas de las farmacias a los pacientes siempre que se pueda (Escolà Casas et al., 2021; Rice et al., 2020).



**Figura 4.** Comparación de los valores de logaritmo de PC en aguas efluentes (PEC) vs logaritmo de MC en aguas efluentes (MEC) en Gran Victoria, Canadá. **IBU**: ibuprofeno; **DCF**: diclofenaco (Saunders et al., 2016)

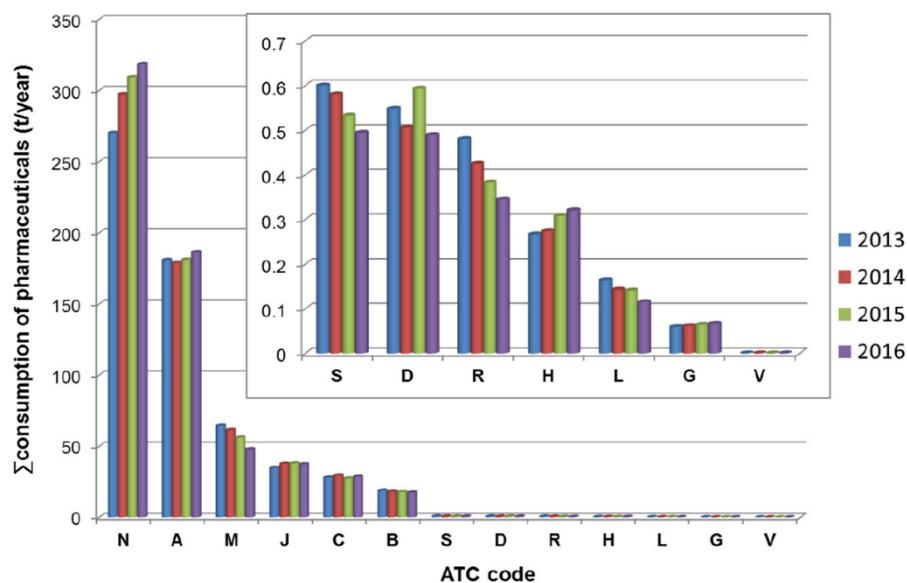
**Tabla 2.** Ventajas e inconvenientes de los métodos de recolección de información de consumo de medicamentos (Escolà Casas et al., 2021)

Método de obtención	Ventajas	Limitaciones
Agrupación de datos de prescripción médica	<p>Fuente más confiable para datos de medicamentos de prescripción cuando se necesita analizar períodos de tiempo.</p> <p>Permite obtener información para analizar grandes períodos de tiempo</p>	<p>No tiene en cuenta los OTC.</p> <p>Requiere reunir las prescripciones en una sola base de datos, tanto público como privado</p>
Datos de venta a farmacias	<p>Grandes compañías multinacionales podrían dar información respecto a muchos años en varios países.</p> <p>Tiene el potencial de reunir datos de manera más específica a una base de datos centralizada</p>	<p>Información con valor comercial y, por tanto, cuesta dinero.</p> <p>Cuando las farmacias de distintas zonas geográficas hacen sus compras a un distribuidor centralizado, se afecta la resolución espacial</p>

### 3.2. Determinación de los biomarcadores más importantes

Aunque lo ideal sería poder analizar todos los fármacos en una sola muestra de agua residual, en el mercado existe un número demasiado elevado, lo que hace prácticamente

imposible monitorizar cada uno de ellos, debido a los largos tiempos de análisis requeridos y los elevados costos que conllevaría. Por ello se hace necesario idear una clasificación para acotar aquellos de mayor relevancia, como los que puedan causar un daño al medioambiente y, por consiguiente, al ser humano, es decir, una evaluación de riesgo (Gómez-Canela et al., 2019; He et al., 2020), o a través de la información obtenida de los datos de consumo de medicamentos de la región o país a analizar, buscar aquellos biomarcadores cuyos fármacos sean más consumidos o vendidos (Escolà Casas et al., 2021). La figura 5 indica que los medicamentos pertenecientes al grupo N (sistema nervioso), A (sistema digestivo y metabolismo), J (antiinfecciosos de uso sistémico), H (preparados hormonales sistémicos, excluidas las hormonas sexuales e insulinas) y G (aparato genitourinario y hormonas sexuales), como son paracetamol, metformina, amoxicilina, prednisona y finasterida, respectivamente, han incrementado su consumo entre los años 2013 y 2016 en Cataluña, mientras que los pertenecientes a los grupos M (sistema musculoesquelético), S (órganos de los sentidos), R (sistema respiratorio) y L (agentes antineoplásicos e inmunomoduladores), como son ibuprofeno, norfloxacin, teofilina y megestrol, respectivamente, lo han disminuido, por lo que los primeros pueden ser candidatos para ser monitorizados y, por tanto, necesitan determinarse sus biomarcadores.



**Figura 5.** Consumo de medicamentos (toneladas por año) en Cataluña, ordenados según el código ATC (Gómez-Canela et al., 2019)

Otra manera propuesta es hacer una evaluación de riesgo medioambiental, que será discutida más adelante.

