

*Máster Química Avanzada Aplicada*

**Desarrollo y validación de un método  
analítico mediante LC-QTOF-MS para la  
caracterización de aguas residuales y  
estudio de su aplicación en agua de riego  
para cultivos hortícolas**

*Junio 2012*

**Autora**

María del Mar Gómez Ramos

**Directores**

Dra. D<sup>a</sup> Ana Agüera López

Dra. D<sup>a</sup> María José Gómez Ramos





# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Contaminantes emergentes: fármacos	1
1.2. Tratamientos para la eliminación de contaminantes orgánicos en agua	5
1.3. Análisis de compuestos farmacéuticos en matrices acuosas	7
1.3.1. Preparación de la muestra	7
1.3.2. Técnicas analíticas	9
1.4. Reutilización de agua residual	12
1.4.1. Reutilización de agua en agricultura	13
<b>2. Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>3. Plan de trabajo</b>	<b>19</b>
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>21</b>
4.1. Productos químicos y reactivos	21
4.2. Método de extracción en agua	21
4.2. Análisis (LC-ESI-QTOF-MS)	22
4.3. Validación del método	23
4.4. Muestras de agua de riego	24
4.5. Estudio de la reutilización del agua residual en cultivo de calabacín	25
4.5.1. Descripción del ensayo experimental	25
4.5.2. Método de extracción de contaminantes orgánicos en planta	25
4.5.3. Método de extracción de contaminantes orgánicos en sustrato	26
<b>5. Resultados y Discusión</b>	<b>27</b>
5.1. Selección de compuestos farmacéuticos	27
5.2. Análisis <i>Off-line</i> SPE-LC-QTOF-MS	27
5.3. Desarrollo de base de datos de masa exacta	35
5.4. Identificación con la base de datos de masa exacta	35
5.4.1. Masa exacta	35
5.4.2. Tiempo de retención	36
5.4.3. Valor de <i>score</i>	36
5.4.4. Fragmentos generados en la fuente de ionización	38
5.5. Cuantificación	39
5.6. Aplicación a muestras reales: Agua residuales reutilizadas en riego	41
5.7. Resultados analíticos de la reutilización del agua residual en cultivo de calabacín	45

6. Conclusiones.....	47
7. Bibliografía .....	49

# Índice Tablas

Tabla 1. Base de datos de masa exacta incluyendo tiempos de retención (RT), fragmentación y composición elemental de los fármacos estudiados y sus fragmentos. Las especies isobáricas han sido resaltadas y cada par está marcado con el mismo número. ....	28
Tabla 2. Recuperaciones, linealidad y límites de detección del método analítico mediante LC-QTOF-MS .....	32
Tabla 3. Concentración de los compuestos detectados en aguas de riego. Agua residual urbana tratada con tratamiento secundario y agua residual urbana regenerada con foto-Fenton solar.....	41
Tabla 4 Concentración de contaminantes presentes en el agua de riego en sustrato y planta. T0 (plantas regadas con agua residual tratada con tratamiento secundario) T1 agua residual regenerada con foto-Fenton solar. ....	45

## 1. Introducción

---

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que, como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, etc., han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias. Al problema de la contaminación, cabe añadir el problema de la escasez, aspecto que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta. Las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente para evitar la contaminación química del agua y los riesgos que se derivan de ella han contribuido a paliar parcialmente esta situación. Sin embargo, la creciente demanda de agua y el descubrimiento continuo de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos dejan clara la necesidad de seguir investigando en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana y la del medio ambiente, conseguir un uso sostenible del agua y atenuar los efectos de la sequías y el cambio climático.

### 1.1. Contaminantes emergentes: fármacos

Durante los últimos 30 años, la química medioambiental se ha centrado casi exclusivamente en los “contaminantes convencionales” Éstos son principalmente plaguicidas y gran cantidad de productos químicos industriales. Sin embargo, los contaminantes convencionales representan sólo un pequeño porcentaje del total de productos químicos que se pueden detectar en el medio ambiente (Daughton and Ternes, 1999). A lo largo de las últimas décadas, sustancias biológicamente activas sintetizadas para la utilización en la agricultura, la industria y la medicina han sido vertidas al medio ambiente sin considerar las posibles consecuencias negativas que traería esta acción. El tipo de sustancias potencialmente peligrosas y el rango de concentración de las mismas en el medio ambiente pueden ser muy variables. En la UE están registradas aproximadamente unas 100000 sustancias diferentes, si bien este número se incrementa constantemente con el desarrollo de otras nuevas. Al margen de los contaminantes prioritarios, cuyos riesgos están bien establecidos, la mayoría de estos compuestos orgánicos, están poco estudiados y para ellos no se han establecido todavía criterios de calidad ambiental.

Los denominados “contaminantes emergentes” se definen como un grupo de sustancias no reguladas, que pueden ser candidatas a una futura regulación dependiendo de los resultados de investigaciones sobre sus efectos en la salud humana y en la biota acuática y de datos de seguimiento con respecto a la frecuencia de su presencia en el medio ambiente. Recientemente una amplia gama de compuestos han sido consideradas como relevantes, como por ejemplo: detergentes, productos farmacéuticos, productos de higiene personal, retardantes de llama, antisépticos, aditivos industriales, esteroides y hormonas. La principal característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que las altas tasas de transformación y/o remoción que son capaces de sufrir pueden ser compensadas por su continua introducción al medio ambiente. Para la mayoría de los contaminantes emergentes, la incidencia, la evaluación del riesgo y los datos eco toxicológicos no están disponibles, así que es difícil predecir qué efectos pueden tener sobre la salud humana y de los organismos acuáticos (Barceló, 2003).

En la actualidad, el desarrollo de técnicas analíticas, como la cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS o GC-MS/MS) y sobre todo la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS y LC-MS-MS), han permitido la detección y análisis en el medio ambiente de muchos de estos nuevos compuestos orgánicos, antes difícilmente evaluables (Hogenboom et al., 2009; Gómez et al., 2009).

De todos los contaminantes emergentes, los que probablemente suscitan mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos y, en particular, los antibióticos. El consumo de fármacos en los países de la UE se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados, entre ellos los antibióticos, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (Jones et al., 2001).

Los compuestos farmacéuticos son moléculas complejas con diversas funcionalidades y propiedades fisicoquímicas y biológicas, desarrollados y utilizados debido a la actividad biológica específica que presentan para el tratamiento, prevención o diagnóstico de enfermedades. La mayor parte de los fármacos son moléculas pequeñas que presentan pesos moleculares comprendidos en el rango de 200 a 1000 Da y, en general se caracterizan por su elevada polaridad (Kümmerer, 2009).

Los ingredientes farmacéuticos activos pueden ser metabolizados totalmente o parcialmente por una gran variedad de mecanismos. Generalmente son metabolizados para formar

derivados más polares y solubles en agua que tienen una actividad farmacológica menor en comparación con los compuestos parentales y se excretan rápidamente. También existen casos en donde el compuesto administrado es un profármaco, que es metabolizado *in vivo* hasta el metabolito activo y, a continuación a las formas menos activas. Los estudios sobre los compuestos originales podrían no conducir a las propiedades, físico-químicas, farmacológicas, toxicológicas o las diferencias de estos metabolitos. Además, la biotransformación o foto-transformación de los compuestos originales durante el tratamiento de aguas residuales siempre debe tenerse en cuenta durante la evaluación de destino y los efectos. Debido a la disponibilidad de la glucosa generalmente en los sistemas biológicos, la formación del glucurónido es uno de los mecanismos más comunes de metabolismo de los fármacos. Por lo tanto, el compuesto administrado padre puede ser excretado sin cambios, como un conjugado glucurónido o conjugado de sulfato, como principal metabolito, y como una mezcla compleja de muchos metabolitos. Existe evidencia de que los glucurónidos, que son la forma más común de los compuestos farmacéuticos conjugados excretados por los seres humanos, son capaces de ser desconjugados al compuesto principal durante el tratamiento de aguas residuales municipales (Kozak et al., 2001).

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenac, los antiepilépticos como la carbamacepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los  $\beta$ - bloqueantes como el metoprolol. A estos cabe añadir sus metabolitos y productos de degradación. Estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica. En consecuencia, para una evaluación realista del medio acuático es necesario un estudio integrado agua subterránea-suelo/sedimento-agua superficial suelo. Los fármacos que se han detectado en el medio ambiente acuático, ya sea directamente o sus metabolitos, incluyen analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos,  $\beta$ - bloqueantes, reguladores de lípidos, medios de contraste en rayos X, anticonceptivos orales, esteroides y otros, como broncodilatadores, tranquilizantes, etc. (Hernando et al., 2000).

Se considera que los fármacos representan el grupo de contaminantes emergentes más importante de la actualidad fundamentalmente por dos razones: el aumento del uso de



estas sustancias y la mejora en los límites de detección de estos compuestos gracias al gran avance en las técnicas analíticas de detección en los últimos años.

Las concentraciones a las que se han encontrado en aguas superficiales (como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas) o en aguas subterráneas se sitúan normalmente en el rango de ng/L o µg/L, mientras que en suelos y sedimentos, donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo (la vida media del ácido clofibrico, por ejemplo, se estima en 21 años), alcanzan concentraciones de hasta g/Kg (Hernando et al., 2006a; Diaz-Cruz and Barcelo, 2005). Pero lo que ha despertado una mayor preocupación ha sido el hallazgo de algunos de ellos (como el ibuprofeno, el diclofenac, la carbamacepina, o el ácido clofibrico) en aguas potables (Bedner and Maccrehan, 2006).

En muchos casos, las consecuencias de su presencia en el medio ambiente no están aun claras, pero en otros el riesgo parece evidente, y alarmante. Así, por ejemplo, el diclofenac, aparte de afectar a los riñones en los mamíferos, se ha asociado (como consecuencia de su uso en veterinaria) con la desaparición de los buitres blancos en la India y Pakistan, lo que supone, según el autor de este estudio (Fent et al., 2006), un desastre ecológico comparable al acontecido en el pasado con el DDT. Otro ejemplo es el del propanolol, que se ha detectado en múltiples ocasiones en España (Hernando et al., 2006b), y que se ha visto tiene efectos sobre el zooplancton, así como sobre los organismos bentónicos (Fent et al., 2006). Recientemente, se ha elaborado una base de datos de evaluación de riesgo preliminar y una clasificación de riesgo de los productos farmacéuticos (Cooper et al., 2008). El propósito de este estudio es proporcionar información sobre el riesgo de las sustancias farmacéuticas para el medio ambiente una vez liberadas a través de descargas de aguas residuales. La clasificación elaborada en este estudio indica que los fármacos del sistema nervioso central (SNC), enfermedades cardiovasculares y los antisépticos podrían plantear el mayor riesgo para el medio ambiente.

En la UE, por el momento, no se han fijado límites máximos en el agua potable, ni en otros tipos de agua y por tanto, no es necesario el seguimiento de tales compuestos, sin embargo, lo más probable es que en un futuro próximo sean regulados

## 1.2. Tratamientos para la eliminación de contaminantes orgánicos en agua

La calidad del efluente tratado en una estación depuradora de aguas residuales se mide mediante el uso de técnicas que evalúan la eliminación de nitrógeno y fosfato, patógenos, sólidos en suspensión, metales, y la materia orgánica. Sin embargo, las plantas convencionales de tratamiento no están diseñadas para eliminar cuantitativamente microcontaminantes como los productos farmacéuticos, y el resultado de esto en su presencia generalizada del medio ambiente. Muchas plantas depuradoras poseen solo dos etapas de tratamiento (físico y biológico), mientras que tan solo unas pocas utilizan un tratamiento terciario o avanzado (por ejemplo, ultrafiltración, floculación, ozonización, oxidación avanzada, o por ósmosis). La eficiencia de la eliminación de los productos farmacéuticos, pueden variar sustancialmente ya que se ve afectada por factores diversos como las propiedades fisicoquímicas de los productos farmacéuticos, los procesos de tratamiento empleado, la edad de los lodos activados (Clara et al., 2005), el tiempo de retención hidráulica (TRH), y las condiciones ambientales como la temperatura y la luz intensidad (Andreozzi et al., 2003)

Una opción eficaz para la la eliminación de los compuestos orgánicos en las aguas contaminadas son los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs). Estos se caracterizan por la generación de radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), especialmente oxidantes a presión atmosférica y temperatura ambiente. Tienen un elevado potencial para el tratamiento de aguas con contaminantes persistentes, pero los costes de operación de estos PAOs para la oxidación completa de compuestos orgánicos tóxicos son elevados, si se comparan con los de los tratamientos biológicos (Comninellis et al., 2008.).

La fotocatalisis (mediante  $\text{TiO}_2$  o foto-Fenton) ha demostrado ser un tratamiento que permite la total mineralización de los contaminantes orgánicos (Gogate and Pandit, 2004). Mediante la fotocatalisis se generan radicales hidroxilo, cuyo potencial de oxidación ( $E^\circ = 2.8$  V) es mucho mayor que el de otros oxidantes tradicionales (ozono 2.07 V, agua oxigenada 1.78 V, dióxido de cloro 1.57 V, cloro 1.36 V, etc.). Los radicales hidroxilo son capaces de oxidar compuestos orgánicos principalmente por abstracción de hidrógeno o por adición electrofílica a los dobles enlaces, generándose radicales orgánicos libres ( $\text{R}\bullet$ ) que reaccionan a su vez con moléculas de oxígeno formando un peroxiradical, iniciándose una serie de

reacciones de degradación oxidativa que pueden conducir a la completa mineralización del contaminante (Malato et al., 2009).

El proceso Fenton fue descrito por primera vez por Henry Fenton en 1894 a través de un estudio en lo cual este investigador demostró que el peróxido de hidrógeno podía ser activado por sales de  $Fe^{2+}$  para oxidar ácido tartárico (Fenton, 1984). A continuación, Haber y Weiss propusieron en 1934 que el  $\bullet OH$  era el oxidante activo generado mediante la reacción de Fenton y más tarde Barb et al. (1951), revisaron el mecanismo original propuesto por Haber y Weiss para dar lugar a lo que actualmente se conoce como la reacción en cadena “clásica” o “vía radicales libres” de Fenton, en la que se considera como etapa clave del proceso la producción de radicales  $\bullet OH$ . La aplicación de la reacción de Fenton como proceso oxidante para la destrucción de sustancias orgánicas tóxicas comenzó a desarrollarse a mediados de los años 60 (Brown, 1964). El reactivo Fenton se ha empleado de forma eficiente en la eliminación de fármacos de forma individual (Shemer et al., 2006) o de forma combinada con otros procesos de tratamiento en la degradación de efluentes industriales (Badawy et al., 2009) a efluentes contaminados con medicamentos de uso veterinario (Ben et al, 2009) o para el tratamiento de aguas residuales de hospitales (Berto et al., 2009). La velocidad de degradación de los contaminantes orgánicos mediante el proceso de Fenton, es fuertemente acelerada gracias a la irradiación con rayos UV o UV/luz visible . Este proceso se conoce como foto-Fenton, y en él los complejos de  $Fe^{3+}$  sufren una transferencia de carga ligando-metal, dando lugar a su disociación en  $Fe^{2+}$  y  $\bullet OH$ . El hierro reducido puede entonces reaccionar de nuevo con el peróxido de hidrógeno. Todo este se resume en las reacciones (x.z – x.z), donde L es un ligando orgánico (Pignatello, 1993)





Los radicales hidroxilo reaccionan de forma conocida con los compuestos orgánicos, principalmente mediante abstracción de hidrógeno de los enlaces C-H, N-H u O-H, adición a enlaces C=C, adición electrofílica, por transferencia de electrones, o adición a anillos aromáticos (Legrini et al., 1993). La abstracción de hidrógeno es el mecanismo de degradación observado más a menudo. La reacción x.s demuestra se puede generar radicales orgánicos (R•), los cuales pueden seguir oxidándose en presencia de peróxido de hidrógeno u oxígeno molecular (reacciones x.z y x.z). Como resultado, se generan radicales hidroxilo o radicales peróxido, respectivamente. Esta serie de reacciones, conduce la mineralización de los compuestos orgánicos.

