

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DE CONTAMINANTES
EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES Y LODOS DE
DEPURADORA. APLICACIONES DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL**

TESIS DOCTORAL

JOSÉ LUIS MALVAR GUZMÁN
SEVILLA, 2021

DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN
DE METABOLITOS DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS
RESIDUALES Y LODOS DE DEPURADORA. APLICACIONES DE
INTERÉS MEDIOAMBIENTAL

El Director




Fdo.: D. Esteban Alonso Álvarez
Catedrático de Universidad
Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

El Director



Fdo.: D. Juan Luis Santos Morcillo
Profesor Titular de Universidad
Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor

MALVAR GUZMÁN, José Luis
77848211-L


Fdo.: José Luis Malvar Guzmán
Graduado en Química

Universidad de Sevilla

Escuela Politécnica Superior

Departamento de Química Analítica

C/ Virgen de África, 7

41011 Sevilla (España)



Dr. Esteban Alonso Álvarez, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Sevilla, y

Dr. Juan Luis Santos Morcillo, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN:

Que D. José Luis Malvar Guzmán, Graduado en Química, de la Universidad de Sevilla, ha realizado en el Departamento de Química Analítica de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación **“Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de metabolitos de contaminantes emergentes en aguas residuales y lodos de depuradora. Aplicaciones de interés medioambiental”**, que reúne las condiciones necesarias para ser presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Dr. Esteban Alonso Álvarez

Fdo.: Dr. Juan Luis Santos Morcillo

AGRADECIMIENTOS

A mi director, D. Esteban Alonso Álvarez, por su altura de miras, por su pragmatismo, por saber escuchar y saber aconsejar. Por reunir todas las cualidades que pueden desearse de un profesional y ser un líder del que siempre se puede y se debe aprender.

A mi director, D. Juan Luis Santos Morcillo, por estar siempre dispuesto a atender mis dudas, por templarme en momentos de agobio, por guiarme en cada actividad, por escuchar mis opiniones, tenerlas en cuenta y corregirme. Por enseñarme a ser mucho mejor científico.

A Dña. Irene Aparicio Gómez y Dña. Julia Martín Bueno, por su actividad incesante, buen criterio y minuciosidad que me han servido, siempre, para mejorar.

A la Universidad de Sevilla, por acompañarme desde que comenzó mi etapa universitaria, por permitirme aprender de profesores cuyas carreras se sitúan en primera línea a nivel internacional y por ofrecerme su confianza a través del contrato predoctoral como Personal Investigador en Formación (PIF) en su VI Plan Propio de Investigación.

A las autoridades estatales competentes, a través del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte y el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, por el contrato predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) que permitió financiar la mayor parte de mi tesis doctoral.

A Dña. Maria João Bebianno por abrirme las puertas tanto de su grupo de investigación como del Centro de Investigação Marinha e Ambiental (CIMA) de la Universidad del Algarve durante 9 meses en los que he podido aprender la importancia de la complementariedad en el mundo de la ciencia que, sin duda, me ha enriquecido.

A Kity, por ser mi compañera de batalla, por estar siempre dispuesta a ayudar, por aguantar mis eternas charlas y compartir, codo a codo, tantas alegrías como lamentos.

A Javier, por acompañarme en este camino con la voluntad de ayudar en cada momento y mantener el laboratorio como un lugar alegre y ameno.

A Pedro, Pepe, Pablo y Francisco, por compartir anécdotas en el laboratorio que siempre recordaré con alegría.

A mis padres, por mostrar siempre un apoyo sin fisuras y sin condiciones, por dárme todo sin pedir nada a cambio y enseñarme que la familia ocupa la base de toda pirámide.

A mi tía y mi abuela, a mi abuela y mi tía, porque hay quien tiene la suerte de tener una madre y yo tengo la suerte de tener una segunda y una tercera para darme siempre un pie de apoyo.

A mi hermana, por tener siempre palabras de ánimo y admiración hacia mi, por enseñarme a relativizar los problemas y por mostrarme esa visión tan diferente de las cosas.

A Sonia, por estar en los momentos difíciles, por levantarme, por intentar comprenderme siempre y celebrar como suyas cada alegría. Por enseñarme a ser mejor persona.

A Javito, porque no es necesario tener la misma sangre para ser familia y ser como un hermano para mi siempre dispuesto a ayudar, consolar y celebrar.

A todos, muchas gracias.

A mis padres

RESUMEN

La presencia y distribución de contaminantes emergentes en compartimentos ambientales ha sido abordada intensamente en la literatura científica de los últimos años. Los avances en las técnicas y métodos analíticos empleados, el conocimiento de los rangos de concentración de algunos compuestos en determinados escenarios y sus potenciales efectos ecotoxicológicos, entre otros, han sido objeto de un interesante debate científico que ha trascendido a otros ámbitos como el de la legislación ambiental.

La mayoría de estos estudios se han centrado en los compuestos tal y como son utilizados en el ámbito doméstico, industrial o agropecuario, pero aún siguen siendo muy escasos los dedicados a los productos de degradación o metabolitos (“los emergentes de los emergentes”) en los que los compuestos originales en sus diferentes vías de introducción en el medio ambiente son transformados.

De acuerdo con estos antecedentes, el objetivo global planteado en la presente tesis doctoral ha sido doble. Por un lado, el desarrollo de nuevos métodos analíticos, fiables y accesibles, para la determinación conjunta de contaminantes emergentes y metabolitos representativos en diferentes matrices ambientales atendiendo a las carencias advertidas en la literatura científica. Por otro lado, la aplicación de esos métodos, optimizados y validados, en la resolución de casos específicos de interés medioambiental.

La tesis se ha estructurado en 5 capítulos. El capítulo 1, antecedentes, incluye una extensa revisión crítica del estado del arte sobre metabolitos de contaminantes emergentes en el medio ambiente. En él se abordan los mecanismos de metabolización de principios activos farmacéuticos y de productos de cuidado personal, las vías de entrada de estos compuestos y sus productos de degradación en el medio ambiente y los potenciales riesgos asociados, y las técnicas de tratamiento y determinación más empleadas en el análisis de estas sustancias en diferentes matrices, finalizando con un apartado sobre perspectivas futuras en este área de estudio.

En el capítulo 2 se describen el objetivo principal y los objetivos parciales de la investigación desarrollada, así como el plan de trabajo seguido para su consecución, incluyendo los compuestos y las matrices seleccionados para el estudio.

El capítulo 3 está formado por un compendio de 5 artículos científicos publicados, o en vías de publicación, en revistas de primer nivel internacional indexadas en el JCR (Journal Citation Reports). En estos trabajos se proponen nuevos métodos analíticos *ad hoc* para dar respuestas a las crecientes y recientes demandas, no sólo en el ámbito de la investigación, también en el de la legislación, en el campo de los contaminantes emergentes. Así, en el primer artículo se desarrolló un procedimiento para el análisis simultáneo de un conjunto de contaminantes emergentes propuestos para ser legislados en aguas superficiales, ante la ausencia de métodos de referencia o, en su defecto, lo suficientemente contrastados. Los artículos 2, 3 y 4, profundizan en los métodos y en las técnicas de preparación de diferentes tipos de matrices para la determinación conjunta de un grupo de compuestos representativos de principios activos farmacéuticos y productos de cuidado personal y sus productos de degradación (metabolitos, en este caso). Las propuestas se desarrollaron concretamente para muestras de aguas residuales urbanas y lodos de depuradora (principales fuentes de este tipo de contaminación) y para muestras de aguas superficiales, potables y suelos (principales primeros destinos de estos compuestos por las prácticas habituales de reutilización de aguas y lodos de depuración). Además de la optimización y validación pormenorizada de métodos completos, se realizó un análisis crítico de las propiedades analíticas principales y complementarias de diferentes técnicas para la extracción de los compuestos seleccionados en las matrices mencionadas. Por último, en el artículo 5 se aborda el desarrollo de un método aplicable a un eslabón más avanzado de la cadena de contaminación: la biota. Concretamente, se determinaron simultáneamente ibuprofeno y sus principales metabolitos en mejillones, también como antesala de unos primeros ensayos previstos de bioacumulación y toxicidad.

El capítulo 4 está constituido por la reunión de 4 artículos científicos, asociado cada uno de ellos a una aplicación de interés medioambiental de los métodos anteriormente desarrollados. En el primer artículo de este capítulo (numerado como artículo 6), se realizó un seguimiento de los metabolitos y compuestos originales de principios activos farmacéuticos y productos de cuidado personal en las líneas de lodos de varias depuradoras de aguas residuales que empleaban distintas tecnologías. Ello permitió extraer información relevante acerca de la distribución de estos compuestos en relación con las fuentes y sobre su persistencia en el producto final de acuerdo con el tratamiento recibido. En el artículo 7 se estudió, mediante simulación en laboratorio de las

condiciones reales, la dinámica de la carbamazepina y sus principales metabolitos en suelos que pueden contaminarse por estos compuestos a través del riego con aguas residuales depuradas o por la aplicación de lodos de depuradora como enmienda agrícola. Entre otros, se demostró la diferencia en los resultados de los ensayos de adsorción para los compuestos individuales y para el conjunto de los mismos, y la influencia de los distintos tipos de suelos ensayados en estos procesos. En el artículo 8 se evaluaron los procesos de degradación de todos los compuestos ya seleccionados en el primer artículo de este capítulo en tres suelos típicos mediterráneos, obteniéndose resultados muy interesantes acerca de la capacidad de adsorción de cada uno de los compuestos y de su persistencia o transformación; procesos todos dependientes de las propiedades físico-químicas de las sustancias estudiadas y de las características de los suelos ensayados. Por último, en el artículo 9 se evaluó el comportamiento de arcillas modificadas como potencial tecnología de descontaminación para contaminantes emergentes en su formulación original y sus metabolitos; en concreto, se ensayó con la montmorillonita organofuncionalizada con octadecilamina como adsorbente de ibuprofeno y 3 de sus principales metabolitos.

El capítulo 5 y último de la tesis recoge las principales conclusiones apuntadas de forma breve con anterioridad.

Los artículos que conforman la tesis con la misma numeración dada en el texto de este resumen y en la propia memoria son:

Artículo 1:

Malvar, J.L., Abril, C., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Escot, C., Basanta, A., Alonso, E., 2018. Development of an analytical method for the simultaneous determination of the 17 EU Watch List compounds in surface waters: a Spanish case study. *Environ. Chem.* 15(8), 493-505.

Artículo 2:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2019. Routine analytical method for monitoring the main metabolites for a recurrent group of parabens and pharmaceuticals in wastewater and tap water. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 6625-6635.

Artículo 3:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Simultaneous pressurized liquid extraction and clean-up for the determination of metabolites in complex environmental solid matrices. *Microchem. J.* 152, 104370.

Artículo 4:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Comparison of ultrasound-assisted extraction, QuEChERS and selective pressurized liquid extraction for the determination of metabolites of parabens and pharmaceuticals in sludge. *Microchem. J.* 157, 104987.

Artículo 5:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Ultrasound-assisted extraction as an easy-to-perform analytical methodology for monitoring ibuprofen and its main metabolites in mussels. *Microchem. J.* (en preparación).

Artículo 6:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Occurrence of the main metabolites of pharmaceuticals and personal care products in sludge stabilization treatments. *Waste Manage.* 116, 22-30.

Artículo 7:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Approach to the dynamic of carbamazepine and its main metabolites in soil contamination through the reuse of wastewater and sewage sludge. *Molecules* (en revisión).

Artículo 8:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Occurrence of the main metabolites of the most recurrent pharmaceuticals and personal care products in Mediterranean soils. *J. Environ. Manage.* (aceptado).

Artículo 9:

Malvar, J.L., Martín, J., Orta, M.M., Medina-Carrasco, S., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Simultaneous and individual adsorption of ibuprofen metabolites by a modified montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* 189, 105529.

ABSTRACT

The presence and distribution of emerging pollutants in environmental compartments has been intensively addressed in the scientific literature of recent years. The advances in the techniques and analytical methods used, the knowledge of the concentration ranges of some compounds in certain scenarios and their potential ecotoxicological effects, among other related topics, have been the subject of an interesting scientific debate that has transcended to other areas such as environmental legislation.

Most of these studies are mainly based on the compounds just as they are used in the domestic, industrial or agricultural environment, but there are still very few studies devoted to degradation products or metabolites (the compounds "emerging" from emerging compounds) into which the original compounds are transformed in their different introduction routes into the environment.

In accordance with these precedents, the global objective proposed in this PhD thesis has been twofold. On the one hand, the development of new, reliable and accessible analytical methods for the joint determination of emerging pollutants and representative metabolites in different environmental matrices, considering the shortcomings noted in the scientific literature. On the other hand, the application of these methods, optimized and validated, in the resolution of specific cases of environmental interest.

The thesis has been structured in 5 chapters. Chapter 1, background, includes an extensive critical examination of the state-of-art in metabolites of emerging pollutants in the environment. It addresses the mechanisms of metabolization in pharmaceuticals and personal care products; the entry routes of these compounds and their degradation products into the environment and the potential associated risks, and the most widely used treatment and classification techniques in the analysis of these substances in different matrices, ending with a section on future perspectives in this study area.

Chapter 2 describes the main objectives of the research, as well as the work plan followed to achieve them, including the compounds and matrices selected for the study.

Chapter 3 consists of a compendium of five scientific articles which either have been published or are in the process of being published, in leading international journals indexed in the JCR (Journal Citation Reports). In these articles, new *ad hoc* analytical

methods are proposed to respond to recent growing demands, not only in the research but also in the legislative field, regarding emerging pollutants. Thus, in the first article, a procedure was developed for the simultaneous analysis of a set of emerging pollutants proposed to be legislated in surface waters, in the absence of reference methods or, failing that, sufficiently contrasted. Articles 2, 3 and 4 deepen into the methods and techniques for preparing different types of matrices for the joint determination of a group of representative compounds of pharmaceuticals and personal care products and their degradation products (metabolites, in this case). The proposals were developed specifically for samples of urban wastewater and sewage sludge (the main sources of this type of pollution) and for samples of surface water, drinking water and soils (the primary destinations of these compounds due to the common practice of reusing water and sewage sludge). In addition to the optimization and detailed validation of complete methods, a critical analysis of the main and complementary analytical properties of different techniques was carried out for the extraction of the selected compounds in the mentioned matrices. Finally, article 5 addresses the development of a method applicable to a more advanced step in the pollution chain: biota. Specifically, ibuprofen and its main metabolites were simultaneously determined in mussels, also as a prelude to planned bioaccumulation and toxicity tests.

Chapter 4 is based on four scientific articles, being each of those associated with an environmental application of the methods previously developed. In the first article of this chapter (numbered as article 6), the metabolites and original compounds of pharmaceuticals and personal care products in the sludge originated in different step from various wastewater treatment plants using different technologies were monitored. That allowed to extract relevant information about the distribution of these compounds in relation to the sources and their persistence in the final product according to the treatment received. In article 7, the dynamics of carbamazepine and its main metabolites in soils that can be contaminated by these compounds through irrigation with treated wastewater or by the application of sewage sludge as organic amendment was studied by means of real conditions simulated in laboratory tests. Among others, the difference in the results of the adsorption tests of each individual compound and of them as a collective, and the influence of the different types of soil tested in these processes was demonstrated. In article 8, the degradation processes of all the compounds chosen in the first article of this chapter were evaluated in three typical Mediterranean soils, obtaining very interesting

results about the adsorption capacity of each compound and about their persistence or transformation; processes which are all dependent on the physical-chemical properties of the substances being studied and the characteristics of the soils tested. Finally, in article 9, the behaviour of modified clays as a potential decontamination technology for emerging pollutants in their original formulation and their metabolites was evaluated; Specifically, organofunctionalized montmorillonite with octadecylamine was tested as an adsorbent for ibuprofen and 3 of its main metabolites.

Chapter 5, the last chapter of the thesis, contains the most critical and important conclusions which were briefly pointed out previously.

The articles that make up this thesis numbered as they were in this summary and in the report itself are:

Artículo 1:

Malvar, J.L., Abril, C., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Escot, C., Basanta, A., Alonso, E., 2018. Development of an analytical method for the simultaneous determination of the 17 EU Watch List compounds in surface waters: a Spanish case study. *Environ. Chem.* 15(8), 493-505.

Artículo 2:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2019. Routine analytical method for monitoring the main metabolites for a recurrent group of parabens and pharmaceuticals in wastewater and tap water. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 6625-6635.

Artículo 3:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Simultaneous pressurized liquid extraction and clean-up for the determination of metabolites in complex environmental solid matrices. *Microchem. J.* 152, 104370.

Artículo 4:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Comparison of ultrasound-assisted extraction, QuEChERS and selective pressurized liquid extraction for the determination of metabolites of parabens and pharmaceuticals in sludge. *Microchem. J.* 157, 104987.

Artículo 5:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Ultrasound-assisted extraction as an easy-to-perform analytical methodology for monitoring ibuprofen and its main metabolites in mussels. *Microchem. J.* (in preparation).

Artículo 6:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Occurrence of the main metabolites of pharmaceuticals and personal care products in sludge stabilization treatments. *Waste Manage.* 116, 22-30.

Artículo 7:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Approach to the dynamic of carbamazepine and its main metabolites in soil contamination through the reuse of wastewater and sewage sludge. *Molecules* (under review).

Artículo 8:

Malvar, J.L., Santos, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Occurrence of the main metabolites of the most recurrent pharmaceuticals and personal care products in Mediterranean soils. *J. Environ. Manage.* (accepted).

Artículo 9:

Malvar, J.L., Martín, J., Orta, M.M., Medina-Carrasco, S., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2020. Simultaneous and individual adsorption of ibuprofen metabolites by a modified montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* 189, 105529.



ÍNDICE GENERAL



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE.....	19
CAPÍTULO 1. Antecedentes.....	23
CAPÍTULO 2. Objetivos y plan de trabajo.....	89
CAPÍTULO 3. Propuestas de metodologías analíticas para la determinación de contaminantes emergentes y metabolitos en muestras ambientales.....	97
CAPÍTULO 4. Aplicaciones en casos reales de actualidad e interés medioambiental.....	235
CAPÍTULO 5. Conclusiones.....	393



CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES



1. CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN EL MEDIO AMBIENTE

La evolución humana ha adaptado, a lo largo de los años, el medio ambiente a sus intereses modificándolo para cubrir sus necesidades. En este sentido, conceptos como cuidado del medio ambiente o desarrollo industrial han sido, a menudo, situados en posiciones contrapuestas. De esta manera, vertidos tóxicos, residuos no degradables o gases que derivan de procesos industriales dan lugar a la mayor parte de la contaminación del aire, el suelo y las aguas.

Dentro de la contaminación ambiental, la contaminación de las aguas es una de las que ha despertado una mayor preocupación y que está sometida a un mayor control debido a la enorme cantidad de vertidos que se producen a través de las aguas residuales en nuestro día a día. Así, remontándonos al año 2000 se establece un marco legal para prevenir y controlar la contaminación de las aguas a través de la Directiva 2000/60/CE aprobada en Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de Julio de 2001. A partir de este momento, se suceden una serie de Directivas, transpuestas a Reales Decretos que van definiendo las diferentes listas de contaminantes y parámetros ambientales que conocemos en la actualidad.

De esta manera, aparecen los contaminantes clasificados como “peligrosos o prioritarios”, los cuales, desde una perspectiva legal, son aquellos que están incluidos en las listas I y II aprobadas por la Decisión no. 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2001 e incluidas en el anexo III del Reglamento del Dominio Público Hidráulico (Real Decreto 849/1987, Real Decreto 606/2003), y normas sucesivas de aplicación (Orden de 12 de noviembre de 1987, y Real Decreto 995/2000). Se trata, en concreto, de un listado de 33 contaminantes prioritarios que pueden presentar un riesgo tanto para el medio como para el ser humano. Más tarde, se establecen las Normas de Calidad Ambiental (NCA) de dichas sustancias prioritarias a través de la Directiva 2008/105/CE aprobada en Real Decreto 60/2011 del 21 de enero de 2011.

Posteriormente, se publica la Directiva 2013/39/UE donde se amplía a 45 el listado de contaminantes prioritarios mientras que en la Decisión de Ejecución 2015/495/UE aparece, por primera vez, una “Lista de Vigilancia” que incluye 17 contaminantes, denominados emergentes, cuyas concentraciones en matrices acuosas medioambientales debían ser controladas y monitorizadas, pues podrían suponer un riesgo significativo. A día de hoy, se cuenta con una “Lista de Vigilancia” modificada sobre la primera y

publicada en la Decisión 2018/840/UE (EC, 2018) que contempla un total de 15 contaminantes emergentes pertenecientes a distintas familias de compuestos, tales como hormonas, antibióticos o neocotinoides, entre otros.

De esta manera, ante el exhaustivo control al que están sometidos aquellos contaminantes denominados prioritarios así como el hecho de contar con medidas ya establecidas para paliar sus efectos o reducir su presencia en el medio ambiente, son los contaminantes emergentes los que están ocupando un puesto de máxima prioridad para numerosos organismos en el ámbito científico. Así, los contaminantes emergentes no son, únicamente, aquellos contaminantes incluidos en las directivas europeas anteriormente mencionadas, sino que abarcan un abanico mucho más amplio. De este modo, se debe entender como contaminante emergente toda aquella sustancia potencialmente dañina para el medioambiente y los seres vivos y que carecen de una legislación vigente que incluya medidas para su control. Entre los contaminantes emergentes, los cuales se pueden presentar en el medio ambiente en concentraciones del orden de las partes por millón a partes por trillón, se encuentran los principios activos farmacéuticos, productos de cuidado personal, plastificantes, plaguicidas surfactantes o aditivos alimentarios, entre otros (Egea-Corbacho, 2018).

Los principios activos farmacéuticos y los productos de cuidado personal son dos de los grupos que mayor preocupación han despertado en relación a su presencia en el medio ambiente pues su excreción o su producción industrial hace que su introducción en el medio sea continua. Además, la persistencia de estos compuestos es, a menudo, elevada impidiendo que los procesos de depuración llevados a cabo en las estaciones depuradoras de agua residuales (EDARs) los eliminen por completo. Es por ello que estos compuestos están presentes, normalmente, en efluentes de depuradora así como en aguas superficiales (Senta et al., 2017).

Una mención especial merecen, además, el caso de los lodos de depuradora, cuyos destinos más extendidos son los vertederos controlados, la incineración y su uso agrícola. En países como España, Francia o Reino Unido, más del 60% del lodo generado en las EDARs tienen fines agrícolas. Considerando que numerosos contaminantes emergentes, como los principios activos farmacológicos y los productos de cuidado personal no son eliminados tras los procesos de depuración y que parte de ellos quedan retenidos en los

lodos de depuradora, la presencia de estos contaminantes en suelos agrícolas e, incluso, en vegetales ha supuesto una preocupación añadida (Verlicchi y Zambello, 2015).

Aunque la mayoría de los estudios sobre contaminación ambiental acerca de los contaminantes emergentes están centrados en la determinación de los compuestos sin modificar, la ingesta de los principios activos farmacológicos o el uso de productos de cuidado personal da lugar a su metabolización en el organismo y, por tanto, a la excreción tanto del producto ingerido como de los metabolitos generados derivados del compuesto original. Estos metabolitos o productos de transformación llegan, de igual modo, a las aguas residuales ocasionando, en numerosas ocasiones, los mismos riesgos y presentando los mismos problemas de persistencia que los productos de partida. Sin embargo, la información acerca de estos metabolitos en los distintos compartimentos ambientales es mucho más escasa (Evgenidou et al., 2015).

2. METABOLISMO DE PRINCIPIOS ACTIVOS FARMACÉUTICOS Y PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL

Tanto los principios activos farmacéuticos como los productos de cuidado personal se engloban dentro de la denominación de compuestos xenobióticos. Así, un compuesto xenobiótico es todo aquel que resulta extraño para el organismo y, por tanto, no forma parte de la composición de este ni tiene relevancia para su metabolismo energético. Estos compuestos tienen, en su mayoría, una naturaleza lipídica que, en caso de no sufrir ninguna modificación, tiende a acumularse en los entornos lipídicos del organismo dificultando su excreción y pudiendo presentar efectos tóxicos.

Tanto los seres humanos como los animales superiores han desarrollado, a lo largo de la evolución, la capacidad de metabolizar estos compuestos con el fin de hacerlos más hidrosolubles y facilitar su excreción. La mayoría de las reacciones que tienen lugar durante el metabolismo de los compuestos xenobióticos ocurren en el hígado, seguido de intestino, pulmones, piel y riñón.

De forma general, se distinguen dos fases principales en el metabolismo de estas sustancias liposolubles:

- Fase I: se producen reacciones químicas que dan lugar a la pérdida o adición de nuevos grupos funcionales a la estructura química de partida gracias a la acción de enzimas que actúan como oxidasas, reductasas e hidrolasas. Entre las reacciones más frecuentes se encuentran las de oxidación, oxigenación, reducción, hidrólisis, desalquilación o deshalogenación. Tras esta fase se obtienen, normalmente, metabolitos más polares, más reactivos y menos lipófilos.
- Fase II: tienen lugar reacciones de conjugación por unión de los compuestos al ácido glucorónico, glutatión, sulfato y aminoácidos. Estos conjugados permiten un aumento de la hidrosolubilidad y, por tanto, que la excreción se efectúe con mayor facilidad.

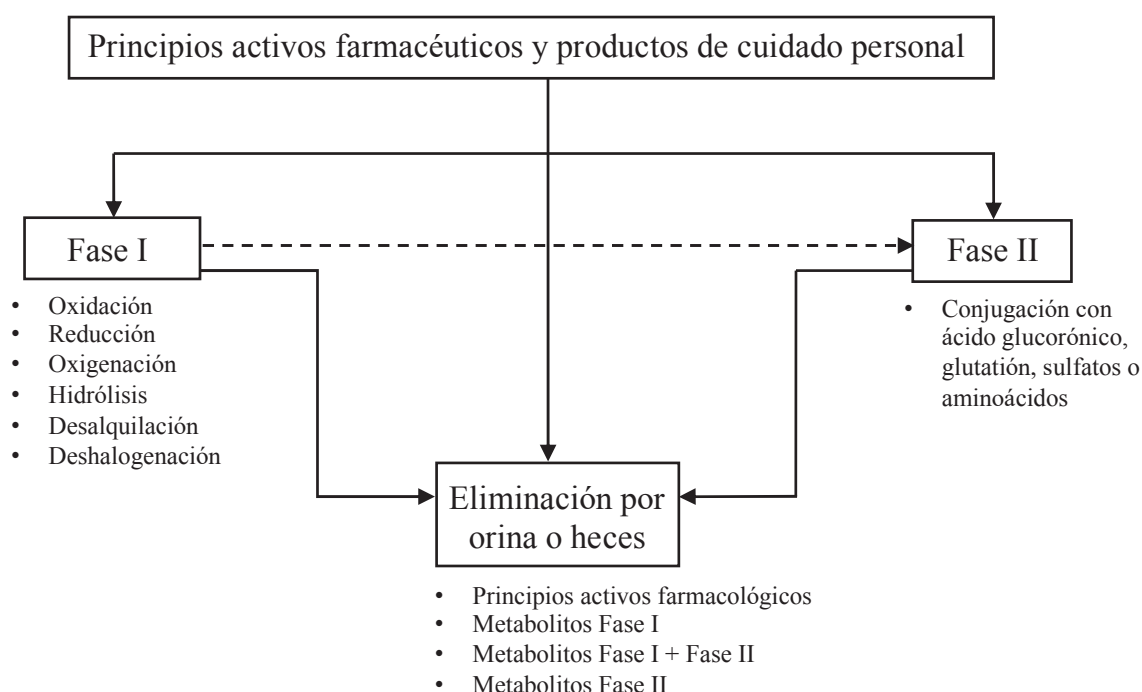


Figura 1.1. Mecanismos de metabolización de principios activos farmacéuticos y productos de cuidado personal

Si bien el objetivo de una reacción de biotransformación como las que sufren los xenobióticos es obtener metabolitos que se excreten con facilidad, este objetivo no tiene por qué conseguirse, necesariamente, con reacciones de fase I seguidas de reacciones de fase II. Como puede verse en la Figura 1.1., en ocasiones, este objetivo se alcanza únicamente con reacciones de fase I o reacciones de fase II. La primera opción, desde el punto de vista celular, es que se lleven a cabo reacciones de conjugación, propias de la fase II, que den lugar a una fácil eliminación. Cuando este tipo de reacciones no son

posibles y la naturaleza lipófila del compuesto tiende a provocar una acumulación en los entornos lipídicos del organismo, es cuando tienen lugar las reacciones de fase I (Castell, 2006).

Las modificaciones que sufren estos compuestos dan lugar, normalmente, a especies con un potencial tóxico para el organismo inferior al del producto de partida. Sin embargo, algunos de los metabolitos que se generan son farmacológicamente activos, siendo capaces de interactuar con biomoléculas del organismo. Por ejemplo, si bien el diazepam, fármaco perteneciente al grupo de las benzodiazepinas, tiene un tiempo de vida media de hasta 48 horas, el metabolito activo N-desmetildiazepam llega hasta las 100 horas, por lo que también debe de ser metabolizado a nivel hepático para que cese el desarrollo de la actividad. Otro ejemplo es el del acetaminofeno, un fármaco con propiedades analgésicas y antipiréticas, metabolizado a nivel hepático y que da lugar a metabolitos hepatotóxicos que pueden interactuar con especies que utilicen las mismas vías de metabolización.

Una vez son metabolizados, tanto los metabolitos formados como el producto de partida que no haya sido modificado, se excretan bien vía heces o bien a través de la orina en proporciones diferentes en función de cada caso.

3. ENTRADA DE METABOLITOS Y COMPUESTOS DE PARTIDA EN EL MEDIO AMBIENTE

La identificación de las vías de entrada al medioambiente de fármacos, productos de cuidado personal y sus metabolitos constituyen una fuente de conocimiento clave para entender los distintos focos de contaminación así como la carga real de este tipo de contaminantes al medio.

En el caso de los principios activos farmacéuticos y sus metabolitos y, obviando la producción industrial que contribuye a la entrada en el medio acuático de los productos de partida, se debe hacer una distinción entre aquellos productos destinados al consumo humano de aquellos destinados al consumo animal. La ingesta de fármacos por parte de los seres humanos da lugar, como se ha comentado anteriormente, a su excreción a través de la orina o heces tanto de los productos de partida como de los metabolitos generados

derivados de su ingesta y a su llegada a las EDARs a través de los influentes de depuradora (Biel-Maeso et al., 2017). Por su parte, en el caso de los fármacos veterinarios, pueden distinguirse aquellos fármacos que actúan como promotores de crecimiento en animales de granja o los empleados para su uso terapéutico en el ganado o aves, que dan lugar a la contaminación de los suelos, o los aplicados en piscifactorías, que dan lugar a la contaminación de las aguas.

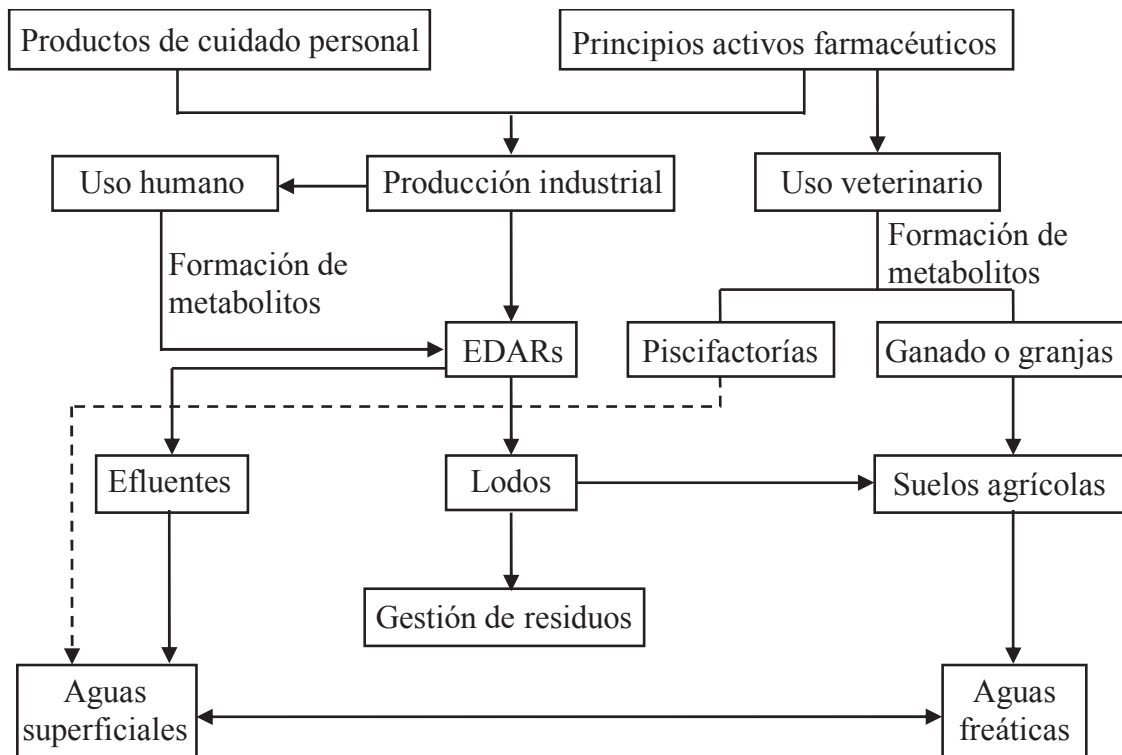


Figura 1.2. Vías de entrada al medio ambiente de principios activos farmacéuticos, productos de cuidado personal y metabolitos

En el caso de los productos de cuidado personal, al igual que los fármacos, su producción industrial da lugar a vertidos a las aguas residuales. Además, la excreción producida a través del uso humano tanto de los productos de partida como de los metabolitos generados constituyen otra vía de entrada hasta las EDARs, como puede verse en la Figura 1.2.

El uso de aguas residuales como aguas de riego así como de lodos de depuradora con fines agrícolas contribuye a mantener la contaminación ambiental en un estado dinámico trasladando aquellos contaminantes que muestran persistencia y, por tanto, no son degradados, desde las plantas depuradoras hasta los suelos. Por último, los contaminantes

presentes en los suelos pueden pasar, de nuevo, hasta el medio acuático por lixiviación o escorrentías causadas por la lluvia o el propio riego continuado (Molins, 2017).

3.1. Degradación de metabolitos y productos de partida en las EDARs

Los procesos de depuración llevados a cabo en las EDARs dan lugar a una eliminación parcial de los contaminantes mediante procesos complejos que ocurren a través de distintos mecanismos posibles. Dicha degradación puede verse afectada por los procesos de depuración empleados, los cuales pueden ser físicos, químicos o biológicos, o por las propiedades físico-químicas de los compuestos a tratar. Algunas de las propiedades que pueden afectar a la eficiencia de los procesos de depuración son la solubilidad en agua, la tendencia a quedarse retenido en el lodo o el tiempo de vida media de degradación en procesos abióticos o bióticos (Luo et al., 2014). Las condiciones operativas de los distintos procesos de depuración así como las condiciones ambientales resultan, también, de gran importancia en la degradación de los contaminantes.

Los parámetros operacionales de mayor importancia son a) el tiempo de retención hidráulica, b) el tiempo de retención del lodo y c) la cinética de biodegradación. En el caso de las condiciones ambientales, ejercen una gran influencia a) la temperatura, con una menor eficiencia a temperaturas bajas propias de períodos de invierno o climas fríos, b) las condiciones redox, observándose comportamientos de degradación diferentes cuando se trabaja en condiciones anaerobias o aerobias, y c) los valores de pH de trabajo, que afectan a la cinética de degradación de los compuestos.

Entre las características físico-químicas de los metabolitos al llegar a las EDARs, así como de sus productos de partida, la capacidad de interactuar con la materia sólida presente en forma de lodo juega un papel fundamental en su degradación. De esta manera, compuestos con un coeficiente de reparto bajo (K_{ow}) tienden a permanecer en la fase acuosa favoreciendo su movilidad a lo largo de los procesos de depuración y su entrada con los efluentes de depuradora. En general, compuestos con valores de $\log K_{ow}$ inferiores a 3 se espera que tengan una pobre retención en el lodo. En el caso de compuestos con valores de $\log K_{ow}$ superiores a 3 pero valores de pK_a por debajo del pH de las aguas residuales, tenderán también a permanecer en la matriz acuosa y no retenerse en los lodos (Evgenidou et al., 2015).

Algunos fármacos, productos de cuidado personal o los propios metabolitos pueden sufrir una descomposición a lo largo de los procesos de depuración llevados a cabo en las EDARs, que den lugar a alguno de los metabolitos provenientes de la excreta humana produciéndose una interconversión entre compuestos o dar lugar a otros compuestos, denominados como productos de transformación, fruto de procesos de fotodegradación, hidrólisis o reacciones oxidorreductoras (Illyas y Van Hullebusch, 2020; Karthikraj et al., 2017).

Así, la complejidad de los procesos de degradación, la eficiencia de esta y el conjunto de factores que influyen en ella hace que resulte muy difícil discriminar o establecer una clasificación del orden o predominancia de los procesos que sufren los metabolitos al ser degradados, tales como la formación de compuestos de menor peso molecular, la retención de los compuestos en los lodos o la formación de conjugados que pueden ser posteriormente hidrolizados dando lugar, de nuevo, al producto original (Yan et al., 2019; Evgenidou et al., 2015).

3.2. Riesgos y toxicidad a causa de la presencia de metabolitos en el medio ambiente

Los principios activos farmacéuticos, así como los productos de cuidado personal, están orientados y diseñados para que tengan efectos en organismos vivos. De esta manera, los organismos acuáticos o terrestres pueden presentar receptores enzimáticos similares a los seres humanos de forma que el contacto con este tipo de contaminantes les ocasione importantes daños. De igual forma, los metabolitos o productos de transformación mantienen en su estructura, normalmente, grupos activos procedentes del producto de partida que pueden ser responsables de efectos toxicológicos. Además, aunque es poco frecuente, en ocasiones, estos pueden presentar nuevos toxicóforos diferentes al producto de partida que den lugar a una mayor toxicidad o un modo de acción diferente (Michael et al., 2014).

Los efectos toxicológicos que presentan los metabolitos se pueden diferenciar entre aquellos relacionados con su bioconcentración (toxicocinética) y los relacionados con su modo de acción (toxicodinámica). Así, aunque la concentración de estos compuestos en el medio pueda ser baja, la continua introducción de estos puede dar lugar a que se produzca una concentración a largo plazo causando efectos en el ecosistema que, en ocasiones, podrían no detectarse hasta ser irreversibles. Además, el hecho de que

coexistan en el medio ambiente y de manera simultánea una amplia variedad de fármacos y productos de cuidado personal con sus respectivos metabolitos y productos de transformación puede producir efectos sinérgicos que aumenten el riesgo ocasionado. De esta manera, además de evaluar y determinar la presencia de metabolitos en distintos compartimentos ambientales, se hace necesario una evaluación y un análisis del riesgo que estos suponen (Evgenidou et al., 2015).

Muy escasos resultan, sin embargo, los estudios acerca de la toxicidad causada por metabolitos debido, en parte, a la baja disponibilidad que se tiene de estos para llevar a cabo ensayos experimentales. La mayoría de estudios donde se analiza el riesgo que estos suponen lo hacen mediante aproximación teniendo en cuenta tanto a los metabolitos formados como al producto de partida mediante simulaciones de las condiciones ambientales y que se llevan a cabo, normalmente, por inducción a degradación biótica (Březinova et al., 2018) o abiótica (Brunner et al., 2019). Los ensayos de toxicidad, generalmente, se llevan a cabo en algas como *Vibrio fischeri*, *Daphnia* y peces obteniéndose, así, una primera información sobre la toxicidad general aunque sin aportar información específica como la toxicidad genética o la neurotoxicidad (Evgenidou et al., 2015).

Por todo lo expuesto anteriormente y, teniendo en cuenta, la falta de información que existe en la actualidad sobre los efectos que ocasionan los metabolitos y productos de transformación, los trabajos de investigación que se lleven a cabo en relación a la contaminación ambiental deben de ir enfocados, entre otras vertientes, a aportar más luz sobre el riesgo que supone la presencia de estos compuestos.

3.3. Metabolitos de principios activos farmacéuticos y productos de cuidado personal en el medio acuático

Las aguas residuales constituyen la principal vía de entrada de metabolitos al medio ambiente. Aunque la mayoría de estudios se han centrado en la determinación de los compuestos de partida, éstos son excretados, a menudo, en menor proporción que sus metabolitos. Reflejo de ello es el incremento reciente, aún comparativamente anecdótico, de artículos científicos sobre la presencia de metabolitos en aguas residuales, en aguas superficiales o potables, detectando concentraciones del orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$ e incluso de los ng L^{-1} .

Las concentraciones a las que estos metabolitos se encuentran en muestras acuosas están influenciadas por múltiples factores como, por ejemplo, la distancia a una EDAR o los patrones de consumo de un determinado compuesto por parte de la población. Además, algunos autores han puesto su foco de atención no solo en los metabolitos, sino también en los productos de transformación que surgen a través de los distintos tratamientos de depuración y que pueden proceder tanto de los productos de partida como de los metabolitos.

De esta manera, en este epígrafe se recogen las concentraciones encontradas en aguas residuales, tanto de influente como de efluente de depuradora, de metabolitos y productos de transformación de los principios activos farmacológicos y productos de cuidado personal cuyo uso está más extendido. Entre las familias de principios activos farmacéuticos más usados se encuentran los analgésicos y antiinflamatorios, antibióticos, antidepresivos, β -bloqueantes, antidiabéticos, antiepilépticos o estimulantes, mientras que entre los productos de cuidado personal, se pueden encontrar los parabenos o los desinfectantes, entre otros.

3.3.1. Antibióticos

Los antibióticos son fármacos usados para tratar infecciones bacterianas debido a sus propiedades para producir la muerte de estas o impedir su reproducción. Por ser uno de los grupos más usados a nivel mundial, los estudios acerca de la presencia de estos fármacos en el medio ambiente es muy amplia. A pesar de que la información sobre contaminación ambiental por parte de los metabolitos es relativamente escasa, varios autores han centrado sus esfuerzos en su determinación y, especialmente, en los metabolitos procedentes de macrólidos y sulfonamidas, dos de los principales grupos de compuestos de esta familia.

Centrándonos en los macrólidos, en primer lugar, 4 son los compuestos usados de manera mayoritaria: eritromicina (ERY), azitromicina (AZI), claritromicina (CLA) y roxitromicina (ROX). La eritromicina, por su parte, se metaboliza casi por completo dando lugar mayoritariamente a su forma anhidra (ERY-H₂O), objeto de estudio de la mayoría de trabajos que evalúan la presencia de metabolitos de macrólidos en el medio ambiente, y a la eritromicina enol éter (ERY-EE). De manera minoritaria, también da lugar a la formación de otros metabolitos como son la N-Demetil eritromicina enol éter

(DME-EE) o la N-Demetil eritromicina en su forma anhidra (DME-H₂O). En el caso de la AZI, obtenida usando ERY como precursor, da lugar a 3 metabolitos principalmente: la eritromicina oxima (EOX), eritromicina imino éter (EIE) y la N-Desmetil azitromicina (N-DMA). Por su parte, la CLA, también obtenida a partir de la ERY, da lugar a otros 3 metabolitos principales: N'-Demetil claritromicina (DMC), descladinosil claritromicina (DCC) y 14-hidroxiclaritromicina (CLA-OH).

Así, Senta et al. (2017) desarrollaron un método para la determinación de los 4 macrólidos anteriormente mencionados con sus respectivos metabolitos mayoritarios en aguas de influente y efluente de una EDAR localizada en Croacia, así como otros metabolitos y productos de transformación minoritarios que se recogen en la Tabla 1.1., aunque no incluye metabolitos derivados de la ROX debido a la falta de disponibilidad comercial de estos.