Una última manera es tomando en cuenta la toxicidad del compuesto. Si la PC en las aguas de salida de la EDAR indicase que teóricamente encontraremos la sustancias en las aguas, se puede monitorizar pues inclusive en bajas concentraciones, estas podrían ser nocivas para el ecosistema acuático (Gómez-Canela et al., 2019).

### **3.3. Importancia de la distinción entre enantiómeros**

Lograr hacer una distinción entre el uso de fármacos de manera legal y la ingesta ilegal de sustancias, cuando el compuesto original puede ser usado de ambas manera; diferenciar cuando un biomarcador encontrado se debe al consumo directo del compuesto o al descarte directo de la droga sin ser usada; o identificar el origen de la droga, son retos que la WBE ha podido resolver cuando se realiza un análisis quiral, es decir, un estudio selectivo de enantiómeros en las muestras de agua (Evans and Kasprzyk-Hordern, 2014; Hernández et al., 2018; Pocurull et al., 2020).

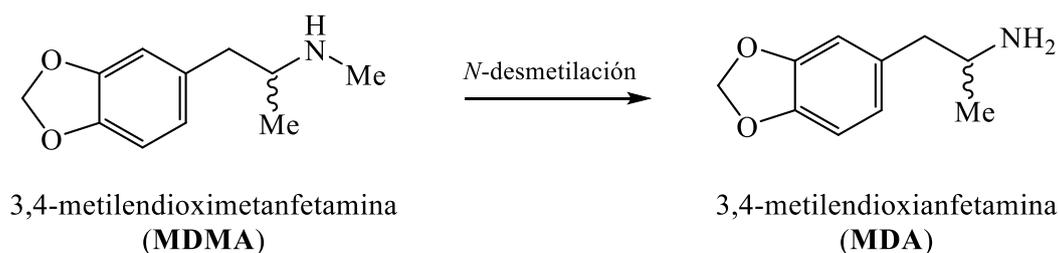
Un ejemplo de ello es la anfetamina, de la cual existen un enantiómero dextrógiro y otro levógiro, con propiedades farmacológicas diferentes. La forma dextrorrotatoria es encontrada en su uso ilegal, mientras que la forma levorrotatoria es un metabolito del principio activo selegilina, fármaco utilizado en la enfermedad de Parkinson, cuyo uso está autorizado en España (Mastroianni et al., 2017; Srinivas, 2004).

El parámetro que suministra información sobre la proporción de enantiómeros en una muestra se denomina fracción enantiomérica (EF), y puede ser definido por la siguiente fórmula (Dogan et al., 2020):

$$EF = R/(S+R)$$

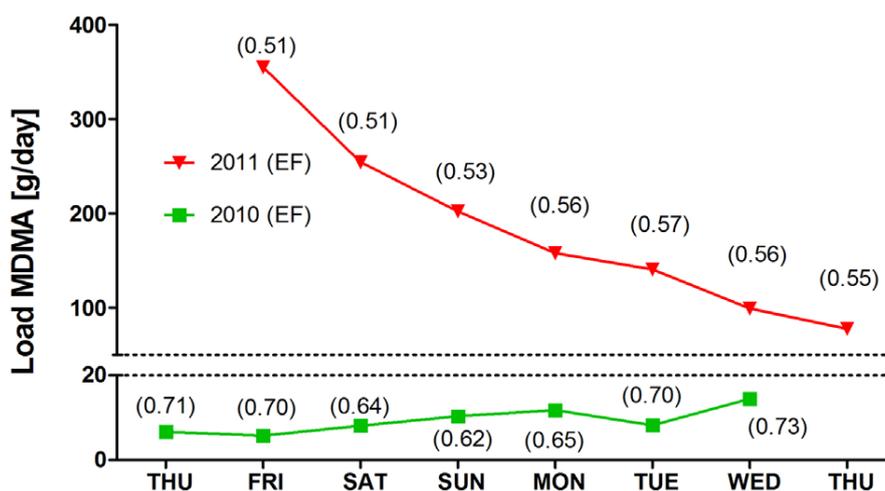
donde [S] y [R] representan las fracciones de los enantiómeros S y R, respectivamente. En el caso de racematos, el valor EF es 0,5, mientras que en el caso de enantiómeros puros el valor EF es 0 (enantiómero S) o 1,0 (enantiómero R).

Otro ejemplo son MDMA y MDA, que también poseen un centro estereogénico, cuyo uso es completamente recreacional y se sintetizan y consumen en forma racémica. Al metabolizarse en el cuerpo, lo hacen de manera estereoselectiva, que lleva a un enriquecimiento en la forma enantiomérica R(-), debido a que el ser humano metaboliza preferentemente el enantiómero S(+).



**Figura 6.** N-desmetilación metabólica de MDMA, con producción de MDA (elaboración propia)

Sabiendo que MDA es un metabolito de MDMA (figura 6), si en un análisis se encuentra mayoritariamente el enantiómero S(+)-MDA, este resultado nos indicaría que este proviene del consumo de MDMA, y no del consumo directo de MDA, ya que en ese caso, encontraríamos un enriquecimiento de la forma R(-)-MDA (Hernández et al., 2018; Kasprzyk-Hordern and Baker, 2012). La figura 7 ejemplifica la distinción entre consumo directo de MDMA en el año 2010, indicado en la línea verde, con una fracción enantiomérica (EF) media de 0,65 y la eliminación directa en el sistema de alcantarillado en el año 2011, reflejada en la línea roja, con una EF media de 0,54 (valor más concordante con una mezcla racémica), probablemente debido a una redada policial realizada dos días antes del comienzo del estudio, donde se estimó que 30 kg de MDMA fueron desechados al drenaje, puesto que la policía encontró mayoritariamente reactivos y múltiples bolsas vacías donde pudo estar la droga ya preparada (Emke et al., 2014).