### 1.3. Análisis de compuestos farmacéuticos en matrices acuosas

#### 1.3.1. Preparación de la muestra

El procedimiento de preparación de la muestra acuosa es una de las partes más importantes del análisis de compuestos orgánicos en matrices ambientales. El primer paso en la preparación de muestras es la filtración de un volumen apropiado de agua residual a través de filtros de fibra de vidrio <1-micras con el fin de evitar las ineficiencias de extracción debido a la presencia de sólidos suspendidos.

La extracción de compuestos farmacéuticos de la muestra se puede realizar por varias técnicas. Las más comunes son extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), extracción con sorción con barras magnéticas (SBSE), microextracción en fase líquida (LPME), etc.

La LLE es una técnica que se usa tradicionalmente para extraer los compuestos orgánicos en muestras acuosas (Chimuka et al., 2006). Se basa en la partición de los analitos disueltos entre el disolvente orgánico y la muestra acuosa de acuerdo con sus coeficientes de

reparto. Debido a que es un procedimiento tedioso y a que se consume una gran cantidad de disolventes orgánicos está siendo sustituida por otras técnicas.

La SPME es un método de extracción moderno en el que se utiliza una fibra de sílice fundida revestida con una fase polimérica. En SPME, por lo general, hay tres modos de funcionamiento: extracción de inmersión directa, extracción de espacio de cabeza (headspace) y la que se usa menos, la SPME de membrana protegida. Las ventajas de la SPME son que elimina por completo el uso de disolventes orgánicos y que es un procedimiento simple ya que incorpora muestreo, extracción, concentración, y la introducción de la muestra en un solo paso. Sin embargo, todavía existen limitaciones, como la vida corta de las fibras, el alto costo, la fragilidad, y los efectos de arrastre. Además, carece de selectividad en la extracción de analitos en matrices complejas (Lord and Pawliszyn, 2000).

SBSE es también una técnica de extracción sin uso de disolvente en el que se usa una barra de agitación magnética revestida con un material adsorbente. El adsorbente de extracción más utilizado es el polidimetilsiloxano (PDMS). Durante el procedimiento de extracción, la barra de agitación, se añade a la muestra y se agita. Después de la extracción y la desorción térmica, el analito puede ser analizado, normalmente por GC-MS. En comparación con la SPME, la SBSE proporciona una sensibilidad mayor, ya que posee una mayor superficie extractiva (la cantidad de fase es más de 100 veces mayor) (Sánchez-Rojas et al., 2009).

La LPME, es una LLE a microescala, se introdujo para reducir el consumo de disolvente orgánico (Fang et al., 2006). En este procedimiento, se utiliza una cantidad pequeña de disolvente orgánico. La LPME se divide básicamente en dos métodos generales: LPME en gota y LPME con membrana. En el primer método se usa una gota de un solvente inmiscible como fase de extracción, sin una membrana de soporte. En este último método, el disolvente de extracción está dentro de una membrana porosa.

La SPE es un método de extracción moderno, que se ha convertido en la técnica de preparación de la muestra más común en análisis de muestras medioambientales (Gros et al., 2006). El principio se basa en la adsorción de los analitos en un adsorbente. La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene los analitos. Los interferentes se

eliminan del lecho y después se eluyen los analitos con el disolvente adecuado. Los disolventes de elución más comunes son el metanol, la acetona y el acetato de etilo.

En comparación con la LLE, la SPE ofrece las siguientes ventajas (Pavlovik et al., 2007):

- Aumento de las recuperaciones
- Mejora de la selectividad, especificidad y reproducibilidad;
- Eliminación de emulsiones
- Menor uso de disolventes orgánicos
- Menor tiempo de preparación de la muestra;
- Funcionamiento más sencillo y posibilidad de automatización

En el procedimiento de SPE, la elección del adsorbente es crítica ya que controla la selectividad, afinidad y la capacidad. Los adsorbentes clásicos de SPE para la extracción de fármacos en muestras acuosas son las sílicas químicamente enlazadas con grupos n-alquil C8 o C18, carbón y materiales de intercambio iónico. Más recientemente se han introducido materiales poliméricos, inmunosorbentes, polímeros molecularmente-impresos y materiales de acceso restringido (permiten únicamente el paso de moléculas pequeñas) que han mejorado la eficacia de la extracción de compuestos objetivo (Pavlovik et al., 2007). El adsorbente más adecuado se elige en función de las características del compuesto o los compuestos que se quieren extraer, como la polaridad. La extracción con polímeros equilibrados hidrofílica y lipofílicamente proporcionan mejores resultados con un pH neutro de la muestra, mientras que las sílicas enlazadas con una fuerte hidrofobicidad, requieren un ajuste pH antes de la extracción, dependiendo de los tipos de analitos que se quieren extraer (Kostopoulou and Nikolau, 2008)

### 1.3.2. Técnicas analíticas

El análisis de fármacos en el medio ambiente requiere su identificación y cuantificación en muestras complejas a niveles muy bajos, de ultra traza. Por lo tanto, las técnicas analíticas tienen que ser específicas para la detección de los analitos entre una gran mayoría de otras impurezas y ser lo suficientemente sensibles para permitir bajos niveles de cuantificación.

Para el análisis de los productos farmacéuticos en muestras ambientales se puede utilizar tanto GC como LC.

En GC, la columna analítica está conectada a un portal de inyección con temperatura controlada, de forma que el extracto de la muestra se inyecta en la corriente del gas portador a una temperatura suficiente para asegurar la vaporización de todos los componentes. La muestra vaporizada es transportada a través de la columna hasta el detector por el gas portador. Los diferentes componentes en las mezclas se separan basándose en la interacción de la diferente adsorción entre los componentes en la corriente de gas y la fase estacionaria. Hay algunos parámetros, como la temperatura, el flujo del gas portador, el tipo y grosor de la fase estacionaria, la longitud y diámetro de la columna, que se pueden modificar para adaptar los métodos a un determinado problema de separación. La temperatura del horno normalmente se programa para que varíe en el rango de 50-300°C con un tiempo de análisis de 30 a 45 minutos. El helio es el gas portador más comúnmente utilizado, y se suelen inyectar 1-3 µL de muestra en el GC con técnicas de inyección “splitless” u “on-column”. La inyección de volúmenes mayores de muestra proporciona límites de detección más bajos en los métodos de GC-MS (Agüera 2000; Gómez, 2007). GC es preferible para el análisis de los compuestos no polares y volátiles, pero se puede aplicar para el análisis de productos farmacéuticos polares a bajas concentraciones añadiendo un paso de derivatización. Este paso es muy importante y puede afectar a la precisión del método, ya que se pueden producir pérdidas de analitos. Las ventajas de GC incluyen selectividad y resolución muy altas, exactitud y precisión, rango dinámico amplio y sensibilidad alta (Hada et al., 2000). Recientemente, se ha introducido la técnica de GC x GC en el análisis medioambiental, que ofrece una separación incluso mejor y la identificación de los analitos en muestras ambientales complejas (Hyotylainen et al., 2002). Mediante GC en modo *full scan* se pueden identificar compuestos. Esta identificación se basa en el uso de librerías de espectros como la NIST (National Institute for Standards and Testing) de forma que para la determinación, los espectros de masas generados en *full scan* se comparan con los espectros de masas incluidos en las librerías. Para cuantificación, se utiliza el modo de selección de iones (SIM) de MS con el que se alcanza mayor sensibilidad. En el caso de GC-MS/MS, se utiliza el modo MS<sup>n</sup> en trampas de iones o SRM (Selected Reaction Monitoring) en tripes cuadrupolos.

LC es la técnica preferida para la separación de los contaminantes orgánicos polares y semipolares, y tiene la ventaja de tener tiempos análisis más cortos, necesarios para los estudios de *monitoring*. El principal inconveniente de análisis de los productos farmacéuticos por HPLC en muestras medioambientales son los efectos de la matriz (el fenómeno de supresión iónica) que puede reducir la sensibilidad, la linealidad y la precisión del método (Fatta et al., 2009). Pero estos efectos matriz se pueden reducir mediante extracción selectiva, un clean-up efectivo después de la extracción, o mejora de la separación cromatográfica. Otros métodos para reducir los efectos de la matriz incluyen la calibración externa, o calibración interna utilizando estándares marcados con isótopos, la dilución de los extractos de muestras y dilución isotópica (uso de un estándar marcado con isótopos para cada compuesto objetivo) (Alder et al., 2004; Van de Steene, 2006).

En las últimas décadas, gracias a su acoplamiento a espectrometría de masas (LC-MS) y masas en tándem (LC-MS/MS), ha experimentado un gran progreso, tanto en términos de desarrollo de tecnología como en aplicaciones. La introducción de las técnicas de ionización a presión atmosférica (API), han convertido la LC-MS en una técnica clave para el análisis de trazas de compuestos polares en el medio ambiente. La LC-MS/MS también ha ganado popularidad debido a su versatilidad, especificidad y selectividad. Hasta ahora, los análisis de los micro-contaminantes polares en agua se han realizado con LC-MS/MS en modo SRM (Selected Reaction Monitoring) (Gros et al., 2006; Gómez et al., 2006; Castiglioni et al., 2005), pero este enfoque de análisis tiene la limitación del número de compuestos que pueden ser evaluados en una única inyección (Alder et al., 2006; Hernández et al., 2006). Estos suelen ser hasta 150-200 compuestos (en función de la velocidad de exploración/*dwell time*) y al aumentar el número de compuestos incluidos en el método SRM, aumenta la posibilidad de encontrar transiciones comunes o superpuestas para compuestos isobáricos que coeluyen. Además, otra de las principales limitaciones de estos métodos SRM es que no pueden detectar los compuestos que no se definen en el método SRM de adquisición (que no son objeto de análisis) por lo que no se genera información sobre compuestos desconocidos o *non-target a priori* no incluidos en el método, o sus productos de degradación. La información proporcionada por los métodos que utilizan el modo de SRM es a menudo insuficiente para evaluar la calidad de las aguas residuales y del medio ambiente, dado que registran un número limitado de analitos.



A diferencia de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) donde, como hemos comentado anteriormente, se pueden realizar búsquedas en librerías con los que identificar los compuestos, en LC-MS no hay bibliotecas comerciales disponibles que permitan una detección rápida de las muestras (Gómez et al., 2009). La aplicación de bibliotecas de espectros de masas se ha visto obstaculizada por la escasa reproducibilidad de los espectros generados en la fuente de ionización (CID) y la dificultad de comparar los espectros adquiridos con instrumentos de diferentes fabricantes (Alder et al., 2006). Sin embargo, la medida de masa exacta es casi específica y universal para cada analito independientemente de la instrumentación empleada. En este sentido, la cromatografía líquida-electrospray -tiempo de vuelo -espectrometría de masas (LC-TOFMS) es una técnica adecuada para llevar a cabo análisis de rutina de masa exacta basada en bases de datos de compuestos objetivos (Mezcua et al., 2009). Las principales características de los instrumentos LC-TOFMS son la capacidad para medir la masa exacta y la alta sensibilidad en modo full scan, de modo que los micro-contaminantes pueden ser detectados en matrices complejas a niveles de concentración de nanogramos por litro. La identificación inequívoca se logra por medio de la masa exacta de las moléculas (de)protonadas, los iones generados en la fuente de ionización y el perfil isotópico (Mezua et al., 2009; Ibañez et al., 2009).

El instrumento LC-TOFMS tiene la posibilidad de registrar un número ilimitado de compuestos, ya que opera en el modo *full scan*, por lo que esta técnica puede ser utilizada para el desarrollo de estrategias de detección basadas en el uso de bases de datos de masa exacta (Mezua et al., 2009; Ibañez et al., 2008).

#### 1.4. Reutilización de agua residual

Actualmente, existe una gran presión sobre los recursos hídricos a nivel mundial. La situación de la distribución del agua en Europa es motivo de especial preocupación ya que durante los últimos 30 años la sequía ha aumentado de forma espectacular tanto en frecuencia como en intensidad (COM, 2007), por lo que cada vez se hace más necesaria una planificación sostenible de su gestión. España, con un gran déficit de agua, tiene una relación entre consumo anual y recursos hídricos superior al 20%. Una de las soluciones pasa por la reutilización de las aguas depuradas, pero sólo se reutiliza el 1.20 % del total de aguas que se producen en las EDAR (Instituto Nacional de Estadística, 2009). Las causas de la escasa

reutilización, son diversas, entre las más importantes puede citarse que no existen criterios fundamentados y generales de evaluación y análisis de dichas aguas que permitan la caracterización de éstas. Por otra parte el no disponer de datos concluyentes sobre los riesgos de componentes minoritarios, hacen que las aguas de las EDAR no sean reutilizadas y se viertan directamente a las aguas superficiales.

Con la entrada del Real Decreto 1620/2007 por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, la ausencia de indicadores de calidad de las aguas reutilizables en función de los usos se ha visto subsanada mediante la publicación de legislación específica al respecto. Este Real Decreto desarrolla la legislación pendiente tras la publicación del Plan Hidrológico Nacional (11/2005) a la vez que da cumplimiento a las exigencias del Reglamento de Dominio Público Hidráulico y transpone la Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/CE) e incorpora el concepto y la definición de 'agua regenerada', cuyo uso requerirá una concesión administrativa que se concederá según la posterior utilización del agua. El objetivo de este decreto es triplicar la actual capacidad de reutilización en el horizonte del año 2015. Se cubre así una opción importante en la gestión sostenible del agua, complementaria a las actuaciones en materia de ahorro y garantía que el Ministerio de Medio Ambiente está desarrollando a través del *Programa AGUA* (Actuaciones para la Gestión y Utilización del Agua). En el Real Decreto, se distinguen los siguientes usos: urbano, agrícola, industrial, recreativo y ambiental y en su anexo I se recogen los criterios de calidad diferenciados según los usos, aportando límites de obligado cumplimiento. Los criterios definidos tienen la consideración de mínimos obligatorios exigibles, incluyendo parámetros físico-químicos y sanitarios. Además, para el resto de los parámetros es necesario que las aguas depuradas cumplan con las condiciones necesarias para el vertido de aguas residuales según se recoge en el Real Decreto 1315/1992. Sin embargo a pesar del potencial riesgo que puede suponer algunos contaminantes emergentes, entre los que se incluyen los fármacos, éstos no son considerados y no están regulados, y por el momento, no se han fijado límites máximos en el agua destinada a la reutilización.