De acuerdo con las concentraciones obtenidas en aguas de influente, la DME-EE, DME-H₂O, EOX y EIE presentaron valores de concentración por debajo del límite de cuantificación mientras que el resto se encontraban en un rango de concentración entre 3.3 ng L⁻¹ para la ERY-H₂O y 560 ng L⁻¹ para la CLA-OH. En relación a los efluentes, todos los metabolitos de los mencionados anteriormente, provenientes de la eritromicina y azitromicina presentaron concentraciones por debajo del límite de cuantificación, indicando una alta degradación. Por su parte, los metabolitos mayoritarios de la claritromicina, fueron detectados en efluentes de depuradora en un rango de concentraciones medias entre 15 ng L⁻¹ para la DMC y 430 ng L⁻¹ para la CLA-OH. La alta degradabilidad observada para la ERY-H₂O por Senta et al. (2017) también fue evaluada por Zhang et al. (2020), quienes detectaron concentraciones medias de este metabolito de 33.3 ng L⁻¹ en influente y de 23.3 ng L⁻¹ en efluente.

Por otro lado, como se ha dicho anteriormente, las sulfonamidas son muy usadas como antibióticos. En este grupo de compuestos se encuentran la sulfapiridina, sulfadiazina, sulfametazina o sulfametoxazol. Estos compuestos, con grupos sulfona en su estructura se caracterizan por ser metabolizados mediante reacciones de acetilación de tipo I dando lugar a metabolitos acetilados. Varios autores han estudiado la presencia de estos metabolitos en aguas residuales como puede verse en la Tabla 1.1.

Así, García-Galán et al. (2016) desarrollaron un método para determinar 12 fármacos y 20 metabolitos en aguas de influente y efluente de depuradora entre los que se encontraban los metabolitos acetilados derivados de las sulfonamidas. Si bien todos ellos se encontraban por debajo del límite de cuantificación en los efluentes, en el caso de los influentes de depuradora se detectó N⁴-acetilsulfapiridina (Ac-sulfapiridina) y N⁴-acetilsulfametoxazol (Ac-sulfametoxazol) a concentraciones medias de 196.8 y 380.6 ng L⁻¹, respectivamente.

De igual modo, Yuan et al. (2019) estudiaron la presencia de sulfonamidas y sus metabolitos acetilados en influentes de depuradora, encontrándose en un rango de concentraciones entre 13.2 ng L⁻¹ (Ac-sulfametazina) y 71.1 ng L⁻¹ (Ac-sulfapiridina). Además, observaron concentraciones en efluentes superiores a las encontradas en las aguas de entrada apuntando a posibles transformaciones entre productos de partida y metabolitos.

Por su parte, Cui et al. (2020), detectaron la presencia de N⁴-acetilsulfadiazina (Ac-sulfadiazina), Ac-sulfametazina y Ac-sulfametoxazol a concentraciones de 7.43 ng L⁻¹, 11.5 ng L⁻¹ y 50.1 ng L⁻¹ en aguas de influente y rendimientos de eliminación del 35.8%, 62.2% y 24.4%, respectivamente. Le-Minh et al. (2012) evaluaron la presencia de Ac-sulfametoxazol, con concentraciones medias en influentes y efluentes de 417.5 ng L⁻¹ y 27.5 ng L⁻¹, respectivamente, mientras que no detectaron la presencia de Ac-sulfametazina.

Por su parte, Gros et al. (2013) no detectaron la presencia de metabolitos provenientes de las sulfonamidas, si bien detectaron el derivado hidroxilado del metronidazol (4-OH metronidazol) con concentraciones medias de 193.7 y 92 ng L⁻¹ en aguas de influente y efluente de depuradora.

Tabla 1.1. Concentración (ng L⁻¹) y frecuencia de detección (f.d.) de metabolitos y productos de transformación derivados de antibióticos en influentes y efluentes de depuradora

Compuestos	Influentes				Efluentes				Referencias
	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	
Antibióticos									
Ac-sulfapiridina	-	-	-	71.7	-	-	-	110.8	Yuan et al. (2019)
	100	83.5	291.6	196.8	-	<LDM	<LDM	<LDM	García-Galán et al. (2016)
Ac-sulfadiazina	75	<LDM	182	7.43	100	0.42	6.7	2.66	Cui et al. (2020)
	-	-	-	41.6	-	-	-	2.7	Yuan et al. (2019)
	-	<LDM	<LCM	<LCM	-	<LDM	<LDM	<LDM	García-Galán et al. (2016)
Ac-sulfametazina	100	1.97	26.6	11.5	100	0.73	21.8	7.15	Cui et al. (2020)
	-	-	-	13.2	-	-	-	16.6	Yuan et al. (2019)
	-	<LDM	<LDM	<LDM	-	<LDM	<LDM	<LDM	García-Galán et al. (2016)
	-	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	Le-Minh et al. (2012)
Ac-sulfametoxazol	100	15.6	96.9	50.1	100	1.73	56.2	12.25	Cui et al. (2020)
	-	95.3	1557.5	380.6	-	<LDM	<LDM	<LDM	García-Galán et al. (2016)
	100	390	445	417.5	100	8	47	27.5	Le-Minh et al. (2012)
MET-OH	66.6	<LDM	454	193.7	66.6	<LDM	177	92	Gros et al. (2013)
ERY-H ₂ O	-	-	-	33.3	-	-	-	23.7	Zhang et al. (2020)
	33.3	<LCM	40	13.3	0	<LCM	<LCM	<LCM	Senta et al. (2017)
ERY-EE	33.3	<LCM	10	3.3	0	<LCM	<LCM	<LCM	Senta et al. (2017)
N-DMA	33.3	<LCM	70	23.3	0	<LCM	<LCM	<LCM	Senta et al. (2017)
N'-DMA	33.3	<LCM	90	30	100	30	30	30	Senta et al. (2017)
DCA	100	50	3600	1266.7	100	190	230	210	Senta et al. (2017)
AOX	100	8	20	16	100	20	20	20	Senta et al. (2017)
AZI-PO ₄	66.7	<LCM	790	303.3	100	300	310	305	Senta et al. (2017)
DCC	100	20	140	70	100	90	50	70	Senta et al. (2017)
DMC	33.3	<LCM	100	50	50	<LCM	30	15	Senta et al. (2017)
CLA-OH	100	320	970	560	100	380	480	430	Senta et al. (2017)

LDM: límite de detección del método; LCM: límite de cuantificación del método

3.3.2. Analgésicos y antiinflamatorios

La respuesta del sistema inmunológico a organismos extraños, traumatismos o enfermedades agudas o crónicas, entre otras, suele desembocar en un proceso inflamatorio. Aunque algunos fármacos tienen propiedades antiinflamatorias, se consideran como tal dos grandes grupos de fármacos: los antiinflamatorios esteroideos y los antiinflamatorios no esteroideos.

Si bien los esteroideos son corticoides naturales o semisintéticos, su uso se ve limitado, normalmente, debido a sus importantes efectos secundarios. Por otro lado, los antiinflamatorios no esteroideos, contemplan un grupo de fármacos que, además de sus propiedades antiinflamatorias, presentan efectos analgésicos y antipiréticos. Estos fármacos son ampliamente consumidos en todo el mundo bajo prescripción médica aunque también, en muchos casos, se pueden adquirir sin tal prescripción. Dentro de estos se encuentran el ácido acetil salicílico, el ibuprofeno, el diclofenaco, el naproxeno o el ketoprofeno, entre otros.

Debido al uso tan extendido de este tipo de fármacos, las concentraciones de estos compuestos en aguas residuales suelen ser del orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$. Si bien la mayoría de autores han centrado su atención, únicamente, en los compuestos de partida, los trabajos científicos que han incluido metabolitos derivados de este tipo de fármacos, a menudo, han detectado concentraciones del mismo orden de magnitud que sus productos de partida y, en ocasiones, superiores a estos.

Por su parte, el ibuprofeno es uno de los fármacos de mayor consumo a nivel mundial y, como tal, uno de los fármacos cuya presencia en aguas residuales ha sido más documentado a lo largo de los años. Sin embargo, la metabolización de este en el organismo da lugar a la excreción, de manera mayoritaria, de 2 metabolitos en un porcentaje muy superior al del producto de partida. Este es el caso del carboxiibuprofeno (CBX-IBU) y el 2-hidroxiibuprofeno (2-OH IBU) (Ferrando-Climent et al., 2012). Algunos autores han evaluado la presencia de estos metabolitos mayoritarios junto a otros minoritarios, como el 1-hidroxiibuprofeno (1-OH IBU) detectando concentraciones, en la mayoría de casos, muy superiores al del producto de partida pudiendo llegar, como puede verse en la Tabla 1.2., a concentraciones de hasta 93980 ng L^{-1} para el 2-OH IBU (Ferrando-Climent et al., 2012) o 75400 ng L^{-1} para CBX-IBU (Březinova et al., 2018)

en aguas de influente, y de hasta 12960 ng L⁻¹ para el 2-OH IBU y 13740 ng L⁻¹ para el 1-OH-IBU (Hijosa-Valsero et al., 2016) en efluentes de depuradora. De esta manera, aunque los rendimientos de eliminación observados para estos metabolitos suelen ser altos, las concentraciones en influentes son suficientemente elevadas para que, tras los procesos de depuración, sigan presentándose en el orden de los µg L⁻¹

La presencia de diclofenaco en aguas residuales ha sido ampliamente estudiada en los últimos años debido a su inclusión en la “Lista de Vigilancia” presente en la Decisión de Ejecución 2015/495/UE. Sin embargo, la metabolización de este fármaco es tan extensa que metabolitos como el 4-hidroxiclofenaco (4-OH DIC) o el 5-hidroxiclofenaco (5-OH DIC) se excretan en porcentajes similares o superiores al producto de partida y cuyas concentraciones en aguas residuales ha sido escasamente estudiada (Evgenidou et al., 2015). Como puede verse en la Tabla 1.2., algunos autores han evaluado la presencia de ambos metabolitos en aguas de influente, detectando concentraciones de hasta 6240 ng L⁻¹ para el 4-OH DIC y de hasta 1830 ng L⁻¹ para el 5-OH DIC, mientras que en aguas de efluente, se han detectado concentraciones de hasta 1530 ng L⁻¹ para el 4-OH DIC y de hasta 330 ng L⁻¹ para el 5-OH DIC (Larsson et al., 2014). El hecho de que no se alcance una eliminación completa de estos metabolitos unido a la preocupación existente en torno al compuesto original en los últimos años, hace que sea recomendable un estudio mucho más amplio acerca, no solo de la presencia de estos compuestos en matrices medioambientales, también de su potencial toxicidad.

Respecto al metamizol, también conocido como dipirona, con potentes propiedades analgésicas y antipiréticas, su consumo da lugar a la excreción de metabolitos como la 4-metilaminoantipirina (4-MAA), 4-formilaminoantipirina (4-FAA), 4 aminoantipirina (4-AA) o la 4-acetil-amino-antipirina (4-AAA).

De acuerdo a la Tabla 1.2., Rosal et al. (2010) estudiaron la presencia de 4-MAA, 4-FAA, 4-AA y 4-AAA en aguas de influente y efluente, detectando concentraciones máximas de entre 1894 ng L⁻¹ para el 4-MAA y 71000 ng L⁻¹ del 4-FAA, en aguas de influente. Rosal et al. (2010) evaluaron, también, los rendimientos de eliminación de dichos metabolitos a lo largo de los procesos de depuración obteniendo concentraciones en efluentes de depuradora, en un rango de entre el 46% para el 4-AAA y el 68% para el 4-FAA respecto a las concentraciones en influentes.

En el caso del naproxeno y el ketoprofeno, Larsson et al. (2014) e Hijosa-Valsero et al. (2016) evaluaron la presencia del O-desmetil-naproxeno (O-DES-Me-NAP), derivado del naproxeno, y del dihidroketoprofeno (DH-KET), derivado del ketoprofeno, en aguas residuales. Respecto a las concentraciones encontradas en influentes, destaca el O-DES-Me-NAP, con concentraciones máximas de 44690 ng L⁻¹ mientras que el DH-KET se detectó a unas concentraciones máximas de 2170 ng L⁻¹ (Larsson et al., 2014). Concentraciones mucho más bajas, sin embargo, fueron encontradas en los efluentes de depuradora analizados, alcanzando máximos de 2510 ng L⁻¹ en el caso del O-DES-Me-NAP (Larsson et al., 2014) y 330 ng L⁻¹ en el caso del DH-KET (Hijosa-Valero et al., 2016). Los rendimientos de eliminación alcanzados por estos compuestos a lo largo de los procesos de depuración se sitúan normalmente, acorde a la literatura científica, en valores superiores al 95%.

Por último, como se puede comprobar en la Tabla 1.2. no se ha incluido ningún derivado del ácido acetil salicílico, conocido popularmente como aspirina, a pesar de su elevado uso debido a que se trata de un profármaco cuyo consumo conlleva a una rápida desacetilación que conduce a la formación de su principal metabolito, el ácido salicílico, el cual ha sido tratado, desde el punto de vista de la contaminación ambiental, prácticamente, como un compuesto de partida. Es por ello que la mayoría de estudios donde se evalúa la presencia de este fármaco en muestras acuosas ambientales lo hacen a través de su metabolito mayoritario, por lo que, a diferencia de la mayoría de sus homólogos derivados de otros fármacos, su presencia en las diferentes matrices ambientales está ampliamente documentada. De esta manera, 33100 ng L⁻¹ (Martín et al., 2012), 15900 ng L⁻¹ (Hijosa-Valsero et al., 2016) o 89135 ng L⁻¹ (Kosma et al., 2014) son algunas de las concentraciones encontradas para el ácido salicílico en aguas de influente que, si bien resultan muy elevadas, presenta elevados rendimientos de eliminación (superiores al 85%) a lo largo de los procesos de depuración (Stamatis y Konstantinou, 2013).

Tabla 1.2. Concentración (ng L⁻¹) y frecuencia de detección (f.d.) de metabolitos y productos de transformación derivados de analgésicos y antiinflamatorios en influentes y efluentes de depuradora

Compuestos	Influentes				Efluentes				Referencias
	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	
Analgésicos y antiinflamatorios									
1-OH IBU	100	2550	5780	3786	100	110	1410	840	Ferrando-Climent et al. (2012)
	-	-	-	11200	100	3750	13740	9116	Hijosa-Valsero et al. (2016)
2-OH IBU	-	6280	8010	-	-	<LDM	910	-	Larsson et al. (2014)
	100	1210	93980	54316	100	390	5870	3728	Ferrando-Climent et al. (2012)
CBX-IBU	-	6450	31080	18300	-	-	-	5362	Březinova et al. (2018)
	-	-	-	12100	100	3220	12960	8675	Hijosa-Valsero et al. (2016)
O-DES-Me-NAP	-	28590	35260	-	-	440	1450	-	Larsson et al. (2014)
	100	<LCM	38400	22578	100	<LCM	10650	5228	Ferrando-Climent et al. (2012)
DH-KET	-	12100	75400	36400	-	-	-	17290	Březinova et al. (2018)
	-	-	-	7840	100	10	4220	1379	Hijosa-Valsero et al. (2016)
4-OH DIC	-	55650	62610	-	-	520	1380	-	Larsson et al. (2014)
	-	-	-	500	-	-	-	<LCM	Hijosa-Valsero et al. (2016)
4-AA	-	34970	44690	-	-	980	2510	-	Larsson et al. (2014)
	-	-	-	120	100	30	330	226	Hijosa-Valsero et al. (2016)
4-MAA	-	1070	2170	-	-	80	130	-	Larsson et al. (2014)
	-	-	-	<LCM	100	10	230	80	Hijosa-Valsero et al. (2016)
4-AAA	-	<LCM	237	237	-	<LCM	860	<LCM-450	Pérez y Barceló (2008)
	-	3180	6240	-	-	<LCM	1530	-	Stülten et al. (2008)
4-FAA	-	160	1830	-	-	<LCM	330	-	Larsson et al. (2014)
	-	262	3325	1517	-	127	2253	676	Larsson et al. (2014)
4-MAA	-	314	1894	880	-	34	1098	291	Rosal et al. (2010)
	-	1760	22200	8333	-	<LCM	6745	4489	Rosal et al. (2010)
4-AAA	-	1005	71000	17579	-	<LCM	27444	5593	Rosal et al. (2010)

LDM: límite de detección del método; LCM: límite de cuantificación del método

3.3.3. Antidepresivos

Inhibidores de la serotonina, antidepresivos tricíclicos o inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina son algunas de las familias de fármacos usados contra la depresión. Algunos autores han evaluado la actividad farmacológica que presentan muchos de sus metabolitos así como su presencia y transformación en aguas residuales. Derivados desmetilados como N-desmetil olanzapina (N-DES-Me-OLAM), O-desmetil venlafaxina (O-DES-Me-VEN), N,O-didesmetil venlafaxina (N,O-DiDES-Me-VEN), N-Desmetil sertralina (N-DES-Me-SER), N-desmetil citalopram (N-DES-Me-CIT), N-Desmetil mirtazapina (N-DES-Me-MIR)) o hidroxilados como hidroxibupropion o N-desmetilhidroxisertralina (N-DES-OH-SER), son los metabolitos detectados con mayor frecuencia en aguas residuales.

Las concentraciones más altas fueron encontradas para la O-DES-Me-VEN, llegando hasta los 1231 ng L⁻¹ detectados por González-Mariño et al. (2018) en aguas de influente de depuradora junto a otros metabolitos como N-DES-Me-MIR (14-22 ng L⁻¹), N-DES-Me-CIT (79-136 ng L⁻¹) o la norfluoxetina, metabolito activo de la fluoxetina (16-43 ng L⁻¹).

Por su parte, Schlüsener et al. (2015) determinaron el rendimiento de eliminación de estos metabolitos, observando que los metabolitos mayoritarios de la venlafaxina (O-DES-Me-VEN y N,O-DiDES-Me-VEN) mostraban una alta persistencia y no se eliminaban en los tratamientos de depuración, presentando unas concentraciones en efluentes de 633.5 ng L⁻¹ y 143.5 ng L⁻¹, respectivamente, mientras que un mejor rendimiento de eliminación se observó para el resto de metabolitos estudiados con un rango de eliminación entre el 23% del hidroxibupropión y el 65% de la norfluoxetina.

Otros autores como Zhang et al. (2020) o Kosma et al. (2019) también han estudiado la presencia de estos metabolitos en aguas residuales obteniendo, en todos los casos, las mayores concentraciones para la O-DES-Me-VEN e indicando, además, un ratio compuesto de partida/metabolito en efluentes, a menudo, mayor que en orina, lo que da cuenta de la labilidad del metabolito así como de la posibilidad de la reconversión, de nuevo, en el producto de partida (Evgenidou et al., 2015).

Tabla 1.3. Concentración (ng L⁻¹) y frecuencia de detección (f.d.) de metabolitos y productos de transformación derivados de antidepresivos en influentes y efluentes de depuradora

Compuestos	Influentes				Efluentes				Referencias
	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	
Antidepresivos									
N-DES-Me-OLAM	0-60	<LDM	27.2	<LCM-8.2	0-20	<LDM	<LCM	<LCM	Kosma et al. (2019)
O-DES-Me-VEN	-	-	-	140	-	-	-	57	Zhang et al. (2020)
	80-100	<LDM	1126	142.2-562.4	0-100	<LDM	1127.4	60-529.6	Kosma et al. (2019)
	100	1066	1231	1066-1231					González-Mariño et al. (2018)
	100	640	667	653.5	100	610	657	633.5	Schlüsener et al. (2015)
N,O-DiDES-VEN	100	150	154	152	100	140	146	143	Schlüsener et al. (2015)
Norfluoxetina	-	-	-	31.4	-	-	-	<LCM	Zhang et al. (2020)
	40-80	<LDM	38.9	<LCM-11.2	20-80	<LDM	18.6	<LCM	Kosma et al. (2019)
	100	16	43	16-43					González-Mariño et al. (2018)
	100	13	14	13.5	100	1	1.4	1.2	Schlüsener et al. (2015)
N-DES-Me-SER	0-40	<LDM	<LCM	-	0-20	<LDM	<LCM	-	Kosma et al. (2019)
	100	65	74	69.5	100	42	45	43.5	Schlüsener et al. (2015)
N-DES-OH-SER	100	7.6	8.4	8	100	3.6	3.9	3.75	Schlüsener et al. (2015)
N-DES-Me-CIT	100	79	136	79-136					González-Mariño et al. (2018)
	100	100	106	103	100	58	62	60	Schlüsener et al. (2015)
N-DES-Me-MIR	100	14	22	14-22					González-Mariño et al. (2018)
Hidroxibupropión	100	74	76	75	100	57	61	59	Schlüsener et al. (2015)

LDM: límite de detección del método; LCM: límite de cuantificación del método

3.3.4. Antiepilépticos

Los fármacos antiepilépticos actúan sobre el sistema nervioso central produciendo una reducción de la actividad neuronal, bien mediante el bloqueo de los canales de sodio y la reducción de la liberación de glutamato, o bien a través del aumento de los efectos inhibitorios del ácido γ -aminobutírico (neurotransmisor GABA). Entre los fármacos que tienen estas propiedades se encuentran carbamacepina, clonazepam, gabapentina, oxcarbamazepina o levetiracetam, entre otros.

Zhang et al. (2020) incluyeron en sus estudios la determinación del ácido levetiracetam en aguas de influente (240 ng L^{-1}) y efluente (75.3 ng L^{-1}), aunque la mayoría de autores se han centrado fundamentalmente en el estudio de la carbamacepina (CBZ) y sus metabolitos y de la oxcarbamacepina, análogo del primero, con algunos metabolitos compartidos como la 10-hidroxi-10,11-dihidro-CBZ (10-OH CBZ) o la 10,11-dihidro-trans-10,11-dihidroxi-CBZ (DiOH-CBZ). Aunque la CBZ da lugar a más de 30 metabolitos, las concentraciones más altas se suelen corresponder a las presentadas por la DiOH-CBZ, pudiendo llegar hasta los 4000 ng L^{-1} y 3400 ng L^{-1} en influentes y efluentes, respectivamente (Bahlmann et al., 2014). En la Tabla 1.4. se presentan las concentraciones encontradas en la literatura para algunos de sus metabolitos en aguas residuales, entre los que se encuentran derivados hidroxilados, como el 1-OH CBZ, 2-OH CBZ o 3-OH CBZ, epoxilados como la 10,11-dihidro-10,11-epoxi-CBZ (EP-CBZ), incluso productos de transformación como la acridona o la 9-carboxiacridina (9-CBX-acrid.) (Evgenidou et al., 2015; Bahlmann et al., 2014). La elevada persistencia de estos contaminantes da lugar a concentraciones similares e incluso superiores en efluentes de depuradora (He et al., 2019; Brezina et al., 2017; Bahlmann et al., 2014). Ese aumento de concentración observado, en ocasiones, puede deberse a la entrada de los compuestos como derivados conjugados que se transforman en el metabolito desconjugado a través de los procesos de depuración (Ekpeghere et al., 2018). Así, He et al. (2019) muestran este tipo de reacciones en el caso de la EP-CBZ, cuya concentración aumenta un 32%. Por último, algunos compuestos pueden sufrir reacciones que den lugar a otros metabolitos, tal y como apunta Brezina et al. (2017), donde se indica que la degradación de la 10-OH CBZ da lugar, entre otros, a la 9-CBX-acrid.

Tabla 1.4. Concentración (ng L⁻¹) y frecuencia de detección (f.d.) de metabolitos y productos de transformación derivados de antiepilépticos en influentes y efluentes de depuradora

Compuestos	Influentes				Efluentes				Referencias
	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	
Antiepilépticos									
3-OH CBZ	-	-	-	28.5	-	-	-	28.5	He et al. (2019)
	100	11	63	24	88	7	103	30	Ekpeghere et al. (2018)
	-	-	-	250	-	-	-	199	Brezina et al. (2017)
10-OH CBZ	-	-	-	92-150	-	-	-	95-140	Bahlmann et al. (2014)
	-	-	-	23.1	-	-	-	7.2	Zhang et al. (2020)
	-	-	-	4.7	-	-	-	5.2	He et al. (2019)
10,11-DiOH CBZ	-	-	-	1700	-	-	-	1230	Brezina et al. (2017)
	-	-	-	270-490	-	-	-	270-500	Bahlmann et al. (2014)
	-	-	-	11.9	-	-	-	3.4	Zhang et al. (2020)
	-	-	-	206.5	-	-	-	210	He et al. (2019)
	100	174	1420	603	100	97	911	472	Ekpeghere et al. (2018)
EP-CBZ	-	-	-	2700	-	-	-	2800	Brezina et al. (2017)
	-	-	-	1900-4000	-	-	-	2000-3400	Bahlmann et al. (2014)
	-	-	-	48.9	-	-	-	60.9	Zhang et al. (2020)
	-	-	-	17.5	-	-	-	21.8	He et al. (2019)
	-	-	-	58	-	-	-	82	Brezina et al. (2017)
1-/2-OH CBZ	-	-	-	48-59	-	-	-	50-87	Bahlmann et al. (2014)
	100	4	47	16	100	0.3	54	14	Ekpeghere et al. (2018)
	-	-	-	210	-	-	-	177	Brezina et al. (2017)
9-CBX-acrid.	-	-	-	90-170	-	-	-	97-140	Bahlmann et al. (2014)
	-	-	-	190	-	-	-	480	Brezina et al. (2017)
Acridona	-	-	-	10	-	-	-	<LCM	Brezina et al. (2017)
Ác. levetiracetam	-	-	-	240	-	-	-	75.3	Zhang et al. (2020)

LCM: límite de cuantificación del método

3.3.5. β -Bloqueantes

Los fármacos β -bloqueantes actúan directamente sobre el sistema nervioso anulando los receptores beta adrenérgicos impidiendo, de esta manera, la unión de las catecolaminas. Así, este tipo de receptores no pueden estimularse provocando una reducción de la frecuencia cardíaca y la tensión arterial. Por ello, este tipo de fármacos son, a menudo, usados para tratar la hipertensión arterial así como otras enfermedades cardíacas como arritmia, insuficiencia cardíaca o angina de pecho.

Entre los fármacos que pertenecen a esta familia, el metoprolol se encuentra entre los más usados, siendo 3 los compuestos que se generan mayoritariamente a través de su metabolización (ácido metoprolol (AMTP), α -hidroximetoprolol (α -HMTP) y O-desmetilmetoprolol (O-DMTP)) (Evgenidou et al., 2015).

Rubirola et al. (2014) evaluaron la presencia de estos tres metabolitos en aguas residuales de influente y efluente de depuradora. Las concentraciones encontradas para el AMTP en influentes fueron hasta 10 veces superiores a su producto de partida, con una concentración media de 203.8 ng L⁻¹, acorde al porcentaje de excreción de este metabolito, el cual puede ser excretado como tal, aproximadamente, en un 65% respecto a la dosis ingerida de metoprolol. Las concentraciones encontradas en efluentes para este metabolito son muy superiores a las encontradas en influentes, llegando a concentraciones de hasta 2506 ng L⁻¹. Este aumento de la concentración en aguas tratadas se debe no solo a la conversión del producto de partida en dicho metabolito a través de los distintos tratamientos de depuración, sino también a que se trata de un producto de transformación común a otros fármacos β -bloqueantes como es el atenolol.

En el caso del α -HMTP, se observó una alta biodegradación del compuesto, sólo detectándose en muestras de influentes de depuradora con una concentración media de 11.35 ng L⁻¹. El O-DMTP, por su parte, no se detectó en ninguna muestra analizada, posiblemente por la rápida transformación de este en MTPA en el organismo humano (Rubirola et al., 2014; Barclay et al., 2012).

Por último, los estudios donde se evalúan la presencia sobre metabolitos provenientes de este tipo de fármacos son muy escasos. Al trabajo de Rubirola et al. (2014) apenas se le suma el de Iancu et al. (2019), donde se evalúa la presencia del 4-hidroxiopropanolol (4-

OH propanolol), metabolito del propanolol, en aguas de influente y efluente de depuradora, no detectándose en ninguna muestra.

3.3.6. Antidiabéticos

El empleo de fármacos antidiabéticos para mantener los niveles glucémicos normales se basan en iguanidas, tiazolidindionas, sulfonilureas, meglitinidas, inhibidores de la dipeptil peptidasa 4, agonistas del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) e inhibidores de la alfa glucosidasa.

Si bien el abanico de fármacos para tratar esta enfermedad es muy amplio, existe un número muy limitado de estudios donde se evalúe la presencia de los productos de transformación derivados de estos en el medio ambiente y, en la mayoría de casos, únicamente se estudia la metformina. Este fármaco no es metabolizado por el organismo, pero muestra una alta biodegradación en las aguas residuales dando lugar a la formación de guanilurea.

Trautwein y Klümerer (2011) evaluaron la degradación de la metformina en una EDAR de Alemania observando que, en condiciones aerobias, tiene lugar un aumento de concentración de guanilurea desde los influentes a los efluentes de depuradora, con concentraciones de 400 y 1860 ng L⁻¹, respectivamente.

Este aumento se observó también por otros autores en las mismas matrices ambientales. Por ejemplo, Scheurer et al. (2012) observaron un aumento muy significativo de las concentraciones de guanilurea en efluentes de depuradora, pasando de valores máximos de 3000 ng L⁻¹ en influentes a los 99000 ng L⁻¹ encontrados en efluentes. Kosma et al. (2015), por su parte, observó el mismo efecto mediante la determinación de guanilurea en 8 EDARs situadas en Grecia, detectando un aumento de concentración desde 58.9 ng L⁻¹ en influentes hasta 627 ng L⁻¹ en efluentes.

3.3.7. Estimulantes

Los estimulantes tienen la capacidad de aumentar la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria y la actividad cerebral. Un ejemplo de este tipo de fármacos es la epinefrina, la cual se administra durante un paro cardíaco para provocar que el corazón vuelva a palpar. Sin embargo, los estimulantes más consumidos en la actualidad son la cafeína y la nicotina (Senta et al., 2015).

En el caso de la cafeína, aunque se usa, en ocasiones, con fines terapéuticos de forma oral o intravenosa, la mayor parte se introduce en el medio ambiente a través de alimentos y bebidas que contienen dicha sustancia mientras que, en el caso de la nicotina, su principal fuente proviene del tabaco.

En la literatura se recogen algunos estudios donde se determina la presencia de metabolitos derivados de la cafeína y la nicotina, siendo los metabolitos mayoritarios la paraxantina y la cotinina, respectivamente, además de otros minoritarios como los que se muestran en la Tabla 1.5.

Las concentraciones a las que se detectan la mayoría de los metabolitos derivados de la cafeína y la nicotina en aguas de influente de depuradora son muy altas, llegando a máximos de hasta 39715 ng L⁻¹, como la que recoge Senta et al. (2015), en el caso de la paraxantina. Sin embargo, los procesos de depuración favorecen la degradación de estos metabolitos, los cuales, si bien se detectan en aguas de efluente en la mayoría de las ocasiones, lo hacen a concentraciones muy bajas con rendimientos de eliminación que pueden superar, incluso, el 90%.

Por último, la extensa metabolización que sufre tanto la cafeína como la nicotina, dando lugar a cantidades tan elevadas de sus metabolitos en el medio ambiente, ha supuesto que varios autores apunten a estos como biomarcadores que sirvan para evaluar patrones de consumo de la población así como su dinámica (Ekpeghere et al., 2018; Evgenidou et al., 2015; Senta et al., 2015).

Tabla 1.5. Concentración (ng L⁻¹) y frecuencia de detección (f.d.) de metabolitos y productos de transformación derivados de β-bloqueantes, antidiabéticos y estimulantes en influentes y efluentes de depuradora

Compuestos	Influente				Efluentes				Referencias
	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	
β-bloqueantes									
MTPA	100	119	298	203.8	100	1107	2506	1630	Rubirola et al. (2014)
α-HMTP	100	<LCM	36.1	11.35	0	<LDM	<LDM	<LDM	Rubirola et al. (2014)
O-DMTP	0	<LDM	<LDM	<LDM	0	<LDM	<LDM	<LDM	Rubirola et al. (2014)
4-OH propanolol	0	<LDM	<LDM	<LDM	0	<LDM	<LDM	<LDM	Iancu et al. (2019)
Antidiabéticos									
Guanilurea	67	<LDM	19.6	58.9	78	<LDM	28.3	627	Kosma et al. (2015)
	100	<LCM	3000	-	80	<LCM	99000	45600	Scheurer et al. (2012)
	-	<LDM	400	-	-	<LDM	1860	-	Trautwein y Kümmerer (2011)
Estimulantes									
Paraxantina	-	-	-	6685	-	-	-	6.3	Zhang et al. (2020)
	-	17500	77300	39715	-	-	-	-	Senta et al. (2015)
	-	12912	23507	17481	-	-	-	-	Huerta-Fontela et al. (2008)
1-metilxantina	-	5000	61900	25592	-	-	-	-	Senta et al. (2015)
7-metilxantina	-	7290	84100	35753	-	-	-	-	Senta et al. (2015)
Cotina	-	-	-	3125	-	-	-	21.7	Zhang et al. (2020)
	100	395	1510	1080	81	8	265	54	Ekpeghere et al. (2018)
	-	650	3120	1820	-	-	-	-	Senta et al. (2015)
<i>trans</i> -3-OH cotina	94	326	5920	2750	69	15	642	145	Ekpeghere et al. (2018)
	-	2140	7000	4371	-	-	-	-	Senta et al. (2015)
Formil-nornicotina	81	46	1210	252	94	28	499	107	Ekpeghere et al. (2018)

LDM: límite de detección del método; LCM: límite de cuantificación del método

3.3.8. Antitumorales

Los fármacos antitumorales usados para el tratamiento del cáncer en terapias de quimioterapia son aplicados, únicamente, en hospitales. Así, este tipo de fármacos son detectados, con frecuencia, en efluentes hospitalarios mientras que las concentraciones a las que llegan a las EDARs a través de las aguas residuales suelen ser muy bajas. Por ello, los estudios donde se pone el foco de atención en los metabolitos son aún muy escasos, si bien existe una gran preocupación en todos los aspectos que derivan de este tipo de fármacos debido a su elevada toxicidad.

En la Tabla 1.6. se recogen las concentraciones medidas por Negreira et al. (2013) y Negreira et al. (2014) quienes analizan los metabolitos derivados del metotrexato (hidroximetotrexato (OH-METHOT)), paclitaxel (hidroxipaclitaxel (OH-PAC)) y tamoxifeno (hidroxitamoxifeno (OH-TAM) y 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (OH-D-TAM)) en aguas de influentes y efluentes de depuradora. Únicamente el derivado hidroxilado del paclitaxel (OH-PAC) fue detectado en aguas de influente, aunque a frecuencias y concentraciones muy baja, de hasta el 33% y 18.5 ng L^{-1} , respectivamente. De igual manera, sólo en una de las 12 muestras medidas en aguas de efluentes se detectaron OH-PAC y OH-TAM, a 3.7 y 5.8 ng L^{-1} , respectivamente.

3.3.9. Productos de cuidado personal

De acuerdo con el Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre de 1997, se entiende como producto cosmético todo compuesto destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano, dientes y mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, y/o corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado. De esta manera, se encuentran varias familias empleadas para este fin, como pueden ser fragancias, filtros UV, parabenos o antibacterianos como el 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol, conocido como triclosán (TCS).

Así, el TCS puede reaccionar con el cloro presente en las aguas residuales, dando lugar a derivados clorados como son el 4,5-dicloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol (4-Cl-TCS), 5,6-dicloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol (6-Cl-TCS) y 4,5,6-tricloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol (4,6-Cl-TCS), los cuales pueden actuar como disruptores endocrinos de manera similar a su producto de partida (Evgenidou et al., 2015). Sobre estos productos

de transformación pueden darse, a su vez, reacciones de fotólisis que den lugar a sus dioxinas correspondientes, consideradas de elevada toxicidad y, por tanto, de gran preocupación. De esta manera, Buth et al. (2011) detectaron concentraciones de hasta 17, 29 y 98 ng L⁻¹ para el 4-Cl-TCS, 4,6-Cl-TCS y 6-Cl-TCS, respectivamente. Si bien estos compuestos tienden a quedarse retenidos en los lodos de depuradora, no se eliminan por completo ya que el triclosán reacciona con el cloro residual presente en las últimas etapas de depuración de algunas EDARs, volviendo a generar sus derivados clorados que, no obstante, se encuentran presentes en efluentes de depuradora a concentraciones mucho menores, como puede verse en la Tabla 1.6., con máximas de 4, 9 y 22 ng L⁻¹ para el 4-Cl-TCS, 6-Cl-TCS y 4,6-Cl-TCS, respectivamente (Evgenidou et al., 2015; Buth et al., 2011).

En relación a los parabenos, al igual que el TCS, pueden reaccionar fácilmente con el cloro residual presente en las aguas dando lugar a sus derivados clorados. Así, González-Mariño et al. (2011) detectaron el 3-clorometilparabeno (3-Cl-MeP) y el 3,5-diclorometilparaben (3,2-Cl₂-MeP) en influentes de depuradora a concentraciones medias de 40 y 46 ng L⁻¹, respectivamente. Estos compuestos parecen alcanzar una elevada tasa de degradabilidad, obteniéndose del mismo estudio porcentajes de eliminación superiores al 94%. En el caso de metabolitos derivados de los parabenos, solo se encuentran en la literatura los trabajos de Wang y Kannan (2016) y Karthikraj et al. (2017), los cuales evalúan metabolitos específicos de ciertos parabenos como el metilprotocatecuato (OH-MeP), derivado del MeP, o el etilprotocatecuato (OH-EtP), derivado del EtP, así como metabolitos no específicos como son el ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3,4-DHB) y el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB), los cuales pueden provenir de otras fuentes adicionales a la excreción y que se encuentran en influentes de depuradora a concentraciones muy altas de hasta 2270 ng L⁻¹ y 293000 ng L⁻¹, respectivamente. Además, estos metabolitos no son eliminados completamente mediante los procesos de depuración actuales, en parte, porque pueden darse interconversiones entre productos de partida y metabolitos, por lo que se detectan en efluentes de depuradora, con una frecuencia de detección, en la mayoría de casos, del 100% y a concentraciones medias de entre 39.6 ng L⁻¹, del OH-EtP, y 5530 ng L⁻¹, del 4-HB.

Tabla 1.6. Concentración (ng L⁻¹) y frecuencia de detección (f.d.) de metabolitos y productos de transformación derivados de antitumorales y productos de cuidado personal en influentes y efluentes de depuradora

Compuestos	Influente				Efluentes				Referencias
	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	f.d. (%)	Min. (ng L ⁻¹)	Máx. (ng L ⁻¹)	Media (ng L ⁻¹)	
Antitumorales									
OH-METHOT	0	<LDM	<LDM	-					Negreira et al. (2013)
	0	<LDM	<LDM	-	0	<LDM	<LDM	-	Negreira et al. (2014)
OH-PAC	12.5	<LDM	4.4	-					Negreira et al. (2013)
	33.3	<LDM	18.5	5.5	8.3	<LDM	3.7	-	Negreira et al. (2014)
OH-D-TAM	0	<LDM	<LDM	-					Negreira et al. (2013)
	0	<LDM	<LDM	-	0	<LDM	<LDM	-	Negreira et al. (2014)
OH-TAM	0	<LDM	<LDM	-					Negreira et al. (2013)
	0	<LDM	<LDM	-	8.3	<LDM	5.8	-	Negreira et al. (2014)
Productos de cuidado personal									
4-Cl-TCS	-	2	17	-	-	<LDM	4	-	Buth et al. (2011)
6-Cl-TCS	-	3	98	-	-	<LDM	9	-	Buth et al. (2011)
4,6-Cl-TCS	-	8	29	-	-	<LDM	22	-	Buth et al. (2011)
3-Cl-MeP	100	12	61	40	18	<LDM	6.9	-	González-Mariño et al. (2011)
3,5-Cl ₂ -MeP	100	8	90	46	45	<LDM	12	2.6	González-Mariño et al. (2011)
3,4-DHB	100	238	1750	-	100	20.2	168	-	Karthikraj et al. (2017)
	100	43.8	2270	720-1010	100	107	1550	232-265	Wang y Kannan (2016)
4-HB	100	1380	31400	-	100	500	2590	-	Karthikraj et al. (2017)
	100	1460	293000	5280-8820	100	555	5530	1780-2080	Wang y Kannan (2016)
OH-MeP	100	86	1050	-	100	<LCM	294	-	Karthikraj et al. (2017)
	100	13	346	66-128	100	9.01	215	19.1-35.6	Wang y Kannan (2016)
OH-EtP	80	4.6	392	-	80	1.4	97.5	-	Karthikraj et al. (2017)
	71	0.36	340	32-71.4	71-86	0.36	39.6	7.33-23.7	Wang y Kannan (2016)

LDM: límite de detección del método; LCM: límite de cuantificación del método

3.4. Metabolitos de principios activos farmacéuticos y productos de cuidado personal en el medio terrestre

La mayoría de estudios presentes en la literatura donde se evalúa la presencia de principios activos farmacéuticos y productos de cuidado personal en matrices sólidas ambientales están centrados, al igual que en las matrices acuosas, en la determinación de los productos de partida. Muy escasos resultan, sin embargo, los trabajos en los que se determina la presencia de metabolitos en este tipo de matrices, como puede verse en la Tabla 1.7. Teniendo en cuenta las altas concentraciones en las que los metabolitos llegan a las EDARs a través de las aguas residuales así como la utilización de estas junto a los lodos de depuradora con fines agrícolas, se considera de gran importancia un mayor enfoque hacia la realización de estudios que complementen la información de los metabolitos ya estudiados y abarquen un abanico mucho más amplio de compuestos en matrices sólidas como lodos de depuradora o suelos agrícolas.

Tabla 1.7. Concentraciones ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de metabolitos en matrices sólidas ambientales

Compuestos	Matriz	Mín. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Máx. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referencias
EP-CBZ	Lodo	15	15	Kodešová et al. (2019)
DiOH-CBZ	Lodo	<LCM	<LCM	Kodešová et al. (2019)
N-DES-Me-CIT	Lodo	125	170	Kodešová et al. (2019)
N-DES-Me-SER	Lodo	165	205	Kodešová et al. (2019)
O-DES-Me-VEN	Lodo	61	39	Kodešová et al. (2019)
Ac-sulfadiazina	Lodo	<LDM	81.75	García-Galán et al. (2013)
	Suelo	<LDM	<LDM	
Ac-sulfametoxazol	Lodo	5.63	9.81	García-Galán et al. (2013)
	Suelo	0.95	1.38	
Ac-sulfapiridina	Lodo	1.24	1.76	García-Galán et al. (2013)
	Suelo	<LDM	0.77	
4-OH DIC	Lodo	<LCM	3.3	Rossini et al. (2016)
1-OH IBU	Lodo	<LDM	15.6	Rossini et al. (2016)
2-OH IBU	Lodo	<LDM	<LCM	Rossini et al. (2016)
CBX-IBU	Suelo	-	46.1	Bragança et al. (2012)
O-DES-Me-NAP	Lodo	<LDM	10.5	Rossini et al. (2016)
OH-MeP	Lodo	5.55	80.3	Wang y Kannan (2016)
	Lodo	3.1	219	Karthikraj et al. (2017)
OH-EtP	Lodo	0.36	8.18	Wang y Kannan (2016)
	Lodo	<LDM	<LCM	Karthikraj et al. (2017)
3,4-DHB	Lodo	101	294	Wang y Kannan (2016)
	Lodo	135	2450	Karthikraj et al. (2017)
4-HB	Lodo	125	3820	Wang y Kannan (2016)
	Lodo	389	31500	Karthikraj et al. (2017)

LDM: límite de detección del método; LCM: límite de cuantificación del método

4. EL PROCESO ANALÍTICO PARA MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

La complejidad de ciertas muestras medioambientales dificulta, a menudo, la determinación simultánea de analitos de diversa naturaleza presentes en bajas concentraciones. Por ello, se requieren de técnicas analíticas fiables, asociadas a métodos validados, que tengan una elevada sensibilidad para detectar concentraciones muy bajas, del orden de las partes por billón o menores, y con una elevada selectividad que permita discriminar los interferentes presentes en las muestras que puedan afectar a la medida.

En la literatura científica se recoge una amplia variedad de metodologías analíticas aplicadas principalmente a los productos de partida (principios activos farmacéuticos y productos de cuidado personal) en muestras biológicas tales como orina (Escobar-Wilches et al., 2020), plasma (Tang et al., 2020) o saliva (Zhou et al., 2020). En cambio, la determinación de estos compuestos en muestras ambientales requieren de procesos mucho más tediosos que necesitan, en la mayoría de ocasiones, de una serie de etapas que permitan el acondicionamiento de la muestra y la extracción de los analitos de interés libres de interferentes. Algunas de las etapas más frecuentes en el tratamiento de muestras ambientales son el secado, la tamización, la filtración, la purificación, la evaporación y, finalmente, la determinación.