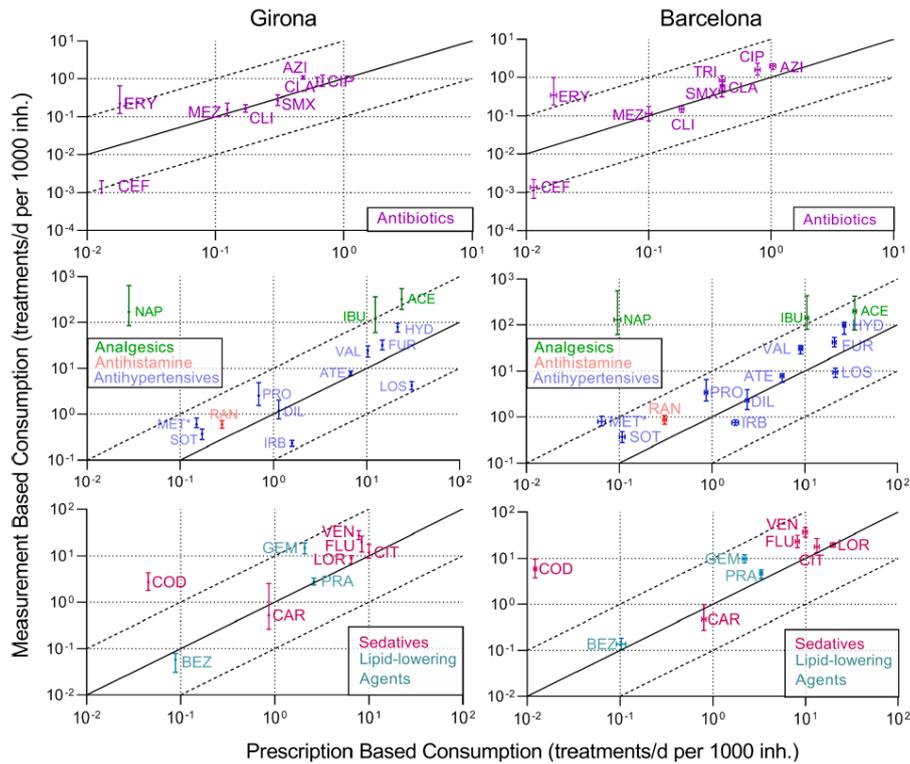


**Figura 7.** Cantidad de MDMA encontrada durante una semana de muestreo en dos años consecutivos en la EDAR de Utrecht, Países Bajos, y sus correspondientes fracciones enantioméricas (Hernández et al., 2018)

### 3.4. Caso práctico en Cataluña, España

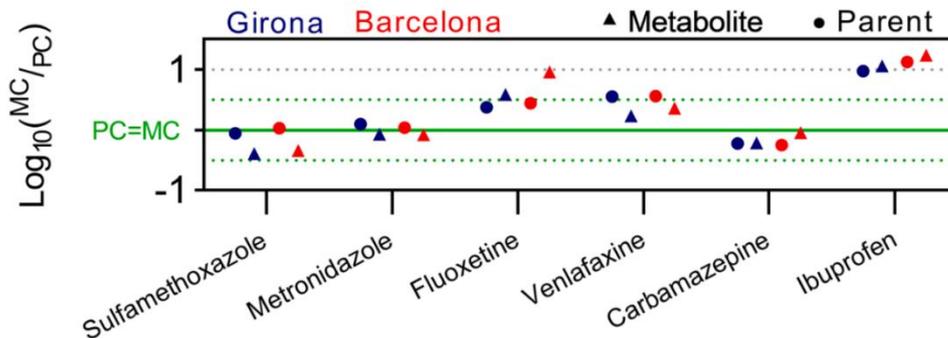
Esta investigación analiza las aguas residuales de las ciudades de Girona y Barcelona durante el mes de octubre de 2019 para los siguientes principios activos: azitromicina (AZI), cefalexina (CEF), ciprofloxacino (CIP), claritromicina (CLA), clindamicina (CLI), eritromicina (ERY), metronidazol (MEZ), sulfametoxazol (SMX), trimetoprim (TRI), paracetamol (ACE), ibuprofeno (IBU), naproxeno (NAP), diltiazem (DIL), irbesartán (IRB), losartán (LOS), valsartán (VAL), furosemida (FUR), hidroclorotiazida (HYD), atenolol (ATE), metoprolol (MET), propanolol (PRO), sotalol (SOT), carbamazepina (CAR), citalopram (CIT), fluoxetina (FLU), venlafaxina (VEN), codeína (COD), lorazepam (LOR), ranitidina (RAN), bezafibrato (BEZ), gemfibrozilo (GEM) y pravastatina (PRA), utilizando como información de consumo de medicamento la agrupación de datos de prescripción médica pública para el cálculo de PC. A pesar de la diferencia en el número de habitantes (1.619.602 en Barcelona y 151.076 en Girona), los resultados obtenidos podrán ser comparados gracias a la normalización de los datos. Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando LC-MS/MS, con un analizador QqQ y a las concentraciones obtenidas en las aguas residuales se les aplicaron los factores de corrección explicados en la figura 1 (población que sirve la EDAR, caudal, factor de excreción, dosis) y un factor de corrección estadístico, para obtener la MC (figura 8).