#### 1.4.1 Reutilización de agua en agricultura

En España, cerca del 80% de los recursos hídricos se emplean en la agricultura (Figura 1). Sin embargo, el riego con aguas subterráneas es una fuente de preocupación medioambiental

debido a la sobre-explotación del agua de los acuíferos subterráneos, que entre otras consecuencias lleva a una salinización de los acuíferos cercanos al mar, la pérdida de la calidad del agua por la utilización de productos fitosanitarios así como una alteración de los hábitats naturales existentes. En este contexto, el agua residual depurada puede considerarse como una fuente muy valiosa para su utilización en el riego de las cosechas, sobre todo en las zonas áridas y semiáridas, como es el caso de nuestro país. El empleo de agua reutilizada en regadío, permite la recuperación parcial de los costes derivados del proceso de depuración y se añaden las numerosas ventajas derivadas del enriquecimiento en nutrientes, implicaciones socio-económicas, reducción de la dosis de aplicación de abonos y posibilidad de gestionar los efluentes de una forma más efectiva (Candela et al., 2007).

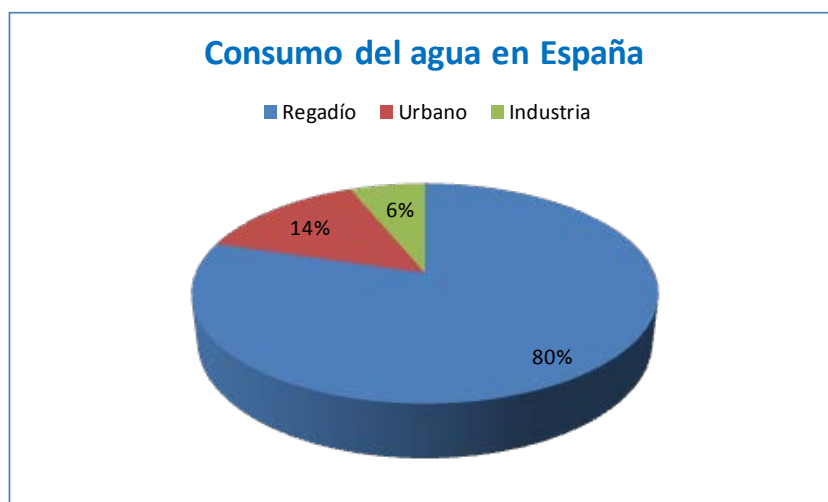


Figura 1. Distribución del consumo de agua en España

El agua residual se ha reciclado en la agricultura durante siglos en ciudades como Berlín, Londres, Milán y París (AATSE, 2004). Sin embargo, recientemente está cobrando mayor importancia en regiones con escasez de agua. En Pakistán el 26 % de la producción nacional vegetal se riega con agua residual (Ensink, 2004). En Hanói el 80 % de la producción vegetal procede de áreas urbanas y periurbanas (Lai, 2000). En Méjico se riegan con agua residual cerca del 260000 ha, la mayoría sin tratar (CAN, 2004). En la mayoría de estos casos, los agricultores riegan con agua residual diluida, sin tratar o parcialmente tratada.

Sin embargo, el uso del agua residual en la agricultura sin un tratamiento adecuado supone un riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Muñoz et al., 2009). El riesgo puede provenir por la presencia de una gran variedad de microorganismos patógenos y de una amplia variedad de contaminantes químicos que se encuentran presentes en el agua residual a niveles traza. A pesar de esto, las normas existentes en materia de reutilización de aguas residuales tienden a centrarse principalmente en los riesgos de los agentes patógenos y hacen poca mención a los contaminantes a niveles traza. Los contaminantes químicos a niveles traza que pueden persistir en las aguas residuales municipales después de los tratamientos en las plantas depuradoras, incluyen compuestos inorgánicos, metales pesados, contaminantes orgánicos persistentes como los disruptores endocrinos, compuestos farmacéuticamente activos, subproductos de la desinfección, y muchos otros compuestos complejos. Los residuos de éstos compuestos, junto con sus productos de transformación y sus metabolitos, se incorporan al medio ambiente a través de descargas de aguas residuales tratadas o las prácticas de riego. Su continua introducción en el medio ambiente a través del riego continuo u otros tipos de descargas es lo que les hace pseudo-persistentes. A largo plazo, la liberación de éstos compuestos puede inducir efectos tóxicos o de otro tipo en los organismos terrestres o acuáticos.

Un uso efectivo del agua residual urbana tratada como agua de riego para la producción agrícola debería ir acompañado de los siguientes pre-requisitos:

- Control adecuado de patógenos
- Eliminación y control de productos químicos perjudiciales (compuestos orgánicos, sustancias farmacéuticas y metales pesados)
- Control de los efectos indeseables en suelo y planta
- Consideración de los temas económicos y legales
- Asegurar la aceptación pública, percepción y responsabilidad

Como se ha mencionado anteriormente el uso de aguas residuales tratadas para el riego es una importante vía para la introducción de contaminantes en el medio ambiente (aguas superficiales y subterráneas y suelo). Hay estudios que indican que los compuestos

orgánicos, que son absorbidos en el suelo, pueden ser transferidos a diferentes partes de la planta (Al Nasir and Batarseh, 2008; Redshaw *et al.*, 2008; Shenker *et al.*, 2011). La velocidad de adquisición de éstos compuestos depende del tipo de la planta y de las propiedades físico-químicas del compuesto orgánico. En un estudio realizado por Shenker *et al.* (2011), se comprobó que por medio de riego con agua contaminada (a niveles traza de 1-1.3 µg/L), se acumula en la planta de pepino el antiepiléptico carbamacepina. Con los niveles de concentración encontrados en el fruto de pepino, se calculó, para una consumición de 200 g de pepino al día podrían resultar en una ingestión diaria de 200 ng de carbamazepina al día. Hasta la fecha, no existen informes sobre evaluaciones de riesgo de la consumición de productos farmacéuticos a través de cultivos contaminados, pero debe prestarse atención a este punto ya que, en el caso de los productos farmacéuticos, la introducción a través de la cadena alimentaria es de la misma magnitud o incluso mayor que por la vía del agua potable (Shenker *et al.*, 2011).

La absorción de productos farmacéuticos por la planta puede influir en su desarrollo. Por ejemplo, en el caso de un cultivo de alfalfa regado con oxitetraciclina, se inhibió su crecimiento entre un 61-85 % (Kong *et al.* 2007). En otro ensayo en el que se evaluó la toxicidad del antibiótico enrofloxacin en varios cultivos (pepino, lechuga, judía y rábano), se encontraron efectos tóxicos en los cuatro cultivos a concentraciones de 50 y 5000 µg/L. Así mismo, se encontró que las plantas fueron capaces de metabolizar el compuesto enrofloxacin a ciprofloxacina, al igual que ocurre en animales. No está claro si los efectos negativos sobre las plantas proceden de los daños directos de la planta por los propios farmacéuticos o si la acción antimicrobiana de los productos farmacéuticos en los microorganismos del suelo es responsable de los daños que afectan a la simbiosis planta-microorganismo (Chander *et al.*, 2005). Este último se atribuye al hecho de que los antibióticos en el suelo pueden influir en el desarrollo de la planta indirectamente interfiriendo en el equilibrio de las comunidades microbianas: la disminución en el número de bacterias del suelo conduce a una falta de alimentación de la fauna del suelo (protozoos, nematodos, artrópodos micro) y finalmente influye en las funciones del suelo: los residuos vegetales se descomponen más lentamente, la desnitrificación es más lenta, y por lo tanto los nutrientes se reciclan más lentamente (Migliore *et al.*, 1998. ).

## 2. Objetivos.

---

El trabajo se divide en tres objetivos generales:

- Desarrollar y validar un método analítico sensible para la identificación y cuantificación de contaminantes orgánicos en matrices acuosas complejas, utilizando LC-Q-TOF-MS mediante el empleo de bases de datos de masa exacta.
- Aplicar el método desarrollado en la caracterización de aguas residuales urbanas tratadas reutilizadas en el riego de cultivos
- Evaluar, desde el punto de vista analítico el uso del agua reutilizada en un cultivo hortícola (calabacín).

Los objetivos específicos son:

1. Optimizar y desarrollar un método de extracción multiresiduos, en agua para el análisis de 78 compuestos que incluyen fármacos y sus principales metabolitos.
2. Desarrollar y evaluar un método de screening automático mediante LC-QTOF-MS y el uso de bases de datos de masa exacta
3. Evaluar los criterios seleccionados para la identificación con bases de datos (masa exacta, tiempo de retención, patrón isotópico e iones fragmento)
4. Validar la metodología analítica desarrollada mediante la evaluación de los parámetros analíticos establecidos por las guías oficiales SANCO de la Unión Europea.
5. Caracterizar, mediante la metodología analítica desarrollada, muestras de agua residual urbana depurada con tratamiento secundario y regenerada mediante foto-Fenton solar
6. Estudiar el empleo ambas aguas (dपुरada y regenerada) como agua de riego en un cultivo de calabacín
7. Determinar la absorción de los contaminantes orgánicos presentes en el agua de riego en la planta de calabacín y su fraccionamiento en hojas y fruto

8. Determinar la acumulación de los contaminantes en el suelo tras el riego con agua residual tratada con ambos procesos.

### 3. Plan de trabajo

---

El plan de trabajo seguido en el presente estudio para la obtención de los objetivos enumerados anteriormente se expone continuación:

1. Revisión bibliográfica del estado actual de la determinación de compuestos farmacéuticos en muestras acuosas
2. Selección de los compuestos farmacéuticos objeto de estudio en base a su uso en los hospitales españoles y su detección en aguas medioambientales
3. Optimización de un método de extracción multiresiduos mediante SPE, para la determinación de los compuestos seleccionados
4. Elaboración de una base de datos de masa exacta, con los compuestos seleccionados y sus iones fragmento
5. Optimización de la metodología de análisis mediante screening automático con LC-QTOF-MS
6. Aplicación de la metodología analítica a muestras reales de aguas residuales utilizadas en el riego de cultivos: agua residual urbana tratada con tratamiento secundario y la misma con un tratamiento terciario de foto-Fenton solar.
7. Desarrollo de un cultivo de calabacín regado con los dos tipos de agua mencionados anteriormente
8. Análisis de los contaminantes presentes en el agua de riego en planta (fruto y hoja) y sustrato.





## 4. Materiales y Métodos

---

### 4.1. Productos químicos y reactivos

Los compuestos seleccionados para el desarrollo del método son 78, principalmente fármacos y algunos de sus metabolitos más importantes. Fueron adquiridos con grado analítico (pureza > 95%) en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), Merck (Mollet del Vallés, España) y Promechem LGC (Barcelona, España) (pureza > 95%). Las disoluciones individuales de los patrones se prepararon en metanol, a una concentración entre 1 y 2 mg/mL, y se almacenaron a -20°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon a diferentes concentraciones mediante la dilución de las disoluciones madre en MeOH: agua, 10:90 (v/v). Los disolventes acetonitrilo y metanol, grado HPLC fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido fórmico (pureza, 98%) y el agua ultrapura se obtuvieron de Fluka (Buchs, Suiza). Los reactivos usados en la preparación del agua residual simulada (peptona, extracto de carne, urea,  $K_2HP_4$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y NaCl) fueron suministrados por Panreac. Los cartuchos de SPE Oasis™ HLB (divinilbenceno / N-vinilpirrolidona, copolímero de 200 mg, 6 cm<sup>3</sup>) fueron adquiridos de Waters (Mildford, MA, EE.UU.).

### 4.2 Método de extracción en agua

Antes de la extracción, la muestra fue filtrada con un filtro de fibra de vidrio de 0.7 µm (Teknokroma, Barcelona, España). El proceso (Figura 2) se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE) usando cartuchos comerciales HLB Oasis (divinilbenceno / N-vinilpirrolidona copolímero) (200 mg, 6 cm<sup>3</sup>). Para esto, se utilizó un procesador de muestras automatizado ASPEC XL equipado con una válvula de conmutación 817 y una bomba externa 306 LC de Gilson (Villiers-le-Bel, Francia). Los cartuchos Oasis HLB fueron acondicionados previamente con 6 mL de MeOH y 5 mL de agua desionizada de grado HPLC (el pH se ajustó a 8 con 20% de  $NH_4OH$ ) con un caudal de 1 mL/min. Después de la etapa de acondicionamiento, se cargaron en el cartucho 200 mL de muestra, previamente fortificadas con 10 µL de una solución de 10 mg/L de <sup>13</sup>C-cafeína e ibuprofeno-d<sup>3</sup> usados como patrones internos. Las muestras se pasaron a través de los cartuchos con un caudal de 10 mL/min y posteriormente se lavaron con 5 mL de agua desionizada. A continuación, los cartuchos se secaron con una corriente de nitrógeno durante aproximadamente 5 minutos para eliminar el exceso de agua y finalmente los analitos retenidos en el cartucho se eluyeron con 2 x 4 mL de MeOH a 1

mL/min. Los extractos se evaporaron hasta casi sequedad usando un Turbo-Vap de Zymark (Hopkinton, Massachusetts), con la temperatura del agua a 35°C y las muestras se reconstituyeron con 1 mL de MeOH:agua, 10:90 (v/ v). Para finalizar, se filtraron directamente en un vial de análisis utilizando un filtro de jeringa PTFE de 0.45 µm (Millipore, EE.UU.) y antes del análisis las muestras fueron diluidas 1:1 con MeOH/agua (10:90).

### OASIS HLB

200 ml de Muestra pH = 8

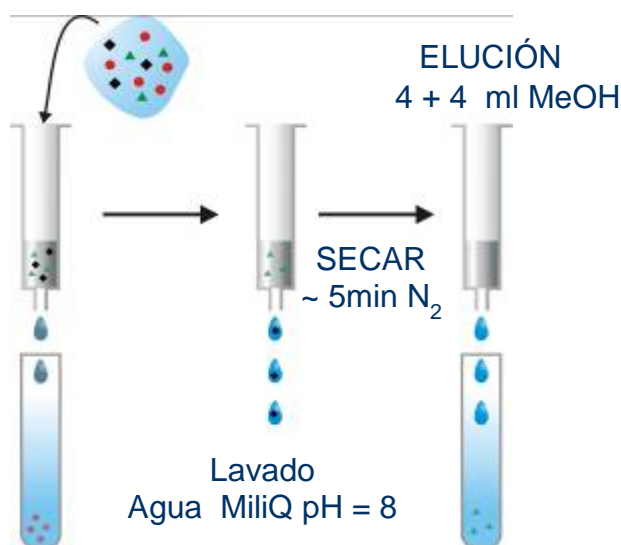


Figura 2. Esquema de extracción de contaminantes en agua mediante SPE

#### 4.2. Análisis (LC-ESI-QTOF-MS)

El método para el análisis de muestras de agua fue desarrollado mediante LC-ESI-QTOF-MS (*liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time -of -flight mass spectrometry*), en modo de ionización positivo y negativo. Los analitos fueron separados utilizando un sistema de HPLC (que consta de desgasificador, inyector automático, y bomba binaria) (Agilent Serie 1200, Agilent Technologies) equipado con columna analítica de fase reversa XDB-C 18 columna de 4.6 mm x 50 mm y 1.8 µm tamaño de partícula (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El gradiente de elución de LC se realizó con acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico y 5% de agua MilliQ como fase móvil A y agua con 0,1% de ácido fórmico

(pH 3.5) como fase móvil B. Para el análisis en el modo positivo, el método cromatográfico que se ha optimizado mantiene la composición inicial de la fase móvil (10% A) constante durante 1 minuto, seguido de un gradiente lineal hasta 100% en 12 min, y se mantiene durante 5 min a 100% A. Después de cada inyección se realiza se vuelve a las composición de la fase móvil inicial y se mantiene durante 7-minutos. El flujo utilizado fue de 0,6 mL/min. Los compuestos analizados en modo negativo fueron separados utilizando acetonitrilo como fase móvil A y agua de grado HPLC como fase móvil B con un flujo de 0,6 mL/min. El gradiente de LC fue el mismo que el que se utiliza en modo positivo. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L en ambos modos.