Grosso modo, la técnica más empleada para la determinación analítica en este tipo de muestras es la cromatografía y, dependiendo de las propiedades físico-químicas de los analitos, la cromatografía líquida de alta resolución o la cromatografía de gases, ambas normalmente acopladas a la detección mediante espectrometría de masas como se explicará, en detalle, a lo largo del presente epígrafe (Jiang et al., 2019; Yuan et al., 2019; Aparicio et al., 2017; Tong et al., 2016).

Dentro de este apartado, nos centraremos en cómo han sido abordadas hasta la fecha las dos etapas más críticas del proceso analítico en la determinación de principios activos farmacéuticos y productos del cuidado personal: el tratamiento de la muestra y la determinación cromatográfica.

4.1. Pretratamiento y tratamiento de muestras

Todo tratamiento de muestra va acompañado de etapas y operaciones que permitan que los analitos se encuentren libres de interferentes o, en su defecto, con la menor presencia posible de estos. Además, la eliminación de interferentes debe permitir que los analitos

conserven sus propiedades físico-químicas y no tenga lugar su degradación. Esto suele conllevar, a menudo, etapas previas al tratamiento que permitan el acondicionamiento de la muestra tales como filtraciones o ajustes de pH, en el caso de muestras acuosas, así como etapas de liofilización o tamización, en el caso de muestras sólidas.

Las técnicas de preparación de muestra pueden clasificarse en función de varios parámetros aunque, posiblemente, al hablar de muestras ambientales una primera clasificación pueda ser en función del tipo de matriz, pudiendo diferenciar entre matrices líquidas y sólidas para, posteriormente, desarrollar la técnica de extracción más adecuada.

4.1.1. Muestras líquidas

Las muestras ambientales acuosas requieren de etapas de filtración previas al tratamiento de extracción con el fin de eliminar las partículas sólidas presentes. Generalmente, se emplean filtros de 0.45 μm que permiten la eliminación de la mayor parte de microorganismos y sólidos en suspensión asociados, los cuales pueden estar presentes, en ocasiones, en cantidades elevadas. Además, a menudo, los compuestos que se quieren analizar se encuentran a concentraciones inferiores a los límites de detección de los equipos usados en la determinación, lo que hace necesaria una etapa de preconcentración.

Entre los métodos de extracción existentes para el tratamiento de muestras líquidas es la extracción en fase sólida (*Solid-phase extraction, SPE*) la que emerge con un claro protagonismo en la mayoría de trabajos donde se evalúa la presencia de contaminantes emergentes en muestras acuosas ambientales dada su versatilidad y facilidad para ser implementada de manera rutinaria en laboratorios de análisis. No obstante, el desarrollo de la química analítica a lo largo de los años ha provocado el auge de una tendencia orientada hacia la búsqueda de una mayor automatización, miniaturización y simplificación, repercutiendo así, directamente, en el desarrollo de nuevos métodos de extracción. De esta manera, algunos autores han enfocado sus esfuerzos en el desarrollo de métodos alternativos a la SPE como pueden ser la microextracción en fase sólida (*Solid-phase microextraction, SPME*), la microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME*) o la extracción mediante sorción a través de barras agitadoras (*Stir-bar sorptive extraction, SBSE*).

4.1.1.1. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida es un método de extracción desarrollado en los años 80 basado en sistemas sólido-líquido empleando, principalmente, cartuchos o discos. El paso de la muestra acuosa a través de dichos soportes, en cuyo interior se encuentra fijado un sorbente con características físico-químicas parecidas a la de los analitos de interés, favorece la extracción de estos.

El uso de esta metodología presenta una serie de ventajas como son, entre otros, la simplicidad del método, alta reproducibilidad y selectividad, automatización o la posibilidad de usar diferentes sorbentes con afinidad por los analitos de interés y, por tanto, con capacidad para extraerlos (Almeida et al., 2016; Mogolodi y Momngongo, 2016).

El procedimiento se compone de varias etapas:

- Etapa 1: consistente en la activación del sorbente haciendo pasar un disolvente adecuado seguido del mismo disolvente en el que se encuentra la matriz. De este modo, se produce la solvatación de este, que permite las interacciones posteriores con los analitos y la eliminación del aire existente gracias al relleno de todos los huecos presentes.
- Etapa 2: carga de la muestra en los cartuchos de manera que una parte de las impurezas eluyen mientras que otra parte de estas junto a los analitos de interés quedan retenidos en el sorbente.
- Etapa 3: lavado o *clean-up* mediante un disolvente de polaridad adecuada para eluir de manera selectiva la mayor parte de los posibles interferentes que hayan sido retenidos en el sorbente.
- Etapa 4: secado del cartucho para eliminar las posibles trazas de disolvente o agua que pueda quedar en el soporte sólido y que puedan influir en etapas posteriores.
- Etapa 5: elución de los analitos haciendo pasar un disolvente adecuado a través del sorbente que favorezca la disolución de los analitos pero no de los interferentes que pudieran quedar aún retenidos en el cartucho.

La amplia aplicabilidad que presenta este método, en parte, es debida a la posibilidad de llevar a cabo una extracción en fase normal, en fase reversa o, incluso, mixta. El modo más frecuente en matrices líquidas es mediante fase reversa haciendo uso de sorbentes con un carácter más hidrófobo que la muestra y, en algunos casos, mediante modo mixto, siendo la SPE en fase normal más frecuente en matrices sólidas para retener interferencias desde el extracto orgánico.

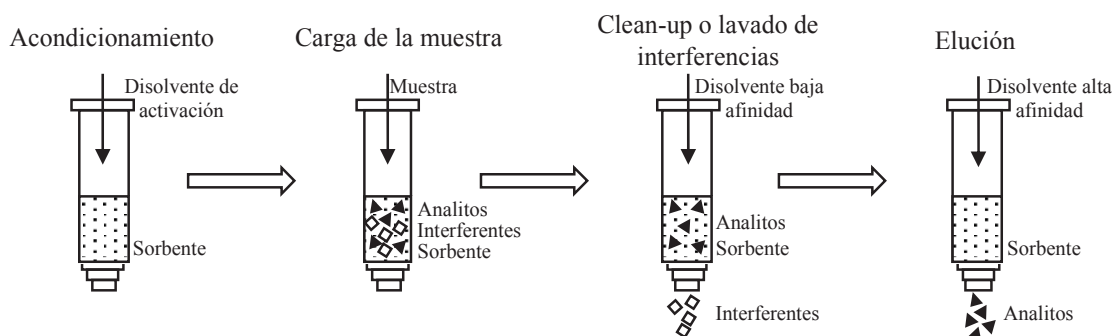


Figura 1.3. Esquema de la extracción en fase sólida

El mecanismo de retención que se produce en la fase reversa se basa en la interacción entre grupos no polares de los analitos de interés y grupos no polares de sorbente a través de fuerzas de Van der Waals. Para facilitar esta interacción se emplean disolventes con una polaridad alta. Algunos de los sorbentes usados en esta técnica son sílices funcionalizadas y materiales poliméricos en fase reversa como el C18 y el Oasis HLB.

Por otro lado, en algunos casos, se han empleado sorbentes mixtos conteniendo grupos funcionales apolares e intercambiadores aniónicos (por ejemplo, Oasis MCX) para la extracción conjunta de fármacos ácidos (Zoluaga et al., 2012).

Bajo estas premisas, Yuan et al. (2019) optimizaron un método para la extracción en fase sólida (SPE) de 4 fármacos antibióticos y 3 de sus principales metabolitos en aguas residuales con análisis online mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas obteniendo recuperaciones entre el 78 y 148%.

4.1.1.2. Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida se trata de una técnica desarrollada a principios de los años 90 por Pawliszyn basada en la utilización de una fibra de sílice fundida recubierta de un material polimérico ensamblada en una microjeringa modificada. Esta técnica

permite la extracción de analitos relativamente volátiles presentes en muestras sólidas, líquidas y gaseosas. Durante la extracción se produce un equilibrio entre las fases y, aunque la máxima sensibilidad se produce en el equilibrio, no es necesario llegar a este punto, pudiendo acortarse el tiempo de análisis si se trabaja a un tiempo fijo inferior al del equilibrio (Férez, 2014).

Esta técnica puede dividirse en dos etapas principales: la primera, la absorción y/o adsorción por parte del recubrimiento polimérico de los analitos presentes en la muestra, la cual puede producirse sumergiendo directamente la fibra en el interior de la muestra o manteniéndola en el espacio de cabeza en equilibrio con la disolución y, la segunda, la desorción de los analitos, la cual se puede llevarse a cabo térmicamente (en el inyector de un cromatógrafo de gases), o bien, químicamente utilizando disolventes orgánicos, de forma manual, o acoplado a un cromatógrafo mediante el uso de un sistema automatizado (Molina, 2014).

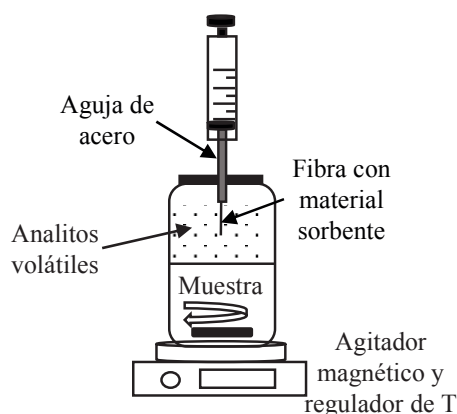


Figura 1.4. Esquema de la microextracción en fase sólida

A diferencia de la SPE, presenta la ventaja de que el uso de disolventes orgánicos se ve muy reducido, la manipulación humana es mínima y puede automatizarse fácilmente. Además, puede usarse para tratar un volumen de muestras pequeño y la extracción y preconcentración de los analitos se produce en una sola etapa. La principal limitación de este método es el volumen de fase extractante, lo cual limita su capacidad de enriquecimiento. (Mogolodi y Momngongo, 2016).

Actualmente hay fibras con diferentes recubrimientos, de manera que la SPME puede usarse para determinar un amplio grupo de compuestos. Algunos de estos recubrimientos

disponibles son Carbowax/divinilbenceno (CW/DVB) o polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB).

De este modo, Peña-Álvarez y Castillo-Alanís (2015) desarrollaron un método para la determinación de ibuprofeno, naproxeno, clorofeno y triclosán en aguas residuales mediante la microextracción en fase sólida usando una fibra de polietilenglicol (PEG) en la etapa de extracción y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la detección, obteniendo unos límites de detección de entre 0.0134 y 0.4066 ng L⁻¹.

4.1.1.3. Microextracción líquido-líquido dispersiva

Esta técnica de extracción surge en 2006 a través de los trabajos realizados por el profesor Rezaee, quien la presenta como una alternativa a las técnicas de extracción que requieren largos tiempos hasta alcanzar el equilibrio. La microextracción líquido-líquido dispersiva se basa en el aumento de la superficie de contacto entre el extractante y los analitos con el fin de que se alcance el equilibrio de manera casi instantánea a través de un disolvente (extractante) en una muestra acuosa ayudado por un segundo disolvente que realiza la función de dispersante (Vicente, 2014; Rezaee et al., 2006).

En este método se suele trabajar con volúmenes de disolvente muy bajos, del orden de los μL para los disolventes de extracción y algunos mL para los disolventes de dispersión, que suelen ser polares. La recuperación de los analitos se produce por centrifugación y, dependiendo de la densidad, la fase aceptora se queda en el fondo o en la superficie.

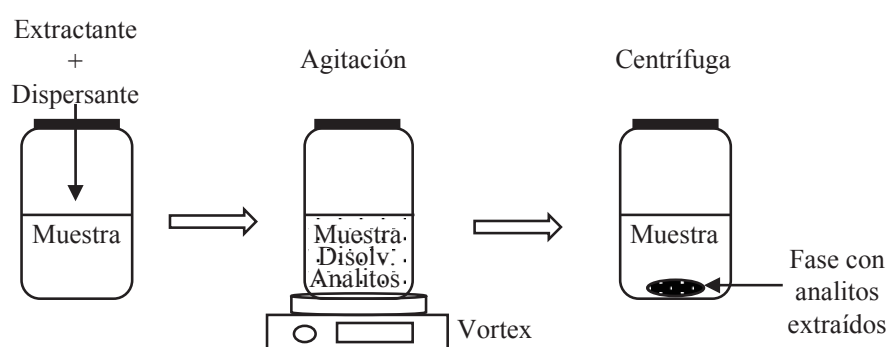


Figura 1.5. Esquema de la microextracción líquido-líquido dispersiva

Se trata de una técnica que presenta las ventajas de tener altas recuperaciones, bajo coste, rapidez y simplicidad. Sin embargo, el número de disolventes aptos para ser empleados en esta técnica está limitado debido a que es preferible que la fase aceptora permanezca en el fondo.

Algunos de los disolventes de extracción utilizados en DLLME han sido hidrocarburos halogenados como el clorobenceno, sin embargo, el mal comportamiento cromatográfico de estos llevó a la necesidad de llevar a cabo una etapa de evaporación previa al análisis final. Por ello, se puede decir que la DLLME ha sido más empleada con la cromatografía de gases que con cualquier otra técnica analítica (Chu et al., 2015).

De este modo, Martins et al. (2017) desarrollaron un método para el análisis de cocaína y sus 2 principales metabolitos (benzoilecgonina y anhidroecgonina) en muestras de aguas provenientes de efluentes de hospitales basado en la DLLME haciendo uso de cloroformo como disolvente de extracción y metanol como agente dispersante y determinación mediante cromatografía líquida haciendo uso de detectores de fluorescencia (FLD) y fila de diodos (DAD) obteniendo recuperaciones muy bajas en el caso de la benzoilecgonina (inferior a 8%) y recuperaciones entre el 28 y 103% para el producto de partida y la anhidroecgonina.

4.1.1.4. Extracción mediante sorción sobre barras agitadoras

La extracción mediante sorción sobre barras agitadoras surge en 1999 como alternativa a la microextracción en fase sólida (SPME) presentando altas recuperaciones y capacidad de sorción debido a una cantidad de fase sólida entre 50-200 veces superior a la SPME. Con el paso de los años, el número de publicaciones donde se emplea este método ha ido aumentando aplicándose a análisis traza de muestras alimentarias, biológicas y ambientales (Li et al., 2016).

La SBSE se basa en el uso de una barra magnética de 1 ó 2 cm de longitud recubierto con un material polimérico, cuyo espesor se sitúa entre 0.5-1 mm, y que se mantiene en agitación en contacto con la muestra. Este dispositivo, que recibe el nombre de twister, fue comercializado, en un primer momento, empleando polidimetilsiloxano como polímero sobre el cual se produce la sorción aunque, actualmente, se pueden encontrar recubiertos por una mezcla de silicona-poliethylenglicol y poliacrilato, cuya eficacia de extracción parece mejorar en muchas ocasiones. Teniendo en cuenta las limitaciones que presenta el hecho de no disponer de una gama más amplia de recubrimientos, algunos grupos de investigación han adaptado las barras agitadoras a sus necesidades modificando dicho recubrimiento haciendo uso de polímeros hidrofílicos o carbón activo, entre otros (Racamonde, 2015; Férez, 2014).

Esta técnica, al igual que la SPME, consta de dos etapas principales: la primera, la sorción de los analitos presentes en la muestra sobre el recubrimiento polimérico a medida que se va agitando y, la segunda, la desorción de los analitos (Racamonde, 2015). Esta segunda etapa puede desarrollarse mediante 2 vías:

- Desorción térmica: en el caso de analitos volátiles, usando un dispositivo de desorción especial que conduce directamente a una columna cromatográfica de gases.
- Desorción química: el twister se introduce en un disolvente o mezcla de estos que provocan el paso de los analitos desde la fase sólida a la fase líquida. Resulta aplicable para analitos que no son volátiles, sensibles a la temperatura o cuando no se dispone de un sistema de desorción térmica especial (Férez, 2014).

En cuanto a las ventajas e inconvenientes que presenta esta técnica frente a la SPME, como se ha comentado anteriormente, ofrece la posibilidad de tener límites de detección más bajos debido a un mayor espesor de fase sólida. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes es el elevado precio de los twister, además de la ya comentada limitación en cuanto a recubrimientos existentes para extraer compuestos polares. Por último, los tiempos de equilibrio son mayores que en la microextracción en fase sólida, oscilando entre 3 y 24 horas (Racamonde, 2015).

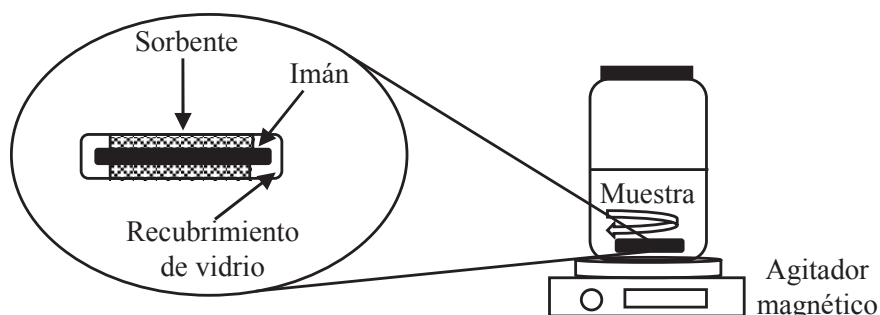


Figura 1.6. Esquema de la extracción mediante sorción sobre barras agitadoras

Así, Aparicio et al. (2017) desarrollaron un método para la determinación de 48 contaminantes entre los que se encontraban 4 conservantes y 14 principios activos farmacológicos en muestras de agua potable y agua superficial mediante el uso de un recubrimiento de polietilenglicol sobre barras agitadoras como técnica de extracción obteniendo recuperaciones entre el 64% y el 122% para los compuestos estudiados.

4.1.2. Muestras sólidas

La extracción y recuperación de los analitos en una matriz sólida suele llevarse a cabo a través de cinco etapas: (i) la desorción de los analitos desde los lugares activos de la matriz, (ii) la difusión de los analitos en la propia matriz sólida, (iii) la solubilidad de los analitos en el líquido extractante, (iv) la difusión de estos en el propio extractante y (v) la recolección de los extractos. Al igual que las muestras acuosas, en el caso de matrices sólidas medioambientales se requiere, también, de una serie de etapas previas al tratamiento de extracción como pueden ser el secado o la tamización.

Una de las razones por la que la presencia de fármacos y productos de cuidado personal y, en especial, de metabolitos de estos ha sido mucho menos investigada en matrices sólidas medioambientales que en matrices acuosas, es su mayor complejidad. De esta manera, es importante tener en cuenta que la estrategia óptima a seguir dependerá en gran medida de la naturaleza de la matriz. Además, en la mayoría de ocasiones, se requieren etapas de limpieza o clean-up con el fin de eliminar la mayor parte de interferentes. Para esta misión, con frecuencia, se llevan a cabo alguno de los métodos anteriormente descritos para muestras líquidas o con alguna modificación como, por ejemplo, la extracción en fase sólida dispersiva (*dispersive solid phase extraction, d-SPE*) basado en el mismo fundamento que la SPE tradicional, con la diferencia de que el sorbente es añadido sobre el extracto líquido y se mantiene en agitación favoreciendo, así, una mayor superficie de contacto y, por tanto, una mayor rendimiento en la eliminación de interferentes.

Aunque la técnica tradicional es la extracción por ultrasonidos (*Ultrasonic Solvent Extraction, USE*), en los últimos años, al igual que en el caso de matrices líquidas, se han venido desarrollando otras técnicas alternativas que integren una mayor miniaturización, automatización y simplificación del método aumentando el abanico de posibilidades disponibles para tratar muestras sólidas en laboratorios de análisis, como son la extracción mediante QuEChERS, asistida por microondas (*Microwave Assisted Extraction, MAE*), extracción mediante fluidos supercríticos (*Supercritical fluid extraction, SFE*) o la extracción con disolventes presurizados (*Pressurized Liquid Extraction, PLE*) (Camel, 2001).

4.1.2.1. Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción por ultrasonidos es una técnica tradicional de extracción empleada, normalmente, para compuestos no volátiles o semivolátiles que quieren ser extraídos desde muestras ambientales como suelos, lodos o aguas residuales basada en la aplicación de energía ultrasonido al poner en contacto la muestra sólida con un disolvente orgánico en un baño de agua o por una sonda de ultrasonidos. De este modo, esta energía favorece el contacto íntimo del disolvente con el sólido, acelerando la transferencia de masa y mejorando la eficiencia de la extracción. A menudo, es recomendable la adición de un líquido acidificado para favorecer la extracción.

Las variables que ejercen una mayor influencia para este tipo de extracción y que se suele tener en cuenta a la hora de optimizar un método son el tiempo de sonicación, el disolvente, el tamaño de partícula y la amplitud de las vibraciones (Bendicho y Lavilla, 2000).

De esta manera, Abril et al. (2018) desarrollaron un método para la determinación de 23 contaminantes orgánicos entre los que se encontraban 4 productos de cuidado personal en muestras de suelos agrícolas, lodos de depuradora y compost mediante extracción con ultrasonido tras el cual se lleva a cabo una etapa de clean-up mediante d-SPE con C18 obteniendo recuperaciones entre el 70 y 120%.

4.1.2.2. Extracción mediante QuEChERS

Este método de extracción debe su nombre a los siguientes términos ingleses: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe (QuEChERS). La traducción al español nos informa de las características y ventajas de este método de extracción rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro. Basado en los fundamentos de la extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), este método surge, en un principio, para analizar plaguicidas en frutas y vegetales, usando acetonitrilo como disolvente de extracción y NaCl y MgSO₄ como sorbentes que facilitan la extracción. Esta etapa de extracción es seguida de una etapa de limpieza, basada también en una d-SPE usando una amina primaria/secundaria (PSA) y MgSO₄ anhidro (Asensio, 2012).

Con el tiempo, sin embargo, se han ido desarrollando modificaciones sobre el método original con el fin de poder aplicarse a otras matrices y para la determinación de un abanico más amplio de analitos. Así, la adición de tampones como citratos,

acético/acetato o incluso ácido fórmico son alguna de las variaciones que algunos autores han llevado a cabo sobre el método original. Además, con objeto de eliminar una mayor cantidad de interferentes, otros sorbentes como C18 han sido estudiados para la etapa de clean-up.

De esta forma, Rossini et al. (2016) llevaron a cabo la determinación de fármacos antiinflamatorios no esteroideos junto a 6 de sus principales metabolitos en lodos de depuradora haciendo uso de QuEChERS como método de extracción, acetonitrilo como disolvente de extracción y posterior sistema SPE acoplado a un cromatógrafo líquido de alta resolución obteniendo recuperaciones entre el 36 y el 76%.

4.1.2.3. Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas se basa en el uso de energía microondas para efectuar la extracción de los analitos, una radiación no ionizante que provoca el movimiento de moléculas por la rotación de dipolos eléctricos permanentes o inducidos presentes tanto en los analitos como en los disolventes en su intento de alinearse con el campo eléctrico. El movimiento de las moléculas es tan rápido que se produce un calentamiento prácticamente instantáneo en el núcleo de los analitos, permitiendo una extracción rápida sin que tenga lugar la degradación de estos, a menos que la temperatura que se alcance sea excesivamente alta (Song, 2016; Camel, 2001).

En la mayoría de los casos se selecciona un disolvente capaz de absorber energía microondas y, de esta manera, elevar su temperatura aunque, otras veces, son los compuestos de la matriz los que se calientan de manera que los analitos se dirijan hacia el disolvente que, en este caso, estaría a baja temperatura (Sánchez-Prado et al., 2015).

Si bien la principal ventaja que ofrece este método de extracción es el hecho de que el calentamiento se produzca a alta velocidad y, por tanto, la velocidad de la extracción sea mayor, los factores que más afectan a este tipo de extracciones son la elección del disolvente así como la energía de irradiación microondas y el tiempo (Milutinovic et al., 2015).

En cuanto a la tecnología empleada, de manera general, existen dos opciones: (i) el uso de recipientes abiertos, cuya presión sería la atmosférica y (ii) recipientes cerrados, donde la presión y temperatura están bajo control.

Así, Tong et al. (2016) desarrollaron un método para la determinación de 25 antibióticos en sedimentos marinos mediante la extracción asistida por microondas seguida por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas obteniendo recuperaciones entre el 55 y el 110 %.

4.1.2.4. Extracción mediante fluidos supercríticos

La extracción mediante fluidos supercríticos se basa en la capacidad de extracción de un fluido que se encuentra por encima de su punto supercrítico. Por tanto, en este tipo de extracción resulta fundamental conocer el concepto de punto crítico, el cual se define como aquel en el que la temperatura y presión dan lugar a que la fase líquida y fase gaseosa se haga indistinguible. Este estado permite al disolvente tener la densidad de un líquido y la viscosidad de un gas, lo que le confiere propiedades únicas como disolvente de extracción.

El proceso de extracción mediante fluidos supercríticos se basa en cuatro etapas principales:

- Primera etapa: se produce la presurización del disolvente mediante un compresor o una bomba.
- Segunda etapa: se ajusta la temperatura que, unido a la presión adecuada, hará que el disolvente se sitúe por encima del punto crítico.
- Tercera etapa: se produce la extracción de los analitos poniendo en contacto la matriz con el fluido supercrítico.
- Cuarta etapa: se produce la separación del extractante de la matriz objeto de estudio.

El disolvente más usado como fluido supercrítico es el dióxido de carbono (CO₂) debido a su bajo coste, facilidad en la obtención así como propiedades críticas bajas (7.38 Mpa, 31.06 °C). El principal inconveniente de este método de extracción es el elevado coste inicial que supone la adquisición de un equipo de extracción capaz de trabajar con este tipo de fluidos.

Hofstetter et al. (2018) desarrollaron un método basado en la extracción mediante fluidos supercríticos usando CO₂ como disolvente de extracción para la determinación de ketoprofeno y sus 3 principales metabolitos en muestras de orina con valores de

recuperación absoluta por encima del 90% y usando para la determinación un equipo de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas conectado online con el sistema de extracción.

4.1.2.5. Extracción mediante líquidos presurizados

La extracción a través de líquidos presurizados surge como una variante de la extracción mediante fluidos supercríticos con la diferencia de que el extractante empleado se encuentra en estado líquido. En esta técnica se emplean valores altos de presión y temperatura disminuyendo, de este modo, la viscosidad del disolvente favoreciendo un mayor acceso a las partículas de la matriz objeto de estudio. De esta manera, se consigue un aumento considerable en la eficiencia de la extracción así como en la velocidad de la misma (Wells y Hess, 2000). Se basa, por tanto, en una celda de extracción en cuyo interior se deposita la muestra mezclada con un dispersante de carácter inerte que permita aumentar la superficie de contacto entre el disolvente de extracción y las partículas de la matriz sólida.

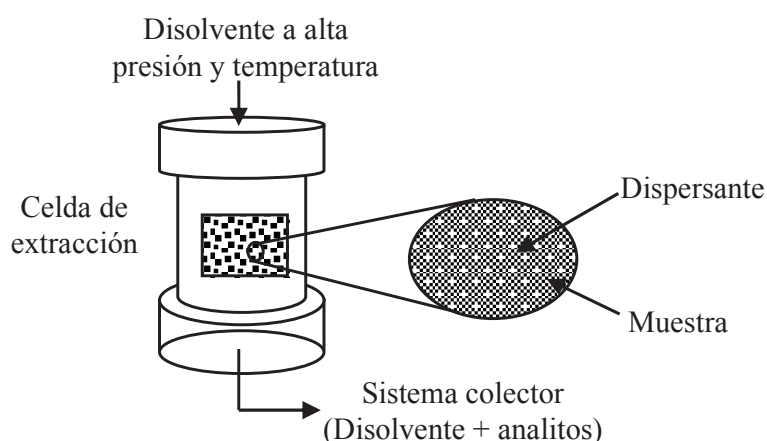


Figura 1.7. Esquema de una celda de extracción para líquidos presurizados

En relación a la tecnología empleada hay que diferenciar entre la extracción en modo estático y la extracción en modo dinámico. Para la extracción en modo estático, la celda de extracción se completa con el extractante para someterlo a las condiciones deseadas y se recoge, pasado el tiempo de extracción, en un vial colector. Tras esta etapa, se hace pasar una pequeña cantidad de disolvente para arrastrar posibles trazas de analito seguido de una purga con gas inerte. Por otro lado, en el caso de la extracción en modo dinámico se hace pasar un flujo continuo de disolvente permitiendo una mayor eficiencia en la extracción con el inconveniente de usar una cantidad de disolvente mucho más elevada.

En la optimización de la técnica hay que tener en consideración, entre otros, el tipo de disolvente, temperatura, tiempo de extracción, número de ciclos y la naturaleza de la matriz. En este caso, la presión no tiene demasiada importancia, siendo su principal efecto el de mantener el disolvente en estado líquido (Subedi et al., 2015; Camel, 2001).

Rauseo et al. (2019) desarrollaron un método para la extracción del sulfametoxazol y su principal metabolito (N⁴-acetil sulfametoxazol) en muestras de suelo haciendo uso de la extracción mediante líquidos presurizados previo a una SPE como etapa de limpieza, obteniendo unos límites de detección entre 0.3 y 0.4 µg Kg⁻¹.

4.2. Determinación analítica

El análisis de muestras ambientales, como se ha mencionado anteriormente, lleva consigo la necesidad de obtener resultados suficientemente exactos y precisos que aseguren una alta fiabilidad y reproducibilidad, respectivamente. Además, con frecuencia, se buscan análisis multi-residuo que permitan la determinación de más de un analito en la muestra mediante un único procedimiento.

La existencia de varios analitos de interés unida a la presencia de interferentes que no hayan podido ser eliminados durante las etapas de extracción hace que la determinación analítica sea una etapa, no sólo crítica, sino también compleja, haciéndose necesario herramientas o técnicas que permitan la separación de los múltiples compuestos presentes en los extractos finales obtenidos tras el tratamiento de la muestra.

4.2.1. Técnicas cromatográficas

La determinación analítica en muestras ambientales, como pueden ser aguas residuales o lodos de depuradora, se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas que permitan la correcta separación de los compuestos de interés, como puede verse en la Tabla 1.8., en el caso de muestras líquidas, y en la Tabla 1.9., en el caso de muestras sólidas. Dentro de las técnicas cromatográficas existentes, la cromatografía de líquidos (LC) y la cromatografía de gases (GC) son las más utilizadas para la determinación de analitos en este tipo de muestras, siendo posible utilizar ambas en función de las propiedades físico-químicas de los analitos objetos de estudio.

En el caso de la cromatografía líquida, al igual que la extracción en fase sólida, la existencia de una fase móvil y de una fase sólida permite la posibilidad de trabajar en fase

normal o en fase reversa, siendo esta última la más usual para lograr la separación de los compuestos objeto de estudio. Las fases estacionarias más utilizadas son las de octadecilsilano, octilsilano o dodecilsilano, entre otras, mientras que soluciones acuosas de un ácido, una sal o un tampón junto con un modificador orgánico (metanol o acetonitrilo, mayoritariamente) suelen ser las fases móviles más frecuentes, lo que permite adecuar las condiciones cromatográficas a las propiedades físico-químicas de los analitos.

Dada su versatilidad, la cromatografía líquida es la que se emplea con mayor frecuencia para la determinación de principios activos farmacéuticos, productos de cuidado personal y los metabolitos derivados de estos (Pérez-Lemus et al., 2019; Evgenidou et al., 2015).

La cromatografía de gases, por su parte, requiere de analitos volátiles que se distribuyan entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria compuesta por un sólido o líquido inmovilizado sobre un soporte sólido o sobre las paredes de la columna cromatográfica. Con el fin de modificar las propiedades físico-químicas de los analitos para hacerlos más volátiles y, por tanto, aptos para ser determinados a través de la cromatografía de gases, a menudo, se llevan a cabo etapas adicionales de derivatización, previas a la determinación cromatográfica. De esta manera, en la literatura científica pueden encontrarse numerosos trabajos donde se realizan análisis multi-residuo mediante cromatografía de gases para la determinación de antiinflamatorios y analgésicos (Bo et al., 2015; Peña-Álvarez y Castillo-Alanís, 2015), antibióticos (Bo et al., 2015), estimulantes (Bo et al., 2015) o productos de cuidado personal (Peña-Álvarez y Castillo-Alanís, 2015; Pintado-Herrera et al., 2014; Ramos et al., 2019), entre otros.

4.2.2. Determinación de metabolitos en muestras ambientales: espectrometría de masas

La sensibilidad y selectividad exigibles en la determinación de metabolitos en muestras ambientales, en las que se esperan concentraciones muy bajas de estos compuestos y un gran número de interferentes, influyen en el uso mayoritario de detectores de espectrometría de masas acoplados a las cromatografías líquida o gaseosa. En algunos casos concretos, prácticamente anecdóticos, algunos autores han propuesto métodos accesibles y asequibles, con potencial uso con fines de rutina, para un número limitado de contaminantes emergentes basados en el uso de detectores de fila de diodos y de fluorescencia (Martins et al., 2017; Morales-Toledo et al., 2016).

Dentro de los detectores de espectrometría de masas la fuente de ionización más usada es la ionización por electronebulización (*electrospray source ionization, ESI*), debido a los mejores límites de cuantificación que presenta frente a otras como la ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization, APCI*) o la fotoionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure photoionization, APPI*).

Los distintos analizadores de masas pueden clasificarse en función de su resolución, diferenciando entre los de baja resolución, como son el cuadrupolo (Q) o trampa de iones (IT) y de alta resolución, como el tiempo de vuelo (TOF). Siendo el más habitual el uso del cuadrupolo como analizador de masa, se pueden distinguir 2 modos de funcionamiento posibles, el modo SIM (*selected ion monitoring*) y el modo SCAN (barrido), los cuales se detallan a continuación:

- Modo SIM: la relación m/z que se transmite es fruto de mantener constantes los potenciales. De esta manera, solo los iones con esa relación atravesarán el analizador mientras que el resto chocarán con los cilindros. Este tipo de configuración permite disponer de un ruido de fondo muy bajo, por lo que suele emplearse para análisis cuantitativos.
- Modo SCAN: se realiza un barrido sobre un determinado rango de masas a la vez que se van variando los potenciales ligeramente. De esta forma, los iones se filtran de manera continua en función de la relación m/z hasta obtener el espectro de masas. Al no perderse información alguna de ningún fragmento formado, la sensibilidad es menor al modo SIM, siendo usual este tipo de configuración para llevar a cabo análisis cualitativos.

Uno de los modos de trabajo más empleados es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) donde un primer (Q_1) y tercer cuadrupolo (Q_3) funcionan como analizadores de masas mientras que un segundo (Q_2) funciona como celda de colisión, la cual se produce por el choque del ión precursor con un gas inerte. Aunque es posible trabajar con los modos SIM y SCAN en cada uno de los dos cuadrupolos, normalmente se trabaja mediante monitorización de reacciones múltiples (*multiple reaction monitoring, MRM*) basado en la selección de iones precursores en el Q_1 , fragmentados en Q_2 y registrados en Q_3 solo algunos de los iones producto consiguiendo, así, una alta sensibilidad y selectividad al reducirse en gran medida el ruido de fondo además de conseguir una identificación fiable.

Table 1.8. Procedimientos de análisis de principios activos farmacéuticos, productos de cuidado personal y metabolitos derivados de ellos en muestras acuosas medioambientales

Compuestos	Matriz	Método de extracción	Determinación	Referencias
Antibióticos y metabolitos	Aguas residuales	SPE	LC-MS/MS	Yuan et al. (2019)
Psicotrópicos y metabolitos	Aguas residuales	SPE	LC-MS/MS	González-Mariño et al. (2018)
Carbamazepina y metabolitos	Aguas residuales	SPE	LC-MS/MS	He et al. (2019)
Antibióticos	Aguas residuales	SPE	LC-MS/MS	Senta et al. (2017)
β -Bloqueantes y metabolitos	Aguas residuales	SPE	LC-MS/MS	Iancu et al. (2019)
Productos de cuidado personal y metabolitos	Aguas residuales	SPE	LC-MS/MS	Karthikraj et al. (2017)
Analgésicos y antiinflamatorios	Aguas marinas	SPE	LC-MS/MS	Pereira et al. (2016)
Estimulantes				
β -Bloqueantes				
Antidepresivos				
Antiepilépticos				
Cocaína y metabolito				
Analgésicos y antiinflamatorios	Aguas residuales	SPME	GC-MS	Peña-Álvarez y Castillo-Alanís (2015)
Clorofeno				
Productos de cuidado personal				
Cocaína y metabolitos	Aguas residuales	DLLME	LC-DAD-FLD	Martins et al. (2017)
Analgésicos y antiinflamatorios	Aguas superficiales y potables	SBSE	LC-MS/MS	Aparicio et al. (2017)
Antilipémicos				
β -Bloqueantes				
Productos de cuidado personal				
Productos de cuidado personal	Aguas residuales, superficiales y subterráneas	SBSE	GC-MS/TOF	Pintado-Herrera et al. (2014)

Table 1.9. Procedimientos de análisis de principios activos farmacéuticos, productos de cuidado personal y metabolitos derivados de ellos en muestras sólidas medioambientales

Compuestos	Matriz	Método de extracción	Determinación	Referencias
Productos de cuidado personal	Lodos de depuradora, compost y suelos	USE	LC-MS/MS	Abril et al. (2018)
Antibióticos	Lodos de depuradora	USE	LC-MS/MS	Hou et al. (2019)
Analgésicos y antiinflamatorios	Lodos de depuradora	USE	GC-MS/MS	Bo et al. (2015)
Estimulantes				
Antibióticos				
Analgésicos y antiinflamatorios	Lodos de depuradora	USE	LC-MS/MS	Boix et al. (2016a)
Antiepilépticos				
β -Bloqueantes				
Antidepresivos				
Productos de cuidado personal	Lodos de depuradora	QuEChERS	GC-MS/MS	Ramos et al. (2019)
Analgésicos y antiinflamatorios y sus metabolitos	Lodos de depuradora	QuEChERS	LC-MS/MS	Rossini et al. (2016)
Parabenos	Lodos de depuradora	QuEChERS	LC-MS/MS	Marta-Sánchez et al. (2018)
Analgésicos y antiinflamatorios	Lodos de depuradora	MAE	LC-FLD	Morales-Toledo et al. (2016)
β -Bloqueantes				
Antibióticos	Compost	MAE	LC-MS/MS	Dorival-García et al. (2015)
Antidepresivos	Lodos de depuradora	MAE	LC-MS/MS	Evans et al. (2015)
β -Bloqueantes				
Diclofenaco	Lodos de depuradora	PLE	LC-MS/MS	Vom Eyser et al. (2016)
Sulfametoxazol y su metabolito	Suelos	PLE	LC-MS/MS	Rauseo et al. (2019)
Analgésicos y antiinflamatorios	Suelos y sedimentos	PLE	LC-MS/MS	Biel-Maeso et al. (2017)
Antidiabéticos				
β -Bloqueantes				
Estimulantes				
Antiepilépticos				

Si bien el uso de espectrómetros de masas acoplados a cromatógrafos de gases o de líquidos tiene como objetivo, en la mayoría de ocasiones, no solo la identificación sino también la cuantificación de los analitos, esto implica la necesidad de contar con patrones de referencia que permitan una correcta determinación. En el caso de los metabolitos, esta dificultad para disponer de ellos en forma de patrones de referencia es aún mayor, dado el abanico tan amplio de compuestos que derivan de los productos de partida. De esta manera, para llevar a cabo la identificación de los metabolitos y productos de transformación introducidos en el medio ambiente se pueden distinguir 3 tipos posibles de análisis:

- Target analysis: existe una selección previa de compuestos que existen como patrones de referencia pudiendo desarrollarse una metodología analítica que asegure una correcta determinación del producto de transformación. La posibilidad de usar la espectrometría de masas para optimizar y seleccionar los iones o transiciones derivados del producto de transformación permite discriminar otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra obteniendo una información específica para los analitos seleccionados. En este tipo de análisis, es la espectrometría de masas en tándem la que se erige como mayoritaria dada su alta selectividad y sensibilidad que presenta permitiendo, así, llegar a límites de detección muy bajos.
- Suspect screening: El uso de la espectrometría de masas permite obtener espectros completos con medidas exactas de masa permitiendo trabajar con cualquier analito presente en la muestra siempre que sea compatible con un método de extracción y determinación determinado. Así, el análisis del tipo *suspect screening* está basado en una identificación tentativa en la que se toma como referencia el ion más abundante y se estudia su fragmentación. No se requieren patrones de referencia y la selección del compuesto a determinar se lleva a cabo después del análisis. La utilización de este tipo de identificación está limitada a la información existente en bases de datos donde se recojan iones moleculares o fragmentos relacionados con los productos de transformación de forma que se pueda realizar un barrido utilizando la masa exacta de los iones

esperados. Para este tipo de análisis, los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) son los que suelen ofrecer un mejor resultado dada su capacidad para registrar espectros completos de masas con elevada resolución permitiendo conocer el valor exacto de dicha masa con un porcentaje de error ínfimo.

- Non-target analysis: se lleva a cabo una búsqueda de desconocidos, es decir, de los que no se tiene información previa y sin llevarse a cabo, por tanto, una preselección. En el ámbito ambiental, con matrices muy complejas, llevar a cabo este tipo de análisis de manera fiable resulta muy complicado y las posibilidades de encontrar productos de transformación previamente desconocidos son remotas.

La identificación de metabolitos y productos de transformación en el medioambiente se lleva a cabo, mayoritariamente, mediante *target analysis* aunque en la literatura pueden encontrarse algunos estudios donde se ha aplicado la identificación mediante *suspect screening* para estudiar productos de transformación generados en experimentos a escala de laboratorio (Jaén-Gil et al., 2019) o para identificar metabolitos derivados de fármacos en muestras de aguas residuales (Boix et al., 2016b).

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tras lo expuesto anteriormente se pone en evidencia la necesidad de profundizar sobre la presencia de nuevos contaminantes emergentes y derivados de éstos, como los metabolitos tratados en este capítulo de antecedentes o, en general, los productos de degradación de estos contaminantes identificados y no identificados. Además, la quiralidad que presentan la mayoría de estos compuestos también está siendo objeto de estudio en la actualidad, pues puede afectar en el comportamiento que puedan presentar en el medio ambiente.

En consecuencia de lo anterior, se hace necesario y urgente el desarrollo de nuevos métodos analíticos que aborden: (i) el análisis de los contaminantes emergentes que están siendo propuestos en la legislación actual para su vigilancia y monitorización con procedimientos y herramientas estándares, asequibles y accesibles, para su potencial extrapolación a los laboratorios de rutina; (ii) la determinación de nuevos compuestos,

metabolitos o productos de degradación que ya han sido identificados, pero sobre cuya presencia existe un importante desconocimiento aún porque, entre otras razones, se requieren de métodos *ad hoc* fiables en todo tipo de matrices ambientales implicadas, líquidas y sólidas; (iii) la identificación y cuantificación de compuestos non-target con estrategias analíticas y herramientas de alta resolución adecuadas para su incorporación al listado de compuestos de interés para su monitorización ambiental; (iv) el desarrollo de métodos para la separación de compuestos quirales y el estudio de la enantioselectividad que mayoritariamente estos presentan.

La consolidación de métodos analíticos fiables y la identificación de nuevos contaminantes emergentes o compuestos derivados de estos facilitará, sin duda, la proliferación de investigaciones en distintos campos del ámbito medioambiental como los que se exponen a continuación a modo de ejemplo:

- La distribución de esos nuevos compuestos poco estudiados en las principales fuentes de contaminación (aguas residuales y lodos de depuradora) y en los principales destinos de estas fuentes (aguas superficiales y suelos) y otros entornos asociados.
- La eficacia en la degradación de estos compuestos de los actuales sistemas de depuración de aguas residuales urbanas y de tratamiento de lodos de depuradora, así como la evaluación del rendimiento de tecnologías avanzadas en la eliminación de compuestos orgánicos persistentes, como las basadas en el uso de membranas, los que emplean procesos de oxidación avanzada, o las que utilizan nuevos materiales adsorbentes.
- La distribución de estos contaminantes en la reutilización de aguas residuales y lodos de depuradora y sus riesgos potenciales para los suelos y los cultivos.
- La evaluación de los riesgos ambientales a partir de las concentraciones cuantificadas de estos compuestos en escenarios reales o en ensayos toxicológicos de laboratorio.
- La epidemiología de las aguas residuales y lodos de depuradora, aprovechando la posibilidad de la utilización de algunos de estos compuestos como marcadores de la exposición a las poblaciones servidas.