En la figura 8 se observa que los antibióticos clindamicina, sulfametoxazol, claritromicina y metronidazol presentaron una relación casi perfecta MC/PC en ambas ciudades, además de ciprofloxacino en Girona, lo que era de esperarse ya que son medicamentos de venta con prescripción y se ajustan mejor que los medicamentos de venta libre como se aprecia por ejemplo con el naproxeno. Las coformulaciones serían una explicación a ciertos principios activos que son de venta con prescripción, pero que son encontrados en concentraciones superiores a las esperadas, como la codeína, en tratamientos para el resfriado y la eritromicina en el tratamiento del acné. Además, otra fuente que incrementaría la MC y no se refleja en la PC son las prescripciones de médicos privados, como con los antidepresivos fluoxetina y venlafaxina. La ranitidina se detectó 5 veces más de lo que fue prescrita. Esto puede deberse a la retirada del mismo por la alerta sanitaria de presencia de impureza tóxica por parte de la AEMPS el 1 de octubre de 2019, pero personas ajenas a esta noticia continuaron consumiendo el medicamento, mientras que los médicos dejaron de recetarlos (Escolà Casas et al., 2021).



**Figura 8.** Comparación de MC y PC de fármacos estudiados, agrupados por clase, para las ciudades de Girona y Barcelona. La línea continua señala la perfecta correlación entre PC y MC, mientras que las líneas discontinuas indican diferencia de un orden de magnitud. No se encontraron datos de prescripción para trimetoprim en Girona, por lo que no fue incluida en el gráfico. (Escolà Casas et al., 2021)

En concordancia con este estudio, Lin y colaboradores hallaron que los compuestos metformina, bezafibrato y gemfibrozilo tienen una alta estabilidad en las aguas residuales y su uso es apropiado como biomarcador, mientras que fluoxetina y citalopram pueden usarse como biomarcadores hasta cierto punto, pues presentan una estabilidad media en las aguas residuales (Lin et al., 2021). Además, ambos grupos de investigadores encontraron que la venlafaxina no es tan buen biomarcador como un metabolito suyo (figura 9).



**Figura 9.** Relación entre MC y PC, usando bien sea el compuesto original o un metabolito. La línea sólida verde  $PC=MC$  corresponde a un perfecto ajuste entre ambos parámetros. Metronidazol, carbamazepina e ibuprofeno no mostraron diferencias apreciables al usar uno u otro. Sulfametoxazol y fluoxetina mejoraron sus valores al usar el compuesto original. El metabolito de la venlafaxina, *O*-desmetil-venlafaxina, da mejores resultados (Escolà Casas et al., 2021)

Finalmente, un estudio piloto llevado a cabo en dos localidades al oeste de Estados Unidos, en una pequeña comunidad urbana y en una comunidad rural aislada geográficamente encontró un consumo medio de fluoxetina de 211 mg/día/1.000 habitantes y 339 mg/día/1.000 habitantes, respectivamente (Bishop et al., 2020) mientras que el presente estudio en Cataluña reportó un consumo medio de fluoxetina de 465,6 mg/día/1.000 habitantes y 396,8 mg/día/1.000 habitantes, para Barcelona y Girona, respectivamente (Escolà Casas et al., 2021), lo que implica un mayor consumo por parte de la población española de fluoxetina que la estadounidense.

### **3.5. Limitaciones y fuentes de incertidumbre que afectan a la WBE**

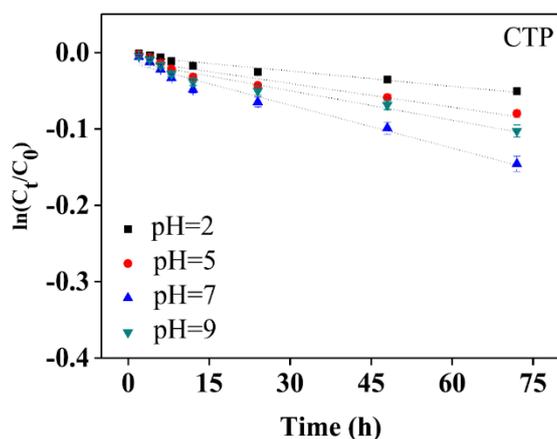
Existe una serie de limitaciones y factores que introducen incertidumbre en el análisis de las aguas residuales con fines epidemiológicos. Entre ellos, los más importantes se relacionan a continuación:

*1. Biomarcador específico:* además de que debe ser específico para la sustancia a estudiar (Pocurull et al., 2020) deben de estudiarse los metabolitos y el compuesto original para determinar cuál de ellos proveerá mejores resultados al momento de analizar las aguas residuales (figura 9). Además del comportamiento en las propias aguas por parte de cada posible biomarcador (punto a tratar en el siguiente apartado), existen algunos metabolitos cuya biodegradación puede conducir a error sobre la fuente de origen, como en el caso de la heroína, que es excretada casi en su totalidad como 6-acetilmorfina (marcador específico de la misma), pero que al cabo de 24 a 48 horas, es biotransformada completamente en morfina, haciendo imposible determinar si esta morfina provenía de la heroína o de la propia morfina (Bishop et al., 2020).