El sistema HPLC está acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo de vuelo (Agilent 6530 Series QTOFMS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El instrumento trabajó a 4 GHz en modo de alta resolución. Los iones son generados utilizando una fuente de iones por electrospray con tecnología Agilent Jet Stream. Los parámetros para la tecnología Agilent Jet Stream son temperatura del nitrógeno *sheath gas* (400°C) y caudal (12 L/min). Las condiciones de electrospray fueron las siguientes: capilar, 4000 V, nebulizador, 40 psi; gas de secado, 10 L/min; temperatura del gas, 325°C, voltaje de *skimmer*, 65 V; octapoleRFPeak, 750 V, fragmentador, 90 V. El eje de masas se calibró usando la mezcla proporcionada por el fabricante en el rango de  $m/z$  70-3200. Así mismo se utilizó disolución de referencia para la calibración continua de los iones positivos con las masas de referencia siguientes: 121.0509 y 922.0098  $m/z$  (resolución:  $19500 \pm 500$  a 922.0098  $m/z$ ). Con la fuente de electrospray en negativo (ESI-), las masas de referencia fueron 112.985587 y 966.000725  $m/z$  (resolución:  $23.900 \pm 500$  a 966,000725  $m/z$ ). En este trabajo, el instrumento QTOF-MS se utiliza como un sistema TOF-MS trabajando en el modo MS y también en el modo MS/MS para la confirmación de la identificación de compuestos isómeros o compuestos con sólo una transición. Los datos obtenidos en *full-scan* y MS/MS se procesaron con el software MassHunter Workstation de Agilent (versión B.02.00).

#### 4.3. Validación del método

Debido a la imposibilidad de obtener muestras de blanco, el procedimiento de validación del método se llevó a cabo utilizando efluente de aguas residuales simulado. El efluente simulado se realizó con peptona (32 mg/L), extracto de carne (22 mg/L), urea (6 mg/L),  $K_2HPO_4$  (28 mg/L),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (4 mg/L),  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  (2 mg/L) y NaCl (7 mg/L), que contiene

una cantidad inicial de DOC (carbono orgánico disuelto) de 25 mg/L(OECD, 1999). Para minimizar los efectos matriz, se utilizaron curvas de calibrado en matriz para las determinaciones cuantitativas.

Las recuperaciones se determinaron mediante la media de tres análisis de un extracto de agua residual urbana simulada fortificada a un nivel de concentración de 0.5 µg/L, antes de la extracción.

La linealidad en la respuesta fue estudiada mediante disoluciones de calibrado en matriz fortificadas con los analitos a seis niveles diferentes de concentración que van desde el límite de determinación a 2.5 µg/L. Los datos experimentales se ajustaron a una recta  $y = a + bx$ , en el intervalo de concentraciones estudiadas.

La precisión del método de análisis, se determinó como la desviación estándar relativa (RSD), obtenida a partir de inyecciones repetidas ( $n = 5$ ) de un extracto fortificado en el mismo día (repetibilidad) y en días diferentes (reproducibilidad).

Los límites de detección del método (MDLs) se determinaron utilizando el método de *screening* con las disoluciones en matriz a niveles bajos de concentración: 5, 50 y 100 ng/L.

#### 4.4. Muestras de agua de riego

El agua residual urbana tratada reutilizada en el riego se obtuvo de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de El Ejido (Almería) que trata 13800 m<sup>3</sup>/día de agua residual urbana. El influente de agua que llega a esta depuradora se somete en primer lugar a un pre-tratamiento físico para eliminar los sólidos más gruesos y grasas, seguido de una decantación primaria de partículas. Finalmente se realiza un tratamiento secundario biológico con lodos activados, después del cual el agua tratada es descargada.

Se analizaron dos tipos de agua para riego: (T0) agua residual urbana con tratamiento secundario procedente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de El Ejido y T(1) agua residual procedente de la EDAR de El Ejido, con un tratamiento terciario adicional de foto-Fenton solar.

#### 4.5. Estudio de la reutilización del agua residual en cultivo de calabacín

##### 4.5.1. Descripción del ensayo experimental

El agua analizada, se aplicó en un cultivo hidropónico de calabacín (Foto 1). Este cultivo se realizó en una parcela al aire libre situada en la Universidad de Almería de 4 x 5, protegida con una malla antitrips de 20x10 mm para la protección los cultivos contra insectos y viento. El riego y el suministro de fertilizantes, se realizó por medio de riego localizado por goteo. La parcela posee dos redes distintas de riego para T0 y T1, para lo que se dispone de dos depósitos opacos de 200 L para el almacén de agua de riego, y dos depósitos opacos de 125L para los fertilizantes. Dentro de la parcela se dispusieron doce contenedores o macetas con sustrato (mezcla de turba y fibra de coco 50:50) donde se trasplantaron las plantas de calabacín. En cada una de las macetas se instalaron dos goteros de 3 L/h, de forma alterna de forma que una maceta recibía el riego de la red T0 (agua residual con tratamiento secundario) y otra de la red T1 (agua regenerada con foto-Fenton solar) y así sucesivamente. Cada tratamiento constó de cuatro repeticiones (A, B, C, D).



Foto 1. Detalle de la finca experimental y de planta de calabacín

##### 4.5.2. Método de extracción de contaminantes orgánicos en planta

Las hojas y los frutos de calabacín fueron analizados para evaluar la absorción de los contaminantes presentes en el agua de riego de la planta de calabacín. La extracción en planta se realizó por medio de ultrasonidos seguida de un *clean-up* mediante cartuchos de SPE Oasis HLB. Se pesaron 10 gramos de planta (fruto u hoja) y fueron extraídos con 10 mL de metanol mediante ultrasonidos durante 5 minutos. A continuación se centrifugaron

durante 15 min a 3700 r.p.m. y se recogió una alícuota de 5 mL del sobrenadante. Se añadieron 95 mL de agua desionizada al sobrenadante, se ajustó el pH a 8 y se realizó el *clean-up*. Los cartuchos Oasis HLB fueron acondicionados con 6 mL de MeOH y 5 mL de agua desionizada de grado HPLC. Después de la etapa de acondicionamiento, se cargaron en el cartucho los 100 mL de muestra y lavaron los cartuchos con 5 mL de agua desionizada. A continuación, los cartuchos se secaron con una corriente de nitrógeno durante aproximadamente 5 minutos para eliminar el exceso de agua y finalmente los analitos retenidos en el cartucho se eluyeron con 2 x 4 mL de MeOH. Los extractos se evaporaron hasta casi sequedad usando un Turbo-Vap de Zymark (Hopkinton, Massachusetts), con la temperatura del agua a 35°C y las muestras se reconstituyeron con 0.5 mL de MeOH:agua, 10:90 (v/v) y se filtraron utilizando un filtro de jeringa PTFE de 0.45 µm (Millipore, EE.UU.). Posteriormente las muestras fueron analizadas mediante LC-TOF-MS mediante la metodología descrita para el análisis de aguas.

#### 4.5.3. Método de extracción de contaminantes orgánicos en sustrato

El sustrato fue analizado para determinar la acumulación de compuestos durante los 3 meses de riego con agua residual tratada. La extracción de los contaminantes orgánicos del sustrato se realizó por medio de ultrasonidos seguida de un *clean-up* SPE. Se pesaron 2 gramos sustrato previamente liofilizado y molido y se extrajeron con 20 mL de metanol mediante ultrasonidos durante 15 minutos. A continuación se centrifugaron durante 5 min a 3700 r.p.m. y se recogió una alícuota de 10 mL del sobrenadante. Se añadieron 100 mL de agua desionizada al sobrenadante, se ajustó el pH a 8 y se realizó el *clean-up*, con las mismas condiciones que en el apartado anterior, para la extracción en planta, pero cargando un volumen de extracto de sustrato de 110 mL. Un vez realizado el *clean-up* el extracto se evaporó y fue reconstituido con 250 µL de MeOH:agua, 10:90 (v/v) y se filtró utilizando un filtro de jeringa PTFE de 0.45 µm (Millipore, EE.UU.). Posteriormente las muestras fueron analizadas mediante LC-TOF-MS mediante la metodología descrita para el análisis de aguas.

## 5. Resultados y Discusión

---

### 5.1. Selección de compuestos farmacéuticos

Los compuestos considerados en este estudio (Tabla 1) fueron seleccionados siguiendo los siguientes criterios: (1) datos de consumo suministrados por hospitales, (2) información previa sobre su detección en muestras de agua residual y aguas superficiales y (3) persistencia y bajas eficiencias de eliminación en plantas depuradoras de agua residual. Los compuestos seleccionados son representativos de un amplio número de grupos terapéuticos. Estos incluyen antibióticos, agentes antiepilépticos, compuestos antiulcerosos, analgésicos, narcóticos,  $\beta$ -bloqueantes, antidepresivos y anestésicos locales.

### 5.2. Análisis *Off-line* SPE-LC-QTOF-MS

El método desarrollado permitió la detección e identificación de los 78 contaminantes orgánicos. La aplicación de los parámetros del instrumento descritos anteriormente permite la separación de los analitos en un tiempo total de análisis de 17 minutos en modo positivo y modo negativo.

Los datos sobre los compuestos incluidos en la base de datos se muestran en la Tabla 1. Los compuestos investigados se enumeran en orden alfabético, junto con información detallada de los tiempos de retención (RT), las masas teóricas, la composición elemental de la molécula protonada y sus fragmentos característicos o el perfil de isotópico característico .

Para confirmar los compuestos que no presentaban fragmentación al voltaje seleccionado y los isómeros que no podían ser distinguidos con el espectro de masas, no presentaban fragmentos y/o patrón isotópico característico (sin átomos de cloro, bromo o azufre), se desarrolló un método MS/MS. La energía de colisión (CE) optimizada para cada compuesto está también incluida en la Tabla 1.

La metodología analítica seleccionada para el tratamiento de la muestra fue una extracción convencional con cartuchos de SPE Oasis HLB, que han sido muy utilizados en bibliografía para la determinación de una amplia gama de analitos en aguas y que ofrecen resultados satisfactorios (Gros et al., 2006; Gómez et al., 2007; Gómez et al., 2006).



**Tabla 1. Base de datos de masa exacta incluyendo tiempos de retención (RT), fragmentación y composición elemental de los fármacos estudiados y sus fragmentos. Las especies isobáricas han sido resaltadas y cada par está marcado con el mismo número.**

Compuesto	RT (min)	m/z calculada	Ion	Composición elemental	Iones fragmento QTOF-MS	
					m/z calculada	Composición elemental
4-AAA	5,60	246,1237	[M+H] <sup>+</sup>	C11H14N3O	204,1132	C11H14N3O
<b>4-DAA (3)</b>	4,75	232,1445	[M+H] <sup>+</sup>	C13H18N3O	113,1073	C6H13N3
<b>4-FAA (3)</b>	5,69	232,1081	[M+H] <sup>+</sup>	C12H14N3O2	204,1132	C11H14N3O
Acetaminophen	4,49	152,0706	[M+H] <sup>+</sup>	C8H10NO2	110,0601	C6H8NO
Amoxicillin	2,31	366,1118	[M+H] <sup>+</sup>	C16H20N3O5S	349,0853	C16H17N2O5S
Atenolol	3,03	267,1703	[M+H] <sup>+</sup>	C14H23N2O3	225,1234	C11H17N2O3
Azithromycin	6,14	749,5158	[M+H] <sup>+</sup>	C38H73N2O12	591,4215	C30H59N2O9
Caffeine	4,73	195,0877	[M+H] <sup>+</sup>	C8H11N4O2	138,0662	C6H8N3O
					180,0808	C13H10N
Carbamazepine epox	7,48	253,0972	[M+H] <sup>+</sup>	C15H13N2O2	210,0914	C14H12NO
					236,0706	C15H10NO2
Carbamazepine	7,88	237,1023	[M+H] <sup>+</sup>	C15H13N2O	194,0964	C14H12N
Cefotaxime	5,98	456,0642	[M+H] <sup>+</sup>	C16H18N5O7S2	396,0431	C14H14N5O5S2
Ciprofloxacin	5,79	332,1405	[M+H] <sup>+</sup>	C17H19FN3O3	288,1507	C16H19FN3O
<b>Clomipramine (8)</b>	8,37	315,1623	[M+H] <sup>+</sup>	C19H24ClN2	317,1593	C19H24[37Cl]N2
Clotrimazole	7,99	277,0779	[M+H] <sup>+</sup>	C19H14Cl	279,0749	C19H14[37Cl]
Diazepam	9,52	285,0789	[M+H] <sup>+</sup>	C16H14ClN2O	287,0759	C16H14[37Cl]N2O
					189,0263	C5H9N4S2
Famotidine	4,63	338,0522	[M+H] <sup>+</sup>	C8H16N7O2S3	259,0794	C8H15N6S2
Fenofibrate	13,21	361,1201	[M+H] <sup>+</sup>	C20H22ClO4	233,0364	C13H10ClO2
Fenofibric Acid	10,30	319,0732	[M+H] <sup>+</sup>	C17H16ClO4	233,0364	C13H10ClO2
Indomethacin	10,36	358,0841	[M+H] <sup>+</sup>	C19H17ClNO4	360,0811	C19H17[37Cl]NO4
Ketoprofen	9,60	255,1016	[M+H] <sup>+</sup>	C16H15O3	209,0961	C15H13O
Lansoprazole	7,15	370,0832	[M+H] <sup>+</sup>	C16H15F3N3O2S	252,0301	C9H9F3NO2S
Loratadine	8,21	383,1521	[M+H] <sup>+</sup>	C22H24ClN2O2	385,1491	C22H24[37Cl]N2O2
Mefenamic Ac.	11,52	242,1176	[M+H] <sup>+</sup>	C15H16NO2	224,1070	C15H14NO
Metronidazole	3,45	172,0717	[M+H] <sup>+</sup>	C6H10N3O3	128,0455	C4H6N3O2
					271,1693	C18H23O2
Mevastatin	11,43	391,2479	[M+H] <sup>+</sup>	C23H35O5	289,1798	C18H25O3
<b>Nadolol (7)</b>	5,35	310,2013	[M+H] <sup>+</sup>	C17H28NO4	254,1387	C13H20NO4
<b>Naproxen (2)</b>	9,20	231,1016	[M+H] <sup>+</sup>	C14H15O3	185,0961	C13H13O
Nicotine	1,19	163,1230	[M+H] <sup>+</sup>	C10H15N2	132,0808	C9H10N
					276,1507	C15H19FN3O
Norfloxacin	5,59	320,1405	[M+H] <sup>+</sup>	C16H19FN3O3	302,1300	C16H17FN3O2
Ofloxacin	5,22	362,1511	[M+H] <sup>+</sup>	C18H21FN3O4	318,1613	C17H21FN3O2
					136,0757	C8H10NO
Omeprazole	6,13	346,1220	[M+H] <sup>+</sup>	C17H20N3O3S	198,0583	C9H12NO2S