6. REFERENCIAS

- Abril, C., Santos, J.L., Malvar, J.L., Martín, J., Aparicio, I., Alonso, E., 2018. Determination of perfluorinated compounds, bisphenol A and personal care products in digested sludge, compost and soil by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1576, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.028>
- Almeida, V., Ribeiro, R., Araújo, A., Falcao, D., Da Silva, R., Da Costa, M., 2016. Development of a solid-phase extraction system modified for preconcentration of emerging contaminants in large sample volumes from rivers of the lagoon system in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 110, 572-577. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.059>
- Aparicio, I., Martín, J., Santos, J.L., Malvar, J.L., Alonso, E., 2017. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of polar and non-polar emerging and priority pollutants in environmental waters. *J. Chromatogr. A* 1500, 43-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.007>
- Asensio, M., 2012. Nuevos procedimientos de extracción y determinación de plaguicidas en muestras medioambientales. Tesis doctoral. Tenerife (España).
- Bahlman, A., Brack, W., Schneider, R.J., Krauss, M., 2014. Carbamazepine and its metabolites in wastewater: Analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal. *Water Res.* 57, 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.022>
- Barclay, V.K.H., Tyrefors, N.L., Johansson, I.M., Petterson, C.E., 2012. Chiral analysis of metoprolol and two of its metabolites, α -hydroxymetoprolol and deaminated metoprolol, in wastewater using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1269, 208-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.090>
- Bendicho, C., Lavilla, I., 2000. Ultrasound-assisted metal extractions. *Encyclopedia of Separation Science*, 4421-4426.
- Biel-Maeso, M., Corada-Fernández, C., Lara-Martín, P.A., 2017. Determining the distribution of pharmaceutically active compounds (PhACs) in soils and sediments by pressurized hot water extraction (PHWE). *Chemosphere* 185, 1001-1010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.094>

Bo, L., Feng, L., Fu, J., Li, X., Li, P., Zhang, Y., 2015. The fate of typical pharmaceuticals in wastewater treatment plants of Xi'an city in China. *J. Environ. Chem. Eng.* 3, 2203-2211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2015.08.001>

Boix, C., Ibáñez, M., Fabregat-Safont, D., Morales, E., Pastor, L., Sancho, J.V., Sánchez-Ramírez, J.E., Hernández, F., 2016a. Analytical methodologies based on LC-MS/MS for monitoring selected emerging compounds in liquid and solid phases of the sewage sludge. *MethodsX* 3, 333-342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2016.04.010>

Boix, C., Ibáñez, M., Bagnati, R., Zuccato, E., Sancho, J.V., Hernández, F., Castiglioni, S., 2016b. High resolution mass spectrometry to investigate omeprazole and venlafaxine metabolites in wastewater. *J. Hazard. Mater.* 302, 332-340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.059>

Bragança, I., Plácido, A., Paíga, P., Domingues, V.F., Delerue-Matos, C., 2012. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Sci. Total Environ.* 433, 281-289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.035>

Brezina, E., Prasse, C., Meyer, J., Mückter, H., Ternes, T.A., 2017. Investigation and risk evaluation of the occurrence of carbamazepine, oxcarbazepine, their human metabolites and transformation products in the urban water cycle. *Environ. Pollut.* 225, 261-269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.106>

Březinová, T.D., Vyamazal, J., Koželuh, M., Kule, L., 2018. Occurrence and removal of ibuprofen and its metabolites in full-scale constructed wetlands treating municipal wastewater. *Ecol. Eng.* 120, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.020>

Brunner, A., Vughs, D., Siegers, W., Bertelkamp, C., Hofman-Caris, R., Kolkman, A., ter Laak, T., 2019. Monitoring transformation product formation in the drinking water treatments rapid sand filtration and ozonation. *Chemosphere* 214, 801-811. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.140>

Buth, J.M., Ross, M.R., McNeill, K., Arnold, W.A., 2011. Removal and formation of chlorinated triclosan derivatives in wastewater treatment plants using chlorine and UV disinfection. *Chemosphere* 84, 1238-1243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.017>

Camel, V., 2001. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*. 126 (7), 1182–1193. <https://doi.org/10.1039/b008243k>

Castell, J.V., 2006. Capítulo 3: El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos.

Chu, S., Tseng, W., Kong, P., Huang, C., Chen, J., Chen, P., 2015. Up and down shaker-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of fungicides in wine. *Food Chem*. 185, 377–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.015>.

Cui, J., Fu, L., Tang, B., Bin, L., Li, P., Huang, S., Fu, F., 2020. Occurrence, ecotoxicological risks of sulfonamides and their acetylated metabolites in the typical wastewater treatment plants and receiving rivers at the Pearl River Delta. *Sci. Total Environ*. 709, 136192. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136192>

Decision 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495. *Off J Eur Union* L141/9.

Decision 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. *Off J Eur Union* L331/1.

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off J Eur Union* L327/1.

Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Off J Eur Union* L348/84.

Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council, of 12 August 2013, amending Directive 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Off J Eur Union L226/1.

Decision 2015/495/EU of the European Parliament and of the Council, of 20 March 2015, watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC. Off J Eur Union L78/40.

Dorival-García, N., Labajo-Recio, C., Zafra-Gómez, A., Juárez-Jiménez, B., Vílchez, J.L., 2015. Improved sample treatment for the determination of 17 strong sorbed quinolone antibiotics from compost by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 138, 247-257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.011>

Egea-Corbacho, Á., 2018. Eliminación de contaminantes emergentes en agua residual para su posterior reutilización. Tesis doctoral. Cádiz (España).

Ekpeghere, K.I., Sim, W., Lee, H., Oh, J., 2018. Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 640-641, 1015-1023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.218>

Escobar-Wilches, D.C., Ventura-Bahena, A., López-González, M.L., Torres-Sánchez, L., Figueroa, M., Sierra-Santoyo, A., 2020. Analysis of testosterone-hydroxylated metabolites in human urine by ultra high performance liquid chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* 597, 113670. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113670>

Evans, S.E., Davies, P., Lubben, A., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. Determination of chiral pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and sludge using microwave assisted extraction, solid-phase extraction and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 882, 112-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.039>

Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A., 2015. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Sci. Total Environ.* 505, 905-926. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.021>

Férez, J., 2014. Nuevos métodos de pretratamiento de muestra para el análisis de alimentos mediante cromatografía líquida. Tesis doctoral. Murcia (España).

Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodríguez-Roda, I., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 438, 404-413. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.073>

García-Galán, M., Petrovic, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2016. Multiresidue trace analysis of pharmaceuticals, their human metabolites and transformation products by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 158, 330-341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.061>

García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, S., Barceló, D., 2013. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–electrospray–quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1275, 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.004>

González-Mariño, I., Castro, V., Montes, R., Rodil, R., Lores, A., Cela, R., Quintana, J.B., 2018. Multi-residue determination of psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs and related metabolites in wastewater by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1569, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.045>

González-Mariño, I., Quintana, J.B., Rodríguez, I., Cela, C., 2011. Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Water Res.* 45, 6770-6780. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.027>

Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1292, 173-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>

He, K., Yonetani, T., Asada, Y., 2019. Simultaneous determination of carbamazepine-N-glucuronide and carbamazepine phase I metabolites in the wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchem. J.* 145, 1191-1198. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.12.014>

Hijosa-Valsero, M., Reyes-Contreras, C., Domínguez, C., Bécares, E., Bayona, J.M., 2016. Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in constructed wetland compartments: Influent, effluent, pore water, substrate and plant roots. *Chemosphere* 145, 508-517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.090>

Hofstetter, R., Fassauer, G.M., Link, A., 2018. Supercritical fluid extraction (SFE) of ketamine metabolites from dried urine and on-line quantification by supercritical fluid chromatography and single mass detection (on-line SFE-SFC-MS). *J. Chromatogr. B* 1076, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.024>

Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Martín-Alonso, J., Ventura, F., 2008. Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. *Sci. Total Environ.* 397 (1-3), 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.057>

Iancu, V., Radu, G.L., Scutarlu, R., 2019. A new analytical method for the determination of beta-blockers and one metabolite in the influent and effluent of three urban wastewater treatment plants. *Anal. Methods* 36, 1-26. <https://doi.org/10.1039/C9AY01597C>

Ilyas, H., van Hullebusch, E.D., 2020. Performance comparison of different types of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and their transformation products: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 14342-14364. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08165-w>

Jaén-Gil, A., Castellet-Rovira, F., Llorca, M., Villagrasa, M., Sarrá, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2019. Fungal treatment of metoprolol and its recalcitrant metabolite metoprolol acid in hospital wastewater: Biotransformation, sorption and ecotoxicological impact. *Water. Res.* 152, 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.054>

Jiang, W., Xia, T., Yun, Y., Li, M., Zhang, F., Gao, S., Chen, W., 2019. UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of carbamazepine and its seven major metabolites

in serum of epileptic patients. *J. Chromatogr. B* 1108, 17-24.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.016>

Karthikraj, R., Vasu, A.K., Balakrishna, K., Sinha, R.K., Kannan, K., 2017. Occurrence and fate of parabens and their metabolites in five sewage treatment plants in India. *Sci. Total Environ.* 593–594, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.173>.

Kodešová, R., Klement, A., Golovko, O., Fér, M., Kočárek, M., Nikodem, A., Grabic, R., 2019. Soil influences on uptake and transfer of pharmaceuticals from sewage sludge amended soils to spinach. *J. Environ. Manage.* 250, 109407.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109407>

Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2014. Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 466-467, 421-438.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.044>

Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2015. Comprehensive study of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea in Greek wastewaters. *Water Res.* 70, 436-448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.010>

Kosma, C.I., Nannou, C.I., Boti, V.I., Albanis, T.A., 2019. Psychiatric and selected metabolites in hospital and urban wastewaters: Occurrence, removal, mass loading, seasonal influence and risk assessment. *Sci. Total Environ.* 659, 1473-1483.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.421>

Larsson, E., Al-Hamimi, S., Jönsson, J.A., 2014. Behaviour of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and eight of their metabolites during wastewater treatment studied by hollow fibre liquid phase microextraction and liquid chromatography mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 485-486, 300-308.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.055>

Le-Minh, N., Stuetz, R.M., Khan, S.J., 2012. Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta* 89, 407-416.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.053>

Li, J., Qi, H., Wang, Y., Su, Q., Wu, S., Wu, L., 2016. Hollow fiber–stir bar sorptive extraction and microwave assisted derivatization of amino acids in biological matrices. *J. Chromatogr. A.* 1474, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.079>

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473-474, 619-641. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

Marta-Sánchez, A.V., Caldas, S.S., Schneider, A., Cardoso, S.M.V., Primel, E.G., 2018. Trace analysis of parabens preservatives in drinking water treatment sludge, treated, and mineral water samples. *Env. Sci. Pollut. R.* 25, 14460-14470. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1583-4>

Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *J. Hazard. Mater.* 239-240, 40-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.068>

Martins, A.F., dos Santos, J.B., Todeschini, B.H., Saldanha, L.F., da Silva, D.S., Reichert, J.F., Souza, D.M., 2017. Occurrence of cocaine and metabolites in hospital effluent - A risk evaluation and development of a HPLC method using DLLME. *Chemosphere* 170, 176-182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.019>

Michael, I., Vasquez, M., Hapeshi, E., Haddad, T., Baginzka, E., Kümmerer, K., Fatta-Kassinos, D., 2014. Chapter 14: Metabolites and Transformation Products of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment as Contaminants of Emerging Concern. <https://doi.org/10.1002/9781118339558.ch14>

Milutinovic, M., Radovanovic, N., Corovi, M., Siler-Marinkovi, S., Rajilic-Stojanovi, M., Dimitrijevic-Brankovi, S., 2015. Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust. *Ind. Crop. Prod.* 77, 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.007>

Mogolodi, D.K., Nomngongo, P.N., 2016. Current simple preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *Trends Anal. Chem.* 82, 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.023>

Molina, A., 2014. Desarrollo de metodologías analíticas mediante cromatografía /espectrometría de masas para el control de contaminantes orgánicos prioritarios y emergentes en aguas residuales y superficiales. Tesis Doctoral. Jaén (España).

Molins, D., 2017. Productos de cuidado personal en el medio ambiente: presencia, destino y efectos. Tesis Doctoral. Barcelona (España).

Morales-Toledo, A., Alfonso-Olivares, C., Montesdeoca-Esponda, S., Guedes-Alonso, R., Soza-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2016. Optimization and Development of SPE and MAE Combined with UHPLCFD for the Determination of Acetylsalicylic Acid, Naproxen, Ibuprofen and Gemfibrozil in Sewage and Sludge Samples. *Curr. Anal. Chem.* 12, 545-552. <https://doi.org/10.2174/1573411012666160113235153>

Negreira, N., López de Alda, M., Barceló, D., 2013. On-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of 17 cytostatics and metabolites in waste, surface and ground water samples. *J. Chromatogr. A* 1280, 64-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.031>

Negreira, N., López de Alda, M., Barceló, D., 2014. Cytostatic drugs and metabolites in municipal and hospital wastewaters in Spain: Filtration, occurrence, and environmental risk. *Sci. Total Environ.* 497-498, 68-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.101>

Peña-Álvarez, Á., Castillo-Alanís, A., 2015. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 18 (1), 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.003>

Pereira, C.D.S., Maranhão, L.A., Cortez, F.S., Pusceddu, F.H., Santos, A.R., Ribeiro, D.A., Cesar, A., Guimaraes, L.L., 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Sci. Total Environ.* 548-549, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.051>

Pérez, S., Barceló, D., 2008. First Evidence for Occurrence of Hydroxylated Human Metabolites of Diclofenac and Aceclofenac in Wastewater Using QqLIT-MS and QqTOF-MS. *Anal. Chem.* 80 (21), 8135-8145. <https://doi.org/10.1021/ac801167w>

Pérez-Lemus, N., López-Serna, R., Pérez-Elvira, S.I., Barrado, E., 2019. Analytical methodologies for the determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage sludge: A critical review. *Anal. Chim. Acta* 1083, 19-40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.044>

Pintado-Herrera, M.G., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A., 2014. Atmospheric pressure gas chromatography–time-of-flight-mass spectrometry (APGC–ToF-MS) for the determination of regulated and emerging contaminants in aqueous samples after stir bar sorptive extraction (SBSE). *Anal. Chim. Acta* 851, 1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.030>

Racamonde, I., 2015. Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de fármacos y sustancias de abuso en muestras acuosas. Tesis Doctoral. Santiago de Compostela (España).

Ramos, S., Homem, V., Santos, L., 2019. Development and optimization of a QuEChERS-GC–MS/MS methodology to analyse ultraviolet-filters and synthetic musks in sewage sludge. *Sci. Total Environ.* 651, 2606-2614. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.143>

Rauseo, J., Barra Caracciolo, A., Ademollo, N., Cardoni, M., Di Lenola, L., Gaze, W., Stanton, I., Grenni, P., Pescatore, T., Spataro, F., Patrolecco, L., 2019. Dissipation of the antibiotic sulfamethoxazole in a soil amended with anaerobically digested cattle manure. *J. Hazard. Mater.* 378, 120769. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120769>

Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S., 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A.* 1116, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>

Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in

urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* 44, 578-588. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.004>

Rossini, D., Ciofi, L., Ancilotti, C., Checchini, L., Bruzzoniti, M.C., Rivoira, L., Fibbi, D., Orlandini, S., Del Bubba, M., 2016. Innovative combination of QuEChERS extraction with on-line solid-phase extract purification and pre-concentration, followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in sewage sludge. *Anal. Chim. Acta* 935, 269-281. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.023>

Rubirola, A., Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Casas, N., Rodríguez-Roda, I., Barceló, D., Buttiglieri, G., 2014. Characterization of metoprolol biodegradation and its transformation products generated in activated sludge batch experiments and in full scale WWTPs. *Water Res.* 63, 21-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.031>

Sánchez-Prado, L., García-Jares, C., Dagnac, T., Llompart, M., 2015. Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination. *Trends Anal. Chem.* 71, 119-143. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.014>

Scheurer, M., Michel, A., Brauch, H., Ruck, W., Sacher, F., 2012. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanilurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Res.* 46, 4790-4802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.019>

Schlüsener, M.P., Hardenbicker, P., Nilson, E., Schulz, M., Viergutz, C., Ternes, T.A., 2015. Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change. *Environ. Pollut.* 196, 247-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.019>

Senta, I., Gracia-Lor, E., Borsotti, A., Zucatto, E., Castiglioni, S., 2015. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water Res.* 74, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.002>

Senta, I., Krizman-Matasic, I., Terzic, S., Ahel, M., 2017. Comprehensive determination of macrolide antibiotics, their synthesis intermediates and transformation products in

wastewater effluents and ambient waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1509, 60-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.005>

Song, S., Shao, M., Tang, H., He, Y., Wang, W., Liu, L., Wu, J., 2016. Development, comparison and application of sorbent-assisted accelerated solvent extraction, microwave-assisted extraction and ultrasonic-assisted extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in sediments. *J. Chromatogr. A.* 1475, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.077>

Stamatis, N.K., Konstantinou, I.K., 2013. Occurrence and removal of emerging pharmaceutical, personal care compounds and caffeine tracer in municipal sewage treatment plant in Western Greece. *J. Environ. Sci Heal. B* 48 (9), 800-813. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2013.781359>

Stülten, D., Zühlke, S., Lamshöft, M., Spiteller, M., 2008. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Sci. Total Environ.* 405, 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.036>

Subedi, B., Aguilar, L., Robinson, E., Hageman, K., Björklund, E., Sheesley, R. Usenko, S., 2015. Selective pressurized liquid extraction as a sample-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of emerging concern. *Trends Anal. Chem.* 68, 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.011>

Tang, C., Li, L., Ma, X., Wang, J., Chen, B., Dai, X., Zhang, Y., Chen, X., 2020. Qualitative and quantitative determination of anaprazole and its major metabolites in human plasma. *J. Pharmaceut. Biomed.* 183, 113146. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113146>

Tong, L., Xie, C., Li, M., 2016. Quantitative analysis of antibiotics in aquifer sediments by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1452, 58-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.027>

Trautwein, C., Klümmerer, 2011. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere* 85, 765-773. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.057>

Verlicchi, P., Zambello, E., 2015. Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil – A critical review. *Sci. Total Environ.* 538, 750-767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.108>

Vicente, Y., 2014. Sistemas de microextracción para la determinación de trazas de especies inorgánicas mediante espectrometría de absorción atómica. Tesis doctoral. Murcia (España).

Vom Eyser, C., Schmidt, T.C., Tuerk, J., 2016. Fate and behaviour of diclofenac during hydrothermal carbonization. *Chemosphere* 153, 180-286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.051>

Wang, W., Kannan, K., 2016. Fate of parabens and their metabolites in two wastewater treatment plants in New York State, United States. *Environ. Sci. Technol.* 50 (3), 1174-1181. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05516>

Wells, D., Hess, P., 2000. Chapter 2: Separation, clean-up and recoveries of persistent trace organic contaminants from soils, sediment and biological matrices. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. 21, 73-113. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(00\)80008-6](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(00)80008-6)

Yan, J., Zhang, X., Lin, W., Yang, C., Ren, Y., 2019. Adsorption behavior of diclofenac-containing wastewater on three kinds of sewage sludge. *Water Sci. Technol.* 80 (4), 717-726. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.315>

Yuan, S., Liu, Z., Yin, H., Dang, Z., Wu, P., Zhu, N., Lin, Z., 2019. Trace determination of sulfonamide antibiotics and their acetylated metabolites via SPE-LC-MS/MS in wastewater and insights from their occurrence in a municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 653, 815-821. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.417>

Zhang, Y., Duan, L., Wang, B., Liu, C.S., Jia, Y., Zhai, N., Blaney, L., Yu, G., 2020. Efficient multiresidue determination method for 168 pharmaceuticals and metabolites: Optimization and application to raw wastewater, wastewater effluent, and surface water in Beijing, China. *Environ. Pollut.* 261, 114113. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114113>

Zhou, W., Wu, H., Wang, Q., Zhou, X., Zhang, Y., Wu, W., Wang, Y., Ren, Z., Li, H., Ling, Y., Zhang, F., Li, P., 2020. Simultaneous determination of formononetin, biochanin A and their active metabolites in human breast milk, saliva and urine using salting-out assisted liquid-liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrum. *J. Chromatogr. B* 1145, 122108. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122108>

Zoluaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Prieto, A., 2012. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Anal. Chim. Acta* 736 (1), 7-29. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.016>



CAPÍTULO 2

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO



1. OBJETIVOS

De acuerdo con los antecedentes anteriormente descritos, el objetivo global de la presente Tesis Doctoral ha sido:

- El desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de un grupo representativo de contaminantes emergentes y sus metabolitos y la aplicación de esos métodos en diferentes casos de interés medioambiental.

El objetivo principal se ha alcanzado por integración de los siguientes objetivos parciales:

- La propuesta de una metodología analítica fiable y accesible para la determinación rutinaria de contaminantes emergentes en aguas superficiales como respuesta a la reciente propuesta de cambios legislativos.
- La optimización y validación de nuevos métodos analíticos para un grupo seleccionado de metabolitos de contaminantes emergentes en sus principales fuentes: aguas residuales y lodos de depuradora.
- El análisis comparativo entre diferentes técnicas de extracción para la determinación de los compuestos seleccionados en una de las matrices medioambientales más complejas: el lodo de depuradora.
- El desarrollo de una metodología analítica que permita la monitorización de un grupo recurrente de metabolitos y sus productos de partida en muestras de biota.
- El análisis de la evolución de las concentraciones de contaminantes emergentes y sus productos de metabolización a lo largo de la línea de tratamiento del lodo de depuradora mediante tecnologías convencionales.
- La comparación de la adsorción individual y conjunta de un contaminante emergente seleccionado junto a sus metabolitos en suelos, con objeto de establecer la competencia intermolecular que se produce en condiciones medioambientales reales.
- La evaluación de la degradación aerobia de los compuestos seleccionados en suelos típicos de la región mediterránea bajo condiciones climáticas propias de la zona.
- La evaluación de arcillas modificadas como adsorbentes de este tipo de contaminantes y su uso como potencial tecnología de descontaminación.

2. PLAN DE TRABAJO

Para la consecución de los objetivos pretendidos se resumen, a continuación, los principales ítems del plan de trabajo que se establecieron y llevaron a cabo a través de actividades encadenadas en el tiempo.

2.1. Revisión y actualización bibliográfica

Se recopiló información acerca de la presencia de principios activos farmacéuticos, productos de cuidado personal y metabolitos derivados del consumo de estos en aguas residuales de influentes y efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), lodos de depuradora y suelos agrícolas, poniendo especial atención tanto a las metodologías empleadas para la determinación de estos compuestos como a sus concentraciones, distribución y tecnologías de tratamiento. La búsqueda se llevó a cabo, principalmente, a través de revistas científicas indexadas en JCR (Journal of Citation Reports) en las áreas de química analítica y ciencias medioambientales y fue una actividad continua a lo largo de todo el desarrollo de la investigación.

2.2. Selección de productos de partida y metabolitos

Se seleccionaron un grupo de principios activos farmacéuticos y productos de cuidado personal, de entre los más estudiados en diferentes compartimentos ambientales sin perder de vista las propuestas legislativas en relación a estos compuestos y que presentaran parámetros de acidez (pK_a) y partición ($\log K_{ow}$) diferenciados, pertenencia a distintos grupos de usos, concentraciones elevadas, toxicidad, persistencia, en vías de legislación en aguas y marcadores antrópicos. Además, se seleccionaron metabolitos procedentes de cada uno de los productos de partida en base a las elevadas concentraciones de excreción y presencia en matrices ambientales.

De esta manera, se seleccionaron a) dos analgésicos y antiinflamatorios (ibuprofeno y diclofenaco) junto a varios de sus metabolitos mayoritarios (1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno, carboxiibuprofeno y 4-hidroxiclofenaco), b) un estimulante (cafeína) y su principal metabolito (paraxantina), c) un antiepiléptico (carbamazepina) y algunos de los metabolitos derivados de su consumo (3-hidroxicarbamazepina, 10-hidroxicarbamazepina y epoxicarbamazepina), d) un antibiótico (sulfametoxazol) y su principal metabolito (N^4 -acetilsulfametoxazol) y e) dos parabenos pertenecientes a la

familia de los productos de cuidado personal (metil parabeno y propil parabeno) junto a metabolitos específicos (metilprotocatecuato) y comunes (ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido 4-hidroxibenzoico).

2.3. Selección del suelo, agua residual y lodos de depuradora

Se seleccionaron tres suelos típicos de la región del Mediterráneo con un contenido medio-bajo en materia orgánica y caracterizados según su textura, composición (materia orgánica, carbonatos, óxidos de hierro y aluminio...), pH, capacidad de intercambio catiónico, mineralogía, superficie específica y porosidad.

Las aguas residuales seleccionadas fueron típicamente urbanas, procedentes de la ciudad de Sevilla, mientras que los lodos de depuradora procedían de once EDARs repartidas por toda la región de Andalucía y que incluían lodos primarios, lodos secundarios, lodos mixtos, lodos digeridos anaeróbicamente, lodos digeridos aeróbicamente, lodos deshidratados, lodos procedentes de lagunas y lodos compostados.

2.4. Propuestas metodológicas

Se propusieron varias metodologías analíticas que permitieran el análisis y la determinación simultánea de los compuestos seleccionados manteniendo unas propiedades analíticas principales óptimas, en términos de exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación, junto a unas adecuadas propiedades analíticas complementarias, en términos de tiempo de análisis, costes y empleo de los principios del concepto de química verde.

Bajo estas premisas, se optimizaron y validaron una metodología analítica para la monitorización de los contaminantes emergentes dictados por la Unión Europea en su Directiva 2015/495/UE, una metodología analítica para la determinación de los compuestos mencionados anteriormente en aguas residuales y potables que pudiera ser implantada en cualquier laboratorio de análisis de manera rutinaria, tres metodologías analíticas con ventajas diferenciadas entre cada una de ellas para la determinación y monitorización de los compuestos a estudiar en lodos de depuradora y suelos agrícolas y, por último, una metodología analítica que permitiera la monitorización de ibuprofeno y sus respectivos metabolitos en muestras de biota.

2.5. Análisis de distribución en lodos de depuradora

A través de las concentraciones medidas en lodos de depuradora procedentes de distintas etapas del proceso de depuración, con diferentes tecnologías y de diferentes zonas geográficas de Andalucía se llevó a cabo una evaluación de la distribución de los compuestos seleccionados poniendo especial énfasis en las ratios de concentración entre los productos de partida y sus metabolitos a lo largo de las distintas líneas de tratamiento.

2.6. Ensayos de adsorción

Se realizaron ensayos con disoluciones acuosas a concentraciones conocidas de un grupo determinado de contaminantes, concretamente de carbamazepina y sus tres metabolitos seleccionados con el fin de modelizar el comportamiento de estos a través de sus isotermas de adsorción. Estos ensayos se llevaron a cabo haciendo uso de disoluciones individuales de cada uno de los cuatro compuestos así como de disoluciones conjuntas de todos ellos para evaluar la potencial competencia intermolecular que puede causar la coexistencia de un determinado producto de partida junto a sus metabolitos cuando son introducidos en el medio ambiente de manera simultánea.

2.7. Ensayos de degradación y biodisponibilidad

Sobre los tres suelos seleccionados, dopados a una concentración predeterminada de productos de partida y metabolitos en función de las concentraciones reales en el medio ambiente, se llevaron a cabo ensayos de degradación aerobia durante 120 días a través del seguimiento de las concentraciones de estos bajo condiciones climáticas representativas de la región del Mediterráneo (temperatura, humedad, radiación). Durante este período se estudió tanto el contaminante unido al suelo como su fracción biodisponible.

2.8. Evaluación de materiales adsorbentes

Se evaluó la aplicación de montmorillonita modificada como material adsorbente para la eliminación, en muestras acuosas, de uno de los grupos de compuestos con mayor presencia en el medio ambiente como es el ibuprofeno y sus metabolitos mayoritarios. Estos ensayos abordaron tanto la adsorción de los compuestos sobre el material arcilloso en función de diversos parámetros (pH, concentración, tiempo y temperatura) como la

descripción del comportamiento de estos a través de sus isothermas de adsorción individuales y conjuntas.

2.9. Interpretación de resultados

La interpretación y discusión de resultados fue una tarea continua a lo largo de la investigación, fundamentalmente a la conclusión de cada una de las actividades realizadas, pudiéndose resumir brevemente en los siguientes epígrafes:

- Evaluación de las metodologías analíticas propuestas para matrices ambientales líquidas y sólidas.
- Aplicación de las diferentes metodologías desarrolladas para casos de interés medioambiental: distribución en lodos de depuradora, adsorción y degradación en suelos agrícolas y descontaminación de muestras acuosas.



CAPÍTULO 3

PROPUESTAS DE METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE
CONTAMINANTES EMERGENTES Y
METABOLITOS EN MUESTRAS
AMBIENTALES



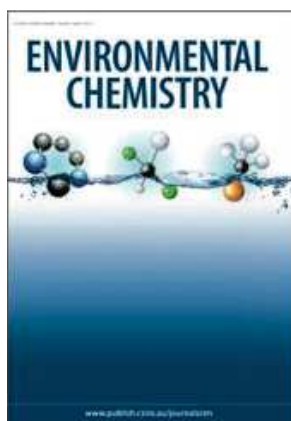
ARTÍCULO N° 1

Título: Development of an analytical method for the simultaneous determination of the 17 EU Watch List compounds in surface waters: A Spanish case study

Autores: José Luis Malvar¹, Concepción Abril¹, Julia Martín¹, Juan Luis Santos¹, Irene Aparicio¹, Carmelo Escot², Ana Basanta², Esteban Alonso¹

Afiliación: ¹Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, C/ Virgen de África, 7, E-41011, Seville, Spain. ²Empresa de Abastecimiento y Saneamiento de Aguas de Sevilla (EMASESA), E-41011, Seville, Spain

Revista: Environmental Chemistry



Editor: J. Lead

Editorial: CSIRO Publishing

Año de publicación: 2018

ISSN: 1448-2517 (Impreso)
1449-8979 (Online)

Categoría: Chemistry, Analytical

Posición de la revista en la categoría: 42/84

Factor de impacto (2018): 2.193

Factor de impacto (5 años): 3.199

Cuartil: Q2

Resumen Artículo 1

En este primer artículo se propuso un nuevo método analítico, como respuesta a una legislación que cambia con rapidez en lo relativo al control y la vigilancia de compuestos orgánicos persistentes en aguas de acuerdo con los resultados científicos recientes en el ámbito de los denominados contaminantes emergentes. Aunque no existe una legislación vigente en cuanto al control de la producción de los contaminantes emergentes o a la reducción de sus emisiones, en el año 2015 se aprobó en el Parlamento Europeo la Decisión de Ejecución 2015/495 donde aparece una primera “Lista de Vigilancia” que incluye 17 contaminantes emergentes (compuestos activos farmacéuticos, insecticidas, herbicidas, hormonas, aditivos alimentarios y filtros ultravioleta) cuyas concentraciones deben ser controladas y monitorizadas.

A lo largo del artículo se pone de manifiesto la ausencia de métodos analíticos de referencia que permitan la monitorización simultánea de todos los nuevos compuestos propuestos y, en consecuencia, se plantea como objetivo el desarrollo de un método rutinario y accesible a cualquier laboratorio de análisis. El artículo describe la optimización y validación de un método de extracción en fase sólida para la determinación simultánea de los compuestos incluidos en la “Lista de Vigilancia” en aguas superficiales mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Desde el punto de vista cromatográfico, se probaron diferentes fases móviles tanto acuosas como orgánicas, observándose el mejor comportamiento con el uso de acetato amónico 10 mM y metanol. La optimización tanto de la separación como de los parámetros propios de la espectrometría de masas permitieron llevar a cabo la determinación mediante una única inyección y en un tiempo de análisis de 20 minutos, tal y como se puede observar en los cromatogramas recogidos en el trabajo.

En relación a la extracción en fase sólida, se optimizaron secuencialmente la elección del disolvente de elución a emplear, en primer lugar, y el pH de la muestra, en segundo lugar. Si bien se observó que el pH no afectaba significativamente a la extracción y, por tanto, esta podía llevarse a cabo a pH neutro, las diferentes propiedades físico-químicas de los compuestos a determinar evidenciaron la necesidad de la utilización de un disolvente de

compromiso de elución polar, como es la acetona, seguido de un disolvente apolar, como es el hexano, para lograr la óptima extracción de todos los compuestos.

Tras la optimización, se validó el método en términos de efecto matriz, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud. Los parámetros obtenidos en la mayoría de los casos se pueden considerar aceptables, con una exactitud entre el 69 y el 120% y una precisión inferior al 20% en todos los casos. Los límites de detección estuvieron comprendidos en un rango entre 0.08 y 13 ng L⁻¹. Contrastan los límites obtenidos para las hormonas, los cuales se situaban por encima de los valores mínimos exigidos por la Unión Europea requiriendo estos compuestos, probablemente, de métodos específicos de alta sensibilidad como la mayoría de autores citados apuntan.

El método se aplicó a muestras puntuales de aguas superficiales de diferentes localizaciones de la región de Andalucía detectándose 14 de los 17 compuestos analizados en dichas muestras, siendo los principios activos farmacéuticos los contaminantes que mostraron una mayor frecuencia de detección, especialmente en el caso del diclofenaco, para el que se llegaron a cuantificar unas concentraciones máximas de 1158 ng L⁻¹.

Development of an analytical method for the simultaneous determination of the 17 EU Watch List compounds in surface waters: a Spanish case study

José Luis Malvar,^A Concepción Abril,^A Julia Martín,^A Juan Luis Santos,^{A,C} Irene Aparicio,^A Carmelo Escot,^B Ana Basanta^B and Esteban Alonso^A

^ADepartment of Analytical Chemistry, Escuela Politécnica Superior, University of Seville, C/ Virgen de África 7, E-41011 Seville, Spain.

^BEmpresa de Abastecimiento y Saneamiento de Aguas de Sevilla (EMASESA), E-41011 Seville, Spain.

^CCorresponding author. Email: jlsantos@us.es

Environmental context. In 2015, the European Union issued a Watch List of organic pollutants resulting from anthropogenic activities. A major obstacle to controlling these pollutants in the environment is the difficulty of their simultaneous measurement at low concentrations. We developed an analytical method for the simultaneous determination in surface water of the 17 pollutants included in the EU Watch List.

Abstract. A multi-class method was developed for the simultaneous determination of the 17 organic pollutants included in the EU Decision 2015/495 regarding surface waters. The target analytes were three estrogens, four pharmaceuticals, a food additive, a solar filter and eight pesticides. The target compounds were extracted through solid-phase extraction with Oasis HLB cartridges. Determination was carried out by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). All compounds were satisfactorily determined in one single injection, with a chromatographic run time of only 20 min. The limit of detection (LOD) of the proposed method was in the range of 0.08–13 ng L⁻¹. For most of the target compounds, except for 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol and estrone, the LOD values were equal or below those required by the EU Decision 2015/495. Accuracy was in the range of 69–120 %, whereas inter-day variability was below 20 % in all cases. The validated method was applied to assess the presence of these compounds in Mediterranean surface waters. Samples were collected from 18 sampling sites located in the south of Spain. Up to 14 compounds were detected, among them, the pharmaceutical compounds were the pollutants most frequently detected at concentration levels up to 1158 ng L⁻¹ (diclofenac).

Additional keywords: EU Decision 2015/495, LC-MS/MS, solid-phase extraction.

Received 23 February 2018, accepted 7 October 2018, published online 26 October 2018

Introduction

In recent years, the declining quality of water resources, which has arisen from the discharge of organic pollutants from anthropogenic activities, has been one of the major concerns of environmental policy. This concern has led the main international organisations involved in human health and the environment (World Health Organization, United States Environmental Protection Agency and the European Commission) to pay special attention to the pollution of natural waters caused by organic contaminants and, in some cases, to propose legislative regulations. In Europe, the Directive 2013/39/EC (EC 2013) regulates the concentrations of these pollutants in surface waters. This directive establishes the environmental quality standards (EQS) (environmental concentration limit values) for 45 compounds considered as priority pollutants (for example, chlorinated solvents, disinfection products, pesticides and their degradation products, perfluorinated compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons and brominated flame-retardants). However, the continuous discharge of hundreds of new

contaminants of emerging concern to the aquatic environment has led the European Union to publish a ‘Watch List’ of substances to be monitored, as part of the European water policy (EC 2015). This first Watch List includes pharmaceutically active compounds (diclofenac, azithromycin, clarithromycin and erythromycin), insecticides (acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, methiocarb, thiacloprid and thiamethoxam), herbicides (trallate and oxadiazon), hormones (17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol and estrone), a food additive (butylate hydroxytoluene (BHT)) and a UV filter (2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate).

Recent studies have reported the presence of these compounds in wastewater (Zorita et al. 2009; Rodil et al. 2010; Paiga et al. 2016; Sadaria et al. 2016; Aparicio et al. 2018), and even in surface water (Benotti et al. 2009; Camacho-Muñoz et al. 2010; Morrissey et al. 2015; Paiga et al. 2016) and groundwater (Fries and Püttmann 2004), at concentrations ranging from ng to μ g per litre. For example, concentrations up to 0.069, 4.90, 0.62, 1.04, 2.25 and 225 μ g L⁻¹ of hormones (Luo et al. 2014), diclofenac

(Lonappan et al. 2016), BHT (Benotti et al. 2009), 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (Amine et al. 2012), macrolides (Hoa et al. 2011) and insecticides (Anderson et al. 2013) respectively have been reported in surface water samples. A recent review (Sousa et al. 2018) indicated that pharmaceuticals are the most studied compounds amongst those included in the EU Watch List (42.9%). Among them, diclofenac is one of the most studied compounds. It is often included in monitoring campaigns together with other pharmaceuticals and/or hormones, such as estrogens and macrolide antibiotics. Regarding pesticides, imidacloprid is the most frequently studied among those included in the Watch List. It has been found at concentrations up to 656 ng L⁻¹ in Europe (Herrero-Hernández et al. 2017) and up to 4560 ng L⁻¹ in Australia (Sánchez-Bayo and Hyne 2014). However, no information has been reported about the concentration levels of BHT and triallate in surface water and ground water (Sousa et al. 2018) nor about the simultaneous determination and distribution of the EU Watch List group of pollutants in surface water.

One of the key points for the control and evaluation of these contaminants in surface waters is the development of analytical methods for their simultaneous and accurate determination at low concentrations. Several analytical methods have been published in the scientific literature regarding this topic, some of them based on solid-phase extraction (SPE) (Dujaković et al. 2010; Robles-Molina et al. 2014; Yao et al. 2015), as it is recommended in the EU Decision 2015/495, and others based on novel extraction techniques (Martín et al. 2015). The analytical determination is commonly carried out by liquid or gas chromatography coupled to mass spectrometry (Dujaković et al. 2010; Robles-Molina et al. 2014; Martín et al. 2015; Yao et al. 2015). However, these analytical methods have been developed for the determination of some of these contaminants but no method has been reported for the simultaneous determination of all 17 compounds included in the EU Watch List.

The aim of this work was to develop an analytical method for the routine determination of the 17 organic pollutants included in the EU Decision 2015/495 Watch List and to assess their presence in surface waters from Andalusia (South of Spain).

Experimental

Chemicals and reagents

HPLC-grade acetone, acetonitrile, hexane, methanol and water were supplied by Romil (Barcelona, Spain). Analytical-grade hydrochloric acid (37%) and formic acid (98%) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Ammonium acetate and ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Analytical standards of diclofenac sodium salt, 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (methoxycinnamate), BHT, clarithromycin, erythromycin and azithromycin were obtained from Sigma-Aldrich. 17 α -Ethinylestradiol, 17 β -estradiol, estrone, imidacloprid, methiocarb, thiacloprid, thiamethoxam, clothianidin, acetamiprid, oxadiazon and triallate were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).

Isotopically labelled compounds were used as internal standards (IS). Bisphenol A-d₁₆ was supplied by Sigma-Aldrich. Phenacetin-ethoxy-1-¹³C was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). Imidazolidin-4,4,5,5-d₄ (imidacloprid-d₄) and erythromycin-(*N,N*-dimethyl-¹³C₂) (erythromycin-¹³C₂) were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH.

Stock solutions of each compound, at a concentration of 1000 mg L⁻¹, were prepared in methanol and stored at -20°C. Standard working solutions of a mixture of the target compounds at 10 mg L⁻¹ were prepared by diluting the stock standard solutions in methanol. An IS working solution, composed of a mixture of isotopically-labelled compounds at 10 mg L⁻¹, was prepared by diluting the stock standard solutions in methanol. The IS working solution was stored at 4°C. These solutions were used to prepare matrix-matched calibration standards and spiked samples. All solutions were stored in dark glass bottles to prevent photodegradation.

Three-millilitre SPE cartridges packed with 60 mg of Oasis HLB were purchased from Waters (Milford, MA, USA).

Study area and sampling

Surface water samples were collected from 18 sampling sites located in the province of Seville (South of Spain). Seventeen sampling points were located in streams of the Rivera de Huelva River basin. One sampling point was located in the Guadiamar River basin. The locations of the sampling sites were: S1 (37° 38' 41.777" N, 6° 3' 24.44" W), S2 (37° 38' 21.613" N, 6° 3' 6.177" W), S3 (37° 37' 47.741" N, 6° 3' 8.089" W), S4 (37° 36' 18.122" N, 6° 3' 2.689" W), S5 (37° 35' 21.246" N, 6° 2' 18.754" W), S6 (37° 34' 44.202" N, 6° 3' 26.672" W), S7 (37° 40' 43.738" N, 5° 59' 48.703" W), S8 (37° 40' 14.707" N, 6° 1' 54.393" W), S9 (37° 44' 9.964" N, 6° 14' 57.137" W), S10 (37° 43' 12.979" N, 6° 13' 26.67" W), S11 (37° 41' 27.344" N, 6° 13' 7.579" W), S12 (37° 41' 20.494" N, 6° 11' 16.749" W), S13 (37° 41' 47.404" N, 6° 12' 46.26" W), S14 (37° 40' 51.409" N, 6° 12' 15.667" W), S15 (37° 40' 3.929" N, 6° 12' 29.505" W), S16 (37° 44' 19.507" N, 6° 13' 54.789" W), S17 (37° 42' 57.506" N, 6° 12' 37.652" W) and S18 (37° 9' 54.954" N, 6° 11' 37.881" W).

The study area was mainly affected by agricultural and livestock activities, except for some of the sampling points (S1, S7, S8, S17 and S18) which were affected by discharges from wastewater treatment plants.

During a one-year period (November 2014–October 2015), six samples were collected from each sampling site. Each sample was composed of aliquots collected across the river at each sampling point. Amber glass bottles (2.5 L each), pre-cleaned with acetone and methanol, were used to transport the samples (at 4°C) to the laboratory, where they were stored at -30°C until analysis (within 48 h after sample collection).

Sample treatment

Sample treatment was based on SPE. Oasis HLB SPE cartridges, previously conditioned with successive aliquots of 3 mL of acetone, 3 mL of methanol and 3 mL of water, were used. One thousand millilitres of the surface water samples were filtered through 1.2 μ m glass fibre membrane filters (Whatman, Maidstone, UK), and percolated through the SPE cartridges at a flow rate of ~10 mL min⁻¹ using a vacuum manifold system (Waters) connected to a vacuum pump. The cartridges were rinsed using 3 mL of a methanol : water (5 : 95 v/v) solution. The elution of the study compounds from the cartridge was performed with three successive aliquots of 1 mL of acetone and three successive aliquots of 1 mL of hexane. The combined aliquots were evaporated to dryness using a gentle nitrogen stream. The residue was dissolved in 0.15 mL of a methanol : water (50 : 50, v/v) solution containing the internal standards at 100 μ g L⁻¹, filtered through a 0.22 μ m nylon filter and immediately analysed by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (LC-QqQ-MS/MS).

Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

The chromatographic determination of the compounds was performed on an Agilent 1200 series HPLC system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a vacuum degasser, a binary pump, an autosampler and a thermostatically-controlled column compartment. The separation of the compounds was performed using a HALO C18 (50 × 4.6 mm i.d.; 2.7 μm) analytical column (Teknokroma, Barcelona, Spain) protected by a HALO C18 (5 × 4.6 mm i.d.; 2.7 μm) guard column (Teknokroma). The compounds were separated by gradient elution with methanol (solvent A) and a 10 mM ammonium acetate aqueous solution (solvent B). Gradient conditions were: 0.0–3.0 min isocratic at 30% A; 3.0–5.0 min, 30–50% A; 5.0–12.0 min, isocratic at 50% A; 12.0–15.0 min, 50–95% A; 15.0–20.0 min, isocratic at 95% A and back to 30% A in 2 min, and then kept for 4 min to equilibrate the column. The flow rate was 0.6 mL min⁻¹. The injection volume was 20 μL. The column temperature was maintained at 35 °C. The total run time was 20 min.

MS/MS analyses were carried out using an Agilent 6410 QqQ instrument equipped with an electrospray ionisation source (ESI; Agilent). The ionisation of the analytes was carried out using the following settings: MS capillary voltage 3000 V, drying-gas flow rate 9 L min⁻¹, drying-gas temperature 350 °C and nebulizer pressure 40 psi. Both positive and negative ionisation modes were monitored. The tandem mass spectrometer was operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The quantification was carried out using matrix-matched calibration curves constructed in the concentration range expected for each compound in surface waters. The calibration curves were constructed by linear regression of the peak area ratio of the analyte and its corresponding internal standard against their respective concentrations.

Method validation

The method was validated by the determination of the linearity, selectivity, accuracy and limits of detection and quantification (the lowest concentration of target compound that can be detected and quantified respectively with a confidence level of 99%). Previously, the matrix effect was evaluated by comparing the slopes of the calibration curves prepared in a methanol: water (50:50 v/v) mixture (mobile-phase calibration curves) and in a surface water sample extract (matrix-matched calibration curves). The calibration curves were prepared at eight concentration levels in triplicate and constructed using the ratio between the peak areas of the analyte and IS versus analyte concentration.

The linearity of the calibration curves was tested using the square of the Pearson correlation coefficient (R^2). The specificity of the method was determined by comparing the chromatograms of the blanks with the corresponding spiked aqueous samples. Owing to the absence of certified materials, a study with spiked surface water samples at three concentrations levels (30, 300 and 750 ng L⁻¹ for estrogens and BHT and 1.5, 15 and 37.5 ng L⁻¹ for the rest of the compounds) was performed to evaluate the trueness and reproducibility of the method. The precision of the method, expressed as the relative standard deviation (% RSD), was determined by measuring the spiked samples in triplicate during the same day (repeatability) and during six different days (reproducibility). The trueness was evaluated by comparing the spiked concentrations with the concentrations of the compounds quantified by using the matrix-matched calibration curves. The instrumental detection

limit (IDL) and instrumental quantification limit (IQL) values were estimated as the concentrations corresponding to signal-to-noise ratios of 3 and 10 respectively by measuring sample extracts spiked at low concentration levels. The method detection limit (MDL) and method quantification limit (MQL) were determined by applying the recoveries achieved in solid-phase extraction to the IDL and IQL. Blank samples, for which no target compound was detected, were used to evaluate MDL and MQL.

Quality control

The validity of the analytical results was verified by an internal quality assurance protocol. In each batch of samples, one sample was divided into four subsamples. Three of the subsamples were spiked with the target compounds, and the matrix effect and recoveries were determined and compared with the values obtained during the validation process.

Each batch contained matrix-matched calibration standards, spiked samples, samples, a procedural blank and a quality control standard solution. The procedural blank and the quality control standard solution were measured before and after the matrix-matched calibration standards and after every five samples.

Results and discussion

Method optimisation

Chromatographic determination and sample treatment were optimised. In Fig. 1, the optimisation procedure and optimised variables are shown.

Liquid chromatography–mass spectrometry optimisation

Two analytical columns were tested: HALO C18 (50 × 4.6 mm i.d.; 2.7 μm particle size) (Teknokroma) and Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 × 4.6 mm; 1.8 μm particle size) (Agilent Technologies). Both columns offered similar resolution for all the studied analytes, but the HALO C18 column provided better peak shape and the shortest run time (Fig. 2), and generated pressures 50 bar lower than the Zorbax Eclipse XDB-C18 column. Consequently, the HALO C18 column was selected for further experiments.

The effect of the mobile phase composition on chromatographic separation was also studied to obtain the highest sensitivity and selectivity in a short time. The salt added to the aqueous phase was also studied. Ammonium formate (from 0 to 10 mM), ammonium acetate (from 0 to 10 mM) and mixtures of them with formic acid (from 0% to 0.2%, v/v) were tested. Higher responses and better peak shapes were obtained using an aqueous ammonium acetate solution (10 mM). MeOH and ACN were evaluated as organic mobile phases. MeOH was selected for the sensitivity, peak shapes and separation achieved. A linear gradient, as described in the *Liquid chromatography–tandem mass spectrometry* section of the Experimental, was used for chromatographic elution. The injection volume was studied to enhance the analytical signal and, consequently, the MDL. The injection volume was studied in the range of 2.5–20 μL. The best sensitivity without loss of resolution was obtained with 20 μL; therefore, this was chosen as the injection volume. Finally, the increase of column temperature from 30 to 50 °C did not significantly improve the characteristics of the chromatographic method, thus 35 °C was chosen to avoid the influence of room temperature.

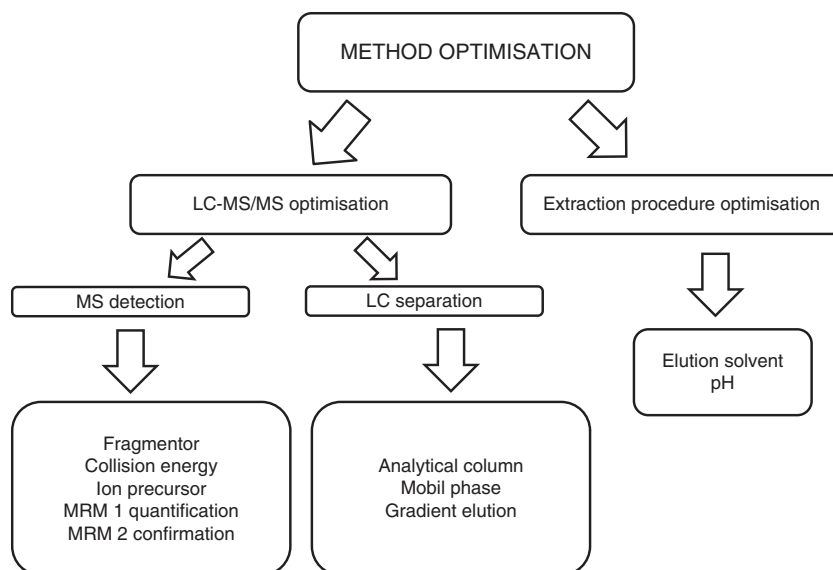


Fig. 1. Scheme of the optimisation procedure and optimised parameters.

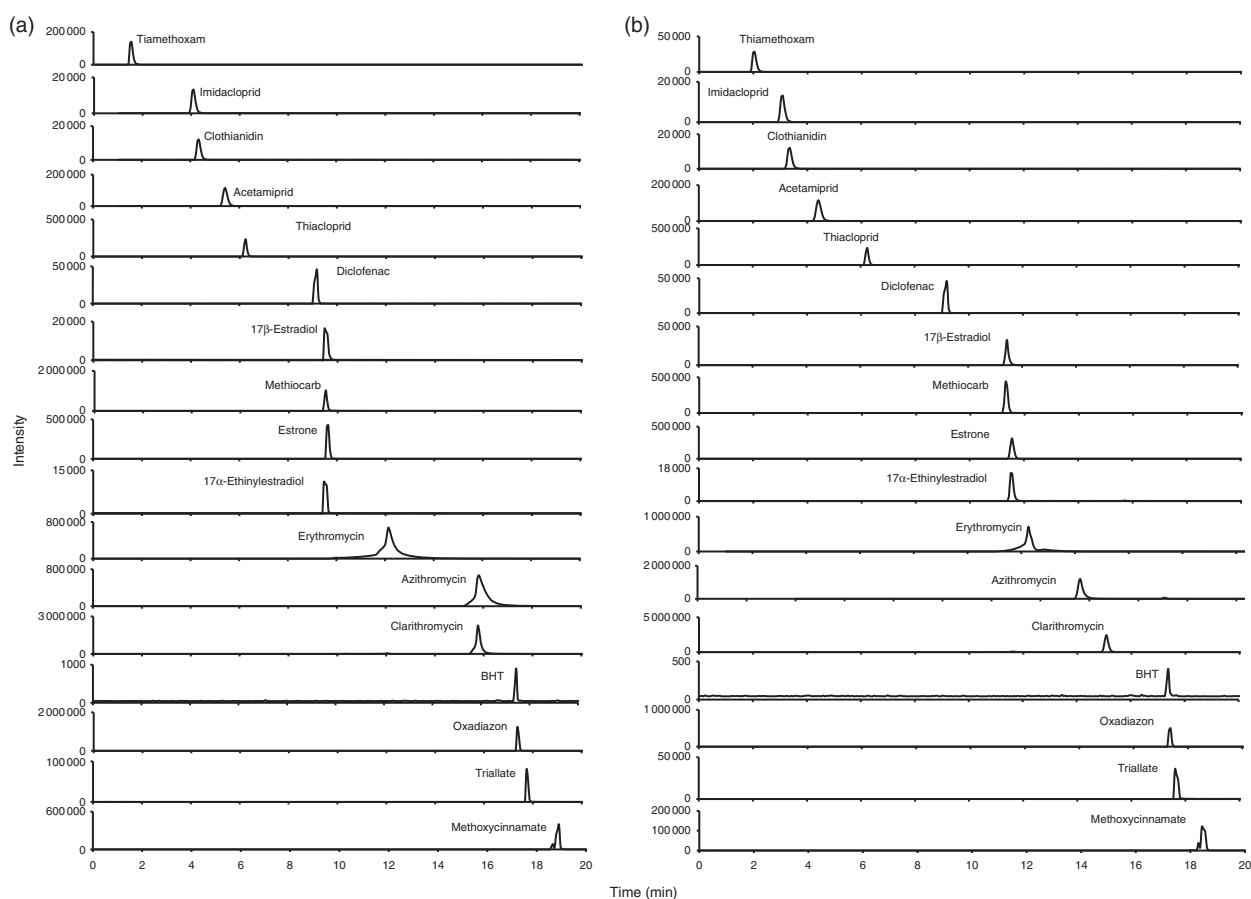


Fig. 2. HPLC-MS/MS chromatograms of a standard mixture (250 ng mL^{-1}) using (a) a HALO C18 column and (b) a Zorbax Eclipse XDB-C18 column.

The MS/MS parameters for the detection of each compound were optimised by the injection of individual standard solutions of each compound (1 mg L^{-1}). For each compound, two transitions were monitored using the multireaction monitoring mode (MRM1 and MRM2): one transition was used for

quantification and another for confirmation. The most abundant transition ion was selected to achieve the maximum sensitivity for quantification. Fragmentor and collision energy were optimised for both MRM1 and MRM2 transitions. The selected parameters are shown in Table 1.

Table 1. Optimised MS/MS parameters for MRM analysis
MRM 1, quantification; MRM 2, confirmation; t_R , retention time

Compound	Internal standard	Ionisation mode	t_R (min)	MRM 1	MRM 2	Ion ratio	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
<i>Estrogens</i>								
17 α -Ethinylestradiol	Bisphenol A-d ₁₆	Negative	11.4	295 > 145	295 > 159	79.6	130	40/33
17 β -Estradiol	Bisphenol A-d ₁₆	Negative	11.2	271 > 145	271 > 183	37.7	150	42/43
Estrone	Bisphenol A-d ₁₆	Negative	11.3	269 > 143	269 > 145	56.0	120	60/38
<i>Pharmaceutically active compounds</i>								
Diclofenac	Phenacetin-ethoxy-1- ¹³ C	Positive	9.26	296 > 215	296 > 250	34.7	84	8/32
Azithromycin	Erythromycin- ¹³ C ₂	Positive	15.3	749 > 591	749 > 116	87.6	204	28/40
Clarithromycin	Erythromycin- ¹³ C ₂	Positive	15.8	748 > 158	748 > 116	45.8	180	40/28
Erythromycin	Erythromycin- ¹³ C ₂	Positive	12.5	734 > 576	734 > 158	77.0	160	16/28
<i>Food additive</i>								
BHT	Phenacetin-ethoxy-1- ¹³ C	Positive	17.4	221 > 149	221 > 65	3.1	160	12/14
<i>Solar filter</i>								
Methoxycinnamate	Phenacetin-ethoxy-1- ¹³ C	Positive	18.4	291 > 179	291 > 161	93.1	60	0/12
<i>Pesticides</i>								
Acetamiprid	Imidacloprid-d ₄	Positive	4.44	223 > 126	223 > 56	50.1	100	16/12
Clothianidin	Imidacloprid-d ₄	Positive	3.35	250 > 169	250 > 132	80.3	60	8/12
Imidacloprid	Imidacloprid-d ₄	Positive	3.14	256 > 209	256 > 175	67.6	80	12/16
Methiocarb	Imidacloprid-d ₄	Positive	11.2	226 > 169	226 > 121	96.8	60	4/12
Oxadiazon	Imidacloprid-d ₄	Positive	17.4	345 > 303	345 > 220	97.2	140	12/20
Thiacloprid	Imidacloprid-d ₄	Positive	6.32	253 > 126	253 > 90	24.5	80	20/40
Thiamethoxam	Imidacloprid-d ₄	Positive	2.07	292 > 211	292 > 181	2.60	60	8/2
Triallate	Imidacloprid-d ₄	Positive	17.6	304 > 143	304 > 86	60.8	80	24/12
<i>Internal standards</i>								
Bisphenol A-d ₁₆	-	Negative	10.6	241 > 142	241 > 22	31.0	113	28
Erythromycin- ¹³ C ₂	-	Positive	12.4	737 > 579	736 > 160	16.4	160	16/28
Imidacloprid-d ₄	-	Positive	3.09	260 > 179	260 > 213	99.2	80	16/20
Phenacetin-ethoxy-1- ¹³ C	-	Positive	6.08	180 > 138	180 > 110	18.8	106	12/126

Optimisation of the extraction procedure

The optimisation of the extraction method was focussed on the variables with the highest impact on SPE, which were the type of SPE elution solvent and sample pH. The optimisation of each variable was carried out using a single factor system as previously described by several authors (Togunde et al. 2012; Neng and Nogueira 2012; Guo et al. 2016). The optimisation of the sample treatment was carried out using aliquots (1000 mL) of distilled water spiked in triplicate with the target compounds at 30 ng L⁻¹. Samples were treated using the sample procedure described above. Three elution solvents (methanol, acetone and hexane) and two sample pH (2 and 7) were tested. Sequential optimisation was applied. First, the type of elution solvent was evaluated and, then, the influence of sample pH was studied. The elution of the target compounds from the SPE cartridge was performed with three aliquots of 1 mL of the tested solvent. Fig. 3 shows the recoveries achieved using the tested solvents and sample pH values. The recoveries achieved using methanol and acetone were statistically similar ($P > 0.05$) whereas the recoveries obtained with hexane were lower than 10 % for most of the studied compounds, except for methoxycinnamate, oxadiazon and triallate, which were better eluted from the cartridge with hexane than with methanol and acetone.

According to these results, the study of the influence of sample pH was carried out using three aliquots of 1 mL of acetone and three 1 mL aliquots of hexane as SPE elution solvents. The extraction recoveries achieved at pH 2 were similar to those obtained from samples at neutral pH. On the basis of these results, acetone, owing to its high volatility, and

hexane and a neutral pH were chosen as SPE elution solvents and sample pH respectively.

Method validation

The matrix effect was evaluated by comparing the solvent calibration (methanol : water (50 : 50, v/v)) curves and the matrix-matched calibration curves. A real surface water sample free of analytes was used for the preparation of matrix-matched calibration standards. A Student's t -test was applied to compare the slopes of the calibration curves. The t calculated was compared with the two-tailed tabulated value (t_{tab}) for the appropriate number of degrees of freedom at P (%) confidence. The typical value is $k = 2$ for 95 % confidence (González and Herrador 2007); thus $t < k$ indicates that the ratio of the slopes is not significantly different from 1, whereas $t > k$ indicates that the ratio of the slopes is significantly different from 1 and, therefore, the matrix-matched calibration curve must be used. Calibration curves were prepared at eight concentration levels. Curves were built by plotting the ratios between the peak areas of analytes and their ISs versus the concentration of the analyte. Similar chromatographic and detection behaviours were the criteria applied to select the proper IS for each target compound. The linearity of the method was tested in the concentration range from MQL to 1500 ng L⁻¹, in the case of estrogens, BHT and methoxycinnamate, and to 100 ng L⁻¹ for the other compounds.

The Student's t -test showed statistical differences between slope values of the solvent calibration curves and matrix-matched calibration curves except for the calibration curves of estrogens and acetamiprid. Therefore, the use of matrix-matched

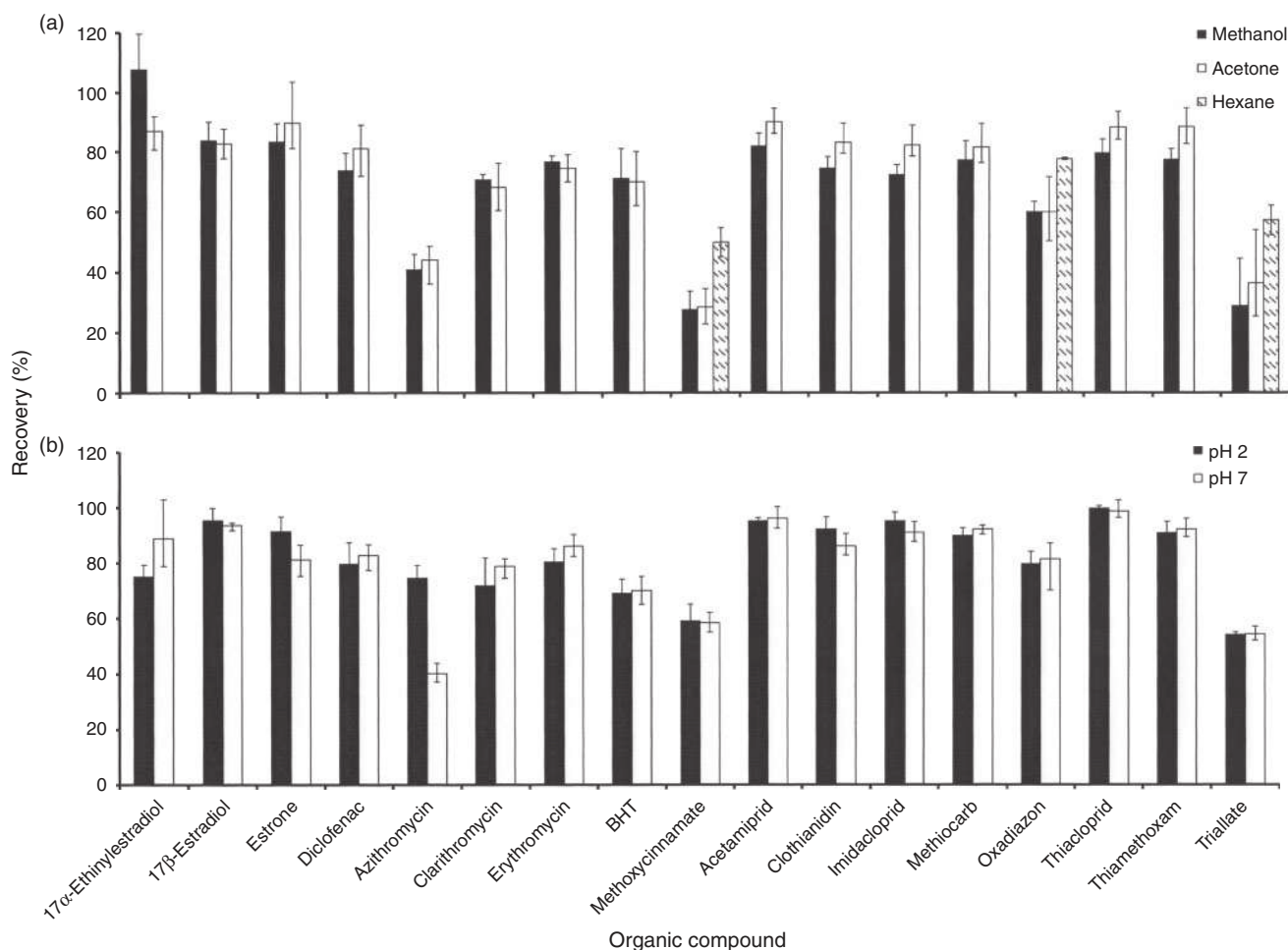


Fig. 3. Optimisation of (a) the SPE elution solvent and (b) sample pH ($n = 3$).

calibration curves was necessary for quantification. Table 2 shows the statistical and analytical parameters obtained for each analysed compound. The determination coefficients were equal or higher than 0.993 for all the compounds (Table 2). The MDLs ranged from 0.08 ng L⁻¹ to 13 ng L⁻¹ (Table 2).

Trueness and precision were evaluated from spiked samples at three concentration levels (30, 300 and 750 ng L⁻¹ for estrogens and BHT, and 1.5, 15 and 37.5 ng L⁻¹ for the rest of the compounds) in triplicate. Trueness was calculated by means of recoveries as the percentage of analyte extracted, quantified using matrix-matched calibration curves, in relation to the spiking level. Recoveries were in the range from 78% (estrone) to 120% (estrone) for estrogens, from 69% (clarithromycin) to 118% (diclofenac) in the case of the pharmaceutically active compounds, from 70% to 113% in the case of BHT, from 94% to 118% for methoxycinnamate and from 73% (acetaminiprid) to 118% (oxadiazon) in the case of the pesticides (Table 3). Precision, expressed as %RSD, was below 20% at the three spike concentration levels.

No interference from endogenous substances was observed at the retention times of the analytes. This fact shows that the selected mass spectrometric conditions assured a high selectivity of the LC-MS/MS method. Fig. 2a shows the MRM chromatograms obtained from a spiked blank sample.

Despite the considerable number of reported methodologies for the determination of these groups of pollutants (Behera et al.

2011; Campos-Mañas et al. 2017; Rubirola et al. 2017; Westlund and Yargeau 2017), the proposed method is the first one to include all 17 organic pollutants in the Watch List of the EU Decision 2015/495. The proposed method is suitable to be used for routine analyses, as it offers some advantages, such as just one sample preparation procedure to extract a wide range of compounds, and their simultaneous chromatographic determination in one chromatographic injection.

In addition, the MDLs obtained in this work were equal or lower than the maximum acceptable method limits of detection established in the EU Watch List, except for estrogens, for which the limits of detection were higher (6.0 ng L⁻¹ for 17 α -ethinylestradiol and 17 β -estradiol and 1.5 ng L⁻¹ for estrone) than those proposed in the current guidelines (0.035 ng L⁻¹ for 17 α -ethinylestradiol and 0.4 ng L⁻¹ for 17 β -estradiol and estrone). The MDLs obtained were similar, or even lower, than those reported in other multiresidue methods involving some of the target compounds in this work (Singer et al. 2010; Anumol and Snyder 2015; Rubirola et al. 2017). Only analytical methods specifically developed for the determination of hormones (Goh et al. 2016; Mnguni et al. 2018) report limits for their detection closer to those proposed in the EU Decision. This fact shows that, to date, the determination of hormones, at the low limits of detection fixed by the EU Decision, requires specific methods for their determination making their simultaneous determination with other target compounds very difficult.

Table 2. Method detection and quantification limits, linear dynamic range and statistical parameters of calibration curves

MP, mobile-phase calibration curve; MM, matrix-matched calibration curve; b , slope; s_b , slope standard deviation; r^2 , determination coefficient; MDL, method detection limit; MQL, method quantification limit; LDR, linear dynamic range

Compound	b_{MP} (L ng ⁻¹)	$S_{b(MP)}$ (L ng ⁻¹)	b_{MM} (L ng ⁻¹)	$S_{b(MM)}$ (L ng ⁻¹)	r^2_{MM}	$t_{student}$	MDL (ng L ⁻¹)	MQL (ng L ⁻¹)	Maximum acceptable method detection limit (ng L ⁻¹) by EU Watch List	LDR (ng L ⁻¹)
<i>Estrogens</i>										
17 α -Ethinylestradiol	4.53E-03	2.39E-04	4.39E-03	2.55E-05	0.998	0.58	5.66	18.9	0.035	18.9–1685
17 β -Estradiol	7.85E-03	2.60E-04	7.75E-03	8.13E-05	0.998	0.38	5.36	17.9	0.4	17.9–1442
Estrone	7.75E-02	2.79E-03	7.73E-02	1.46E-03	0.995	0.05	1.92	3.85	0.4	3.85–1596
<i>Pharmaceutically active compounds</i>										
Diclofenac	1.51E-03	4.30E-05	1.40E-03	1.60E-05	0.998	2.40	0.08	1.49	10	1.49–90
Azithromycin	1.12E-02	3.00E-04	1.25E-02	2.25E-04	0.994	3.27	0.07	0.14	90	0.14–94
Clarithromycin	3.60E-04	1.50E-05	1.31E-03	1.05E-05	0.993	17.06	0.12	0.43	90	0.43–119
Erythromycin	1.48E-02	4.50E-04	5.25E-02	1.05E-03	0.993	19.72	0.08	0.32	90	0.32–103
<i>Food additive</i>										
BHT	2.32E-02	5.70E-04	2.75E-02	1.80E-03	0.995	15.64	18.6	32.7	3160	32.7–1327
<i>Solar filter</i>										
Methoxycinnamate	4.68E-03	2.08E-04	4.10E-03	9.46E-05	0.993	2.85	0.08	1.60	6000	1.60–73
<i>Pesticides</i>										
Acetamiprid	4.60E-03	1.17E-04	4.63E-03	3.36E-05	0.999	0.29	0.11	1.50	9	1.50–80
Clothianidin	1.26E-04	2.68E-06	2.65E-01	4.71E-03	0.997	36.10	0.08	1.49	9	1.49–80
Imidacloprid	4.17E-04	1.18E-05	4.46E-04	4.70E-06	0.998	2.19	1.28	12.8	9	12.8–76
Methiocarb	1.39E-02	4.06E-04	1.97E-02	2.85E-04	0.997	9.10	0.10	0.38	10	0.38–73
Oxadiazon	9.23E-03	1.89E-04	7.85E-03	7.15E-05	0.999	7.90	0.08	0.31	88	0.31–100
Thiacloprid	5.79E-03	1.66E-04	6.20E-03	7.25E-05	0.998	2.15	0.08	0.30	9	0.30–101
Thiamethoxam	8.96E-04	2.17E-05	7.99E-04	7.73E-06	0.998	4.68	0.09	1.81	9	1.81–79
Triallate	1.25E-03	2.17E-05	6.95E-04	4.22E-06	0.999	43.58	0.07	1.33	670	1.33–78

Table 3. Trueness and precision of target compounds in surface waters
RSD, relative standard deviation; Rec., recovery

Compound	Spiked (ng L ⁻¹)	Found (ng L ⁻¹)	RSD (%)	Rec. (%)	Spiked (ng L ⁻¹)	Found (ng L ⁻¹)	RSD (%)	Rec. (%)	Spiked (ng L ⁻¹)	Found (ng L ⁻¹)	RSD (%)	Rec. (%)
<i>Estrogens</i>												
17 α -Ethinylestradiol	30.0	31.7	1.4	106	300	326	7.2	109	750	682	7.2	91
17 β -Estradiol	30.0	33.5	6.3	112	300	341	8.2	114	750	750	8.2	100
Estrone	30.0	23.5	2.9	78	300	361	14.3	120	750	737	14.3	98
<i>Pharmaceutically active compounds</i>												
Diclofenac	1.50	1.51	2.3	101	15.0	14.6	19.5	97	37.5	44.4	10.2	118
Azithromycin	1.50	1.65	13.1	110	15.0	13.8	5.9	92	37.5	42.7	8.3	114
Clarithromycin	1.50	1.03	4.3	69	15.0	11.3	15.6	75	37.5	34.1	7.8	91
Erythromycin	1.50	1.43	8.3	95	15.0	11.4	2.1	76	37.5	33.6	7.8	90
<i>Food additive</i>												
BHT	30.0	21.0	17.0	70	300	300	6.9	100	750	848	13.0	113
<i>Solar Filter</i>												
Methoxycinnamate	1.50	1.41	7.6	94	15.0	17.7	13.9	118	37.5	37.4	10.8	100
<i>Pesticides</i>												
Acetamiprid	1.50	1.09	7.7	73	15.0	14.0	17.1	93	37.5	38.8	3.8	103
Clothianidin	1.50	1.52	5.3	101	15.0	15.4	13.2	103	37.5	39.3	8.8	105
Imidacloprid	1.50	1.76	8.5	117	15.0	17.2	20.0	115	37.5	36.2	11.0	97
Methiocarb	1.50	1.21	5.6	80	15.0	16.4	16.6	109	37.5	36.2	7.4	97
Oxadiazon	1.50	1.47	4.8	98	15.0	17.7	7.7	118	37.5	31.0	3.7	83
Thiacloprid	1.50	1.48	5.6	99	15.0	16.3	13.0	109	37.5	40.3	5.8	107
Thiamethoxam	1.50	1.24	2.4	83	15.0	15.4	12.1	102	37.5	40.1	6.2	107
Triallate	1.50	1.70	7.3	113	15.0	14.1	2.3	94	37.5	41.6	2.8	111

Case study: distribution of pollutants in surface waters in Andalusia region

The method was applied to determine the target compounds in different surface waters from Andalusia (south of Spain). Eighteen different sample sites were selected. Six samples were taken from each sampling site throughout a one-year period. A total of 108 samples were taken. A summary of the data is shown in Table 4.

Up to 14 compounds were detected at least in one of the analysed samples, but the frequency of detection was low for the majority of compounds. Estrogens, pesticides and BHT were the groups less frequently detected (< 5% in most cases), whereas pharmaceuticals were the compounds most frequently detected (> 55%, with the exception of erythromycin), followed by methoxycinnamate (37%). The highest concentrations for most of the target compounds were measured at the beginning of the rainy season (November–December). This fact could be explained by the release of the compounds from sediment during the first rain events.

17 α -Ethinylestradiol, oxadiazon and triallate were not detected in the analysed samples. The highest concentrations corresponded to diclofenac, BHT and methoxycinnamate with maximum concentration levels of 1158, 939, and 528 ng L⁻¹ respectively, which corresponded to the sampling sites affected by wastewater discharges. This fact was particularly noticeable in the case of the pollutants with an eminently urban origin, such as pharmaceutical drugs and food additives.

As an illustrative example, Fig. 4 shows HPLC–MS/MS chromatograms corresponding to a real surface water sample, containing acetamiprid, imidacloprid, methiocarb, methoxycinnamate, thiacloprid, thiamethoxam and oxadiazon. The confirmation of the compound identity is a relevant aspect, especially at low concentration levels. The identification of the target compounds was carried out taking into account their retention

time, MRM1 and MRM2 transitions (the two most abundant MRM transitions) and their ion ratio (MRM1/MRM2) (Grimalt et al. 2006; Gros et al. 2006). The tolerance intervals for the ion ratios should be within the limits of $\pm 30\%$ of the absolute ion abundance ratios according to Blue et al. (2018). MRM1 and MRM2 chromatograms, which corresponded to a standard solution at the lowest calibration level and to a real surface water sample, are shown in Figs. S1 and S2 (Supplementary Material) respectively. Mass spectra of the target compounds are also shown in Figs. S1 and S2.

These results were consistent with the concentrations of the selected pollutants reported in surface waters from other countries (see Table 5). For instance, Ribeiro et al. (2015) quantified the anti-inflammatory diclofenac, the synthetic oestrogen 17 α -ethinylestradiol, and the three macrolide antibiotics (azithromycin, clarithromycin and erythromycin) in effluent wastewater after tertiary treatments in Portugal. Diclofenac, azithromycin and clarithromycin were detected at concentrations between 265 and 999 ng L⁻¹; 17 α -ethinylestradiol was quantified in two samples at concentrations between 584 and 776 ng L⁻¹, and erythromycin was detected at concentrations between 6.6 and 84.7 ng L⁻¹.

Aparicio et al. (2017) reported a method for the determination of 48 target compounds, some of which are included in the Watch List (acetamiprid, thiacloprid, triallate, methiocarb, BHT, clarithromycin, diclofenac, 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol and estrone). The method was applied to tap water and surface water samples. None of the target compounds was detected in tap water whereas diclofenac and thiacloprid were detected in surface water at concentration levels below their MQL values. Tsaboula et al. (2016) detected thiamethoxam, imidacloprid, thiacloprid and oxadiazon in the Pinios River basin (Greece) at concentrations up to 330, 306, 120 and 108 ng L⁻¹ respectively. Sánchez-Bayo and Hyne (2014)

Table 4. Concentrations of estrogens, pharmaceutically active compounds, food additive, solar filter and pesticides (ng L⁻¹) in 18 surface-water sampling sites
MDL, method detection limit; MQL, method quantification limit

Compound	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
17 α -Ethinylestradiol	< MQL	< MQL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
17 β -Estradiol	< MQL	< MQL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
Estrone	< MQL	< MQL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-61.3	< MDL-17.6	< MDL
Diclofenac	1.55–31.5	< MQL-7.14	< MDL-57.1	< MDL-51.8	< MDL-14.5	< MDL-9.03	8.56–1158	32.5–247	< MDL-6.94
Azithromycin	< MQL-38.6	< MQL-6.79	< MQL-14.5	0.76–2.47	0.22–13.3	0.92–10.8	< MDL	3.30–88.7	< MDL-9.31
Clarithromycin	< MQL-2.53	< MQL	< MDL-0.52	< MDL-0.50	< MDL-20.0	< MQL-0.55	< MDL-70.8	< MDL-39.3	< MDL-6.48
Erythromycin	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-85.0	< MDL
BHT	< MDL-939	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
Methoxycinnamate	< MDL-69.2	< MDL-72.6	< MDL-74.1	89.1–115	< MDL-106	< MDL-60.6	< MDL-141	< MDL-222	< MDL-528
Acetamiprid	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-20.2	< MDL	< MDL-8.21	< MDL-8.5	< MDL
Clothianidin	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-15.5	< MDL-40.9	< MDL-5.65	< MDL	< MDL
Imidacloprid	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-48.3	< MDL-36.4	< MDL
Methiocarb	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MQL	< MDL
Oxadiazon	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL
Thiacloprid	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-18.9	< MDL	< MDL	< MDL-0.83	< MDL
Thiamethoxam	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-18.0	< MDL	< MDL	< MQL	< MDL
Triallate	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
Compound	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
17 α -Ethinylestradiol	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MQL	< MQL	< MDL	< MDL	< MDL
17 β -Estradiol	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-20.5	< MQL	< MQL	< MDL	< MDL	< MDL
Estrone	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MQL	< MQL	< MDL	< MDL	< MDL
Diclofenac	< MDL-8.50	< MDL-24.7	3.59–3.60	< MQL-50.9	< MQL-25.7	< MQL-18.4	< MDL-18.3	< MDL-18.8	< MDL
Azithromycin	0.88–9.19	0.33–9.61	< MDL-6.71	< MDL-10.2	< MDL-1.64	< MDL-3.48	< MDL-9.90	< MDL-10.1	< MDL
Clarithromycin	< MDL-1.68	< MQL-2.15	< MDL	< MQL-0.81	< MDL-1.27	< MDL-1.59	0.59–10.0	< MDL-10.0	< MDL-0.88
Erythromycin	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-0.3
BHT	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
Methoxycinnamate	< MDL-172	< MDL-238	< MDL-83.5	< MDL-148	< MDL-230	< MDL-56.0	< MDL-446	< MDL-46.6	15.9–20.5
Acetamiprid	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
Clothianidin	< MDL-23.8	< MDL	< MQL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL-14.5	< MDL	< MDL
Imidacloprid	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
Methiocarb	< MDL	< MDL	< MDL-0.55	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
Oxadiazon	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MQL	< MDL
Thiacloprid	< MDL	< MDL	< MQL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
Thiamethoxam	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
Triallate	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL

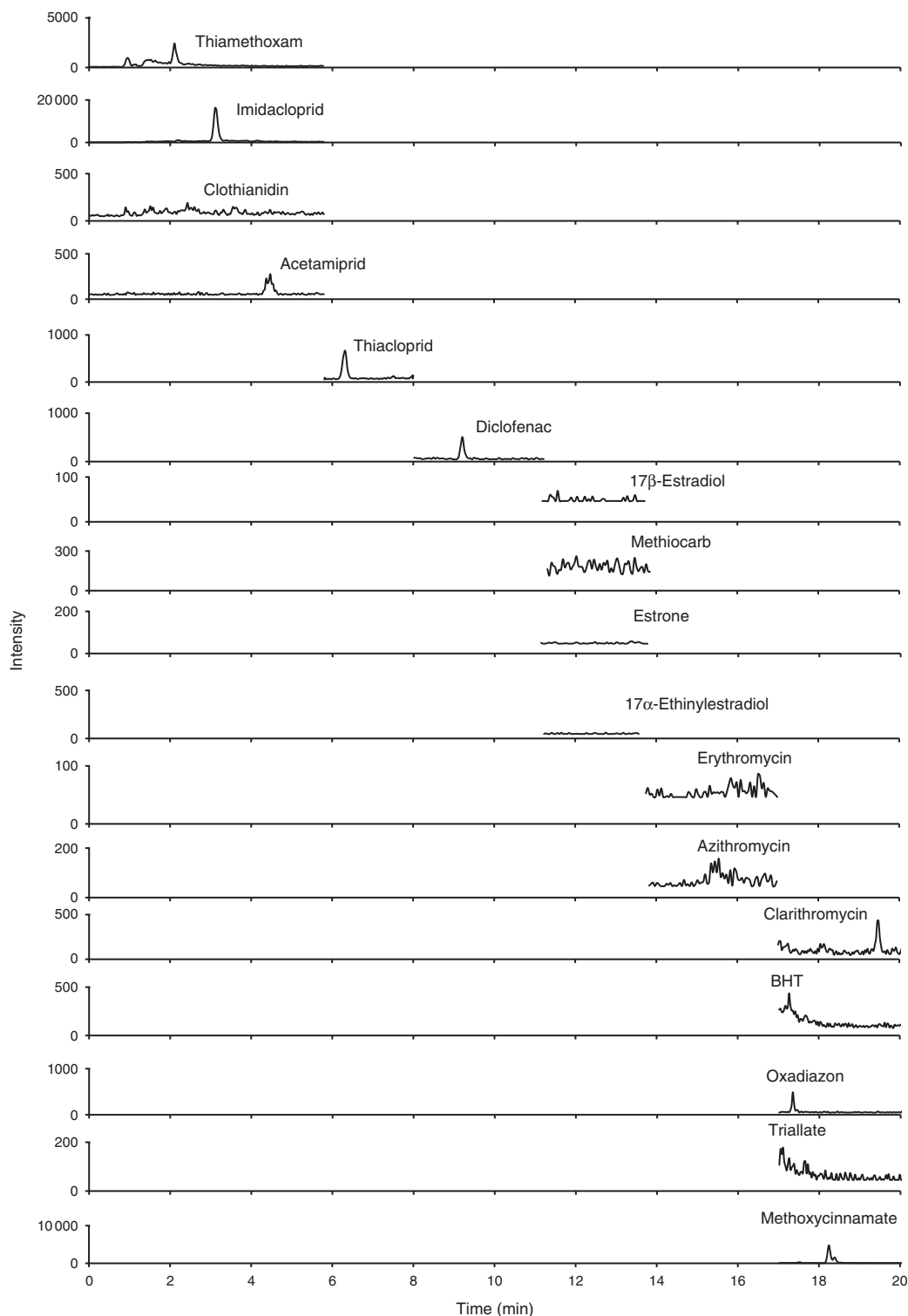


Fig. 4. HPLC-MS/MS chromatogram of a surface water sample.

determined the most common neonicotinoid compounds in surface water from rivers around Sydney (Australia) at concentration levels in the ranges 20–380, 20–420, 20–400, 40–4560 and 40–170 ng L^{-1} for acetamiprid, clothianidin, thiacloprid, imidacloprid and thiamethoxam respectively.

Despite the considerable number of studies reported on the occurrence and removal of estrogens, diclofenac and macrolide antibiotics (azithromycin, clarithromycin and erythromycin),

there is a lack of knowledge concerning pesticides (methiocarb, neonicotinoids, oxadiazon and triallate), food additives (BHT) and the solar filter methoxycinnamate, which are included in the Decision 2015/495/EU Watch List for monitoring by the European Union member countries. These data reinforce the need for applying multi-class methods to obtain an in-depth and realistic knowledge on the occurrence of the selected pollutants in environmental water.

Table 5. Concentrations of estrogens, pharmaceutically active compounds, food additive, solar filter and pesticides (ng L⁻¹) reported in the literature in water samples from several countries

Compound	Effluent wastewater	Surface water	Groundwater	Drinking water	Country	Reference
17 α -Ethinylestradiol	6.55 584–776	1.98	0.5–230		Singapore, France, Portugal, USA	Hu et al. (2008); Ribeiro et al. (2015); Barbosa et al. (2016)
17 β -Estradiol	5.01	2.26	0.3–147		Singapore, France, USA	Hu et al. (2008); Barbosa et al. (2016)
Estrone	1.84	0.32	0.7–79		Singapore, France, USA	Hu et al. (2008); Barbosa et al. (2016)
Diclofenac	< MQL-561 172–277 6–430 255–999	< MQL-41	1.7–380		Spain, France, Portugal	Rosal et al. (2010); Idder et al. (2013); Ribeiro et al. (2015); Barbosa et al. (2016); Biel-Maeso et al. (2018)
Azithromycin	1291–1737 927–1404 350–700		0.6–1620		Spain, China, Portugal, Czech Republic	Ribeiro et al. (2015); Barbosa et al. (2016); Landova and Vavrova (2017)
Clarithromycin	1283–1849 186–503 936–1394 410–960	< MDL-12	0.2–20.5		France, Spain, China, Portugal, Czech Republic	Idder et al. (2013); Ribeiro et al. (2015); Barbosa et al. (2016); Landova and Vavrova (2017); Biel-Maeso et al. (2018)
Erythromycin	51–149 < MQL-2310 46–83 64–270 < MQL-760 6.6–84.7	< MDL-2806	4.8–154.3		Spain, China, Portugal, Czech Republic, Lebanon	Rosal et al. (2010); Ribeiro et al. (2015); Barbosa et al. (2016); Landova and Vavrova (2017); Mokh et al. (2017); Biel-Maeso et al. (2018)
BHT		49–620		49	USA, Sweden	Benotti et al. (2009); Barbosa et al. (2016)
Methoxycinnamate	500–19000 <10–100		770		Spain, Germany	Rodil et al. (2009); Barbosa et al. (2016)
Acetamiprid	2.00	20–380			Germany, Australia	Sánchez-Bayo and Hyne (2014); Münze et al. (2017)
Clothianidin	14.0	20–420			Germany, Australia	Sánchez-Bayo and Hyne (2014); Münze et al. (2017)
Imidacloprid	<25 6	306 40–4560			Germany, Greece, Spain, Australia	Pitarch et al. (2010); Sánchez-Bayo and Hyne (2014); Tsaboula et al. (2016); Münze et al. (2017)
Methiocarb	1600				Spain	Pitarch et al. (2010)
Oxadiazon		4–1440 108			Greece, British Columbia	Furtula et al. (2006); Tsaboula et al. (2016)
Thiacloprid	3	120 20–400			Germany, Greece, Australia	Sánchez-Bayo and Hyne (2014); Tsaboula et al. (2016); Münze et al. (2017)
Thiamethoxam		330 40–170			Greece, Australia	Sánchez-Bayo and Hyne (2014); Tsaboula et al. (2016)

Conclusions

An HPLC–MS/MS analytical methodology was developed for the simultaneous quantification and confirmation of the 17 emerging pollutants included in the ‘Watch List’ of the EU Decision 2015/495 for Union-wide monitoring in the field of water policy. The proposed methodology allows for the extraction of all these compounds in a single SPE procedure and their simultaneous determination under positive and negative electrospray ionisation modes with a chromatographic run time of only 20 min. Two MRM transitions were acquired per compound for a reliable identification giving the sensitivity and selectivity necessary for the detection of these compounds at the relevant concentrations in the few nanograms per litre level in surface waters.