*2. Caudal de entrada a la EDAR:* importante en la manera como se recolecta este dato, se aconseja seguir las pautas del grupo SCORE (Bijlsma et al., 2018; European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2013; Pocurull et al., 2020).

*3. Comportamiento del biomarcador desde su excreción hasta su llegada a la EDAR:* debe evaluarse la estabilidad, volatibilidad, degradación, distribución sólido-líquido y/o adsorción a lo largo de la red de saneamiento pues esto afectará directamente a la MC, subestimándola (Bijlsma et al., 2018; Escolà Casas et al., 2021; Lin et al., 2021). Biomarcadores con una alta estabilidad (< 20% de decaimiento, en relación a la cantidad

desde que son excretadas hasta que llegan a la EDAR) pueden ser considerados buenos indicadores para calcular la MC (McCall et al., 2016). En general, predomina la adsorción a baja temperatura ( $\leq 15^{\circ}\text{C}$ ) y la biodegradación por parte de los microorganismos a alta temperatura ( $\geq 25^{\circ}\text{C}$ ), siendo más estables mientras más ácido sea el ambiente ( $\text{pH}=2$ ) y menos estables mientras más cerca de la neutralidad ( $\text{pH}=7$ ), como se observa en la figura 10 (Lin et al., 2021), por lo que es recomendable filtrar las muestras antes de almacenarlas y disminuir el pH a 2 y así disminuir la actividad biológica y por ende, la degradación del biomarcador (Bishop et al., 2020; Saunders et al., 2016). Por último, la longitud del recorrido en el sistema de alcantarillado hasta la EDAR es mayor en una ciudad que en una zona rural, haciendo que el biomarcador pase más tiempo en las aguas residuales en la primera, aumentando la probabilidad de que sea afectado por alguno de los factores antes expuestos (Bishop et al., 2020; He et al., 2020).

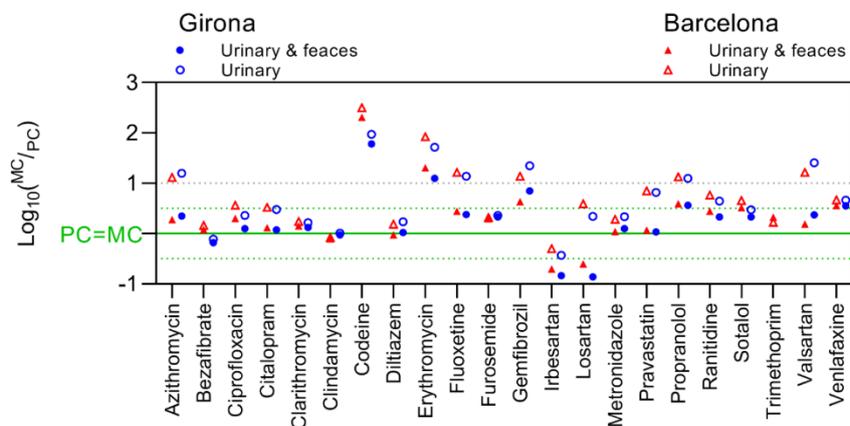


**Figura 10.** Modelo de cinética de primer orden para el citalopram (CTP) en aguas residuales a 25°C a diferentes pH (Lin et al., 2021)

4. Muestra representativa: la frecuencia en la toma de muestra en la EDAR puede no representar el comportamiento real si los intervalos de muestreo son muy espaciados en el tiempo, pues existen variaciones de consumo a lo largo del día, de los meses (Saunders et al., 2016) e inclusive entre cada día de la semana, sobre todo en drogas de abuso, cuyo consumo es superior los fines de semana, causando el “*efecto de fin de semana*”, como en la ketamina (Rice et al., 2020), así como en el caso de algunos fármacos que son de consumo ocasional o estacional, como los antihistamínicos, que se usan más en la época en que hay más alérgenos en el ambiente, o los AINES para dolores puntuales, incrementarán el error asociado (Rice et al., 2020). Además, hay que considerar el tiempo que transcurre desde que el agua sale del inodoro hasta que llega a la EDAR, para asegurarnos que toda la zona a la que sirve la EDAR queda cubierta y muestreada (Lin et al., 2021).