<b>Paraxanthine (1)</b>	3,55	181,0720	[M+H] <sup>+</sup>	C7H8N5O2	124,0506	C5H5N4O
Primidone	6,57	219,1128	[M+H] <sup>+</sup>	C12H15N2O2	162,0914	C10H12NO
<b>Ranitidine (8)</b>	2,18	315,1486	[M+H] <sup>+</sup>	C13H23N4O3S	176,0488	C5H10N3O2S
					270,0907	C11H16N3O3S
					148,0757	C9H10NO
Salbutamol	3,69	240,1594	[M+H] <sup>+</sup>	C13H22NO3	166,0863	C9H12NO2
					222,1489	C13H20NO2
Simvastatin	12,51	419,2792	[M+H] <sup>+</sup>	C25H39O5	285,1849	C19H25O2
					303,1955	C19H27O3
Sotalol	4,53	273,1268	[M+H] <sup>+</sup>	C12H21N2O3S	255,1162	C12H19N2O2S
Sulfadiazine	5,13	251,0597	[M+H] <sup>+</sup>	C10H11N4O2S	156,0114	C6H6NO2S
					124,0869	C6H10N3
<b>Sulfamethazine (6)</b>	6,17	279,0910	[M+H] <sup>+</sup>	C12H15N4O2S	186,0332	C6H8N3O2S
Sulfamethoxazole	7,36	254,0594	[M+H] <sup>+</sup>	C10H12N3O3S	156,0114	C6H6NO2S
Sulfapyridine	5,60	250,0645	[M+H] <sup>+</sup>	C11H12N3O2S	156,0114	C6H6NO2S
<b>Sulfathiazole (6)</b>	5,76	256,0209	[M+H] <sup>+</sup>	C9H10N3O2S2	156,0114	C6H6NO2S
Terbutaline	2,77	226,1438	[M+H] <sup>+</sup>	C12H20NO3	152,0706	C8H10NO2
Tetracycline	5,41	445,1606	[M+H] <sup>+</sup>	C22H25N2O8	428,1340	C22H22NO8
<b>Theobromine (1)</b>	1,91	181,0720	[M+H] <sup>+</sup>	C7H9N4O2	138,0662	C6H8N3O
<b>Theophylline (1)</b>	2,84	181,0720	[M+H] <sup>+</sup>	C7H9N4O2	124,0506	C5H6N3O
<b>Venlafaxine (5)</b>	6,34	278,2115	[M+H] <sup>+</sup>	C17H28NO2	260,2009	C17H26NO
Bezafibrate	7,58	360,1008	[M-H] <sup>-</sup>	C19H19ClNO4	274,0662	C15H13ClNO2
Chlorophene	10,24	217,0426	[M-H] <sup>-</sup>	C13H10ClO	219,0396	C13H10[37Cl]O
					85,0301	C4H5O2
<b>Clofibric Acid (10)</b>	6,47	213,0324	[M-H] <sup>-</sup>	C10H10ClO3	126,9958	C6H4ClO
					296,0064	C14H10[37Cl]ClNO2
Diclofenac	9,55	294,0094	[M-H] <sup>-</sup>	C14H10ClNO2	298,0034	C14H10[37Cl]2NO2
					197,0973	C14H13O
Fenoprofen	9,22	241,0870	[M-H] <sup>-</sup>	C15H13O3	211,0757	C14H11O2
					204,98436	C6H6ClNO2S
Furosemide	5,95	329,0040	[M-H] <sup>-</sup>	C12H10ClN2O5S	285,0129	C11H10ClN2O3S
Gemfibrozil	10,52	249,1496	[M-H] <sup>-</sup>	C15H21O3	121,0661	C8H9O
					297,9542	C7H7[37Cl]N3O4S2
					299,9500	C7H7[37Cl]N3O4[34S]S
Hydrochlorothiazide	4,34	295,9572	[M-H] <sup>-</sup>	C7H7ClN3O4S2	301,9458	C7H7[37Cl]N3O4[34S]2
					297,9530	C7H7ClN3O4[34S]S
					299,9488	C7H7ClN3O4[34S]2
Ibuprofen	9,91	205,1234	[M-H] <sup>-</sup>	C13H17O2	161,1336	C11H18
Indomethacin	9,51	356,0695	[M-H] <sup>-</sup>	C19H15ClNO4	312,0798	C17H16ClNO2
Ketoprofen	8,07	253,0870	[M-H] <sup>-</sup>	C16H13O3	209,0975	C15H13O
Pravastatin	6,65	423,2388	[M-H] <sup>-</sup>	C23H35O7	321,17096	C18H25O5
Salicylic Acid	1,29	137,0244	[M-H] <sup>-</sup>	C7H5O3	93,03407	C6H5O

Compuesto	RT (min)	m/z calculada	Ion	Composición elemental	Iones fragmento QTOF-MS/MS		
					CE	m/z calculada	Composición elemental
4-AA	2,18	204,1132	[M+H] <sup>+</sup>	C11H14N3O	15	56,0495	C3H6N
						83,0604	C4H7N2
						94,0651	C6H8N
						159,0917	C10H11N2
4-MAA	1,95	218,1288	[M+H] <sup>+</sup>	C12H16N3O	13	56,0495	C3H6N
						97,076	C5H9N2
						159,0917	C10H11N2
						91,0542	C7H7
Amitriptyline (5)	7,34	278,1903	[M+H] <sup>+</sup>	C20H24N	23	105,0701	C8H9
						191,0855	C15H11
						233,1325	C18H17
						56,05	C3H6N
Antipyrine	5,34	189,1023	[M+H] <sup>+</sup>	C11H13N2O	31	77,03686	C6H5
						106,0651	C7H8N
						147,0917	C9H11N2
						109,0448	C7H6F
Citalopram Hydrobr.	6,74	325,1711	[M+H] <sup>+</sup>	C20H22FN2O	23	234,0714	C16H9FN
						262,1027	C18H13FN
						116,107	C6H14NO
Clarithromycin	7,38	748,4842	[M+H] <sup>+</sup>	C38H70NO13	19	158,1176	C8H16NO2
						590,3899	C30H56NO10
						58,0651	C3H8N
Codeine	3,43	300,1594	[M+H] <sup>+</sup>	C18H22NO3	37	181,0648	C13H9O
						199,0754	C13H11O2
						215,1067	C14H15O2
Cotinina	1,19	177,1023	[M+H] <sup>+</sup>	C10H13N2O	22	80,0495	C5H6N
						98,06	C5H8NO
						146,06	C9H8NO
						106,0418	C4H9CIN
Cyclophosphamide (4)	6,57	261,0321	[M+H] <sup>+</sup>	C7H16Cl2N2O2P	6	120,0209	C3H7NO2P
						140,0028	C4H8Cl2N
						142,0185	C4H10Cl2N
						83,0491	C5H7O
Erythromycin	6,94	734,4685	[M+H] <sup>+</sup>	C37H68NO13	18	116,107	C6H14NO
						158,1176	C8H16NO2
						576,3749	C29H53NO10
Fluoxetine (7)	7,78	310,1413	[M+H] <sup>+</sup>	C17H19F3NO	15	44,0495	C2H6N
						148,1121	C10H14N

Ifosfamide (4)	6,38	261,0321	[M+H] <sup>+</sup>	C7H16Cl2N2O2P	6	78,0103	CH5NOP
						92,026	C2H7NOP
						153,9819	C3H6CINO2P
						182,0132	C5H10CINO2P
Ketorolac (6)	8,32	256,0968	[M+H] <sup>+</sup>	C15H14NO3	12	105,0335	C7H5O
						178,0499	C9H8NO3
						210,0913	C14H12NO
Lincomycin	3,32	407,2211	[M+H] <sup>+</sup>	C18H34N2O6S	20	126,1277	C8H16N
						359,2196	C11H27N12S
Mepivacaine	4,86	247,1805	[M+H] <sup>+</sup>	C15H23N2O	20	70,0651	C4H8N
						98,0964	C6H12N
						150,0913	C9H12NO
Metoprolol	5,73	268,1907	[M+H] <sup>+</sup>	C15H26NO3	23	74,06	C3H8NO
						116,107	C6H14NO
						133,0648	C9H9O
						159,0804	C11H11O
Paroxetine	7,01	330,1500	[M+H] <sup>+</sup>	C19H21FNO3	24	70,0651	C4H8N
						123,0605	C8H8F
						151,039	C8H7O3
						192,1183	C12H15FN
Propyphenazone (2)	8,06	231,1492	[M+H] <sup>+</sup>	C14H19N2O	28	56,0495	C3H6N
						189,1022	C11H13N2O
						201,1022	C12H13N2O
Propranolol	6,36	260,1645	[M+H] <sup>+</sup>	C16H22NO2	22	74,06	C3H8NO
						116,107	C6H14NO
						155,0855	C12H11
						183,0804	C13H11O
Tamoxifen	8,94	372,2322	[M+H] <sup>+</sup>	C26H30NO	26	72,0808	C4H10N
						91,0542	C7H7
						129,0699	C10H9
						123,0665	C5H7N4
Trimethoprim	4,97	291,1452	[M+H] <sup>+</sup>	C14H19N4O3	26	230,1176	C14H16NO2
						261,0982	C12H13N4O3
						275,1139	C13H15N4O3

4-AAA: N-acetyl-4-aminoantipirine; 4-DAA: 4-dimethylaminoantipirine; 4-FAA: N-formyl-4-aminoantipirine

4-AA: 4-aminoantipirine; 4-MAA: 4-methylaminoantipirine

La optimización del procedimiento de extracción se realizó con el objetivo de alcanzar buenas recuperaciones de la mayor parte del grupo de compuestos en una sola etapa de extracción. El uso de un cartucho de SPE óptimo puede tener efectos significativos en las recuperaciones. Para metodologías multirresiduos en las que se determinan simultáneamente diferentes grupos de contaminantes con estructuras que varían mucho, es

necesaria una etapa de preparación de la muestra universal, y se utilizan adsorbentes no selectivos. Las recuperaciones con los cartuchos seleccionados fueron altas para la mayoría de los compuestos analizados. Estos cartuchos de extracción presentan balance hidrofílico (N-vinilpirrolidona) y lipofílico (divinilbenceno) que proporcionan las mejores condiciones para la extracción simultánea de analitos ácidos en agua sin acidificación de la muestra, junto con los analitos neutros en una amplia gama de polaridad. Esto es muy importante cuando se realiza un análisis de residuos múltiples, porque el riesgo de hidrólisis ácida de otros compuestos no aumenta.

El efecto del pH sobre la eficacia de la extracción es un parámetro muy importante. Debido a la diferente polaridad de los compuestos, los experimentos se llevaron a cabo ajustando el pH de las muestras a tres valores diferentes: 5, 7 y 8. Los resultados mostraron que, como regla general, a pH neutro y básico se obtenían los mejores resultados para la mayoría de los analitos, con ligeras diferencias en favor de pH 8, que fue finalmente seleccionado. Las recuperaciones (la media de tres repeticiones  $\pm$  desviación típica relativa) en el pH seleccionado se presentan en la Tabla 2. Como puede observarse, las recuperaciones fueron superiores a 70% en la mayoría de los casos (67 compuestos). Se obtuvieron recuperaciones menores (<50%) en 8 compuestos, aunque en todos los casos las desviaciones estándar relativas observadas fueron inferiores a 20%. Sólo hubo dos 2 analitos que no se recuperaron bien: la amoxicilina y el tamoxifeno. Estos valores se pueden considerar aceptables teniendo en cuenta la amplia gama de polaridades implicadas y la reproducibilidad obtenida.

**Tabla 2. Recuperaciones, linealidad y límites de detección del método analítico mediante LC-QTOF-MS**

Compuesto	Recuperaciones (RSD, %) n = 3	Linealidad		MDL (ng/L)
		Rango (ng/L)	r <sup>2</sup>	
<b>Ionización positiva</b>				
4-AA	112 (7)	5-1000	0,9467	<5
4-AAA	94 (11)	5-1000	0,99	<5
4-DAA	77 (5)	5-250	0,9725	<5
4-FAA	90 (12)	5-1000	0,9857	<5
4-MAA	101 (7)	5-1000	0,9682	<5
Acetaminophen	42 (12)	5-2500	0,9869	<5
Amitriptyline	74 (9)	2-250	0,92274	<5

Compuesto	Recuperaciones (RSD, %) n = 3	Linealidad		MDL (ng/L)
		Rango (ng/L)	r <sup>2</sup>	
Amoxicillin	-(-)	50-1000	0,9596	5 - 50
Antipyrine	114 (8)	5-1000	0,9921	<5
Atenolol	83 (11)	5-125	0,9423	<5
Azithromycin	73 (11)	5-125	0,998	<5
Caffeine	100 (16)	5-2500	0,9988	<5
Carbamazepine epox.	127 (12)	5-2500	0,9934	<5
Carbamazepine	88 (2)	5-1000	0,9915	<5
Cefotaxime	38 (11)	50-2500	0,997	5 - 50
Ciprofloxacin	70 (13)	5-250	0,9682	<5
Citalopram H.	86 (13)	5-250	0,9	<5
Clarithromycin	86 (8)	5-250	0,9458	<5
Clomipramine	51 (16)	5-250	0,9443	<5
Clotrimazole	34 (11)	5-250	0,9669	<5
Codeine	120 (23)	5-250	0,9872	<5
Continine	100 (8)	5-1000	0,9558	<5
Ciclopohosphamide	84 (8)	5-2500	0,9943	<5
Diazepan	90 (14)	5-500	0,9796	<5
Erythromycin	107 (8)	5-250	0,9095	<5
Famotidine	107 (8)	5-125	0,9809	<5
Fenofibrate	20 (3)	1-500	0,9968	<5
Fenofibric Acid	70 (11)	50-2500	0,9885	5 - 50
Fluoxetine	72 (13)	5-125	0,9376	<5
Ifosfamide	81 (18)	5-2500	0,994	<5
Indomethacin	81 (12)	50-2500	0,9968	5 - 50
Ketoprofen	100 (12)	5-2500	0,9997	<5
Ketorolac	83 (2)	5-2500	0,9954	<5
Lansoprazole	91 (12)	5-2500	0,9995	<5
Loratadine	76 (19)	5-125	0,9694	<5
Lincomycin	75 (22)	5-250	0,9915	<5
Mefenamic Acid	67 (13)	50-2500	0,9975	5 - 50
Mepivacaine	91 (6)	5-250	0,93	<5
Metoprolol	100 (5)	5-125	0,9123	<5
Metronidazole	52 (14)	50-2500	0,9873	5 - 50
Mevastatin	93 (10)	5-2500	0,9986	<5
Nadolol	86 (23)	5-125	0,8684	<5