The proposed method allows for the determination of the 17 organic pollutants included in the Watch List, complying in most of the cases with the LOD required by the EU Decision 2015/495. Only the LOD achieved for hormones were higher than those required in the EU Decision. Therefore, further

investigation is necessary to improve their LOD values in multiclass analytical methods. The proposed method was applied to samples collected from 18 surface water sites selected in the province of Seville (South of Spain). The pharmaceutical compounds were the target compounds most frequently detected and quantified. In the near future, environmental monitoring programs will be carried out to address the questions of whether these compounds should be included in the list of priority pollutants in future directives, as well as if their levels could cause adverse effects on aquatic and terrestrial microorganisms.

Supplementary material

Chromatograms of a matrix-matched standard and a surface water sample are available on the Journal’s website.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

K

Acknowledgements

This work has been carried out in collaboration with Empresa Metropolitana de Abastecimiento y Saneamiento de Aguas de Sevilla (EMASESA), financed by Ministerio de Economía y Competitividad (Project CGL2013–44402-R) and Corporación Tecnológica de Andalucía (CTA), Spain, and supported by the ERDF.

References

- Amine H, Gómez E, Halwani J, Casellas C, Fenet H (2012). UV filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene and ethylhexyl dimethyl PABA from untreated wastewater in sediment from eastern Mediterranean river transition and coastal zones. *Marine Pollution Bulletin* **64**, 2435–2442. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2012.07.051
- Anderson TA, Salice CJ, Erickson RA, McMurry ST, Cox SB, Smith LM (2013). Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere* **92**, 84–90. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.02.054
- Anumol T, Snyder SA (2015). Rapid analysis of trace organic compounds in water by automated online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **132**, 77–86. doi:10.1016/J.TALANTA.2014.08.011
- Aparicio I, Martín J, Abril C, Santos JL, Alonso E (2017). Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of polar and non-polar emerging and priority pollutants in environmental waters. *Journal of Chromatography A* **1500**, 43–52. doi:10.1016/J.CHROMA.2017.04.007
- Aparicio I, Martín J, Santos JL, Malvar JL, Alonso E (2018). Determination of household and industrial chemicals, personal care products and hormones in leafy and root vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1533**, 49–56. doi:10.1016/J.CHROMA.2017.12.011
- Barbosa M, Moreira N, Ribeiro A, Pereira M, Silva A (2016). Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Research* **94**, 257–279. doi:10.1016/J.WATRES.2016.02.047
- Behera SK, Kim HW, Oh J, Park H (2011). Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *The Science of the Total Environment* **409**, 4351–4360. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2011.07.015
- Benotti MJ, Trenholm RA, Vanderford BJ, Holady JC, Stanford BD, Snyder SA (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science & Technology* **43**, 597–603. doi:10.1021/ES801845A
- Biel-Maeso M, Baena-Nogueras RM, Corada-Fernández C, Lara-Martín P (2018). Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *The Science of the Total Environment* **612**, 649–659. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.08.279
- Blue SW, Winchell AJ, Kaucher AV, Lieberman RA, Gilles CT, Pyra MN, Heffron R, Hou X, Coombs RW, Nanda K, Davis NL, Kourtis AP, Herbeck JT, Baeten JM, Lingappa JR, Erikson DW (2018). Simultaneous quantitation of multiple contraceptive hormones in human serum by LC–MS/MS. *Contraception* **97**, 363–369. doi:10.1016/J.CONTRACEPTION.2018.01.015
- Camacho-Muñoz D, Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E (2010). Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain). *Journal of Hazardous Materials* **183**, 602–608. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2010.07.067
- Campos-Mañas M, Plaza-Bolaños P, Sánchez-Pérez J, Malato S, Agüera A (2017). Fast determination of pesticides and other contaminants of emerging concern in treated wastewater using direct injection coupled to highly sensitive ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1507**, 84–94. doi:10.1016/J.CHROMA.2017.05.053
- Dujaković N, Grujić S, Radišić M, Vasiljević T, Laušević M (2010). Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **678**, 63–72. doi:10.1016/J.ACA.2010.08.016
- EC (2013). Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union* L226.
- EC (2015). Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council.
- Fries E, Püttmann W (2004). Monitoring of antioxidant BHT and its metabolite BHT-CHO in German river water and ground water. *The Science of the Total Environment* **319**, 269–282. doi:10.1016/S0048-9697(03)00447-9
- Furtula V, Derksen G, Colodey A (2006). Application of automated mass spectrometry deconvolution and identification software for pesticides analysis in surface waters. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **41**, 1259–1271. doi:10.1080/03601230600962211
- Goh SXL, Duarah A, Zhang L, Snyder S, Lee HK (2016). Online solid phase extraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of estrogens and glucocorticoids in water. *Journal of Chromatography A* **1465**, 9–19. doi:10.1016/J.CHROMA.2016.08.040
- González AG, Herrador MA (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry* **26**, 227–238. doi:10.1016/J.TRAC.2007.01.009
- Grimalt S, Sancho J, Pozo O, García-Baudin JM, Fernández-Cruz ML, Hernández F (2006). Analytical study of trichlorfon residues in kaki fruit and cauliflower samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 1188–1195. doi:10.1021/JF052737J
- Gros M, Petrovic M, Barceló D (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* **70**, 678–690. doi:10.1016/J.TALANTA.2006.05.024
- Guo R, Megson D, Myers AL, Helm PA, Marvin C, Crozier P, Mabury S, Bhavsar SP, Tomy G, Simcik M, McCarry B, Reiner EJ (2016). Application of a comprehensive extraction technique for the determination of poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) in Great Lakes region sediments. *Chemosphere* **164**, 535–546. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.08.126
- Herrero-Hernández E, Rodríguez-Cruz MS, Pose-Juan E, Sánchez-González S, Andrades MS, Sánchez-Martín MJ (2017). Seasonal distribution of herbicide and insecticide residues in the water resources of the vineyard region of La Rioja (Spain). *The Science of the Total Environment* **609**, 161–171. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.07.113
- Hoa PT, Managaki S, Nakada N, Takada H, Shimizu A, Anh DH, Viet PH, Suzuki S (2011). Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *The Science of the Total Environment* **409**, 2894–2901. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2011.04.030
- Hu E, Zhang L, Yang Z (2008). Picogram determination of estrogens in water using large volume injection gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**, 349–359. doi:10.1007/S00216-007-1683-3
- Idder S, Ley L, Mazellier P, Butzinski H (2013). Quantitative on-line preconcentration-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for the determination of pharmaceutical compound in water. *Analytica Chimica Acta* **805**, 107–115. doi:10.1016/J.ACA.2013.10.041
- Landova P, Vavrova MA (2017). A new method for macrolide antibiotics determination in wastewater from three different wastewater treatment plants. *Acta Chimica Slovenica* **10**, 47–53. doi:10.1515/ACS-2017-0008
- Lonappan L, Brar SK, Das RK, Verma M, Surampalli RY (2016). Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity – A review. *Environment International* **96**, 127–138. doi:10.1016/J.ENVINT.2016.09.014

- Luo Y, Guo W, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, Liang S, Wang XC (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *The Science of the Total Environment* **473–474**, 619–641. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2013.12.065
- Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E (2015). Determination of hormones, a plasticizer, preservatives, perfluoroalkylated compounds, and a flame retardant in water samples by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of a floating organic drop. *Talanta* **143**, 335–343. doi:10.1016/J.TALANTA.2015.04.089
- Mnguni SB, Schoeman C, Marais SS, Cukrowska E, Chimuka L (2018). Determination of oestrogen hormones in raw and treated water samples by reverse phase ultra-fast liquid chromatography mass spectrometry – a case study in Johannesburg South, South Africa. *Water S.A.* **44**, 111–117. doi:10.4314/WASA.V44I1.13
- Mokh S, El Khatib M, Koubar M, Daher Z, Al Iskandarani M (2017). Innovative SPE-LC-MS/MS technique for the assessment of 63 pharmaceuticals and the detection of antibiotic-resistant-bacteria: A case study natural water sources in Lebanon. *The Science of the Total Environment* **609**, 830–841. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.07.230
- Morrissey CA, Mineau P, Devries JH, Sanchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro MC, Liber K (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International* **74**, 291–303. doi:10.1016/J.ENVINT.2014.10.024
- Münze R, Hannemann C, Orlinsky P, Gunold R, Paschke A, Foit K, Becker J, Kaske O, Paulsson E, Peterson M, Jernstedt H, Kreuger J, Schüürmann G, Liess S (2017). Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities. *The Science of the Total Environment* **599–600**, 387–399. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.03.008
- Neng NR, Nogueira JMF (2012). Development of a bar adsorptive microextraction–large-volume injection–gas chromatography–mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 1355–1364. doi:10.1007/S00216-011-5515-0
- Paíga P, Santos LH, Ramos S, Jorge S, Silva JG, Delerue-Matos C (2016). Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *The Science of the Total Environment* **573**, 164–177. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2016.08.089
- Pitarch E, Portolés T, Marín JM, Ibáñez M, Albarrán F, Hernández F (2010). Analytical strategy based on the use of liquid chromatography and gas chromatography with triple quadrupole and time-of-flight MS analyzers for investigating organic contaminants in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**, 2763–2776. doi:10.1007/S00216-010-3692-X
- Ribeiro AR, Pedrosa M, Moreira N, Pereira M, Silva A (2015). Environmental friendly method for urban wastewater monitoring of micropollutants defined in the directive 2013/39/EU and Decision 2015/495/EU. *Journal of Chromatography A* **1418**, 140–149. doi:10.1016/J.CHROMA.2015.09.057
- Robles-Molina J, Lara-Ortega FJ, Gilbert-López B, García-Reyes JF, Molina-Díaz A (2014). Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1350**, 30–43. doi:10.1016/J.CHROMA.2014.05.003
- Rodil R, Schrader S, Moeder M (2009). Non-porous membrane-assisted liquid-liquid extraction of UV filter compounds from water samples. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4887–4894. doi:10.1016/J.CHROMA.2009.04.042
- Rodil R, Quintana JB, Basaglia G, Pietrogrande MC, Cela R (2010). Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaled solid-phase extraction, silylation and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**, 6428–6435. doi:10.1016/J.CHROMA.2010.08.020
- Rosal R, Rodríguez A, Perdígón JA, Petre A, García E, Gómez MJ, Aguilera A, Fernández A (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research* **44**, 578–588. doi:10.1016/J.WATRES.2009.07.004
- Rubirola A, Boleda MR, Galceran MT (2017). Multiresidue analysis of 24 Water Framework Directive priority substances by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry in environmental waters. *Journal of Chromatography A* **1493**, 64–75. doi:10.1016/J.CHROMA.2017.02.075
- Sadaria MA, Supowit SD, Halden RU (2016). Mass balance assessment for six neonicotinoid insecticides during conventional wastewater and wetland treatment: nationwide reconnaissance in United States wastewater. *Environmental Science & Technology* **50**, 6199–6206. doi:10.1021/ACS.EST.6B01032
- Sánchez-Bayo F, Hyne R (2014). Detection and analysis of neonicotinoids in river waters – Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere* **99**, 143–151. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.10.051
- Singer H, Jaus S, Hanke I, Lueck A, Hollender J, Alder AC (2010). Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behavior in wastewater and surface water. *Environmental Pollution* **158**, 3054–3064. doi:10.1016/J.ENVPOL.2010.06.013
- Sousa JCG, Ribeiro AR, Barbosa MO, Pereira MFR, Silva AMT (2018). A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials* **344**, 146–162. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2017.09.058
- Togunde OP, Cudjoe E, Oakes KD, Mirnaghia FS, Servos MR, Pawliszyn J (2012). Determination of selected pharmaceutical residues in wastewater using an automated open bed solid phase microextraction system. *Journal of Chromatography A* **1262**, 34–42. doi:10.1016/J.CHROMA.2012.09.011
- Tsaboula A, Papadakis E, Vryzas Z, Kotopoulou A, Kintzikoglou K, Papadoupoulo-Mourkidou E (2016). Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. *Environment International* **91**, 78–93. doi:10.1016/J.ENVINT.2016.02.008
- Westlund P, Yargeau V (2017). Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays. *The Science of the Total Environment* **607–608**, 744–751. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.07.032
- Yao L, Wang Y, Tong L, Li Y, Deng Y, Guo W, Gan Y (2015). Seasonal variation of antibiotics concentration in the aquatic environment: a case study at Jiangnan Plain, central China. *The Science of the Total Environment* **527–528**, 56–64. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2015.04.091
- Zorita S, Mårtensson L, Mathiasson L (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *The Science of the Total Environment* **407**, 2760–2770. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2008.12.030

Handling Editor: Ralf Ebinghaus

Supplementary Material

Development of an analytical method for the simultaneous determination of the 17 EU watch list compounds in surface waters: a Spanish case study

José Luis Malvar,^A Concepción Abril,^A Julia Martín,^A Juan Luis Santos,^{A,*} Irene Aparicio,^A Carmelo Escot,^B Ana Basanta^B and Esteban Alonso^A

^ADepartment of Analytical Chemistry, Escuela Politécnica Superior, University of Seville, C/ Virgen de África 7, E-41011 Seville, Spain

^BEmpresa de Abastecimiento y Saneamiento de Aguas de Sevilla (EMASESA), E-41011 Seville, Spain

*Corresponding author:

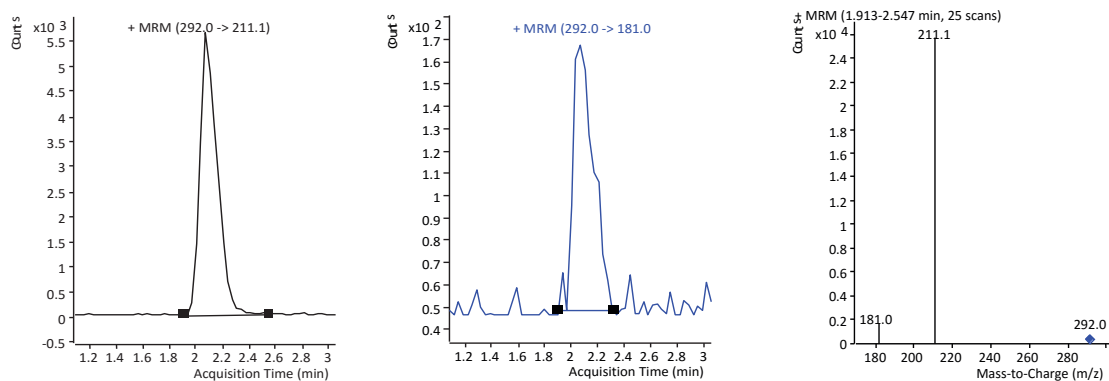
Address: Juan Luis Santos Morcillo
Department of Analytical Chemistry
Escuela Politécnica Superior
University of Seville
C/ Virgen de África, 7
E-41011 Seville, Spain

E-mail: jlsantos@us.es

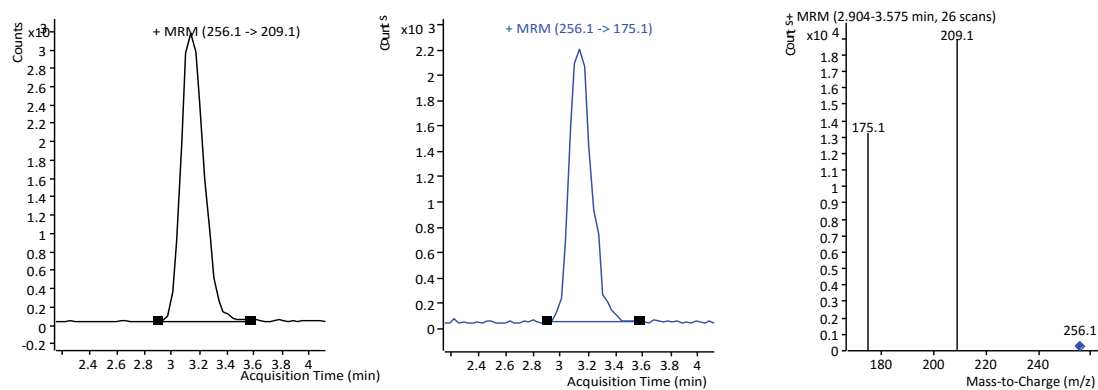
Figure S1.

MRM1 and MRM2 chromatograms corresponding to the lowest concentration matrix-matched standard solution and mass spectra of the target compounds.

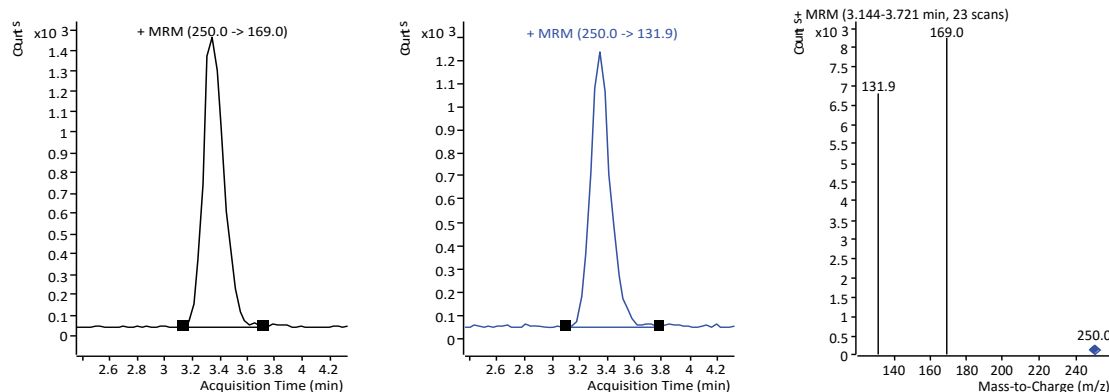
Thiamethoxam (1.81 ng/L)



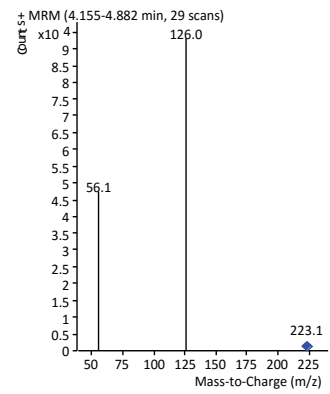
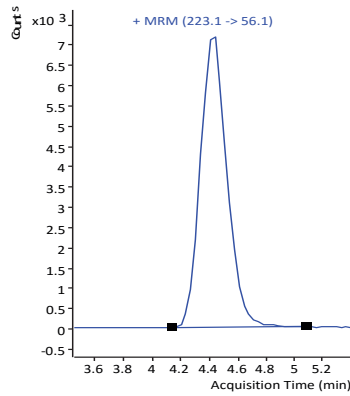
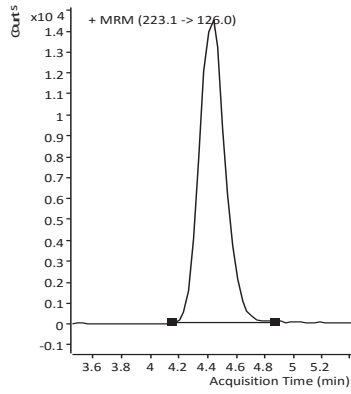
Imidacloprid (12.8 ng/L)



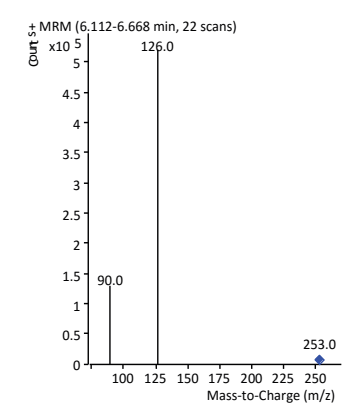
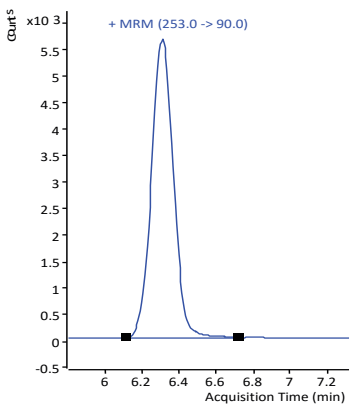
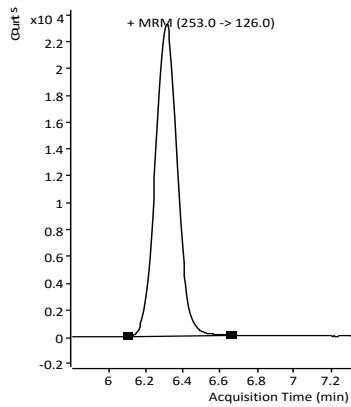
Clothianidin (1.49 ng/L)



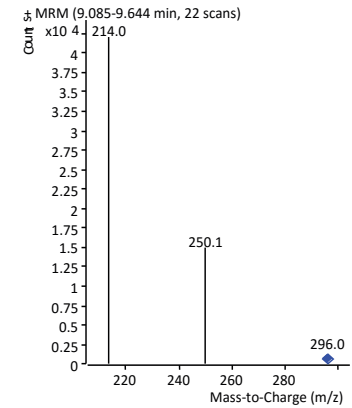
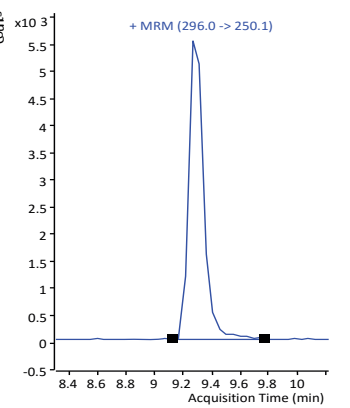
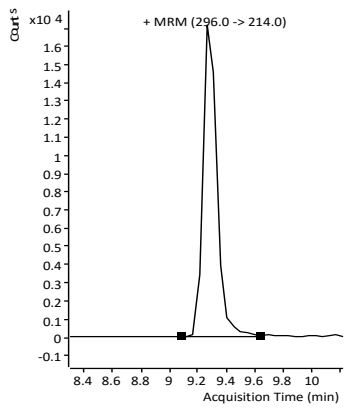
Acetamidrid (1.50 ng/L)



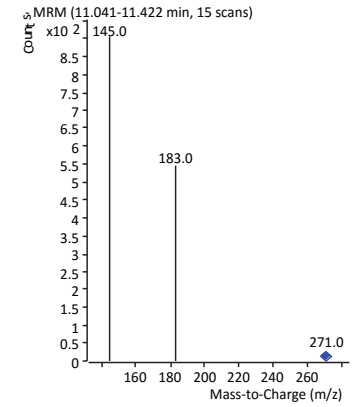
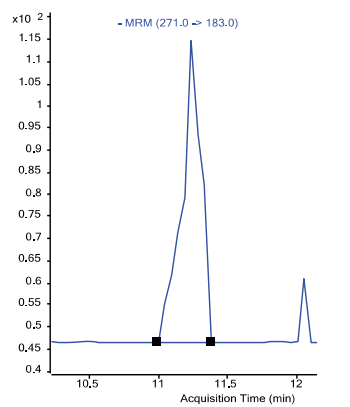
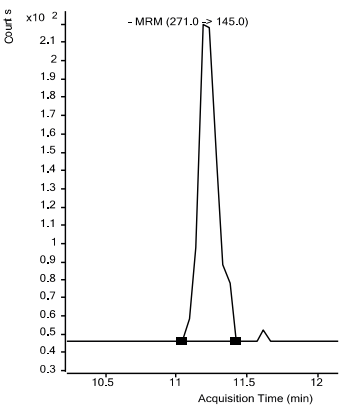
Thiacloprid (0.30 ng/L)



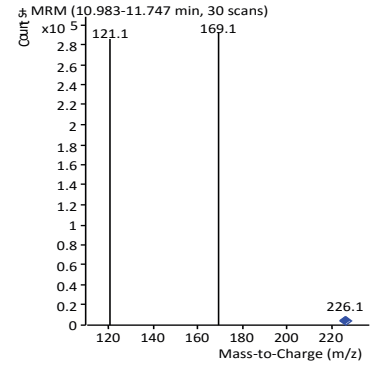
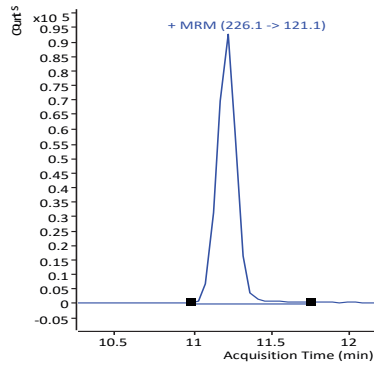
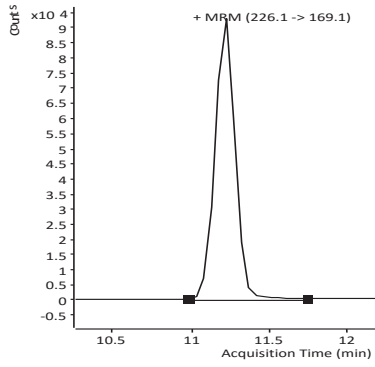
Diclofenac (1.49 ng/L)



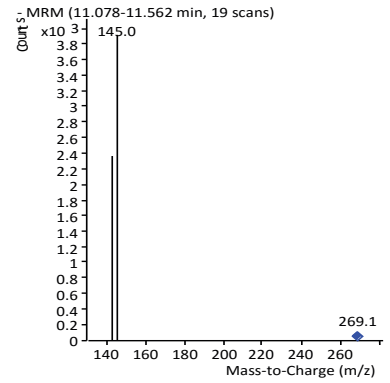
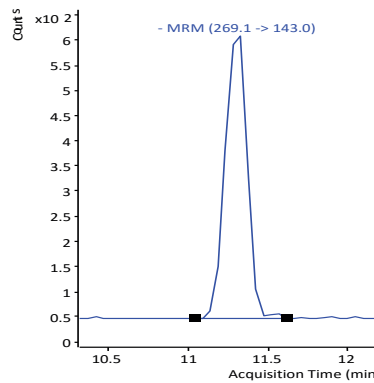
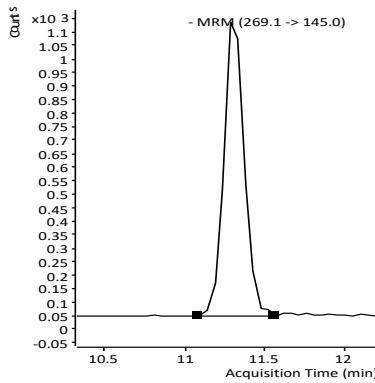
17β-estradiol (17.9 ng/L)



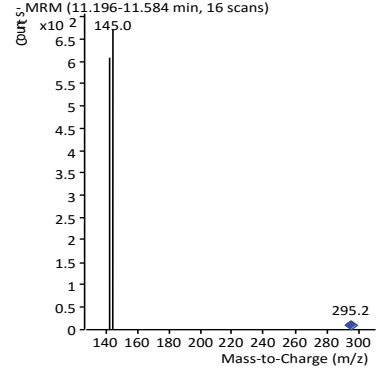
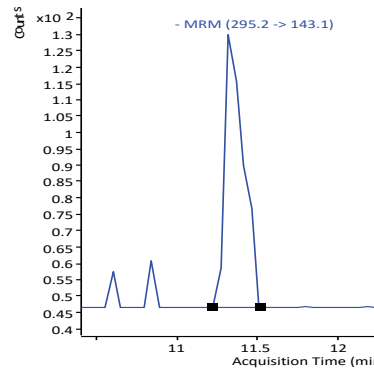
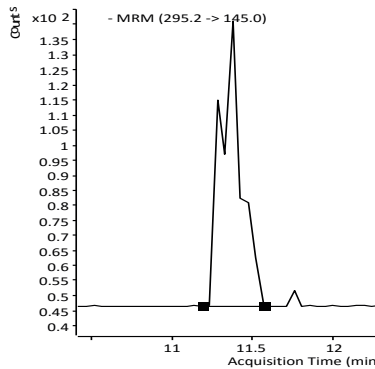
Methiocarb (0.38 ng/L)



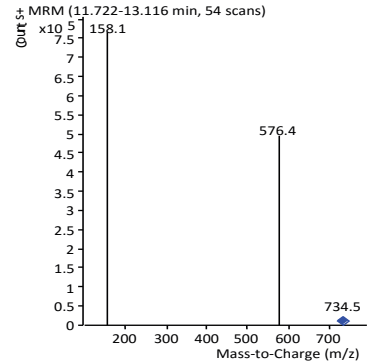
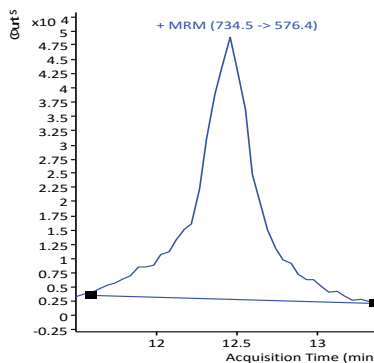
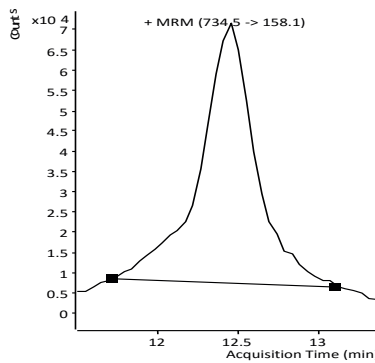
Estrone (3.85 ng/L)



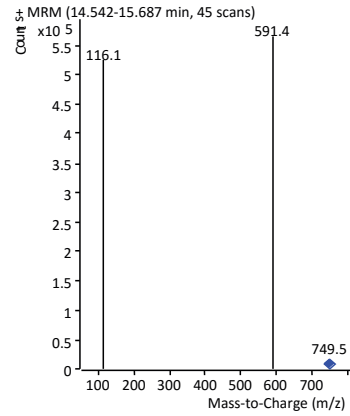
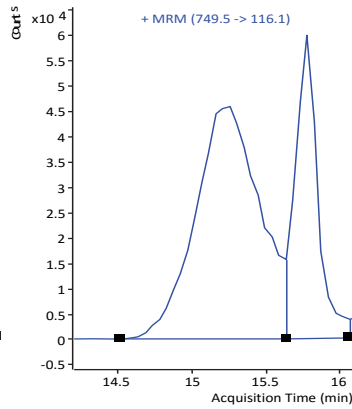
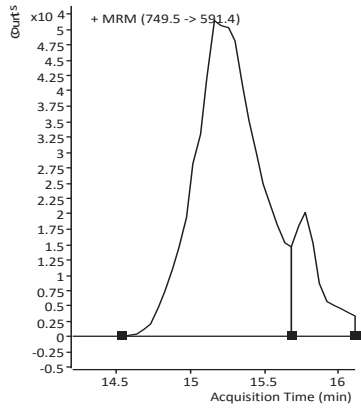
17 α -ethinylestradiol (18.9 ng/L)



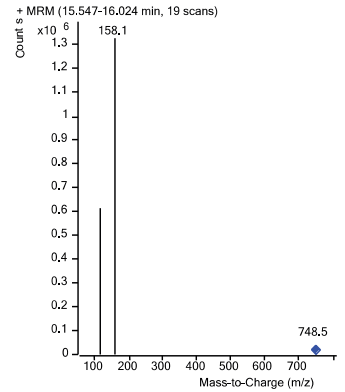
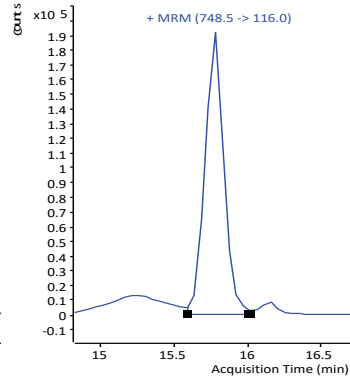
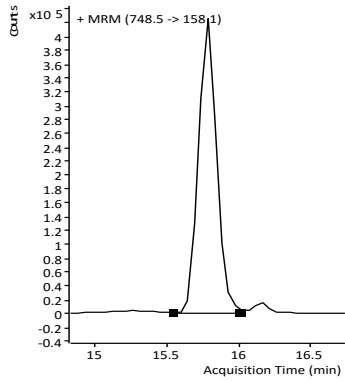
Erythromycin (0.32 ng/L)



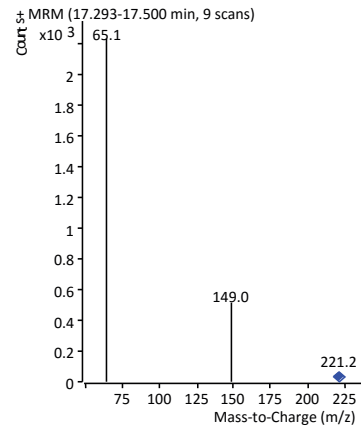
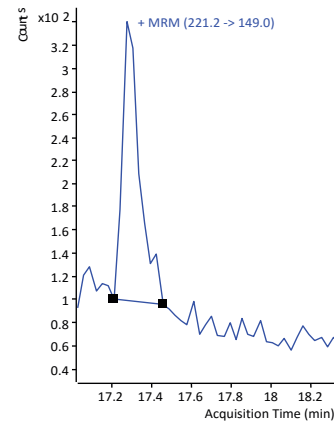
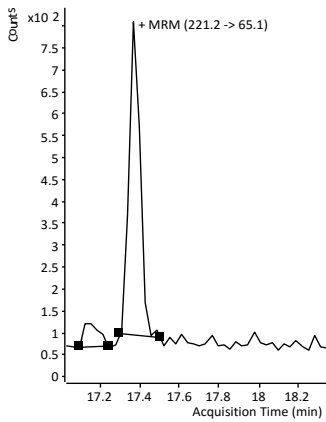
Azithromycin (0.14 ng/L)



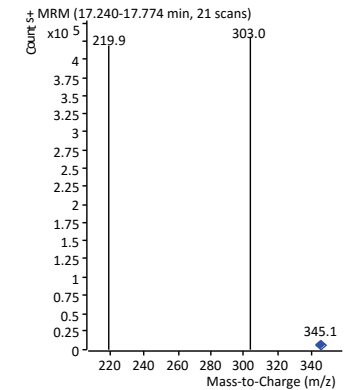
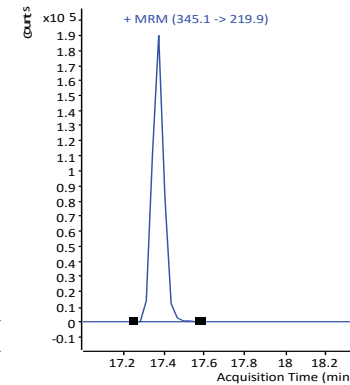
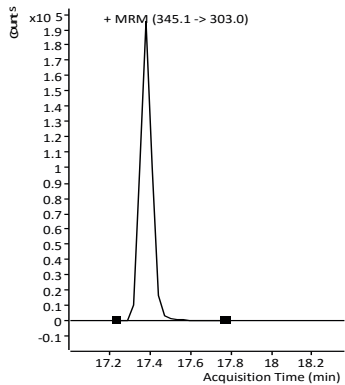
Clarithromycin (0.43 ng/L)



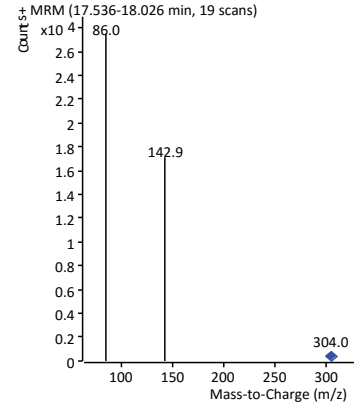
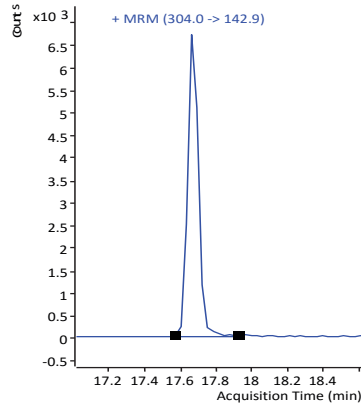
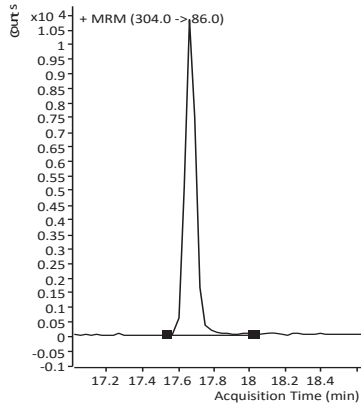
BHT (32.7 ng/L)



Oxadiazon (0.31 ng/L)



Triallate (1.33 ng/L)



Methoxycinnamate (1.60 ng/L)

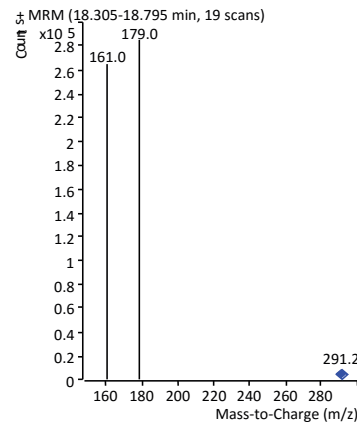
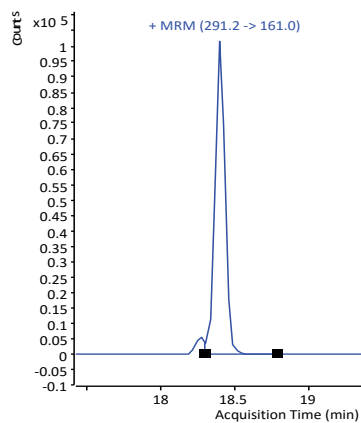
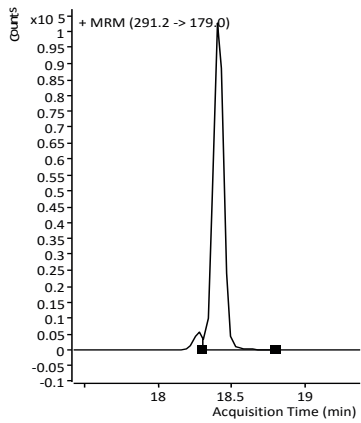
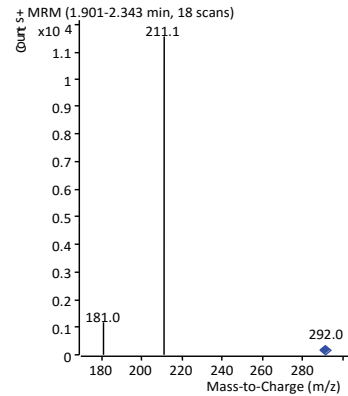
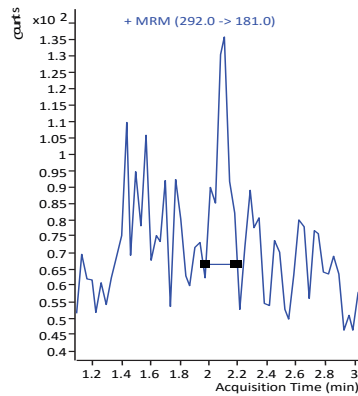
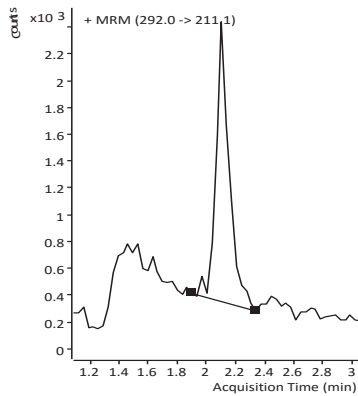


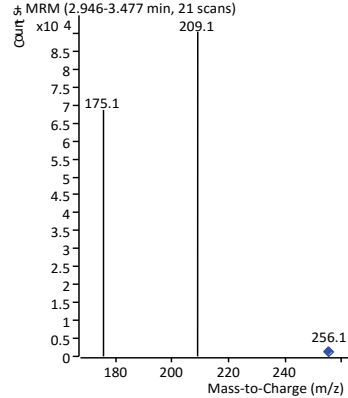
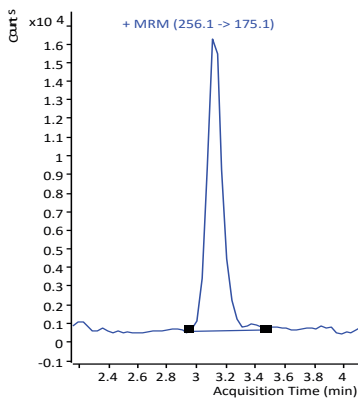
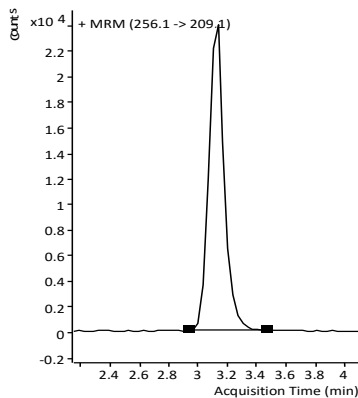
Figure S2.

MRM1 and MRM2 chromatograms and mass spectra of the target compounds in a surface water sample.