5. Número real de habitantes a las que sirve la EDAR: el tamaño de la población es un factor necesario para poder normalizar los datos y hacer que sean comparables, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, los datos que suelen estar disponibles para conocer la población a la que sirve la EDAR provienen del censo poblacional, “*el cual está basado en fronteras políticas, como la delimitación de una ciudad, mientras que las EDAR raramente se alinean con estas fronteras políticas y suelen aprovechar las características topográficas del entorno para maximizar el flujo por gravedad*” (Banta-Green et al., 2016). Una manera de obtener este número de personas reales puede ser obteniendo la información del GPS de los móviles por parte de las compañías telefónicas, ya que además de lo expuesto antes, puede ocurrir que el sitio de trabajo y de dormir estén conectados a EDAR distintas (Banta-Green et al., 2016).

6. Factor de excreción del biomarcador: la información referente a la misma es escasa y no está actualizada. Algunas toman en cuenta solo la excreción urinaria y otras incluyen la excreción fecal, dificultando que se pueda aplicar un factor de excreción general para cada biomarcador. Este factor altera los valores que se obtienen al calcular PC y MC (ya que es necesario utilizarlo en la etapa 4 de la metodología WBE como se observó en la figura 1 y como se puede apreciar en la figura 11, puede hacer que los valores sean más concordantes entre sí ( $PC=MC$ ), tomando mayor importancia en los fármacos que se excretan mayormente por las heces y cuyo coeficiente de partición sea alto, es decir, que son hidrofóbicos, como es el caso de azitromicina y de valsartán. Sin embargo, puede empeorar la correlación cuando el fármaco es muy hidrofóbico, como en el irbesartán ( $\log K_{ow} = 5,31$ ) (Bijlsma et al., 2018; Escolà Casas et al., 2021; Gómez-Canela et al., 2019; Pocurull et al., 2020; Saunders et al., 2016).



**Figura 11.** Efecto del factor de excreción al usar solo el urinario vs urinario y fecal para una mejor aproximación  $PC=MC$  (Escolà Casas et al., 2021)

7. Fuentes externas: la posibilidad y facilidad para recibir envíos internacionales de compras a través de internet y farmacias que hacen envíos internacionales, pueden hacer que un medicamento que ni siquiera es comercializado en un lugar, sea detectado en sus aguas residuales (Saunders et al., 2016). Adicionalmente, regiones o países con turismo también pueden encontrar biomarcadores ajenos a la zona, pero típicos del lugar de los turistas, así como ver disminuido el MC de otros biomarcadores locales por la contribución al aumento en la cantidad de aguas residuales por parte de estos turistas (Bishop et al., 2020; Saunders et al., 2016).

### **3.6. Evaluación de riesgo medioambiental**

Es otro método para determinar los biomarcadores que deben tener prioridad al investigarse. Para ello, se puede estimar la efectividad de la EDAR al tratar sus aguas residuales antes de ser expulsadas al medioambiente, comparando la MC de las aguas de entrada y salida (Gómez-Canela et al., 2019). Es importante tomar en cuenta los enantiómeros, pues el tratamiento biológico por parte de la EDAR (como el fango activo) es propenso a ser enantioselectivo, originando compuestos en su forma no racémica, enriqueciendo más una forma sobre la otra, por lo que se debe hacer un evaluación de la toxicidad enantiomérica, pues algunos pueden ser más dañinos para el ecosistema (Evans and Kasprzyk-Hordern, 2014). He y colaboradores proponen clasificar a los medicamentos en cuatro grupos según su toxicidad y su PC, donde los riesgos medioambientales asociados a los medicamentos de los grupos I, II y IV deberían ser evaluados y recomiendan incluir procesos avanzados de tratamiento en las EDAR como la ozonización (He et al., 2020).

Finalmente, indicar que un estudio llevado a cabo en Cataluña en el 2016 encontró que la amoxicilina presenta un pequeño potencial de causar efectos adversos por su alta PC en el medioambiente (Gómez-Canela et al., 2019).

## 4. Conclusiones

El avance de la tecnología permite que cada vez sea más fácil separar y detectar analitos en las muestras de aguas, disminuyendo cada vez más los límites de detección y cuantificación, permitiendo detectar compuestos que hace unos años no sería posible.

La WBE no solo nos permite implementar medidas sociosanitarias en base a los compuestos mayoritariamente encontrados en las aguas residuales, sino que también es una manera de hacer seguimiento para políticas ya implantadas y medir su efectividad y seguimiento por parte de la población. Al observar si los hábitos de consumo cambian, y cuan rápido lo hacen, se pueden destinar los recursos de una campaña en curso a una nueva.

En las poblaciones que no sean demográficamente homogéneas, es relevante obtener el número de habitantes por grupos de edad, por ejemplo, intervalo de 14 a 29 años, e inclusive según el medicamento o código ATC que se quiera estudiar, por sexo. Una población joven tendrá menor consumo de medicamento en comparación con una población envejecida, que suele estar polimedicada. Aún más, poblaciones rurales y urbanas deben ser analizadas por separado para tener un resultado más acorde a la realidad, ya que los hábitos de consumo son distintos y el tiempo que tarda en llegar el biomarcador desde que es excretado hasta que llega a la EDAR, así como los procesos que usa la misma para tratar las aguas suelen ser diferentes, lo que pudiese llevar a una sub o sobreestimación en el consumo de medicamento predicho, medido y finalmente, afectando a la evaluación de riesgo medioambiental del compuesto.