Compuesto	Recuperaciones (RSD, %) n = 3	Linealidad		MDL (ng/L)
		Rango (ng/L)	r <sup>2</sup>	
Naproxen	98 (3)	5-125	0,9751	<5
Nicotine	86 (16)	5-250	0,983	<5
Norfloxacin	52 (13)	5-1000	0,9946	<5
Ofloxacin	102 (5)	5-250	0,9927	<5
Omeprazole	74 (6)	5-2500	0,9854	<5
Paraxanthine	45 (13)	5-2500	0,9925	<5
Paroxetine	55 (18)	5-125	0,9358	<5
Primidone	88 (10)	5-2500	0,9961	<5
Propyphenazone	79 (14)	5-125	0,9753	<5
Propranolol	95 (9)	5-125	0,9586	<5
Ranitidine	109 (8)	5-125	0,9565	<5
Salbutamol	95 (7)	5-125	0,9129	<5
Simvastatin	76 (19)	50-500	0,9925	<5
Sotalol	89 (13)	5-125	0,9521	<5
Sulfadiazine	22 (15)	5-1000	0,9947	<5
Sulfamethazine	98 (7)	5-2500	0,9905	<5
Sulfamethoxazole	57 (2)	5-2500	0,9989	<5
Sulfapyridine	62 (14)	5-1000	0,9968	<5
Sulfathiazole	83 (14)	50-2500	0,9947	5 - 50
Tamoxifen	-(-)	5-125	0,9759	<5
Terbutaline	82 (15)	5-125	0,9286	<5
Tetracycline	25 (11)	50-2500	0,9987	5 - 50
Theobromine	49 (18)	50-2500	0,9924	5 - 50
Theophylline anhydrous	62 (16)	50-2500	0,9924	5 - 50
Trimethoprim	104 (13)	5-500	0,9547	<5
Venlafaxine	79 (16)	5-250	0,977	<5
<b>Ionización negativa</b>				
Bezafibrate	85 (7)	5-2500	0,9795	<5
Chlorophene	104 (9)	5-2500	0,9947	<5
Clofibric Acid	75 (7)	5-2500	0,996	<5
Diclofenac	120 (4)	5-2500	0,9983	<5
Fenoprofen	105 (12)	50-2500	0,9195	5 - 50
Furosemide	83 (6)	50-2500	0,9842	5 - 50
Gemfibrozil	114 (11)	5-2500	0,9754	<5
Hydrochlorothiazide	96 (9)	5-2500	0,9765	<5

Compuesto	Recuperaciones (RSD, %) n = 3	Linealidad		MDL (ng/L)
		Rango (ng/L)	r <sup>2</sup>	
Ibuprofen	116 (13)	5-2500	0,9992	<5
Ketoprofen	100 (12)	50-2500	0,9996	5 - 50
Pravastatin	120 (11)	5-2500	0,9978	<5
Salicylic Acid	10 (14)	5-250	0,9838	<5

MDL: Límite de detección; 4-AAA: N-acetyl-4-aminoantipirine; 4-DAA: 4-dimethylaminoantipirine;

4-FAA: N-formyl-4-aminoantipirine; 4-AA: 4-aminoantipirine; 4-MAA: 4-methylaminoantipirine

### 5.3. Desarrollo de base de datos de masa exacta

Los compuestos seleccionados fueron inyectados individualmente en LC-QTOF-MS, trabajando en el modo MS, a una concentración de 100 µg/mL. Para el método de *screening* automático se recogió en una hoja Excel el tiempo de retención, la masa exacta teórica, y la composición elemental de cada compuesto. Además, se investigó el espectro de masas de cada compuesto cuidadosamente, y fueron incluidos en la base de datos los iones fragmentos característicos (con abundancia relativa superior al 10%, utilizando un valor de *fragmentor* de 190 V) (Tabla 1). Este archivo se puso en formato CSV y se incluyó en el software de análisis automatizado de datos de Agilent. El equipo hace la búsqueda automática o *screening* de los compuestos que hay incluidos en la base de datos, y al final de la inyección se genera un informe con los compuestos identificados.

### 5.4. Identificación con la base de datos de masa exacta

#### 5.4.1. Masa exacta

Una de las principales características de los instrumentos TOF es la medida de la masa exacta, lo que proporciona la masa exacta de los iones del compuesto padre y sus fragmentos. La fiabilidad del método de *screening* depende en gran medida de la robustez del instrumento TOF con el fin de proporcionar mediciones de la masa exacta precisas dentro de una tolerancia de error de masa fija. Para la verificación de la composición elemental, se aceptan mediciones de masa exacta dentro con un margen de error de 5 ppm (García-Reyes, 2007). El sistema Q-TOF utilizado para este trabajo ha demostrado valores de masa de masa exacta con errores <2 ppm en la mayoría de los casos, independientemente del nivel de concentración. Solo se encuentran errores mayores a concentraciones elevadas



o compuestos muy sensibles que pueden producir la saturación del detector. Para lograr una medida de masa exacta, el equipo Q-TOF utiliza una referencia interna automática, dos compuestos de masa conocida se introducen continuamente en la fuente de iones y el software automáticamente calibra el eje de las masas de todo el espectro.

Así mismo, la exactitud de masa puede utilizarse para identificar compuestos desconocidos y diferenciar compuestos isobáricos (compuestos diferentes con la misma masa nominal pero diferente composición elemental y, por tanto, diferentes masas exactas). En los compuestos estudiados se han observado 17 especies isobáricas (en la Tabla 1 se destacan en negrita, y cada par de especies isobáricas están marcadas con el mismo número).

#### 5.4.2. Tiempo de retención

La mayoría de los compuestos isobáricos son resueltos por sus tiempos de retención, tales como sulfatiazole-ketorolac, teofilina-teobromina-paraxantina, la fluoxetina-nadolol o clomipramina- ranitidina. Esto demuestra la importancia de proporcionar los datos de tiempo de retención en el desarrollo de bases de datos para la detección automatizada. Además de esto, cuando se analizan muestras reales, se podría esperar un número mayor de posibles especies interferentes, y el tiempo de retención se puede utilizar para descartar la mayoría de ellos. Otra ventaja de usar los datos de tiempo de retención es un importante ahorro de tiempo, sin tiempo de retención el tiempo dedicado a realizar la búsqueda de una muestra se convertiría en un cuello de botella en el procedimiento de *screening*.

#### 5.4.3. Valor de *score*

Teniendo en cuenta la masa exacta y la distribución isotópica, el software calcula un valor denominado *score*, que se utiliza para clasificar los resultados de la base de datos. El *score* de las fórmulas generada tiene un valor de 0 a 100 y su cálculo se basa en dos factores: masa y patrón isotópico del compuesto.

Incluso en el caso de que no haya ningún patrón isotópico favorable (ausencia de átomos de Cl, Br o S en la molécula), el valor de *score* es muy útil para discriminar entre los posibles composiciones elementales de otros compuestos con distribuciones isotópicas más favorables.

Por ejemplo, en la Figura 3 se muestra un ejemplo de un falso positivo en la identificación del metoprolol. El metoprolol eluye a un tiempo de retención de 5.73 minutos, con m/z

268,1907. Si se extrae manualmente esta masa exacta del TIC de la muestra de agua residual, se puede ver que hay un pico en el minuto 5.71 con  $m/z$  268.1908, lo que sugiere la presencia de metoprolol en la muestra. Sin embargo, la medida del patrón isotópico muestra un patrón que es típico para un compuesto clorado, mientras que el metoprolol no tiene átomos de cloro en su molécula. Utilizando una ventana de masa de 5 ppm y el patrón isotópico calculado por el TOF, se obtiene una única fórmula ( $C_{10}H_{26}ClN_5O$ ) con un buen score de 84.75. En estos casos, para confirmar si el metoprolol está presente, o no, es importante su análisis utilizando el modo QTOF-MS/MS porque a veces si el nivel de concentración del compuesto se aproxima al límite de detección, la identificación puede fallar debido a que la concentración es tan baja que cualquier interferencia de fondo que se superpone con nuestro objetivo podría alterar la distribución isotópica. En este caso, el análisis MS/MS confirmó que el metoprolol no estaba presente en esta muestra.

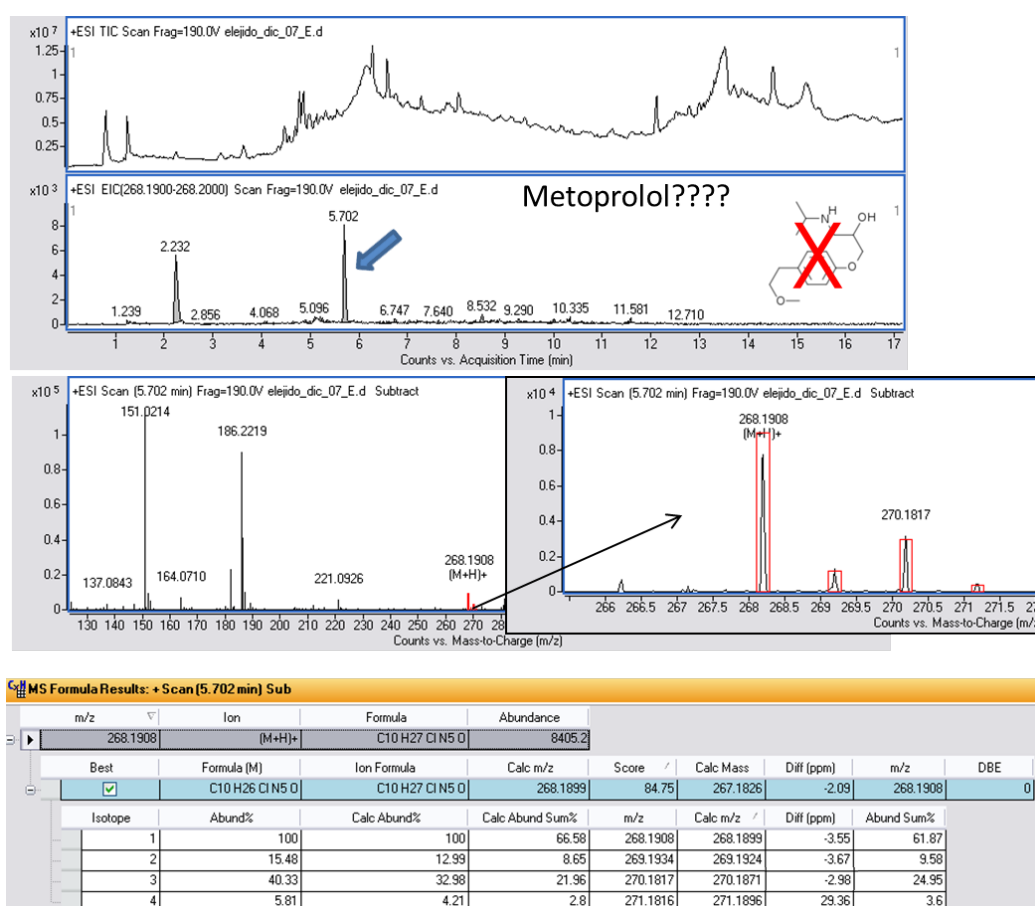


Figura 3. Identificación de un falso positivo de metoprolol mediante el patrón isotópico

#### 5.4.4. Fragmentos generados en la fuente de ionización

La base de datos de masa exacta creada también incluye datos sobre las masas exactas de los iones fragmento característicos generados en la fuente. El voltaje del *fragmentor* es muy importante en el suministro de iones hijos característicos en los espectros de masas.

Cuanto más característicos son los iones fragmento obtenidos, más fiable es la confirmación de la estructura. Se utilizó un voltaje de *fragmentor* relativamente alto, con el fin de obtener información adicional de los iones fragmento con fines de confirmación. El principal inconveniente es la pérdida de sensibilidad en los compuestos, ya que la intensidad del ion molecular disminuye a medida que los fragmentos se forman. Como equilibrio entre la sensibilidad y la fragmentación, se fijó un voltaje de *fragmentor* óptimo de 90 V.

Más de 77% de los compuestos estudiados, por lo menos contenía un ion fragmento característico (ver Tabla 1). El uso de información de la fragmentación es muy útil no sólo como dato adicional para proporcionar una confirmación inequívoca de los resultados, sino también para diferenciar entre los compuestos de alta resolución isobáricos e isómeros. El instrumento QTOF que se utilizó puede resolver interferencias en el intervalo de 10-30 mDa, de modo que puede ser utilizado para resolver la mayoría de las especies isobáricas incluidas en la Tabla 1. Sin embargo, algunas de las especies isobáricas tienen diferencias exactas de masa inferior a 10-30 mDa, por lo que se debe utilizar información adicional incluida en la base de datos para diferenciar entre estas especies isobáricas cuando el tiempo de retención no es suficiente.

Como ejemplo para ilustrar la utilidad de los datos de fragmentación incluidos en la base de datos, en la Figura 4 se muestra el espectro de masas de dos isómeros, la teobromina y la teofilina con la misma composición elemental ( $C_7H_9N_4O_2$ ) y masa exacta ( $m/z$  181.0720). Además, los tiempos de retención (1.091 min para teobromina y 2.84 para la teofilina) son muy similares. En este caso, no se pueden diferenciar por el perfil isotópico. Sin embargo, se pueden distinguir porque tienen fragmentación diferente. El fragmento de la teobromina es un ion de  $m/z$  138.0658, mientras que el fragmento de la teofilina es un ion de  $m/z$  124.0491.

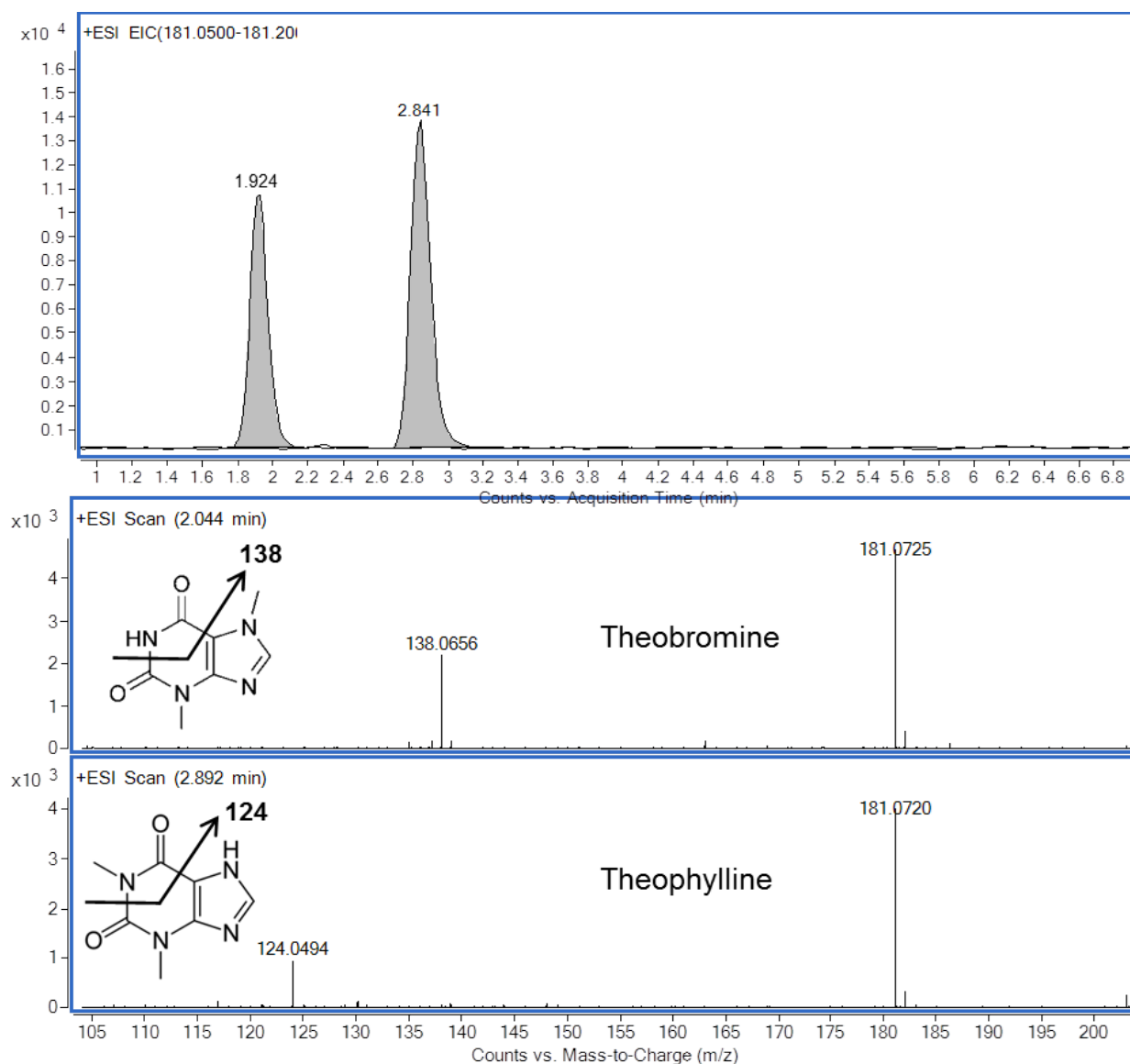


Figura 4. Diferenciación de dos compuestos farmacéuticos isobáricos mediante iones generados en la fuente de ionización

### 5.5. Cuantificación

El método analítico fue evaluado para probar su capacidad de cuantificación. En el procedimiento de validación del método se determinaron la sensibilidad, linealidad, recuperación y precisión. En la Tabla 2, se muestran los parámetros propuestos para el método de LC-MS-QTOF.