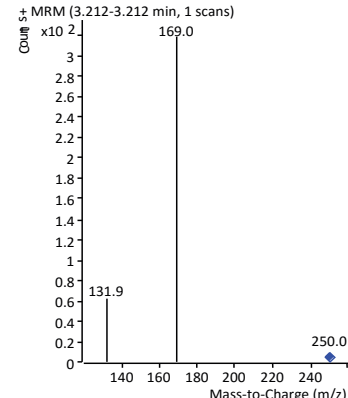
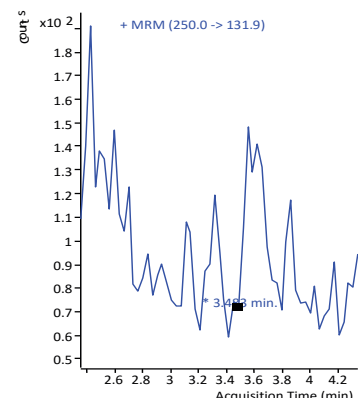
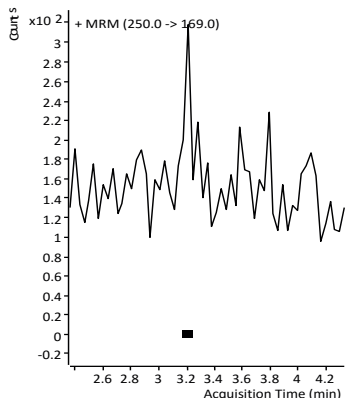
Thiamethoxam (<MDL)



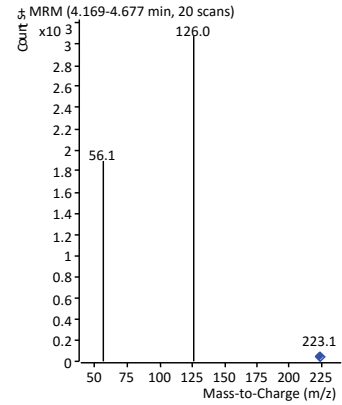
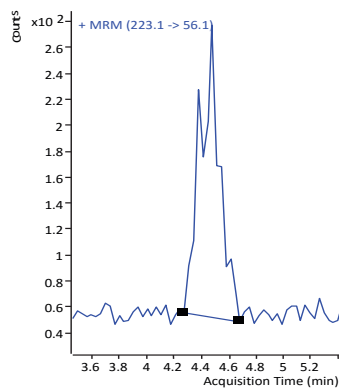
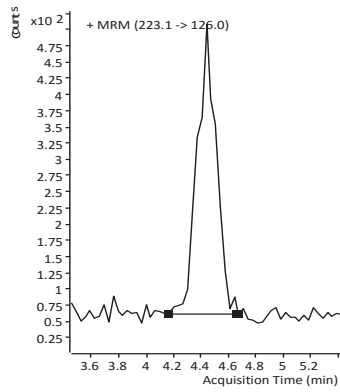
Imidacloprid (36.4 ng/L)



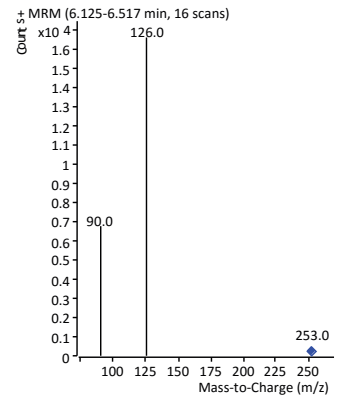
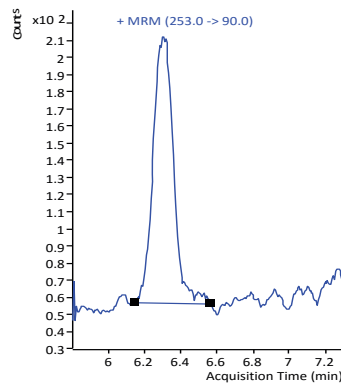
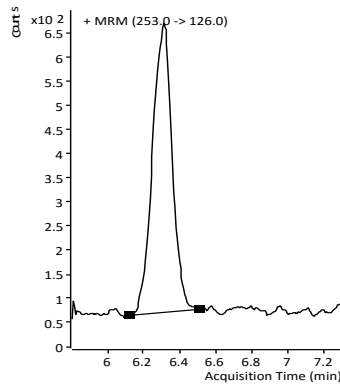
Clothianidin (<MDL)



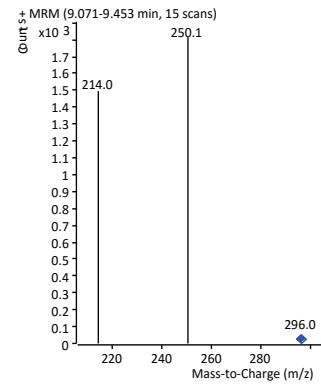
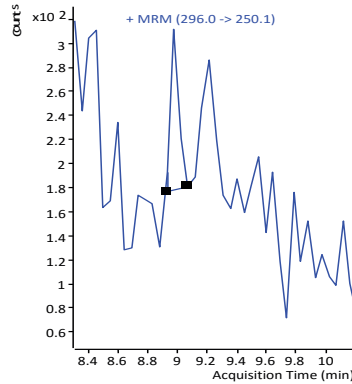
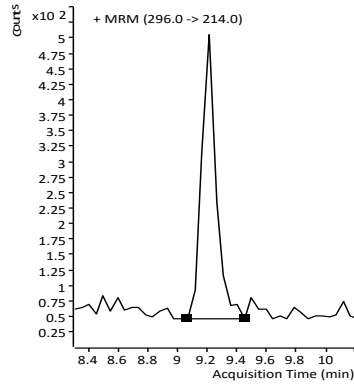
Acetamidrid (<MDL)



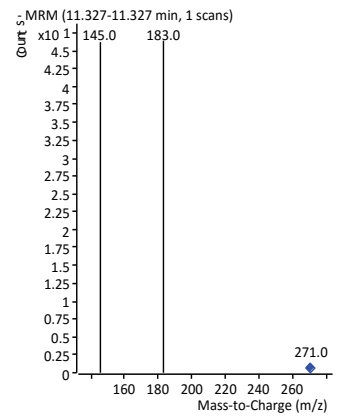
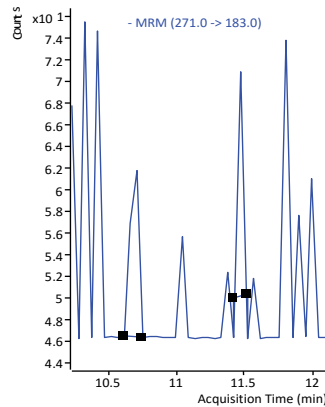
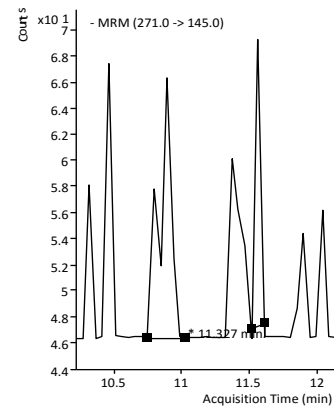
Thiacloprid (<MQL)



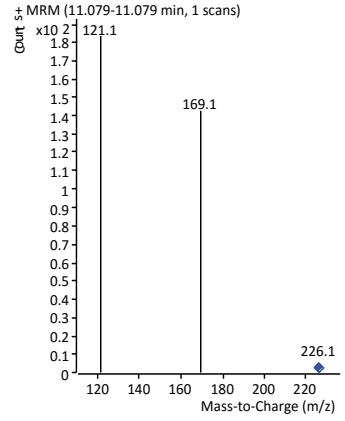
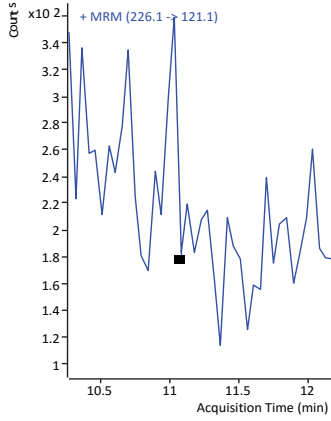
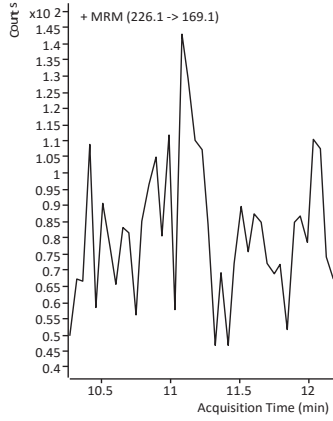
Diclofenac (<MDL)



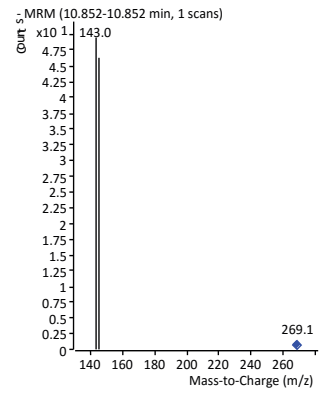
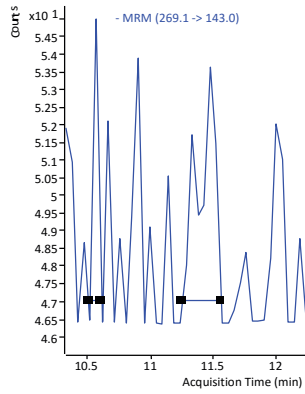
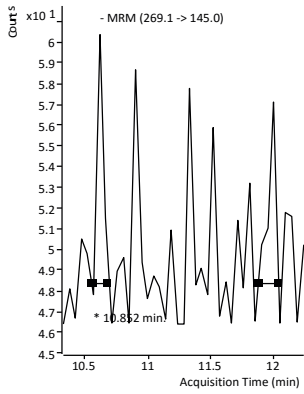
17β-estradiol (<MDL)



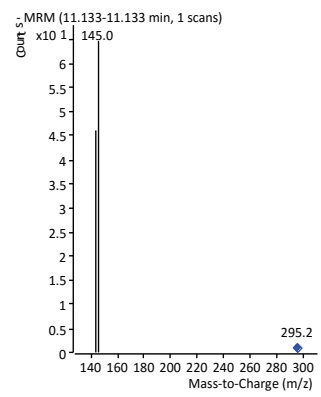
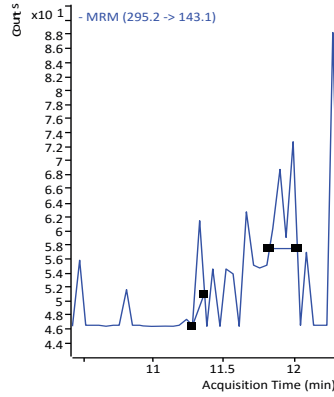
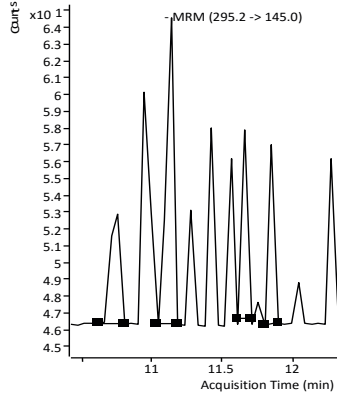
Methiocarb (<MDL)



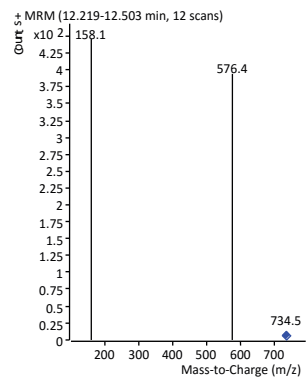
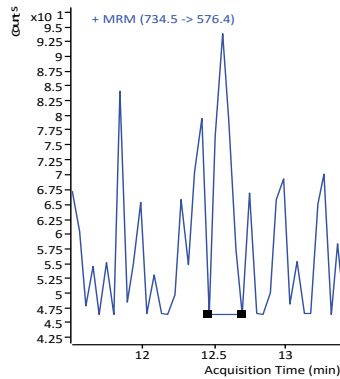
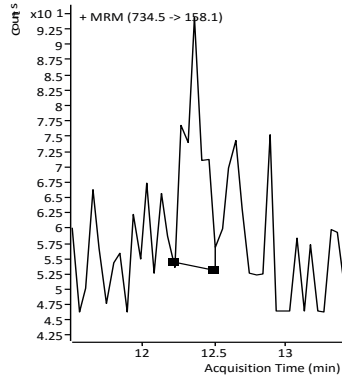
Estrone (<MDL)



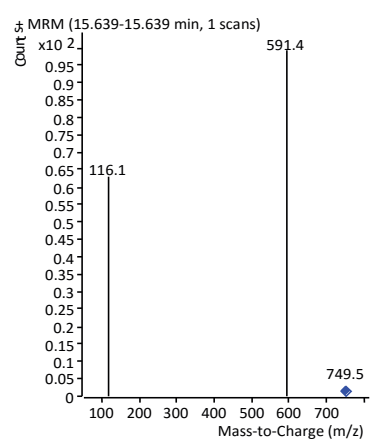
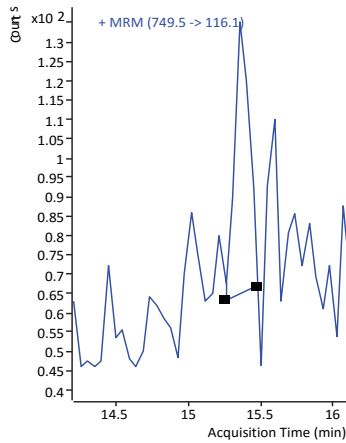
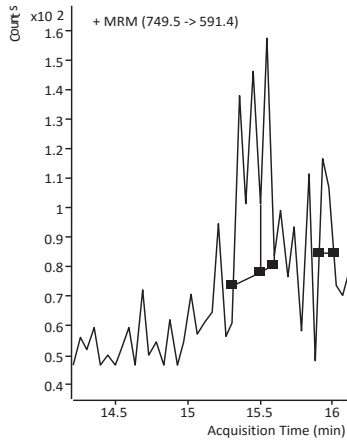
17 α -ethinylestradiol (<MDL)



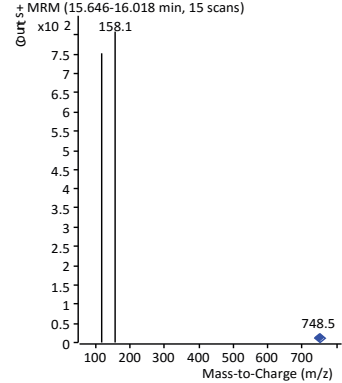
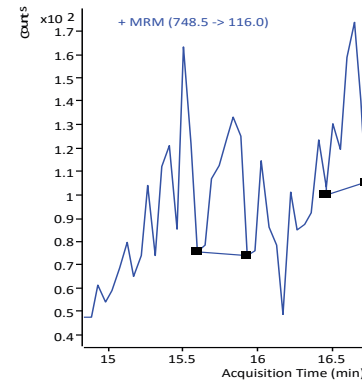
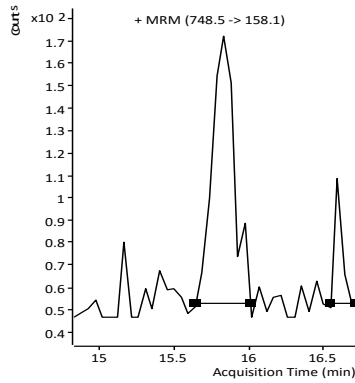
Erythromycin (<MDL)



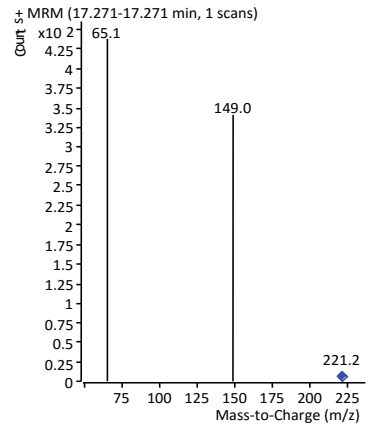
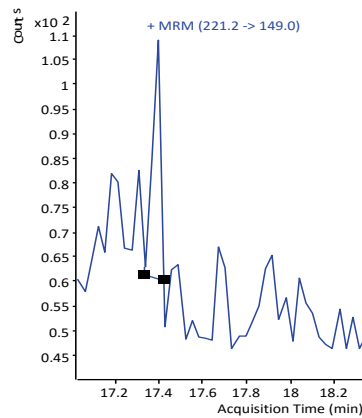
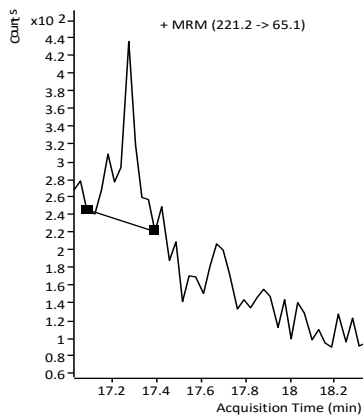
Azithromycin (<MDL)



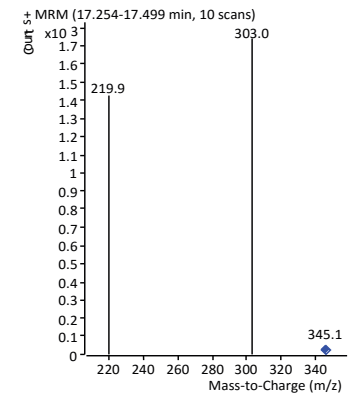
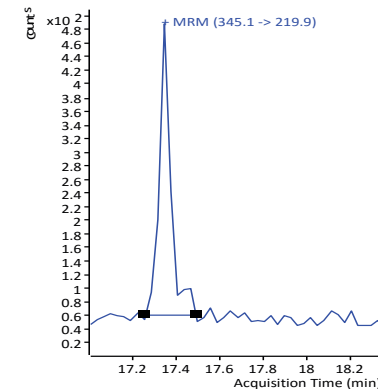
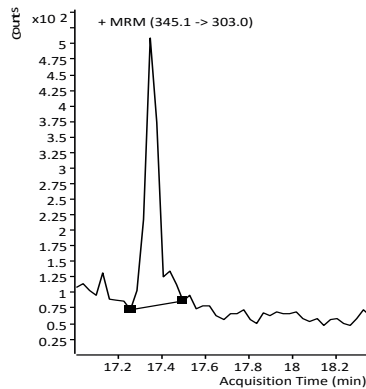
Clarithromycin (<MDL)



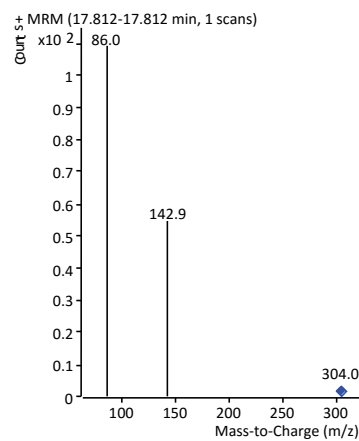
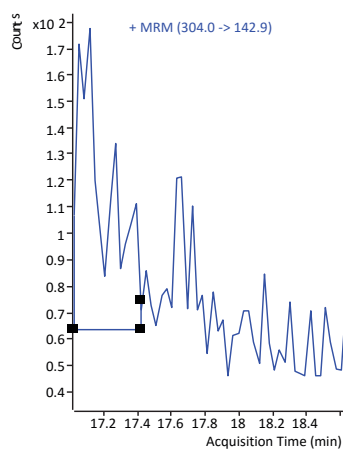
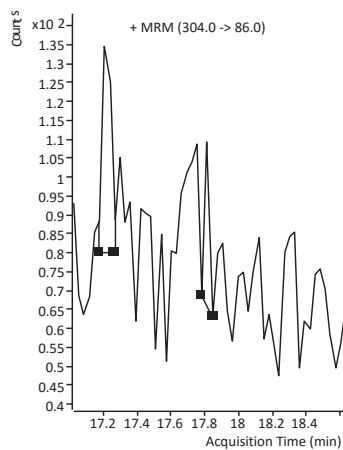
BHT (<MDL)



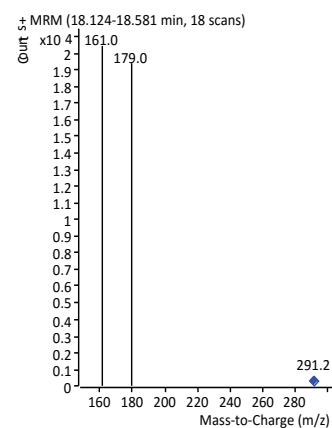
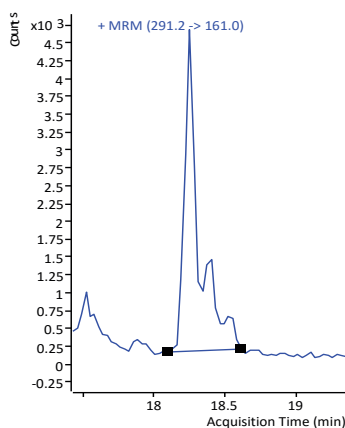
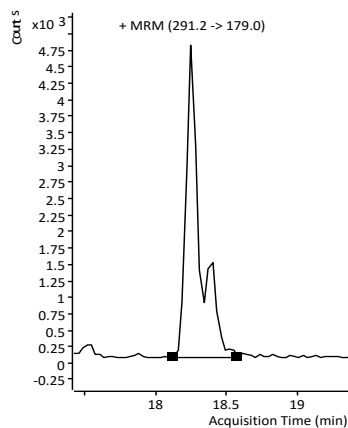
Oxadiazon (<MQL)



Triallate (<MDL)



Methoxycinnamate (<MQL)



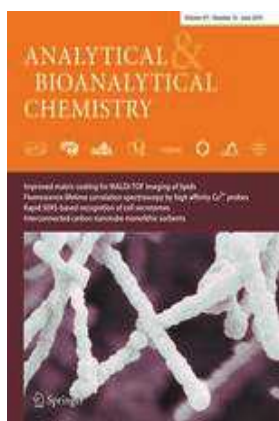
ARTÍCULO N° 2

Título: Routine analytical method for monitoring the main metabolites for a recurrent group of parabens and pharmaceuticals in wastewater and tap water

Autores: José Luis Malvar, Juan Luis Santos, Julia Martín, Irene Aparicio, Esteban Alonso

Afiliación: Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, C/ Virgen de África, 7, 41011, Seville, Spain

Revista: Analytical and Bioanalytical Chemistry



Editor: A.T. Wooley

Editorial: Springer Heidelberg

Año de publicación: 2019

ISSN: 1618-2642 (Impreso)

1618-2650 (Online)

Categoría: Chemistry, Analytical

Posición de la revista en la categoría: 18/86

Factor de impacto (2019): 3.637

Factor de impacto (5 años): 3.444

Cuartil: Q1

Resumen Artículo 2

En este artículo se describe el creciente interés por la presencia de metabolitos derivados de principios activos farmacéuticos y de productos de cuidado personal en aguas residuales (una de las principales fuentes de estos compuestos), poniéndose de manifiesto la escasez de métodos analíticos que permitan su cuantificación en matrices ambientales y, en mayor medida, su determinación simultánea conjunta de productos de partida y metabolitos de distintas familias de compuestos.

En el artículo se propone el desarrollo de un nuevo método analítico, plausible para su uso en laboratorios de rutina, basado en una extracción en fase sólida y determinación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo, para la determinación simultánea de un amplio abanico de principios activos farmacéuticos, productos de cuidado personal y sus metabolitos mayoritarios en aguas residuales y potables. En concreto, se seleccionaron 19 compuestos con propiedades físico-químicas diferenciadas y representativas de otras familias de compuestos, con objeto de la potencial extrapolación de los resultados, en base a su amplio consumo, escasa eliminación a través de los tratamientos de depuración actuales, su distribución en diferentes compartimentos ambientales o el elevado riesgo toxicológico. Son: 5 principios activos farmacéuticos (cafeína, carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno y sulfametoxazol), 2 parabenos (metilparaben y propilparaben) y 12 de sus principales metabolitos (paraxantina, 3-hidroxicarbamazepina, 10-hidroxicarbamazepina, epoxicarbamazepina, 4-hidroxidiclofenaco, 1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno, carboxiibuprofeno, N⁴-acetilsulfametoxazol, metilprotocatecuato, ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido 4-hidroxibenzoico).

La optimización del proceso de extracción en fase sólida con cartuchos Oasis HLB se centró en el estudio de la influencia del pH y de los disolventes para las etapas de elución y de limpieza, llegándose a una solución de compromiso para compuestos con pK_a muy diferenciadas para un pH de 5, acetona como disolvente de elución por su mayor volatilidad en comparación con la del metanol (que presentó rendimientos de extracción similares), y hexano como disolvente para la eliminación de interferencias en la etapa de limpieza.

En cuanto a la determinación cromatográfica, se ensayaron con tres fases móviles acuosas y dos disolventes orgánicos, con mejores rendimientos para la fase acuosa en presencia de ácido fórmico 0.1%, v/v debido a una mejor ionización. Para los disolventes probados, metanol y acetonitrilo (ambos en ácido fórmico 0.1% v/v), se obtuvieron resultados similares, seleccionando el metanol por su menor toxicidad y coste en comparación con el acetonitrilo.

La validación comparativa del método para aguas residuales y aguas potables mostró un importante efecto matriz en el caso de las primeras. En cualquier caso, se obtuvieron valores aceptables de exactitud (entre el 66% y el 120% en aguas residuales y entre el 86 y el 120% en agua potable) y precisión para la mayoría de los compuestos (inferiores al 17%). La validez del método quedó refrendada al comparar los parámetros analíticos obtenidos con los de otros métodos existentes en la literatura, con límites de cuantificación (en un rango de entre 1.0 y 33 ng L⁻¹ para aguas residuales y entre 0.5 y 28 ng L⁻¹ para aguas potables) incluso mas bajos para la mayoría de compuestos.

El método se aplicó a muestras reales de aguas residuales y de aguas potables, no detectándose ninguno de los compuestos objeto de análisis en aguas potables mientras que en aguas residuales todos fueron detectados, siendo las concentraciones de los metabolitos cuantificados similares o más altas que las de los compuestos de partida.



Routine analytical method for monitoring the main metabolites for a recurrent group of parabens and pharmaceuticals in wastewater and tap water

José Luis Malvar¹ · Juan Luis Santos¹ · Julia Martín¹ · Irene Aparicio¹ · Esteban Alonso¹

Received: 25 April 2019 / Revised: 5 June 2019 / Accepted: 16 July 2019 / Published online: 27 July 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The presence of parabens and pharmaceuticals on the aquatic environment has been widely evaluated in the last years. Nevertheless, there is scarce information about the occurrence of their metabolites and/or degradation products in spite of the fact that they can be more toxic or more concentrated than their parent compounds. One of the main drawbacks for their monitoring is the lack of simple and reliable analytical methods for their routine determination. In this work, an analytical method has been developed and validated for the simultaneous extraction and determination of the main metabolites of the pharmaceuticals diclofenac, ibuprofen, sulfamethoxazole, carbamazepine and caffeine and of the parabens methylparaben and propylparaben and their parent compounds in wastewater and tap water samples. Sample extraction was carried out by conventional solid-phase extraction with OASIS HLB cartridges. Analytical determination was carried out by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionization. Average accuracy was in the range from 66 to 120% in wastewater and from 86 to 120% in tap water. Precision, expressed as relative standard deviation, was lower than 17% for all the compounds. Method quantification limits were in the range from 1.0 to 33 ng L⁻¹ in wastewater and from 0.5 to 28 ng L⁻¹ in tap water. The method was applied to wastewater and tap water samples. None of the target compounds was detected in tap water whereas all of them were detected in wastewater. Concentrations of the metabolites were similar or higher than those of the parent compounds.

Keywords Metabolites · Pharmaceuticals · Personal care products · Aqueous samples · Solid-phase extraction · Mass spectrometry

Introduction

Pharmaceuticals and personal care products are some of the pollutants of emerging concern most widely studied in the environment [1–3]. They are continuously released into the aquatic media mainly through wastewater discharges from wastewater treatment plants. They have been detected not only in wastewater and surface water but also in tap water [1, 4]. Among personal care

products, special interest has been focused on parabens because of their wide use as antimicrobial preservatives not only in personal care products but also in pharmaceuticals and food [1, 2]. Pharmaceuticals and parabens are released to wastewater as parent compounds and/or as free or conjugated metabolites and can be transformed into degradation products in wastewater treatment plants and in the aquatic environment. In the case of the metabolites, they can be transformed into their parent compounds [5].

The determination of the metabolites of pharmaceuticals in wastewater can be used to assess their environmental risk and to establish population size, dynamics [6, 7] and consumption patterns, and even to assess community health [8]. In addition, the determination of metabolites of parabens can be used to assess human exposure to such estrogenic pollutants [9] in the so-called exposome studies [10]. Nevertheless, in spite of the large and useful information from the analysis of metabolites and parent compounds and that some metabolites can be more toxic,

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00216-019-02035-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Juan Luis Santos
jlsantos@us.es

¹ Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, C/ Virgen de África, 7, 41011 Sevilla, Spain

persistent and more concentrated in the aquatic media than the parent compounds [5, 11, 12], there is little information about their occurrence in the environment. One of the main reasons for this little information is the lack of analytical methods that allow the routine determination of these compounds in complex matrices. To date, the scarce analytical methods reported in the literature for the determination of metabolites of pharmaceuticals or metabolites of parabens in aqueous samples are based on solid-phase extraction (SPE), with different types of extraction cartridges, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). These methods are mainly focused on the determination of just one pharmaceutical compound such as carbamazepine [13–16], diclofenac [17], ibuprofen [18], omeprazole [19] and caffeine [7, 20], or on one class of compounds such as opioid analgesics [21], psychoactive pharmaceuticals [22], nonsteroidal anti-inflammatories [23] or parabens [9, 24]. Recently, a method based on direct sample injection and two LC-MS/MS chromatographic runs has been reported for multiresidue determination of micropollutants and transformation products in aqueous samples [25]. Nevertheless, probably due to the direct sample injection, matrix effects in the range from –75% (signal suppression) to 65% (signal enhancement) and method quantitation limits up to 150 ng L⁻¹ were achieved for wastewater samples.

In spite of these analytical methods, there is not reported in the literature, as far as we know, an analytical method that allows the reliable, simple and routinely simultaneous determination of the main metabolites of environmental problematic pharmaceuticals and parabens. On this basis, the aim of this work was to develop a method, with the characteristics mentioned above, which could be used for monitoring the metabolites of some representative pharmaceuticals and parabens. Conventional SPE was selected for sample treatment as an easy-to-perform and affordable technique for sample enrichment and clean-up in order to reduce matrix effect and to prevent damage of the chromatographic column and LC-MS/MS was used in order to allow the clear identification of the target compounds at low detection and quantification limits. The parent compounds were selected considering their widespread usage and consumption (such as caffeine, diclofenac, ibuprofen, methylparaben and propylparaben), their poor removal in wastewater treatments and, as result, their wide distribution in environmental compartments (as carbamazepine) and their potential ecotoxicological risk (as carbamazepine and sulfamethoxazole). Target compounds and their physical-chemical properties and abbreviations are presented in Table S1 in the Electronic Supplementary Material (ESM). The optimized method was validated for its application to wastewater and tap water and was tested in real samples.

Experimental

Chemicals and reagents

HPLC-grade acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), acetone, hexane and water were supplied by Romil (Barcelona, Spain). Analytical-grade hydrochloric acid (37%) and formic acid (98%) were provided by Panreac (Barcelona, Spain). Analytical standards of methylparaben (MeP), methylprotocatechuate (OH-MeP), propylparaben (PrP), 3,4-dihydroxybenzoic acid (3,4-DHB), 4-hydroxybenzoic acid (4-HB), 1,3,7-trimethylxanthine (caffeine) (CAF), 1,7-dimethylxanthine (PX), carbamazepine (CBZ), 3-hydroxycarbamazepine (3-OH CBZ), 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine (10-OH CBZ), carbamazepine-10,11-epoxide (EP-CBZ), diclofenac (DIC), 4-hydroxydiclofenac (4-OH DIC), ibuprofen (IBU), 1-hydroxyibuprofen (1-OH IBU), 2-hydroxyibuprofen (2-OH IBU), carboxyibuprofen (CBX-IBU), sulfamethoxazole (SMX) and N⁴-acetylsulfamethoxazole (AcSMX) were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). 4-hydroxybenzoic acid-¹³C₇ (4-HB-¹³C₇), caffeine-¹³C₃ (CAF-¹³C₃), propyl-paraben-¹³C₆ (PrP-¹³C₆) and ibuprofen-d₃ (IBU-d₃) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) to be used as internal standards (I.S.). Individual stock standard solutions (500 µg mL⁻¹ or 1000 µg mL⁻¹) were prepared in MeOH and stored at –18 °C. Working solutions, of a mixture of the target compounds and of a mixture of the I. S., were prepared at 10 µg mL⁻¹, by dilution of the stock standard solutions in MeOH, and stored in amber glass bottles. Calibration standards were prepared in MeOH:water (1:1, v/v). Oasis HLB (60 mg/3 mL) solid-phase extraction (SPE) cartridges were supplied by Waters (Milford, MA, USA).

Sampling and sample treatment

Wastewater samples were collected from six urban wastewater treatment plants sited in Andalucía (South of Spain). Samples were collected as a mixture of the aliquots collected every hour by an automatic sample device operating during 24 h. Tap water samples were collected as grab samples using amber glass bottles. Water samples were filtered through 1.2-µm glass fibre membrane filters (Whatman, Maidstone, UK), adjusted to pH 5 by addition of 0.1 M hydrochloric acid and extracted using Oasis HLB cartridges. Cartridges were previously conditioned, passing through the cartridges by gravity, successive aliquots of 3 mL of acetone, 3 mL of MeOH and 3 mL of ultrapure water at pH = 5 (adjusted by addition of 0.1 M hydrochloric acid). Samples (250 mL) were percolated through the cartridges at a flow rate of 10 mL min⁻¹, using a vacuum manifold system (Waters, Milford, MA, USA) connected to a vacuum pump, and vacuum dried for

Table 1 MS/MS parameters applied to the determination of the metabolites and parent compounds

Compound	Ionization mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ions (MRM1/MRM2) (<i>m/z</i>)	Ion ratio	Fragmentor (V)	CE (V)	RT (min)
MeP	Negative	151.0	92.0/136.0	60.7	60	20/12	8.3
OH-MeP	Negative	167.0	108.0/152.0	22.3	100	20/12	6.4
PrP	Negative	179.1	92.0/136.0	30.8	60	24/12	14.2
3,4-DHB*	Negative	153.0	109.0	–	80	12	2.3
4-HB*	Negative	137.0	93.0/65.1	8.4	60	16/32	3.7
CAF	Positive	195.1	42.1/138.0	77.2	100	40/16	6.4
PX	Positive	181.1	124.0/42.1	45.7	80	20/40	4.6
CBZ	Positive	237.1	194.1/179.0	13.6	140	16/36	13.2
3-OH CBZ	Positive	253.1	210.1/167.0	18.5	120	16/40	11.4
10-OH CBZ	Positive	255.1	194.1/237.1	93.4	60	20/4	10.3
EP-CBZ	Positive	253.1	180.1/236.1	68.6	60	24/4	10.7
DIC	Positive	296.0	214.0/250.0	37.8	60	32/8	21.1
4-OH DIC	Positive	312.0	230.0/266.0	46.1	60	40/8	17.3
IBU	Positive	207.1	161.1/119.1	31.5	100	4/20	21.4
1-OH IBU	Negative	221.1	159.1/177.1	65.3	60	4/0	14.2
2-OH IBU	Negative	221.1	177.1	–	40	0	12.7
CBX-IBU	Negative	235.1	191.1/73.0	51.0	40	0/8	13.2
SMX	Positive	254.1	92.1/65.0	58.2	80	28/40	6.8
AcSMX	Positive	296.1	65.0/134.0	68.6	60	40/20	9.2
4-HB- ¹³ C ₇	Negative	144.1	99.1/70.1	9.2	60	16/36	3.7
CAF- ¹³ C ₃	Positive	198.2	140.0/43.1	92.1	100	20/36	6.4
PrP- ¹³ C ₆	Negative	185.2	142/89	19.8	100	12/24	14.2
IBU-d ₃	Positive	210.3	164.1/122.1	26.0	40	4/20	21.4

CE, collision energy; RT, retention time; parent compounds are marked in italic. MRM1 were used for quantification; MRM2 were used for confirmation

*Metabolites of MeP and PrP

2 min. Then, the cartridges were washed with 3 mL of hexane and vacuum dried for 2 min. Target compounds were eluted by gravity with three successive aliquots of 1 mL of acetone. The eluates were collected in glass tubes and evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream in an XcelVap® automated evaporation/concentration system (Horizon Technology, Salem, New Hampshire, USA). Extracts were reconstituted in 0.25 mL of MeOH:water (1:1, v/v), filtered through a 0.22- μ m syringe filter and injected (10 μ L) into the LC-MS/MS system.

Instrumental analysis

An Agilent 1200 series HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to a 6410 triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer (MS) equipped with an electrospray ionization source was used for chromatographic determination. The LC system includes a vacuum degasser, a binary pump, an autosampler and a thermostatically controlled column compartment. Chromatographic separation was

carried out on a Kinetex Polar C18 (50 mm \times 3.0 mm i.d., 2.6- μ m particle size) (Phenomenex, Torrance CA) column protected with a C18 guard column (Phenomenex, Torrance CA) and thermostated at 35 °C. Mobile phase was composed of water (containing formic acid 0.1%, v/v) (solvent A) and MeOH (containing formic acid 0.1%, v/v) (solvent B). Chromatographic elution was carried out at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ by linear increase of solvent B from 2% to 38% in 9.5 min (held for 2.5 min), increased to 50% in 3.5 min (held 2.5 min) and increased to 98% in 4 min (held for 1 min). Back to initial conditions was carried out by linear decrease of solvent B from 98 to 2% in 2 min (held for 5 min for equilibration). The total run time was 30 min. MS parameters were as follows: capillary voltage, 4000 V; drying gas flow rate, 9 L min⁻¹; drying gas temperature, 350 °C; and nebuliser pressure, 40 psi. Instrument control and data acquisition were carried out with MassHunter software (Agilent, USA). The LC-MS/MS parameters for each compound are given in Table 1.

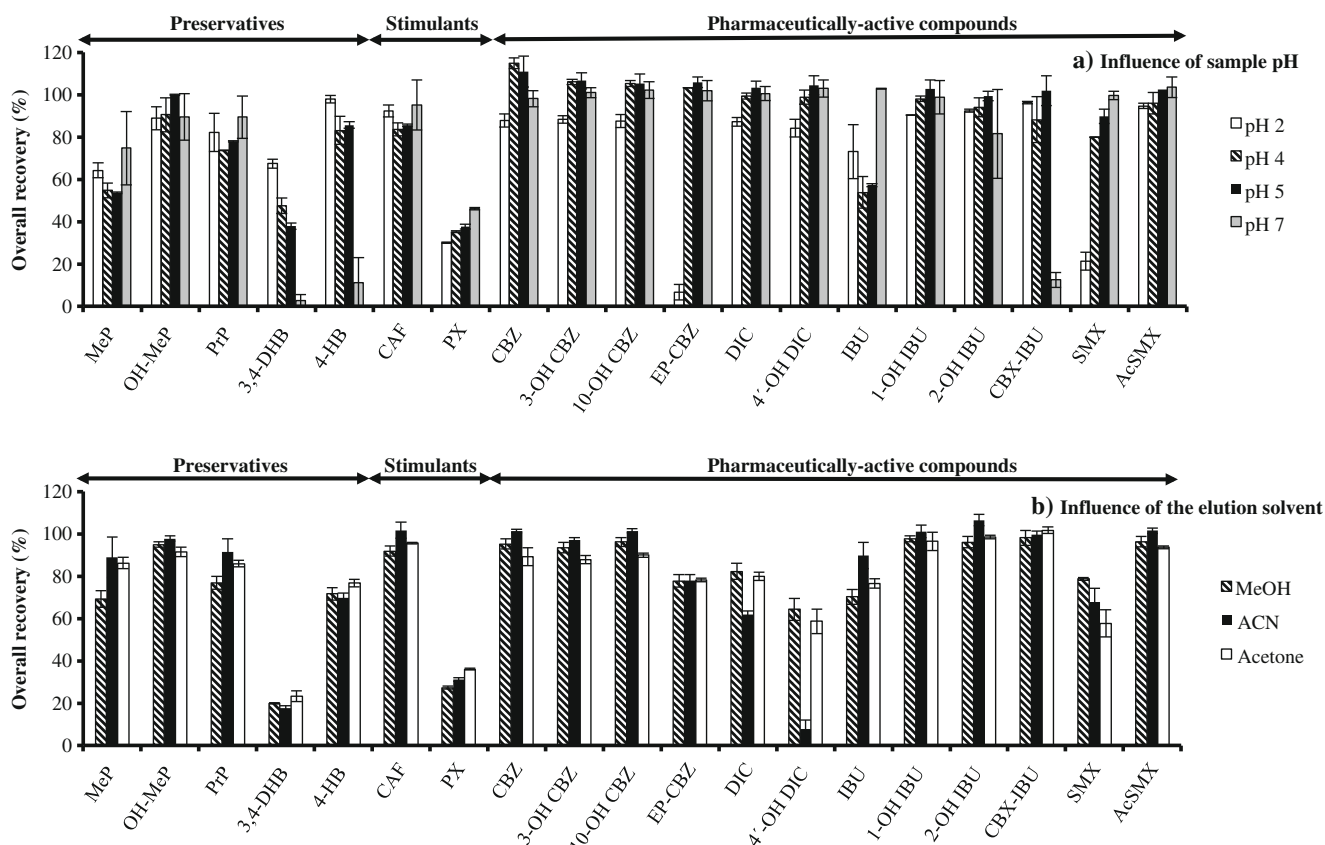


Fig. 1 Influence of sample pH (a) and elution solvent (b) in SPE

Method validation

The optimized method was validated in terms of linearity, recovery, accuracy, precision, method detection limits (MDL) and method quantitation limits (MQL). Non-spiked samples and procedural blanks were simultaneously processed for blank correction. Matrix effect was also evaluated by comparison of the slopes of seven-point calibration curves constructed with standards in the range from 10 to 500 ng L⁻¹ prepared in MeOH:water (1:1, v/v) (external calibration curves) and in sample extract (matrix-matched calibration curves). Matrix effect was quantified by comparison of the area of the target compound in matrix extract (A_{extract}) and in MeOH:water (1:1, v/v) (A_{standard}) at low, medium and high concentration levels. Matrix effect (ME) was calculated as follows: $ME (\%) = (A_{\text{extract}} - A_{\text{blank}} - A_{\text{standard}}) / A_{\text{standard}} \times 100$ where A_{blank} is the peak area obtained in non-spiked extract.

Recovery, accuracy and inter-day precision were evaluated by samples spiked in triplicate at three concentration levels. Recoveries were determined by comparison of the peak area obtained from the spiked samples, after blank correction, with that of a spiked extract. Accuracy was calculated by comparison of the concentration

obtained from spiked samples with the spike concentration. Inter-day precision was calculated as the relative standard deviation obtained from spiked samples analysed in three separate days. Method detection limits (MDL) and method quantitation limits (MQL) were calculated from matrix-matched calibration standards corresponding to signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively, and taking into account analyte recovery and enrichment factor (EF = 1000) achieved in sample treatment. Linearity was evaluated in the range from MQL to 500 ng L⁻¹ from seven-point matrix-matched calibration curves.

Results and discussion

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry optimization

Three aqueous solutions (formic acid 0.1%, v/v, ammonium acetate 10 mM and ammonium formate 10 mM) and two organic solvents (MeOH and ACN) were tested as mobile phases. Ammonium acetate and ammonium formate provided good results for most of the compounds except for 3,4-DHB, 4-HB and CA-IBU that were better ionized when formic acid

Table 2 Mean matrix effect (ME) and recovery (%), method detection limits (MDL) and method quantitation limits (MQL) of the proposed method in the studied sample matrices

Compound	Wastewater				Tap water			
	ME (%)	R (%)	MDL (ng L ⁻¹)	MQL (ng L ⁻¹)	ME (%)	R (%)	MDL (ng L ⁻¹)	MQL (ng L ⁻¹)
MeP	-31	86	0.4	1.3	-30	83	2.1	7.0
OH-MeP	-70	109	5.0	17	-20	59	4.0	13
PrP	-82	108	4.3	14	-19	98	1.6	5.3
3,4-DHB	12	55	10	33	-5.2	37	8.3	28
4-HB	26	80	7.6	25	4.1	101	4.9	16
CAF	-40	94	5.0	17	15	100	2.9	9.5
PX	-27	24	6.5	22	16	57	2.0	6.6
CBZ	-68	99	0.3	1.0	-11	97	0.7	2.2
3-OH CBZ	-69	98	3.4	11	-3.3	96	0.2	0.5
10-OH CBZ	-60	100	0.6	2.2	30	98	0.2	0.5
EP-CBZ	-68	96	1.6	5.4	8.3	89	0.2	0.5
DIC	-76	109	0.3	1.0	-34	99	0.1	0.5
4-OH DIC	-79	105	1.6	5.3	-27	87	0.2	0.6
IBU	-72	110	4.1	14	-21	100	3.2	11
1-OH IBU	-54	88	7.4	25	-10	104	5.8	19
2-OH IBU	-47	107	5.4	18	-19	110	7.6	25
CBX-IBU	-40	83	7.6	25	-16	103	6.1	20
SMX	-79	98	3.4	11	6.0	78	0.7	2.4
AcSMX	-76	98	3.4	11	-3.3	98	1.6	5.4

0.1%, v/v was used. Therefore, water containing formic acid 0.1%, v/v was selected as aqueous mobile phase. MeOH and ACN, both containing formic acid 0.1%, v/v, were tested as organic mobile phases. Similar results were obtained. MeOH was selected because it is cheaper, less toxic and more environmentally friendly than ACN [26]. Therefore, MeOH and water, both containing formic acid 0.1% (v/v) were selected as mobile phases.