## 5. Bibliografía

Akash MSH, Rehman K. Mass Spectrometry. En: Essentials of Pharmaceutical Analysis. 1ª ed. Singapore: Springer Singapore; 2020. p.121–36.

Anand U, Adelodun B, Pivato A, Suresh S, Indari O, Jakhmola S, et al. A review of the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and airborne particulates and its use for virus spreading surveillance. *Environ Res.* 2021; 196: 110929.

Andrés-Costa MJ, Escrivá Ú, Andreu V, Picó Y. Estimation of alcohol consumption during “Fallas” festivity in the wastewater of Valencia city (Spain) using ethyl sulfate as a biomarker. *Sci Total Environ.* 2016; 541: 616–22.

Banta-Green CJ, Brewer AJ, Ort C, Helsel DR, Williams JR, Field JA. Using wastewater-based epidemiology to estimate drug consumption—Statistical analyses and data presentation. *Sci Total Environ.* 2016; 568: 856–63.

Beccaria M, Cabooter D. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Analyst.* 2020; 145(4): 1129–57.

Bijlsma L, Celma A, González-Mariño I, Postigo C, Andreu V, Andrés-Costa MJ, et al. Análisis de aguas residuales con fines epidemiológicos: aplicaciones a la estimación del consumo de sustancias de abuso y en salud pública en general. *Red española ESAR-Net. Rev Esp Salud Publica.* 2018; 92(1): e1–10.

Bijlsma L, Sancho J V., Pitarch E, Ibáñez M, Hernández F. Simultaneous ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of amphetamine and amphetamine-like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater. *J Chromatogr A.* 2009; 1216(15): 3078–89.

Bijlsma L, Serrano R, Ferrer C, Tormos I, Hernández F. Occurrence and behavior of illicit drugs and metabolites in sewage water from the Spanish Mediterranean coast (Valencia region). *Sci Total Environ.* 2014; 487: 703–9.

Bishop N, Jones-Lepp T, Margetts M, Sykes J, Alvarez D, Keil DE. Wastewater-based epidemiology pilot study to examine drug use in the Western United States. *Sci Total Environ.* 2020; 745: 140697.

Campíns-Falcó P, Sevillano-Cabeza A, Herráez-Hernández R, Molins-Legua C, Moliner-Martínez Y, Verdú-Andrés J. Solid-Phase Extraction and Clean-Up Procedures in Pharmaceutical Analysis Update based on the original article by P. Campíns-Falcó, A. Sevillano-Cabeza, R. Herráez-Hernández, and C. Molins-Legua, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, © 2000, John Wiley & Sons, Ltd. En: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. American Cancer Society; 2012.

Castiglioni S, Thomas K V., Kasprzyk-Hordern B, Vandam L, Griffiths P. Testing wastewater to detect illicit drugs: State of the art, potential and research needs. *Sci Total Environ.* 2014; 487(1): 613–20.

Castiglioni S, Zuccato E, Crisci E, Chiabrando C, Fanelli R, Bagnati R. Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2006; 78(24): 8421–9.

Daughton CG. Illicit Drugs in Municipal Sewage: Proposed New Non-Intrusive Tool to Heighten Public Awareness of Societal Use of Illicit/Abused Drugs and Their Potential for Ecological Consequences. En: *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment.* Washington DC: American Chemical Society; 2001; p.348–64.

Dogan A, Płotka-Wasyłka J, Kempieńska-Kupczyk D, Namieśnik J, Kot-Wasik A. Detection, identification and determination of chiral pharmaceutical residues in wastewater: Problems and challenges. *TRAC-trends Anal. Chem.* 2020; 122: 1-14.

Emke E, Evans S, Kasprzyk-Hordern B, de Voogt P. Enantiomer profiling of high loads of amphetamine and MDMA in communal sewage: A Dutch perspective. *Sci Total Environ.* 2014; 487: 666–72.

Escolà Casas M, Schröter NS, Zammit I, Castaño-Trias M, Rodríguez-Mozaz S, Gago-Ferrero P, et al. Showcasing the potential of wastewater-based epidemiology to track pharmaceuticals consumption in cities: Comparison against prescription data collected at fine spatial resolution. *Environ Int.* 2021; 150: 106404.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Common protocol of action for monitoring illicit drugs in wastewater [en línea]. Lisboa: octubre 2013. [Consultado en junio 2021]. Disponible en: [https://www.emcdda.europa.eu/drugs-library/common-protocol-action-monitoring-illicit-drugs-wastewater\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/drugs-library/common-protocol-action-monitoring-illicit-drugs-wastewater_en).

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Ethical research guidelines for wastewater-based epidemiology and related fields. [en línea]. Lisboa: 2016. [Consultado en junio 2021]. Disponible en: <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/attachments/10405/WBE-ethical-guidelines-v1.0-03.2016%20.pdf>

Evans SE, Kasprzyk-Hordern B. Applications of chiral chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of chiral pharmaceuticals in the environment. *Trends Environ Anal Chem.* 2014; 1: e34–51.

Gómez-Canela C, Pueyo V, Barata C, Lacorte S, Marcé RM. Development of predicted environmental concentrations to prioritize the occurrence of pharmaceuticals in rivers from Catalonia. *Sci Total Environ.* 2019; 666: 57–67.