La sensibilidad del método de detección es una característica clave para evaluar la viabilidad del procedimiento de screening. Los instrumentos TOF ofrecen una alta selectividad y sensibilidad en condiciones *full-scan* en comparación con otros analizadores pero se ha

documentado que estos analizadores son un orden de magnitud menos sensible para algunos compuestos cuando se compara con un instrumento triple cuadrupolo en modo de trabajo SRM (Lacorte, 2006). Sin embargo, la sensibilidad conseguida por el instrumento QTOF-MS utilizado en este trabajo se ha mejorado utilizando la fuente de iones de electrospray con la tecnología Jet Stream. Esta tecnología utiliza un *gas-sheath* sobrecalentado para dirigir el aerosol nebulizador, aumentando drásticamente el número de iones que entran en el espectrómetro de masas y mejorando la señal ruido. Los límites de detección del método (LDM) de los compuestos analizados en la base de datos se calcularon mediante la inyección de una disolución en matriz de efluente simulado de aguas residuales a tres niveles diferentes de concentración: 5, 50 y 100 ng/L. El ochenta y seis por ciento de los compuestos se detectaron automáticamente, utilizando el método de *screening* desarrollado, en la solución de 5 ng /L, teniendo LDM inferior, o igual a 5 ng /L. Tan sólo no se detectaron 11 compuestos en la disolución de 5 ng/L pero se encontraron usando el método de detección automática en el extracto de 50 ng/L, teniendo un LDM entre 5 y 50 ng/L. La sensibilidad alcanzada mediante este método es suficiente para detectar los compuestos objetivo en las muestras de aguas residuales.

Además de la selectividad y la sensibilidad, el rango dinámico lineal de la respuesta del TOF es importante cuando se aplica para los propósitos cuantitativos. La tecnología Jet Stream es muy útil en la mejora de la sensibilidad, pero esta alta sensibilidad puede causar la saturación del detector, lo que lleva a un error de masa elevado y en algunos casos rangos dinámicos estrechos. Como se puede observar en la Tabla 2, el instrumento QTOF utilizado en este trabajo ofrece un rango dinámico lineal de alrededor de 2-3 órdenes de magnitud. Algunos compuestos que son extremadamente sensibles, pueden llegar a saturar el detector a concentraciones de 125 o 250 ng/L. En estos casos, se podría esperar encontrar errores de masas en el rango de 1-5 ppm si estos compuestos están presentes en la muestra a estos niveles de concentración. El instrumento QTOF utilizado se satura a concentraciones inferiores a otros instrumentos TOF (Mezcua et al., 2009; Gómez et al., 2007), pero el rango dinámico lineal de la mayoría de los compuestos es suficiente para hacer aplicaciones cuantitativas para el análisis de contaminantes orgánicos en aguas, ya que las concentraciones de contaminantes que normalmente se encuentran en las muestras reales se encuentran dentro de los rangos lineales.

Para asegurar la correcta cuantificación de los analitos en las muestras, se determinó la precisión en la respuesta cromatográfica en términos de repetibilidad y reproducibilidad. Las desviaciones estándar relativas (RSD) obtenidas fueron de 0,4% al 19% y del 3% al 22% para los estudios intra-e inter-día, respectivamente.

### 5.6. Aplicación a muestras reales: Agua residuales reutilizadas en riego

El método desarrollado fue aplicado para el análisis de 3 muestras de agua residual procedente de la Estación depuradora de Aguas residuales de El Ejido y tres muestras de esa misma agua tratada con foto-Fenton solar, que fueron aplicadas a un cultivo de calabacín como agua de riego.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. Las muestras fueron analizadas en modo *full-scan* con screening automático utilizando la base de datos de compuestos farmacéuticos.

**Tabla 3. Concentración de los compuestos detectados en aguas de riego. Agua residual urbana tratada con tratamiento secundario y agua residual urbana regenerada con foto-Fenton solar**

Compuesto	Concentración (ng/L)	
	Agua secundario*	Agua foto-Fenton*
4-AA	1429	--
4-AAA	23233	5911
4-FAA	7979	3246
4-MAA	3986	--
Antipyrine	70	45
Atenolol	1054	492
Azithromycin	405	--
Benzafibrate	182	69
Caffeine	41700	7547
Carbamazepine	116	93
Ciprofloxacin	923	--
Citalopram HBr	141	71
Clarithromycin	217	68
Clofibric Acid	8	--
Codeine	902	328
Cotinine	18065	6332
Diazepan	18	18
Diclofenac	854	--

Compuesto	Concentración (ng/L)	
	Agua secundario*	Agua foto-Fenton*
Carbamazepine		
epox	33	22
Erythromycin	244	65
Famotidine	30	--
Fenofibric Acid	190	--
Furosemide	1701	--
Hidrochlorothiazide	2673	--
Ibuprofen	7398	2846
Indomethacine	103	--
Ketoprofen	601	16
Lincomycin	145	66
Mefenamic Acid	20	11
Mepivacaine	28	21
Nadolol	28	15
Naproxen	3163	589
Nicotine	4979	1040
Norfloxacin	107	--
Ofloxacin	860	56
Paraxanthine	10185	1558
Pravastatin	271	76
Primidone	108	59
Propanolol	27	12
Propyphenazone	95	70
Ranitidine	630	36
Salicilic_Acid	93	32
Sotalol	17	11
Sulfamethazine	167	58
Sulfamethoxazole	1100	293
Sulfapyridine	219	67
Sulfathiazole		11
Terbutaline	17	8
Trimethoprim	377	145
Velafaxime	368	176

\*Concentraciones medias de tres muestras de agua

Como se muestra en la Tabla 3, se detectan en las muestras de agua residual urbana tratada con tratamiento secundario 49 de los 78 compuestos incluidos en la base de datos, lo que

indica su resistencia a los tratamientos convencionales del agua que se aplican habitualmente en las estaciones depuradoras de aguas residuales. El rango de contaminantes detectado en las muestras de agua residual depurada fue de 8 a 41700 ng/L, concentraciones correspondientes a un regulador lipídico, el ácido clofítrico y a la cafeína respectivamente. Los compuestos detectados a concentraciones más altas fueron la cafeína y su metabolito paraxantina (41700 y 10185 ng/L), dos metabolitos del analgésico antipirina 4-AAA y 4 F-AA (23233 y 7979 ng/L), el antiinflamatorio ibuprofeno (7979 ng/L) y el metabolito de la nicotina denominado cotinina (18065 ng/L).

En el agua regenerada con tratamiento terciario de foto-Fenton solar, se detectan 38 compuestos de los 78 analizados, un número menor de compuestos que en el agua residual tratada solo hasta tratamiento secundario. Las concentraciones medias son más bajas y se encuentran en un rango de 8 a 7547 ng/L correspondientes al compuesto con actividad broncodilatadora terbutalina y a la cafeína respectivamente. Los compuestos encontrados a concentraciones más altas, al igual que en el agua residual tratada, son la cafeína, la cotinina, 4-AAA, 4-FAA y paraxantina pero se detectan a concentraciones más bajas 7547, 6332, 5911, 3246, 2846 y 1558 ng/L respectivamente. Como se observa en la Figura 5, la carga total de compuestos encontrados en el agua residual tratada con secundario es de 137244 ng/L frente a la del agua regenerada con foto-Fenton de 31576 ng/L. El tratamiento de foto-Fenton degrada los compuestos estudiados pero parte de ellos no son eliminados completamente y se siguen encontrando a niveles traza, por lo que el tratamiento debe ser mejorado con el fin de degradar por completo estos contaminantes.

Es interesante señalar que cuatro de los compuestos encontrados a mayor concentración y en ambos tipos de agua (cotinina, paraxantina, 4-AAA y 4-FAA) son metabolitos, lo que indica que el *monitoring* de metabolitos y productos de transformación es necesario en este tipo de estudios



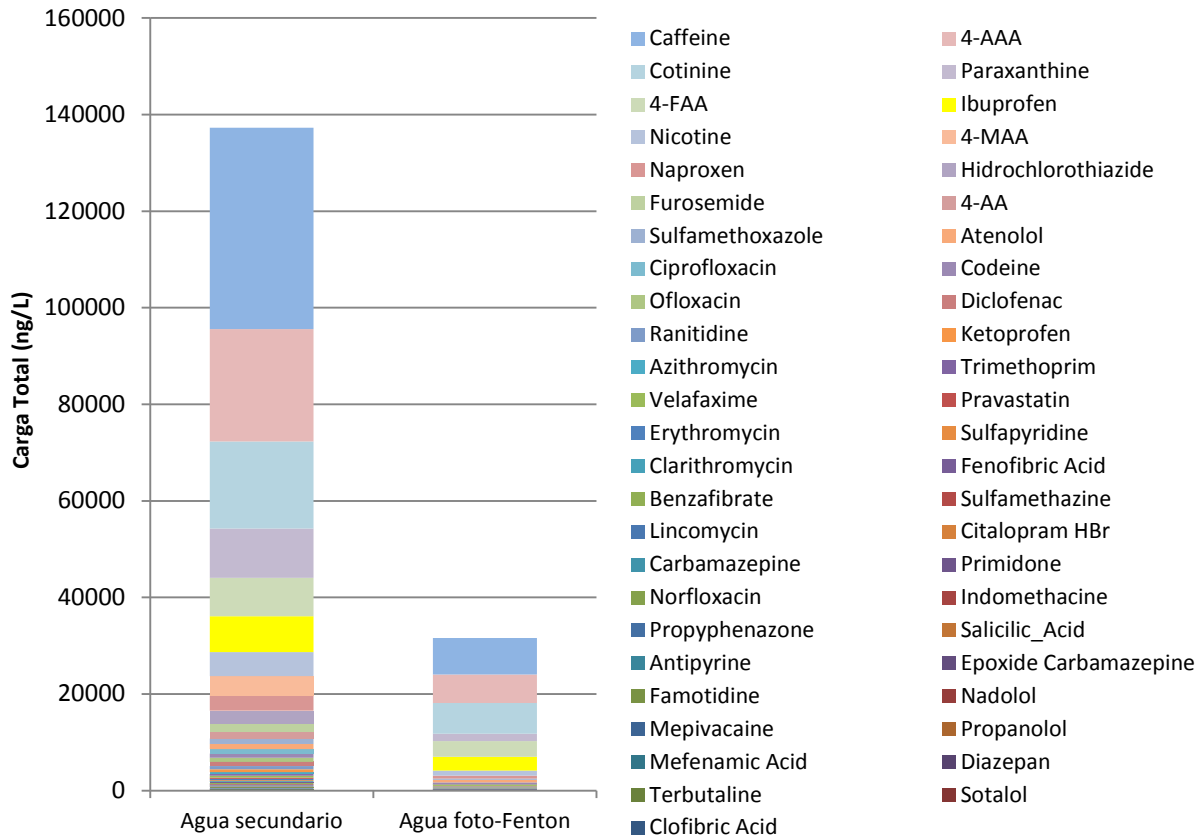


Figura 5. Carga total de contaminantes (ng/L) en agua residual tratada con secundario y agua residual regenerada con foto-Fenton solar

De los compuestos detectados, la cafeína es uno de los fármacos más extendidos, por lo que se ha utilizado incluso como marcador de la contaminación antropogénica por aguas residuales domésticas en aguas superficiales (Buerge et al., 2003). Aunque la presencia de cafeína en las aguas es principalmente debida al consumo de café y otras bebidas estimulantes, se usa también como fármaco, administrado conjuntamente con otros principios activos para incrementar la efectividad de los mismos. Otros fármacos como el ácido clorfibracico, ibuprofeno, carbamazepina, o atenolol, encontrados en el presente análisis de agua de riego, son también omnipresentes en las aguas residuales y superficiales (Nikolaou et al., 2007).

La mayoría de los compuestos encontrados en el agua están poco estudiados y para ellos no se han establecido todavía criterios de calidad ambiental. Algunos son fácilmente absorbidos por la planta, por lo que deben ser tenidos en cuenta a la hora de su reutilización como agua de riego. Por ejemplo, la carbamazepina, puede ser tomada incluso a concentraciones bajas de 1-3  $\mu\text{g/L}$  en el agua de riego (Shenker et al., 2011). Así mismo, sobre todo los compuestos

más polares como la carbamazepina, gemfibrozil, ibuprofeno, sulfametoxazol etc. que presentan una gran movilidad en el medio acuático, pueden llegar a contaminar las aguas subterráneas a través del riego, a no ser que se absorban o degraden durante su paso por el suelo.

Las concentraciones de fármacos encontradas en efluentes usados para riego, en algunos casos a niveles de  $\mu\text{g/L}$ , como los encontrados en este estudio, preocupan por el potencial riesgo para la salud que puede suponer su exposición a bajas concentraciones a largo plazo o por su paso a la cadena alimentaria (Shenker *et al.*, 2011).

### 5.7. Resultados analíticos de la reutilización del agua residual en cultivo de calabacín

El cultivo de calabacín tuvo una duración de 3 meses durante los cuales se estuvo regando con el agua residual urbana con tratamiento secundario (T0) y la misma agua residual urbana pero regenerada con un tratamiento adicional de foto-Fenton solar (T1). En la Tabla 4 se muestran los resultados de los análisis en sustrato, hoja y fruto de calabacín.

**Tabla 4** Concentración de contaminantes presentes en el agua de riego en sustrato y planta. T0 (plantas regadas con agua residual tratada con tratamiento secundario) T1 agua residual regenerada con foto-Fenton solar.