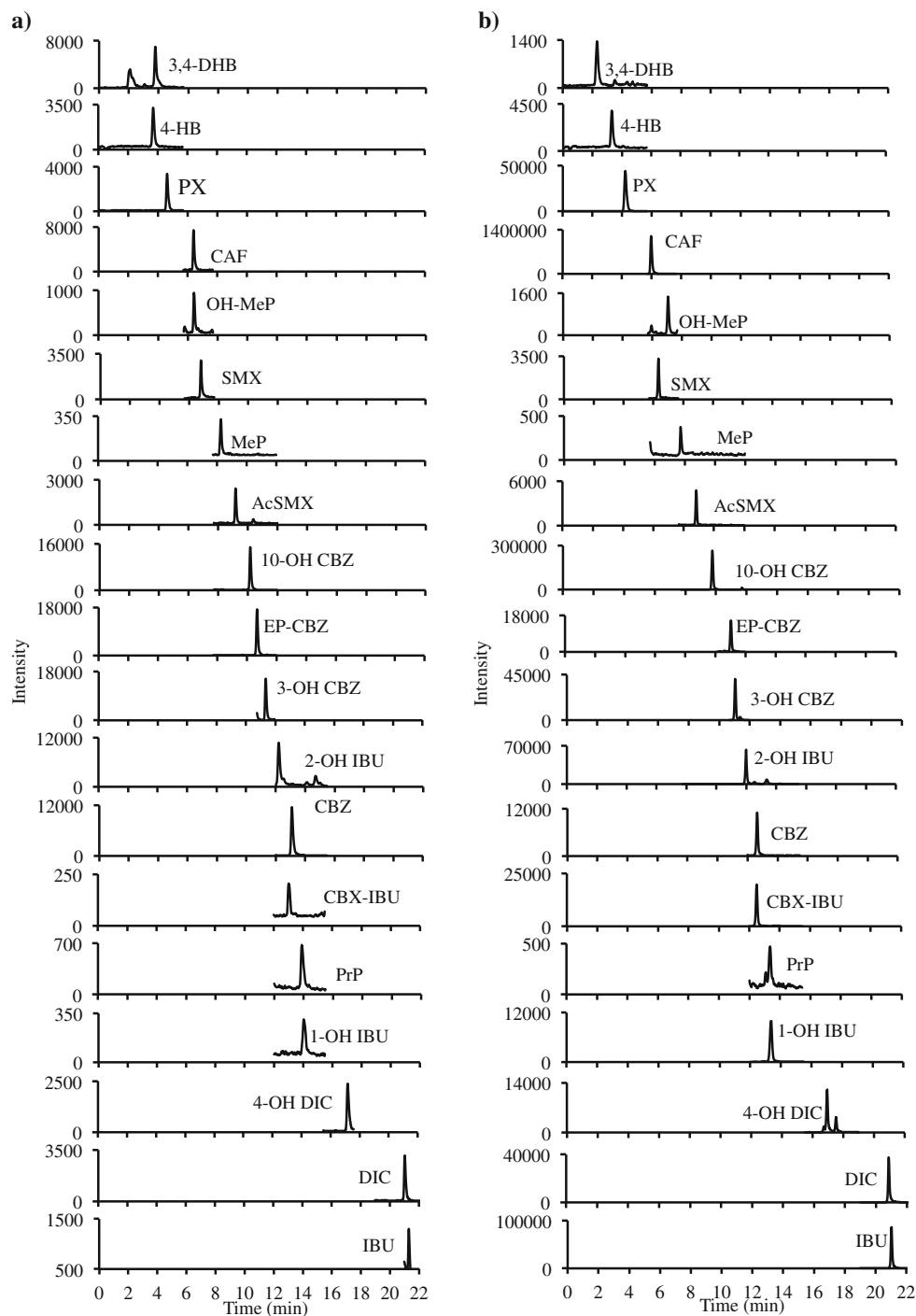
LC-MS/MS parameters were optimized by direct injection of individual standard solutions at 10 mg L⁻¹ in MeOH at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. The optimal MS/MS conditions are shown in Table 1. Precursor ions corresponded to the molecular ions after protonation or deprotonation, depending on the ionization mode. The analyses were carried out using multiple reaction-monitoring mode (MRM). The two most abundant transitions were selected. The most abundant (MRM1) was selected for quantification. The other transition (MRM2) and ion ratio were used for confirmation according to Commission Decision 2002/657/EC [27]. For 2-OH IBU and 3,4-DHB, just one product ion could be obtained. This fact has been previously reported [18, 24]. In the case of 2-OH IBU, it was explained by resonance stabilization of the aromatic ring due to the position of the hydroxyl group in the aromatic ring [18]. The hydroxylated metabolites of IBU (1-OH IBU and 2-OH IBU) were differentiated by their retention times and MRM2 of 1-OH IBU.

Optimization of the extraction procedure

The type of washing and elution solvents and sample pH were evaluated. All the experiments were carried out in triplicate by means of deionized water samples (250 mL) spiked at 1 µg L⁻¹. The influence of sample pH was evaluated at pH 2, 4, 5 and 7 using Oasis HLB cartridges and MeOH as elution solvent. As can be seen in Fig. 1, most of the compounds, except EP-CBZ and SMX, were better extracted at acidic pH than at neutral pH. In addition, the extraction recoveries of some of the acidic compounds such as 3,4-DHB, 4-HB and CBX-IBU, decreased to 5–10% when water samples were not acidified. The best overall recoveries, for most of the target compounds, were achieved at pH = 5. Therefore, acidification of sample to pH 5 was selected for further studies.

Three polar (MeOH, ACN and acetone) and a non-polar (hexane) solvents were tested for elution and removing the target and interfering compounds, respectively, from the SPE cartridges. Three consecutive aliquots of 1 mL of each tested solvent were passed through the cartridges in elution step. For most of the compounds, similar extraction efficiencies were achieved with MeOH, ACN and acetone (Fig. 1b). None of the target compounds were extracted using hexane as elution solvent (recoveries lower than 5%). However, hexane removes

Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms of a 100 ng L⁻¹ matrix-matched calibration standard (a) and a real wastewater sample (b)



lipophilic matrix components. For that reason, it was selected as rinsing solvent to remove non-polar matrix compounds retained in the cartridges. ACN was discarded as elution solvent because of the poor recoveries obtained for DIC and 4'-OH DIC. Acetone was selected as elution solvent because of its higher volatility, in comparison to MeOH, which eases its evaporation to dryness.

Method validation

Student's *t* test, at 95% of confidence, revealed that curve slopes of matrix-matched calibration curves and external calibration curves were statistically different. In Table S2 in ESM, it can be seen that *t* values were higher than 2 for all compounds and sample matrixes, revealing the existence of

Table 3 Accuracy (A (%)), and precision, expressed as relative standard deviation (%RSD), for wastewater and tap water

Compound	Wastewater						Tap water					
	10/20/50 ng L ⁻¹		100 ng L ⁻¹		250 ng L ⁻¹		10/20/50 ng L ⁻¹		100 ng L ⁻¹		250 ng L ⁻¹	
	A (%)	RSD (%)	A (%)	RSD (%)	A (%)	RSD (%)	A (%)	RSD (%)	A (%)	RSD (%)	A (%)	RSD (%)
MeP	120 ^a	14 ^a	96	3	105	7	120 ^a	4 ^a	92	6	101	5
OH-MeP	102 ^c	2 ^c	83	5	82	13	101 ^c	3 ^c	114	7	112	3
PrP	114 ^b	1 ^b	99	13	108	1	58 ^a	20 ^a	96	6	101	1
3,4-DHB	71 ^c	15 ^c	79	4	81	19	105 ^c	13 ^c	118	16	111	8
4-HB	80 ^c	21 ^c	66	14	119	12	100 ^c	4 ^c	89	0.5	102	14
CAF	99 ^b	5 ^b	103	11	103	7	110 ^a	6 ^a	103	5	107	3
PX	68 ^c	5 ^c	72	1	91	1	96 ^a	4 ^a	97	2	100	0.2
CBZ	104 ^a	2 ^a	92	4	105	1	89 ^a	10 ^a	102	3	100	2
3-OH CBZ	90 ^a	12 ^a	104	3	104	4	93 ^a	11 ^a	101	3	100	4
10-OH CBZ	94 ^a	3 ^a	101	4	107	2	94 ^a	6 ^a	102	2	100	3
EP-CBZ	95 ^a	3 ^a	100	6	100	3	92 ^a	14 ^a	102	11	100	9
DIC	110 ^a	3 ^a	117	3	115	11	95 ^a	7 ^a	91	13	101	3
4-OH DIC	105 ^a	4 ^a	108	4	115	10	109 ^a	6 ^a	86	9	103	1
IBU	108 ^b	11 ^b	113	11	116	11	102 ^a	11 ^a	96	3	100	18
1-OH IBU	96 ^c	11 ^c	87	6	98	6	100 ^c	13 ^c	93	8	101	1
2-OH IBU	117 ^c	2 ^c	119	10	95	2	99 ^c	7 ^c	94	1	101	1
CBX-IBU	104 ^c	10 ^c	108	14	104	5	100 ^c	2 ^c	100	5	100	0.2
SMX	111 ^a	5 ^a	109	0.2	114	4	101 ^a	15 ^a	97	7	101	19
AcSMX	84 ^a	7 ^a	118	5	119	4	94 ^a	15 ^a	98	4	100	0.1

^a 10 ng L⁻¹; ^b 20 ng L⁻¹; ^c 50 ng L⁻¹

matrix effect. The highest differences between curve slopes were obtained for wastewater calibration curves. Quantitative values of matrix effect (ME) at low, medium and high concentration levels are shown in Table S3 in ESM. Most of the target compounds were affected by signal suppression, except 3,4-DHB and 4-HB (Table 2). CRB, DIC, SMX and their metabolites, as well as OH-MeP, PrP and IBU, were highly affected by the matrix in wastewater samples (higher than 60%), while others such as MeP and PX showed signal suppression close to 30%. Considering tap water, lower ME was observed for all target compounds (from -34.3% (DIC) to 30.3% (10-OH-CRB)). In order to correct this ME, four isotopically labelled compounds (4-HB-¹³C₇, CAF-¹³C₃, PrP-¹³C₆ and IBU-d₃) were tested as internal standards (Table 1). Signal suppression of some compounds was corrected but most of them were still affected by signal suppression (data not shown). Therefore, internal standards were not used for signal correction. Instead, matrix-matched calibration curves were used for quantification as reported by other authors [28]. Quantification was carried out by means of matrix-matched calibration curves and taking into account recovery and the enrichment factor achieved in SPE treatment (EF = 1000).

Mean recoveries were in the range from 55 to 110% for wastewater and from 57 to 110% for tap water, except in the case of PX in wastewater (24%) and 3,4-DHB in tap water (37%) (Table 2). Recoveries at low, medium and high concentration levels are shown in Table S3 in ESM.

MDL values were in the range from 0.3 to 10 ng L⁻¹, for wastewater, and in the range from 0.14 to 8.3 ng L⁻¹, for tap water. MQL values were in the ranges from 1.0 to 33 ng L⁻¹ in wastewater and from 0.5 to 28 ng L⁻¹ in tap water.

Calibration curves were linear in the range from MQL to 500 ng L⁻¹ with correlation coefficients equal or higher than 0.990 for all the compounds in both wastewater and tap water matrices (Table S2 in ESM). The chromatogram corresponding to the 100 ng L⁻¹ matrix-matched calibration standard can be seen in Fig. 2a. Accuracy values in wastewater were in the range from 66% (4-HB) to 120% (MeP) in wastewater and in the range from 86% (4-OH DIC) to 120 (MeP), except for PrP (58% at low spike level) in tap water (Table 3). Precision was lower than 15% for most of the compounds and spike levels in both wastewater and tap water matrices.

In Table 4, extraction conditions and analytical performance of the proposed method are compared with that of the scarce methods reported for the determination of metabolites

Table 4 Summary of analytical methods published in the last 10 years for the determination of metabolites of pharmaceutical compounds and parabens and their parent compounds

Compound	Sample	Sample volume (mL)	Extraction				Recovery (%)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	Reference	
			Technique	Sample pH	Clean-up solvent	Elution solvent					Elution solvent volume (mL)
CBZ, DIOH-CBZ, 2-OH-CBZ, 10-OH-CBZ, EPO-CBZ, 3-OH-CBZ, Ox-CBZ	Wastewater	100–5000	SPE	–	–	Acetone:ethylacetate (1/1, v/v)	9	46–125	–	30–200	[14]
CBZ, EPO-CBZ, DIOH-CBZ, 2-OH-CBZ, 10-OH-CBZ	Wastewater and groundwater	–	SPE	–	–	Ethyl acetate	10	77–96	1.8–10	5.0–20	[13, 16]
IBU, 1-OH-IBU, 2-OH-IBU, CBX-IBU	Wastewater, surface water	50	SPE	4.5	HPLC water	Methanol	6	41–193	0.7–23	2.4–78	[18]
Clofibric acid, omeprazole, 4-OH omeprazole sulfide, 5-OH omeprazole, CBZ, EPO-CBZ, DIOH-CBZ, SMX, AcSMX, clopidogrel, clopidogrel carboxylic acid, 4-amino antipyrine, 4-formylamino antipyrine, 4-acetamido antipyrine, clarithromycin, N-desmethyl clarithromycin, enalapril, enalaprilat, losartan, losartan carboxylic acid, fenofibric acid	Wastewater, surface water	50	SPE	–	–	Methanol	5	53–215	–	0.4–24	[29]
CAF, theobromine, theophylline, PX, 1-methylxanthine, 3-methylxanthine, 7-methylxanthine, xanthine	Wastewater	50–200	SPE	3	Ultrapure water pH 3 Acetate buffer pH 4.5	Methanol Methanol:ammonia (95:5)	5 5	60–83	–	–	[20]
CBZ, CBZ N-Glucuronide, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, 10-OH-CBZ, DIOH-CBZ, EPO-CBZ	Wastewater	10000	SPE	7	Ultrapure water	Methanol	5	79–96	–	10–50	[15]
84 precursors and 70 metabolites/transformation products	Wastewater and surface water	0.08	Direct injection	–	–	–	–	50–170	–	0.5–200	[25]
MeP, ethylparaben, PrP, buthylparaben, heptylparaben, benzylparaben, 4-HB, 3,4-DHB, OH-MeP, ethyl protocatechuete and benzoic acid	Wastewater	50	SPE	–	–	Methanol	10	74–102	10–5000	100–50000	[24]
Ketoprofen, naproxen, DIC, IBU, 4-OH-DIC, 5-OH-DIC, CBX-DIC, dihydroketoprofen, 1-OH IBU, 2-OH IBU, CBX-IBU	Wastewater	50	Hollow fibre liquid phase microextraction	–	–	0.1 M ammonium carbonate solution at pH 9	2	–	7000–89300	23600–297400	[23]
Cotinine, nicotine, trans-3-hydroxycotinine, CAF, 1,7-dimethylxanthine, 1-methylxanthine, 7-methylxanthine	Wastewater	3	SPE	6.0–7.5	–	Methanol	2	64–89	–	0.43–28.5	[7]

Table 4 (continued)

Compound	Sample	Sample volume (mL)	Extraction Technique	Sample pH	Clean-up solvent	Elution solvent	Elution solvent volume (mL)	Recovery (%)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	Reference
DIC, 5-OH DIC, 4-OH DIC, 4'-hydroxy diclofenac dehydrate	Wastewater	250	SPE	6.3	Water	Methanol	10	62–81	60–70	60–70	[17]
MeP, OH-MeP, PrP, 3,4-DHB, 4-HB, CAF, PX, CBZ, 3-OH CBR, 10-OH CBZ, EP-CBZ, DIC, 4-OH DIC, IBU, 1-OH IBU, 2-OH IBU, CBX-IBU, SMX, AcSMX	Wastewater, tap water	250	SPE	5	Hexane	Acetone	3	37–110	0.3–10	0.5–28	Proposed method

Table 5 Concentrations of the target compounds in raw wastewater samples

Compound	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6
MeP	0.13	0.14	0.082	0.014	0.38	0.72
OH-MeP	0.018	<MDL	<MDL	<MQL	<MQL	<MQL
PrP	0.21	0.20	0.29	0.15	0.36	0.49
3,4-DHB (*)	9.26	4.56	5.13	5.60	0.70	0.86
4-HB (*)	32.6	6.80	3.4	8.34	<MQL	0.12
CAF	20.2	16.8	17.3	16.6	23.2	20.5
PX	10.7	8.7	8.5	6.9	10.1	10.3
CBZ	0.09	0.07	0.06	0.06	0.04	0.05
3-OH CBZ	0.19	0.16	0.15	0.14	0.13	0.14
10-OH CBZ	2.39	1.88	1.37	1.41	2.42	2.47
EP-CBZ	0.56	0.43	0.35	0.36	0.51	0.52
DIC	0.59	0.72	0.58	0.61	0.70	0.81
4-OH DIC	0.72	0.61	0.47	0.52	0.57	0.59
IBU	15.4	18.3	16.3	17.2	23.2	21.5
1-OH IBU	9.73	8.71	7.75	7.62	9.40	9.29
2-OH IBU	3.29	3.33	3.41	2.68	4.92	4.89
CBX-IBU	68.1	59.4	52.4	55.3	44.0	33.1
SMX	1.33	0.75	0.64	0.77	0.86	1.18
AcSMX	1.70	1.57	1.08	0.93	1.41	1.54

<MDL: lower than method detection limits

<MQL: lower than method quantitation limits

of pharmaceuticals or metabolites of parabens in water samples. It should be pointed out that to our knowledge, no analytical method has been reported yet for the simultaneous determination of metabolites of both pharmaceuticals and parabens. The proposed method has been optimized for the determination of metabolites of pharmaceuticals and parabens, which, as mentioned in method optimization section, implies the selection of compromise extraction conditions (sample pH, type of SPE washing and elution solvents) for their simultaneous extraction. In spite of that fact, extraction recoveries achieved in the proposed method are similar to those of other SPE analytical methods optimized for the determination of metabolites of just one compound [13, 14, 16] and using higher volumes of elution solvents [13, 14, 16, 17, 24].

MDL and MQL values were lower than those previously reported for the selected compounds [14, 17, 23–25]. Only some of the methods reported in the literature showed similar MDL and MQL values (Table 4). However, these methods were developed for the determination of just one compound and their metabolites as CBZ [13, 15, 16], IBU [18] or CAF [7]. Moreover, the proposed method requires a lower volume of elution solvent methods, just 3 mL of acetone, which reduces analysis cost and sample treatment by easing the

evaporation to dryness of the extract due to the volatility of acetone and its low volume.

Method application

The method was applied to raw wastewater from six urban wastewater treatment plants and to tap water. None of the target compounds was detected in tap water but all of them were detected in wastewater samples. The concentrations in wastewater samples are shown in Table 5. The chromatogram corresponding to sample S1 is shown in Fig. 2b. The concentrations of some of the metabolites were similar (3-OH CBZ, EP-CBZ, 4-OH DIC and AcSMX) or even higher (3,4-DHB, 4-HB, 10-OH CBZ and CBX-IBU) than those of their parent compounds. Metabolites of parabens (3,4-DHB and 4-HB) were found at concentrations up to 55 times higher than those of their parent compounds which is consistent with the data reported by Wang et al. [9] in the first study about parabens and their metabolites in wastewater. Their monitoring in wastewater can provide information about human exposition to parabens that have been reported to be endocrine-disrupting compounds. The main metabolite of CAF, it is PX, was detected at concentrations in the range from 6.9 to 11 $\mu\text{g L}^{-1}$. The concentration rate CAF/PX is similar to that reported by Senta et al. [7] in wastewater from Italy although concentrations measured in Italy were up to three times higher than those measured in this work. The monitoring of this compound can be useful to establish consumption patterns of caffeine, mainly through coffee ingestion and, in a lower extent, as component of some pharmaceutical preparations. The concentrations of the metabolites of the pharmaceutical compounds were similar or even up to 4.5 to 24 times higher (CBX-IBU and 10-OH CBX) than those of the parent compound.

Conclusions

An analytical method for the determination of two parabens, five pharmaceutical compounds and 12 of their main metabolites has been developed and validated for its application to wastewater and tap water samples. The method is based on simultaneous extraction by SPE and analytical determination by LC-MS/MS. To our knowledge, the proposed method allows the first-time simultaneous determination of metabolites of two of the most relevant groups of emerging concern pollutants, parabens and pharmaceuticals. The applicability of the method was demonstrated by the analysis of several wastewater and tap water samples. None of the target compounds was detected in tap water samples whereas all of them were detected in wastewater at concentrations up to 68 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CBX-IBU). The concentrations of the metabolites were similar or even higher than the parent compound. The application of the

method to wastewater can provide information about consumption patterns of pharmaceuticals and caffeine and about human exposure to parabens. The application of the method to tap water can be used to obtain information about human exposure to the target compounds via diet. Moreover, the proposed method can be applied to evaluate the removal of the target compounds in wastewater and drinking water treatment plants and to improve environmental risk assessment by considering not only the parent compounds but also their metabolites that can have similar environmental effects or can be transformed to the parent compounds once released into the environment.

Funding information This work was financially supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project No. CTM2017-82778-R). J.L. Malvar acknowledges the predoctoral grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FPU17/00368) and from the University of Seville (VIPIT-2018-IL2).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Błędzka D, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ Int.* 2014;67:27–42.
2. Haman C, Dauchy X, Rosin C, Munoz J. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environment: a review. *Water Res.* 2015;68:1–11.
3. Miller TH, Bury NR, Owen SF, MacRae JI, Barron LP. A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environ Pollut.* 2018;239:129–46.
4. Tröger R, Klöckner P, Ahrens L, Wiberg K. Micropollutants in drinking water from source to tap – method development and application of a multiresidue screening method. *Sci Total Environ.* 2018;627:1404–32.
5. López-Serna R, Petrović M, Barceló D. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Sci Total Environ.* 2012;440:280.
6. Lai FY, Ort C, Gartner C, Carter S, Pricahard J, Kirkbride P, et al. Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis: co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment. *Water Res.* 2011;45:4437–48.
7. Senta I, Gracia-Lor E, Borsotti A, Zucatto E, Castiglioni S. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water Res.* 2015;74:23–33.
8. Daughton CG. Monitoring wastewater for assessing community health: sewage chemical-information mining (SCIM). *Sci Total Environ.* 2018;619–620:748–64.
9. Wang W, Kannan K. Fate of parabens and their metabolites in two wastewater treatment plants in New York State, United States. *Environ Sci Technol.* 2016;50:1174–81.
10. Wild CO. Complementing the genome with an “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2005;14:1847–50.

11. Evgenidou EN, Konstantinou IK, Lambropoulou DA. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review. *Sci Total Environ.* 2015;505:905–26.
12. Yin L, Wang B, Yuan H, Deng S, Huang J, Wang Y, et al. Pay special attention to the transformation products of PPCPs in environment. *Emerg Contam.* 2017;3:69–75.
13. Fenet H, Mathieu O, Mahjoub O, Li Z, Hillaire-Buys D, Casellas C, et al. Carbamazepine, carbamazepine epoxide and dihydroxycarbamazepine sorption to soil and occurrence in a wastewater reuse site in Tunisia. *Chemosphere.* 2012;88:49–54.
14. Bahlman A, Brack W, Schneider RJ, Krauss M. Carbamazepine and its metabolites in wastewater: analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal. *Water Res.* 2014;57:104–14.
15. He K, Yonetani T, Asada Y. Simultaneous determination of carbamazepine-N-glucuronide and carbamazepine phase I metabolites in the wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchem J.* 2019;145:1191–8.
16. Leclercq M, Mathieu O, Gomez E, Casellas C, Fenet H, Hillaire-Buys D. Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2008;56:408–15.
17. Stülten D, Zühlke S, Lamshöft M, Spiteller M. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Sci Total Environ.* 2008;405:310–6.
18. Ferrando-Climent L, Collado N, Buttiglieri G, Gros M, Rodríguez-Roda I, Rodríguez-Mozaz S, et al. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Sci Total Environ.* 2012;438:404–13.
19. Boix C, Ibáñez M, Zamora T, Sancho JV, Niessen WMA, Hernández F. Identification of new omeprazole metabolites in wastewaters and surface waters. *Sci Total Environ.* 2014;468:469:706–14.
20. He K, Echigo S, Asada Y, Itoh S. Determination of caffeine and its metabolites in wastewater treatment plants using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Sci.* 2018;34:349–54.
21. Krizman-Matasic I, Kostanjevecki P, Ahel M, Terzic S. Simultaneous analysis of opioid analgesics and their metabolites in municipal wastewaters and river water by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2018;1533:102–11.
22. González Alonso S, Catalá M, Romo R, Rodríguez JL, Gil de Miguel A, Valcárcel Y. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ Int.* 2010;36:195–201.
23. Larsson E, Al-Hamimi S, Jönsson JA. Behaviour of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and eight of their metabolites during wastewater treatment studied by hollow fibre liquid phase microextraction and liquid chromatography mass spectrometry. *Sci Total Environ.* 2014;485-486:300–8.
24. Karthikraj R, Vasu AK, Balakrishna K, Sinha RK, Kannan K. Occurrence and fate of parabens and their metabolites in five sewage treatment plants in India. *Sci Total Environ.* 2017;593-594:592–8.
25. Hermes N, Jewell KS, Wick A, Ternes TA. Quantification of more than 150 micropollutants including transformation products in aqueous samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using scheduled multiple reaction monitoring. *J Chromatogr A.* 2018;1531:64–73.
26. Capello C, Fischer U, Hungerbühler K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chem.* 2007;9:927–34.
27. Commission Decision 2002/657/EC of August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Commun L221,* 8–36.
28. Arbeláez P, Borrull F, Marcé RM, Pocurull E. Trace-level determination of sweeteners in sewage sludge using selective pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2015;1408:15–21.
29. Gracia-Lor E, Ibáñez M, Zamora T, Sancho JV, Hernández F. Investigation of pharmaceutical metabolites in environmental waters by LC-MS/MS. *Environ Sci Pollut Res.* 2014;21:5496–510.

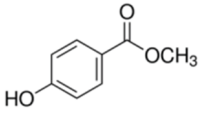
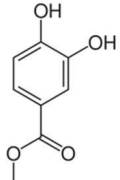
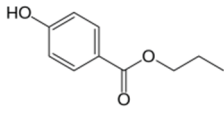
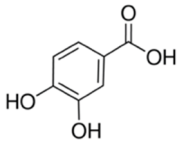
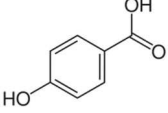
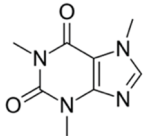
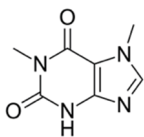
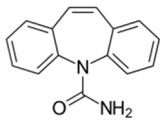
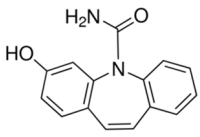
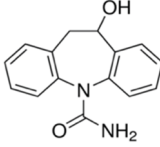
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

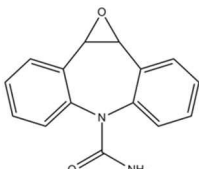
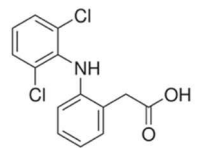
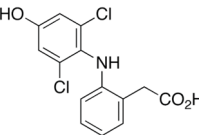
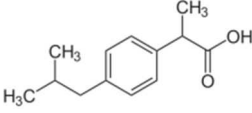
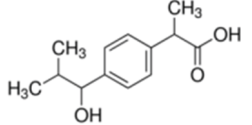
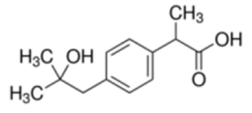
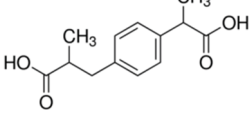
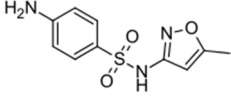
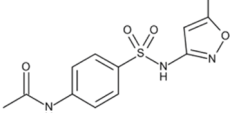
Electronic Supplementary Material

Routine analytical method for monitoring the main metabolites for a recurrent group of parabens and pharmaceuticals in wastewater and tap water

José Luis Malvar, Juan Luis Santos, Julia Martín, Irene Aparicio, Esteban Alonso

Table S1 Physical-chemical properties of the target compounds

Group	Compound	Molecular weight	pKa	Log Kow	Structure
Parabens	Methylparaben (MeP)	152.15	8.17 ^a	1.96 ^b	
	Methyl protocatechuate (OH-MeP)	168.15	8.19	0.87 ^b	
	Propylparaben (PrP)	180.20	8.35 ^a	2.97 ^b	
	3,4-dihydroxybenzoic acid (3,4-DHB)*	154.12	4.16 ^c	0.91 ^b	
	4-hydroxybenzoic acid (4-HB)*	138.12	2.7 ^a	1.39 ^b	
Caffeine	1,3,7-trimethylxanthine (caffeine) (CAF)	194.19	10.4 ^d	-0.1 ^e	
	1,7-dimethylxanthine (PX)	180.16	8.5 ^d	-0.2 ^e	
Antiepileptic drug	Carbamazepine (CBZ)	236.27	13.9 ^d	2.5 ^e	
	3-Hydroxycarbamazepine (3-OH-CBZ)	252.27	9.19 ^f	2.41 ^g	
	10,11-Dihydro-10-hydroxycarbamazepine (10-OH-CBZ)	254.28	12.8 ^g	0.93 ^h	

	Carbamazepine-10,11-epoxide (EP-CBZ)	252.27	16.0 ^g	1.0 ^e	
Antiinflammatory drug	Diclofenac (DIC)	295.15	4.2 ^e	4.5 ^e	
	4-Hydroxydiclofenac (4-OH-DIC)	312.15	4.17 ⁱ	3.97 ⁱ	
	Ibuprofen (IBU)	206.28	4.9 ^e	4.0 ^e	
	1-Hydroxyibuprofen (1-OH IBU)	222.28	4.55 ^j	2.69 ^j	
	2-Hydroxyibuprofen (2-OH IBU)	222.28	4.63 ^j	2.37 ^j	
	Carboxyibuprofen (CBX-IBU)	236.26	3.97 ^j	2.78 ^j	
Antibiotic	Sulfamethoxazole (SMX)	253.28	5.7 ^e	0.9 ^e	
	N ⁴ -Acetylsulfamethoxazole (AcSMX)	295.31	5.54 ^k	1.18 ^k	

Parent compounds are marked in bold; Abbreviations are written in brackets; *Metabolites of MeP and PrP.

^aHaman et al. 2015 [1]; ^bWang et al. 2016 [2]; ^cChemAxon; ^dRosal et al. 2010 [3]; ^eMuñoz et al. 2008 [4]; ^fLee et al. 2011 [5]; ^gHuntscha et al. 2012 [6]; ^hMiao et al. 2005 [7]; ⁱRossini et al. 2016 [8]; ^jFerrando-Climent et al. 2012 [9]; ^kBaumer et al. 2017 [10].

Table S2 Curve slopes (b), standard deviation of curve slopes (S) and correlation coefficients (r^2) of matrix-matched calibration curves

Compound	Wastewater				Tap water			
	b (L ng ⁻¹)	S _b (L ng ⁻¹)	t _{Student}	r ²	b (L ng ⁻¹)	S _b (L ng ⁻¹)	t _{Student}	r ²
MeP	4.86E-02	4.78E-03	2.0	0.9910	1.43E-01	2.35E-03	10.5	0.9973
OH-MeP	7.99E-02	1.57E-03	34.9	0.9949	1.81E-01	5.49E-03	2.4	0.9909
PrP	8.05E-02	1.98E-03	67.8	0.9958	3.96E-01	3.49E-03	4.0	0.9992
3,4-DHB	9.08E-02	1.74E-03	1.9	0.9974	1.26E-01	4.54E-03	4.0	0.9910
4-HB	2.03E-01	4.51E-03	1.6	0.9951	2.29E-01	5.03E-03	1.5	0.9952
CAF	2.58E-01	7.98E-03	36.5	0.9980	7.97E-01	1.47E-02	1.0	0.9966
PX	2.56E-01	3.76E-03	6.4	0.9972	4.31E-01	2.27E-03	5.8	0.9996
CBZ	1.13E+00	1.28E-02	64.1	0.9987	4.19E+00	3.39E-02	0.6	0.9989
3-OH CBZ	1.26E+00	1.40E-02	54.0	0.9988	4.24E+00	8.72E-03	2.5	0.9999
10-OH CBZ	1.20E+00	1.42E-02	43.1	0.9978	4.15E+00	1.29E-02	10.4	0.9998
EP-CBZ	1.45E+00	1.78E-02	46.3	0.9980	5.47E+00	1.51E-02	5.3	0.9998
DIC	2.17E-01	2.45E-03	157.8	0.9976	1.05E+00	9.73E-03	9.6	0.9981
4-OH DIC	4.55E-01	6.00E-03	110.8	0.9970	1.85E+00	2.61E-02	4.8	0.9956
IBU	4.10E-02	7.54E-04	81.9	0.9966	1.80E-01	1.76E-03	1.5	0.9990
1-OH IBU	3.03E-02	1.26E-03	49.2	0.9980	1.30E-01	3.01E-03	1.6	0.9947
2-OH IBU	7.36E-02	1.92E-03	20.2	0.9953	1.32E-01	5.47E-03	5.8	0.9903
CBX-IBU	8.60E-02	1.43E-02	2.4	0.9930	1.19E-01	2.26E-03	6.2	0.9985
SMX	2.57E-01	6.21E-03	72.1	0.9942	1.35E+00	5.99E-03	5.8	0.9997
AcSMX	1.64E-01	3.40E-03	72.8	0.9957	6.50E-01	2.73E-03	2.4	0.9998

Table S3 Matrix effect (ME%) and recovery (R%) at low (10, 20 or 50 ng L⁻¹), medium (100 ng L⁻¹) and high (250 ng L⁻¹) concentration levels

Compound	Wastewater						Tap water					
	ME (%)			R (%)			ME (%)			R (%)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
MeP	-25 ^a	-15	-35	76 ^a	88	94	-44 ^a	-20	-28	71 ^a	97	81
OH-MeP	-74 ^c	-64	-71	120 ^c	111	97	-8 ^c	-45	-11	94 ^c	45	37
PrP	-79 ^b	-86	-81	104 ^b	107	114	-27 ^a	-12	-20	95 ^a	92	107
3,4-DHB	-4 ^c	1	40	60 ^c	44	60	-4 ^c	-7	-5	49 ^c	31	31
4-HB	15 ^c	11	52	79 ^c	70	92	-1 ^c	-7	19	100 ^c	103	99
CAF	-23 ^b	-45	-52	89 ^b	100	93	1 ^a	31	16	105 ^a	99	95
PX	-35 ^c	-20	-25	26 ^c	27	19	7 ^a	30	11	76 ^a	50	46
CBZ	-57 ^a	-77	-70	97 ^a	95	106	-11 ^a	-15	-7	91 ^a	91	110
3-OH CBZ	-69 ^a	-73	-66	84 ^a	106	104	10 ^a	-7	-13	92 ^a	90	105
10-OH CBZ	-58 ^a	-66	-56	91 ^a	105	103	26 ^a	46	19	95 ^a	92	108
EP-CBZ	-68 ^a	-72	-64	92 ^a	101	96	-5 ^a	4	26	95 ^a	82	89
DIC	-61 ^a	-85	-83	97 ^a	117	114	-39 ^a	-19	-45	104 ^a	88	105
4-OH DIC	-75 ^a	-83	-78	95 ^a	110	111	-36 ^a	-9	-37	85 ^a	84	91
IBU	-55 ^b	-81	-81	110 ^b	106	113	-25 ^a	-9	-30	93 ^a	89	118
1-OH IBU	-61 ^c	-69	-33	81 ^c	88	94	-7 ^c	-15	-11	111 ^c	101	101
2-OH IBU	-52 ^c	-55	-34	112 ^c	115	94	-10 ^c	-19	-28	115 ^c	109	106
CBX-IBU	-40 ^c	-48	-32	79 ^c	73	98	-15 ^c	-22	-15	107 ^c	96	105
SMX	-80 ^a	-83	-75	88 ^a	105	100	6 ^a	0	12	84 ^a	76	73
AcSMX	-77 ^a	-78	-73	86 ^a	104	104	-9 ^a	8	-9	92 ^a	95	108

^a10 ng L⁻¹; ^b20 ng L⁻¹; ^c50 ng L⁻¹

References

- [1] Haman C, Dauchy X, Rosin C, Munoz J. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environment: A review. *Water Res.* 2015;68:1-11.
- [2] Wang W, Kannan K. Fate of parabens and their metabolites in two wastewater treatment plants in New York State, United States. *Environ Sci Technol.* 2016;50:1174-1181.
- [3] Rosal R, Rodríguez A, Perdigón-Melón JA, Petre A, García-Calvo E, Gómez MJ, Agüera A, Fernández-Alba AR. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* 2010;44:578-588.
- [4] Muñoz I, Gómez MJ, Molina-Díaz A, Huijbregts MAJ, Fernández-Alba AR, García-Calvo E. Ranking potential impacts of priority and emerging pollutants in urban wastewater through life cycle impact assessment. *Chemosphere* 2008;74:37-44.
- [5] Lee S, Kang S, Lim J, Huh YJ, Kim K, Cho J. Evaluating controllability of pharmaceuticals and metabolites in biologically engineered processes, using corresponding octanol-water distribution coefficient. *Ecol Eng.* 2011;37:1595-1600.
- [6] Huntscha S, Singer HP, McArdell CS, Frank CE, Hollender J. Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry *J Chromatogr A.* 2012;1268:74-83.

- [7] Miao X, Yang J, Metcalfe CD. Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol.* 2005;39:7469-7475.
- [8] Rossini D, Ciofi L, Ancilotti C, Checchini L, Bruzzoniti MC, Rivoira L, Fibbi D, Orlandini S, Del Bubba M. Innovative combination of QuEChERS extraction with on-line solid-phase extract purification and pre-concentration, followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in sewage sludge. *Anal Chim Acta.* 2016;935:269-281.
- [9] Ferrando-Climent L, Collado N, Buttiglieri G, Gros M, Rodríguez-Roda I, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Sci Total Environ.* 2012;438:404-413.
- [10] Baumer A, Bitterman K, Klüver N, Escher BI. Baseline toxicity and ion-trapping models to describe the pH-dependence of bacterial toxicity of pharmaceuticals. *Environ Sci-Proc Imp.* 2017;19:901-916.

ARTÍCULO N° 3

Título: Simultaneous pressurized liquid extraction and clean-up for the determination of metabolites in complex environmental solid matrices

Autores: José Luis Malvar, Juan Luis Santos, Julia Martín, Irene Aparicio, Esteban Alonso

Afiliación: Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, C/ Virgen de África, 7, E-41011, Seville, Spain

Revista: Microchemical Journal



Editor: M. de la Guardia

Editorial: Elsevier

Año de publicación: 2020

ISSN: 0026-265X (Impreso)
1095-9149 (Online)

Categoría: Chemistry, Analytical

Posición de la revista en la categoría: 19/86

Factor de impacto (2019): 3.594

Factor de impacto (5 años): 3.273

Cuartil: Q1

Resumen Artículo 3

En este artículo se propuso el desarrollo de un método analítico para la determinación de los contaminantes emergentes y sus metabolitos, ya seleccionados en el artículo anterior, en muestras sólidas. Se eligieron las matrices más relevantes, bien por ser fuentes principales de estos compuestos, como es el caso de los lodos de depuradora digeridos anaeróbicamente o del lodo compostado cuando se aplican en suelos, o bien por ser destinos habituales como es el caso de los suelos.

El método se basó en una extracción selectiva mediante líquidos presurizados y una determinación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo. Las condiciones cromatográficas no difirieron de las ya optimizadas para los mismos compuestos aplicadas a muestras acuosas descritas en el artículo 2.

En cuanto a las etapas de extracción y limpieza, se realizó una rigurosa optimización empleando adicionalmente, de acuerdo con el número de variables a considerar, un diseño estadístico experimental de superficie de respuesta Box-Behnken. Como disolventes extractantes, optimizados secuencialmente, se probaron metanol, acetona y acetato de etilo, presentándose las mejores recuperaciones para el metanol, para el que también se ajustó la cantidad de ácido fórmico a adicionar con objeto de mejorar la extracción simultánea de compuestos con propiedades físico-químicas tan diferenciadas. Se optimizaron también parámetros operacionales de la extracción como número de ciclos de extracción, tiempo de extracción y temperatura. En el caso de la limpieza, se optimizó la cantidad y tipo de adsorbente (C18, Florisil® y PSA) de manera offline mediante un procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva. Los valores óptimos, obtenidos para una mezcla de C18 (0.8 g) y PSA (0.4 g), fueron incorporados a la propia celda de extracción para que tanto extracción como limpieza tuvieran lugar de manera conjunta en un único paso.

El método, una vez optimizado, fue validado obteniéndose una buena linealidad, exactitud (entre el 60 y el 120% en más del 98% de los casos) y precisión (<21% para todos los compuestos y niveles de concentración evaluados). Los límites de cuantificación estuvieron comprendidos entre 0.12 y 14.4 ng g⁻¹ de materia seca.

En su aplicación a muestras reales de lodos y suelos, se detectaron dieciséis de los compuestos en muestras de lodos digeridos, doce en muestras de compost y siete en

muestras de suelo. Al igual que pudo verse en el análisis de estos compuestos en aguas residuales, algunos metabolitos se encontraron a concentraciones similares o incluso superiores que sus productos de partida.



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

Simultaneous pressurized liquid extraction and clean-up for the determination of metabolites in complex environmental solid matrices

José Luis Malvar, Juan Luis Santos, Julia Martín, Irene Aparicio, Esteban Alonso*

Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla. C/ Virgen de África, 7, E-41011 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Metabolites
Parabens
Pharmaceuticals
Selective pressurized liquid extraction
Soil
Sludge

ABSTRACT

Parabens and pharmaceuticals are two of the most significant groups of pollutants of emerging concern. Nevertheless, in spite that their presence in the environment is well-known, to the date, there is scarce information about the presence of their metabolites that can be present at higher concentrations in the environment, be more toxic and be transformed into the parent compound. In this work, an analytical method has been developed and validated for the first-time simultaneous determination of metabolites of methyl- and propylparabens, caffeine, carbamazepine, diclofenac, ibuprofen and sulfamethoxazole and their parent compounds in soil, compost and digested sludge. Box-Behnken experimental design was applied for method optimisation due to the high number of experimental variables to optimize and the different physical-chemical properties of the target compounds. The method involves simultaneous sample extraction and clean-up by selective pressurized liquid extraction and analytical determination in a single run by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Good linearity, accuracy (mainly from 80 to 112%) and precision (<11%) was obtained. Method quantification limits were in the range from 0.12 to 14.4 ng g⁻¹ dry matter. The application of the method to soil, compost and digested sludge revealed that metabolites of parabens, carbamazepine, diclofenac and ibuprofen were at similar or higher concentrations than their parent compounds in digested sludge and the presence of metabolites of parabens, caffeine and carbamazepine in compost.

1. Introduction

In the European Union, 40% of the 10.13 million tons (dry solids) of sludge generated by the 27 member states is estimated to be spread on agricultural lands [1]. This disposal option is even more frequent in some countries, such as France, Ireland, Spain and United Kingdom, where more than 60% of sludge (70, 63, 65 and 68%, respectively) is applied onto agricultural lands [1]. In the last years, there is an increasing concern about the occurrence and fate of the so-called emerging pollutants in sludge and soils, and even in crops, affected by sludge amendments or by irrigation with reclaimed wastewater [2] what is a common practice in arid and semiarid regions [3]. Among them, special attention has been focused on pharmaceuticals and personal care products [3] that can be released to wastewater as parent compounds and as metabolites [4] and could entry in the food chain through vegetables cultivated in soils amended with treated sewage sludge [3] or irrigated with reclaimed wastewater. Nevertheless, to the date, studies have been focused on parent compounds and not on their metabolites in spite that they can be more toxic and concentrated than the parent compound [5]. Moreover, the scarce methods reported in literature for the

determination of pharmaceuticals and their metabolites in soil and sludge are focused on a single pharmaceutical (carbamazepine [6,7], or on pharmaceuticals from the same therapeutic group (sulfonamides [8] or non-steroidal anti-inflammatory drugs [9]). Those methods are based on pressurized liquid extraction (PLE) [6,8] and on QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe extraction method) [7,9]. After extraction, clean-up is carried out by solid-phase extraction (SPE) [6,8]. Analytical determination is commonly carried out by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [7–9]. Analytical methods for the determination of parabens and their metabolites are even scarcer and are based on solid-liquid extraction and then, clean-up by SPE [10,11]. Analytical determination is carried out by LC-MS/MS [10,11]. Nevertheless, and to the best of our knowledge, no analytical method has been reported yet for the simultaneous determination of metabolites of parabens and pharmaceuticals in spite of being environmental pollutants of emerging concern well-known to be present in wastewater. In addition, to the date, most of the analytical methods reported for the determination of emerging concern pollutants in sludge samples are based on Soxhlet, solid-phase extraction (SPE), pressurized liquid extraction (PLE) and ultrasound-assisted extraction

* Corresponding author.

E-mail address: calonso@us.es (E. Alonso).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104370>

Received 11 September 2019; Received in revised form 16 October 2019; Accepted 23 October 2019

Available online 24 October 2019

0026-265X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.