Gros M, Petrović M, Barceló D. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Anal Bioanal Chem.* 2006; 386(4): 941–52.

He K, Borthwick AG, Lin Y, Li Y, Fu J, Wong Y, et al. Sale-based estimation of pharmaceutical concentrations and associated environmental risk in the Japanese wastewater system. *Environ Int.* 2020; 139(Abril): 105690.

Hernández F, Castiglioni S, Covaci A, de Voogt P, Emke E, Kasprzyk-Hordern B, et al. Mass spectrometric strategies for the investigation of biomarkers of illicit drug use in wastewater. *Mass Spectrom Rev.* 2018; 37: 258–80.

Hernández F, Ibáñez M, Bade R, Bijlsma L, Sancho J V. Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2014; 63: 140–57.

Kasprzyk-Hordern B, Baker DR. Estimation of community-wide drugs use via stereoselective profiling of sewage. *Sci Total Environ.* 2012; 423: 142–50.

Koller D, Zubiaur P, Saiz-Rodríguez M, Abad-Santos F, Wojnicz A. Simultaneous determination of six antipsychotics, two of their metabolites and caffeine in human plasma by LC-MS/MS using a phospholipid-removal microelution-solid phase extraction method for sample preparation. *Talanta.* 2019; 198(Septiembre 2018): 159–68.

Lin W, Huang Z, Gao S, Luo Z, An W, Li P, et al. Evaluating the stability of prescription drugs in municipal wastewater and sewers based on wastewater-based epidemiology. *Sci Total Environ.* 2021; 754: 142414.

López-García E, Pérez-López C, Postigo C, Andreu V, Bijlsma L, González-Mariño I, et al. Assessing alcohol consumption through wastewater-based epidemiology: Spain as a case study. *Drug Alcohol Depend.* 2020; 215: 108241.

López Serna R. Análisis y destino de residuos farmacéuticos en aguas subterráneas, superficiales y residuales. Tesis Doctoral. Univ. Barcelona, 2013.

Mastroianni N, López-García E, Postigo C, Barceló D, López de Alda M. Five-year monitoring of 19 illicit and legal substances of abuse at the inlet of a wastewater treatment plant in Barcelona (NE Spain) and estimation of drug consumption patterns and trends. *Sci Total Environ.* 2017; 609: 916–26.

McCall A-K, Bade R, Kinyua J, Lai FY, Thai PK, Covaci A, et al. Critical review on the stability of illicit drugs in sewers and wastewater samples. *Water Res.* 2016; 88: 933–47.

Pocurull E, Marcé RM, González-Mariño I, Rodil R, Montes R, Estévez-Danta A, et al. Wastewater-based epidemiology: Present and future in Spain. *Rev Esp Drog.* 2020; 45(2): 91–103.

Postigo C, López de Alda M, Barceló D. Evaluation of drugs of abuse use and trends in a prison through wastewater analysis. *Environ Int.* 2011; 37(1): 49–55.

Rice J, Kannan AM, Castrignanò E, Jagadeesan K, Kasprzyk-Hordern B. Wastewater-based epidemiology combined with local prescription analysis as a tool for temporal monitoring of drugs trends - A UK perspective. *Sci Total Environ.* 2020; 735: 139433.

Rodríguez-Álvarez T, Rodil R, Rico M, Cela R, Quintana JB. Assessment of local tobacco consumption by liquid chromatography-tandem mass spectrometry sewage analysis of nicotine and its metabolites, cotinine and trans-3'-hydroxycotinine, after enzymatic deconjugation. *Anal Chem*. 2014; 86(20): 10274–81.

Saunders LJ, Mazumder A, Lowe CJ. Pharmaceutical concentrations in screened municipal wastewaters in Victoria, British Columbia: A comparison with prescription rates and predicted concentrations. *Environ Toxicol Chem*. 2016; 35(4): 919–29.

Srinivas NR. Simultaneous chiral analyses of multiple analytes: case studies, implications and method development considerations. *Biomed Chromatogr*. 2004; 18(10): 759–84.

Stashenko EE, Martínez JR. GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué?. *Sci Chromatogr*. 2010; 2(4): 25–48.

Tarcomnicu I, Van Nuijs ALN, Simons W, Bervoets L, Blust R, Jorens PG, et al. Simultaneous determination of 15 top-prescribed pharmaceuticals and their metabolites in influent wastewater by reversed-phase liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2011; 83(3): 795–803.

Trowsdale S, Price M, Wilkins C, Tschärke B, Mueller J, Baker T. Quantifying nicotine and alcohol consumption in New Zealand using wastewater-based epidemiology timed to coincide with census. *Drug Alcohol Rev*. 2021. (Septiembre 2020).

Zuccato E, Castiglioni S, Tettamanti M, Olandese R, Bagnati R, Melis M, et al. Changes in illicit drug consumption patterns in 2009 detected by wastewater analysis. *Drug Alcohol Depend*. 2011; 118(2): 464–9.

Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ Health Perspect*. 2008; 116(8): 1027–32.

Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Calamari D, Bagnati R, Schiarea S, et al. Cocaine in surface waters: A new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ Heal A Glob Access Sci Source*. 2005; 4: 1–7.