Compuestos	Sustrato ( $\mu\text{g/kg}$ )*		Fruto de calabacín ( $\mu\text{g/kg}$ **)		
	T0	T1	Compuestos	T0	T1
4-AAA	32.55	24.09	4-AAA	1.17	0.91
4-FAA	9.21	1.54	Nicotina	0.38	0.27
Atenolol	5.48	0.04	<b>Hojas de calabacín (<math>\mu\text{g/kg}</math>**)</b>		
Cafeína	1.36	1.29	Compuestos	T0	T1
Carbamazepina	0.91	0.74	4-AAA	17.97	14.01
Mepivacaina	0.11	0.00	4-FAA	10.82	6.13
Nicotina	4.13	0.00	Antipirina	14.81	13.90
Trimetoprim	2.67	1.07	Cafeína	2.95	1.17
Velafaxime	1.56	0.54	Nicotina	1.58	2.60

\*Peso seco

\*\*Peso fresco

Los fármacos son fácilmente absorbibles y presentan tendencia a acumularse en suelos (Díaz-Cruz et al., 2003). En este estudio, se acumulan 9 compuestos en el sustrato regado con agua procedente de secundario y 7 compuestos en el sustrato regado con agua tratada con foto-Fenton, con concentraciones comprendidas entre 0.11 - 32 µg/kg (T0) y 0.04 - 24.09 µg/kg en peso seco. El uso de agua reutilizada es una ruta muy importante para la introducción de compuestos xenobióticos en el medio ambiente y aunque no existe regulación que establezca unos niveles máximos tolerables de estos compuestos en el suelo, hay estudios que indican que los residuos farmacéuticos, que son reversiblemente absorbidos en el suelo, pueden ser absorbidos por las plantas (Schneider, 2008) y por lo tanto pasar a la cadena alimenticia. Por otro lado, los productos farmacéuticos, pueden afectar a la comunidad microbiana del suelo, modificando la simbiosis de los microorganismos, lo que puede repercutir en daños directos para la planta (Thiele-Bruhn, 2003, Chander et al, 2005).

En la planta de calabacín se acumulan compuestos tanto en las hojas como en el fruto. En ambos tratamientos, se acumulan en las hojas cinco compuestos, tres metabolitos de la dipirona, la nicotina y la cafeína, con concentraciones comprendidas entre 1.58 – 17.97 (T0) y 1.17- 14.01 (T1) µg/kg en peso fresco. Estos compuestos coinciden con los encontrados en el agua de riego a mayor concentración. En fruto de calabacín se acumulan en ambos tratamientos dos compuestos, el metabolito de la dipirona 4-AAA y la nicotina.

La concentración y el número de compuestos acumulados en la planta son mayores en las hojas que en el fruto. En el caso del compuesto 4-AAA se acumula en las hojas un 96 % del total acumulado en la planta, valores algo superiores a los encontrados anteriormente en estudios realizados por Shenker et al., (2011), en los que el 76-84 % de la acumulación de carbamazepina total en planta de pepino se produjo en las hojas. Sin embargo, aunque las concentraciones encontradas en los frutos son muy bajas, de 1.17 µg/kg (4-AAA) y 0.38 µg/kg (nicotina) en relación con la dosis máxima terapéutica recomendada para la dipirona (6 g/día) y la nicotina presente en un cigarrillo (0.05-2.75 mg/kg), y en principio no deben suponer un riesgo para el consumidor, estos compuestos pueden presentar efectos sinérgicos o combinados con otros presentes en la planta, por lo que deben ser estudiados.

## 6. Conclusiones

---

- El método de extracción optimizado obtiene recuperaciones superiores al 70% en el 86% de los compuestos estudiados, por lo que está indicado para el estudio de contaminantes orgánicos de una amplia gama de polaridades en muestras de agua residual.
- Con el trabajo realizado, se ha demostrado la aplicabilidad y la eficacia de la técnica de *screening* automático por LC-QTOF-MS mediante en el uso base de datos de masa exacta, para el análisis cualitativo
- Se ha demostrado la viabilidad de la aplicación del método LC-QTOF-MS desarrollado para la cuantificación de los compuestos estudiados a niveles de concentración del orden de ng/L. El método ha demostrado ser una alternativa simple, rápida y viable para el control rutinario de contaminantes orgánicos en aguas.
- Los resultados obtenidos en el análisis de agua residual muestran que están presentes un gran número de los contaminantes estudiados (62% en aguas depuradas mediante tratamiento secundario y 49% en aguas tratadas mediante tratamiento terciario con foto-Fenton) en concentraciones de ng/L y mg/L.
- El tratamiento de foto-Fenton solar evaluado en el estudio no es totalmente efectivo para la eliminación de compuestos orgánicos.
- Debido al número elevado de contaminantes orgánicos, presentes en el agua de riego residual depurada, es necesario un control continuo de la misma para prevenir acumulaciones en el suelo y la contaminación de aguas subterráneas.
- Algunos de los compuestos presentes en el agua de riego se acumulan en el sustrato y pueden ser absorbidos por las plantas. Aunque las concentraciones en fruto y hoja son muy bajas, pueden existir efectos combinados con otros compuestos orgánicos y éstos deben ser estudiados, principalmente en los vegetales cuyas partes comestibles son las hojas.



## 7. Bibliografía

---

AATSE, 2004. Water recycling in Australia.

Agüera A., Piedra L., Hernando M.D., Fernández-Alba A.R. Multiresidue method for the analysis of five antifouling agents in marine and coastal waters by gas chromatography-mass spectrometry with large-volume injection. *J. Chromatogr. A* , 2000. 889:261-269

Al Nasir, F., Batarseh, M.I. Agricultural reuse of reclaimed water and uptake of organic compounds: Pilot study at Mutah University wastewater treatment plant, Jordan. *Chemosphere* 2008. 72, 1203-1214.

Alder, L., K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth. Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: Better by Gc-Ms or Lc-Ms/Ms?. *Mass Spectrometry Reviews* , 2006. 25( 6): 838-65.

Alder, L., S. Lüderitz, K. Lindtner, H. J. Stan. The Echo Technique - the More Effective Way of Data Evaluation in Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Chromatography A* , 2004. 1058 (1-2): 67-79.

Badawy M.I., Wahaab R.A., El-Kalliny A.S. Fenton-biological treatment processes for the removal of some pharmaceuticals from industrial wastewater *Journal of Hazardous Materials*, 2009. 167:567–574

Barb W.G., Baxendale J.H., George P., Hargrave K.R. Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Part II. – The ferric ion reaction *Transactions of the Faraday Society* 1951. 47 : 591-616

Barceló, D. Emerging pollutants in water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003 22: 14-16

Bedner, M., W. A. MacCrehan. Transformation of Acetaminophen by Chlorination Produces the Toxicants 1,4-Benzoquinone and N-Acetyl-P-Benzoquinone Imine. *Environmental Science and Technology* , 2006. 40 (2): 516-22.

Ben W., Qiang Z., Pan X., Chen M.. Removal of veterinary antibiotics from sequencing batch reactor SBR pretreated swine wastewater by Fenton's reagent *Water Research*, 2009. 43:4392–4402

Berto J., Rochenbach G.C., Barreiros M.A.B., Corrêa A.X.R., Peluso-Silva S., Radetski C.M. Physico-chemical, microbiological and ecotoxicological evaluation of a septic tank/Fenton reaction combination for the treatment of hospital wastewaters *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009. 72:1076–1081.

Brown R.F., Jamison S.E., Pandit U.K., Pinkus J., White G.R., Braendlin H.P. The reaction of Fenton's reagent with phenoxyacetic acid and some halogensubstituted phenoxyacetic acids. *Journal of Organic Chemistry*, 1964. 29:146-153..

Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D., Buser, H.R. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ. Sci. Technol* 2003. 37,:691-700.

CAN, C.N.d.A.M., 2004. Water Statistics, National Water Commission, Mexico City.

Candela, L., Fabregat, S., Josa, A., Suriol, J., Mas, J., N. Vignes . Assesment of soil and groundwater impacts by treated urban wastewater reuse. A case study: application in a golf course (Girona, Spain). *Science of Total Environment* 2007. 374: 26-35

Castiglioni, S., R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zuccato. A Multiresidue Analytical Method Using Solid-Phase Extraction and High-Pressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry to

- Measure Pharmaceuticals of Different Therapeutic Classes in Urban Wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 2005. 1092 (2): 206-15.
- Chander Y., Kumar K., Goyal S.M., Gupta S.C. Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *J Environ Qual* 2005.34:1952–7.
- Chimuka L., Cukrowska E., Jonsson J. A. Why liquid membrane extraction is an attractive alternative in sample preparation. *Pure and Applied Chemistry*, 2004.76:707–722.
- COM 2007. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo. Afrontar el desafío de la escasez de agua y la sequía en la Unión Europea. COM (2007) 414 final.
- COM, 2006. Proposal for a Directive of the European parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. Brussels, 17.7.2006.
- Comninellis C., Kapalka A., Malato S., Parsons A., Poulios L., Mantzavinos D.. Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D. *J Chem Technol Biotechnol*. 2008.83: 769–776,
- Cooper E.R., Siewicki T.C., Phillips K. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Sci Total Environ* 2008. 398:26–33.
- Daughton C.G., Ternes T.A Pharmaceuticals and Personal Care Products in the environment: Agentes of subtle change? *Environ. Health Perspect.*,1999. 107: 907-938.
- Díaz-Cruz, M. S., Barceló D.Lc-MS2 Trace Analysis of Antimicrobials in Water, Sediment and Soil. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2005. (247): 645-57.
- Díaz-Cruz, M.S., López De Alda, M.J., Barceló, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 2003. 22: 340-351.
- Document Sanco 10684/2011. Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
- Ensink, H.H., T. Mehmood, W. Vand der Hoeck, L. Raschid-Sally and F.P. Amerasinghe. Amerasinghe, A nation-wide assessment of wastewater use in Pakistan: an obscure activity or a vitally important one?, *Water Policy* 2004. 6: 197–206
- Fang H. F., Zeng Z. R., Liu L., Pang D. W. On-line back extraction field-amplified sample injection method for directly analyzing cocaine and thebaine in the extractants by solventmicroextraction. *Analytical Chemistry*, 2006. 78:1257–1263.
- Fatta, D., A. Achilleos, A. Nikolaou, S. Meriç. Analytical Methods for Tracing Pharmaceutical Residues in Water and Wastewater. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007. 26(6): 515-33.
- Fent, K., A. A. Weston, D. Caminada. Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 2006. 76(2): 122-59.
- Fenton H.J.H.. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of Chemical Society*, 1984. 65:899-910.
- García-Reyes, J. F., A. Molina-Díaz, A. R. Fernández-Alba. Identification of Pesticide Transformation Products in Food by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry Via Fragmentation-Degradation Relationships. *Analytical Chemistry*, 2007. 79(1): 307-21.
- Gogate P.R., Pandit A.B. A review of comparative technologies for wastewater treatment. I: oxidation technologies at ambient conditions. *Adv. Environ. Res.* 8 2004 501-551.

Gómez M.J., Agüera A., Mezcua M., Hurtado J., Mocholí F., Fernández-Alba A.R. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography-tandem mass spectrometry in wastewater. *Talanta* , 2007. 73: 314-320.

Gómez M.J., Gómez-Ramos M.M., Agüera A., Mezcua M., Herrera S, Fernández-Alba A.R.. A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters. *Journal of Chromatography A*, 2009 . 1216 18:4071-4082.

Gómez, M. J., M. J. Martínez Bueno, S. Lacorte, A. R. Fernández-Alba, A. Agüera. Pilot Survey Monitoring Pharmaceuticals and Related Compounds in a Sewage Treatment Plant Located on the Mediterranean Coast. *Chemosphere* , 2007. 66(6): 993-1002.

Gómez, M. J., M. Petrović, A. R. Fernández-Alba, Barceló D. Determination of Pharmaceuticals of Various Therapeutic Classes by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis in Hospital Effluent Wastewaters. *Journal of Chromatography A* , 2006. 1114(2): 224-33.

Gómez, M. J., O. Malato, I. Ferrer, A. Agüera, A. R. Fernández-Alba. Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Time-of-Flight-Mass Spectrometry to Evaluate Pharmaceuticals in Effluents. A Pilot Monitoring Study. *Journal of environmental monitoring : JEM* , 2007. 9(7): 718-29.

Gros, M., M. Petrović, Barceló D. 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* , 2006. 70 (4): 678-90.

Gros, M., M. Petrović, Barceló D. Multi-Residue Analytical Methods Using Lc-Tandem Ms for the Determination of Pharmaceuticals in Environmental and Wastewater Samples): A Review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 2006. 386(4): 941-52.

Hada, M., M. Takino, T. Yamagami, S. Daishima, K. Yamaguchi. Trace Analysis of Pesticide Residues in Water by High-Speed Narrow-Bore Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Programmable Temperature Vaporizer. *Journal of Chromatography A* , 2000. 874(1): 81-90.

Hernández, F., O. J. Pozo, J. V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch. Multiresidue Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Determination of 52 Non Gas Chromatography-Amenable Pesticides and Metabolites in Different Food Commodities. *Journal of Chromatography A* , 2006. 1109(2): 242-52.

Hernando, M. D., E. Heath, M. Petrovic, Barceló D. Trace-Level Determination of Pharmaceutical Residues by Lc-Ms/Ms in Natural and Treated Waters. A Pilot-Survey Study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 2006a. 385(6): 985-91.

Hernando, M. D., M. Mezcua, A. R. Fernández-Alba, Barceló D. Environmental Risk Assessment of Pharmaceutical Residues in Wastewater Effluents, Surface Waters and Sediments. *Talanta* , 2006b. 69(2): 334-42.

Hogenboom, J.A. van Leerdam, P. de Voogt. Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009. 1216 3: 510-519

Hyötyläinen, T., M. Kallio, K. Hartonen, M. Jussila, S. Palonen, M. L. Riekkola. Modulator Design for Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography: Quantitative Analysis of Polyaromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls. *Analytical Chemistry* , 2002. 74 (17): 4441-46.

Ibáñez, M., C. Guerrero, J. V. Sancho, F. Hernández. Screening of Antibiotics in Surface and Wastewater Samples by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography Coupled to Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* , 2009. 1216 (12): 2529-39.



Ibáñez, M., J. V. Sancho, F. Hernández, D. McMillan, and R. Rao. Rapid Non-Target Screening of Organic Pollutants in Water by Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled to Time-of-Light Mass Spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2008. 27(5): 481-89.

Jones, O. A. H., N. Voulvoulis, and J. N. Lester. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment a Review. *Environmental Technology*, 2001. 22(12): 1383-94.

Kaliskan, R. Quantitative Structure-Retention Relationships. *Analytical Chemistry* 64, 11, 1992. 64(11): 619A-31A.

Kong W.D., Zhu Y.G., Liang Y.C., Zhang J., Smith F.A., Yang M. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environ Pollut* 2007. 147(1):87-193.

Kozak, R. G., D'Haese, I., Verstraete, W. Pharmaceuticals in the Environment: Focus on 17-ethinyloestradiol. In: *Pharmaceuticals in the Environment*; Kuemmerer, K., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2001. 6, p 50.

Kümmerer, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 2009. 90: 2354-2366.

Lacorte, S., and A. R. Fernandez-Alba. Time of Flight Mass Spectrometry Applied to the Liquid Chromatographic Analysis of Pesticides in Water and Food. *Mass Spectrometry Reviews*, 2006. 25(6): 866-80.

Lai, T.V. Perspectives of peri-urban vegetable production in Hanoi. Background paper prepared for the Action Planning Workshop of the CGIAR Strategic Initiative for Urban and Peri-urban Agriculture (SIUPA), 2000. Hanoi, 6–9 June. Convened by International Potato Center (CIP), Lima.

Legrini O., Oliveros E., Braun A.M. Photochemical processes for water-treatment. *Chemistry Review* 1993. 93:671-698

Lord H., Pawliszyn J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 2000. 885: 153–193.

Malato S, Fernández-Ibáñez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends *Catalysis Today*, 2009. 147: 1–59

Martínez Bueno, M. J., A. Agüera, M. J. Gómez, M. D. Hernando, J. F. García-Reyes, and A. R. Fernández-Alba. Application of Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry to the Determination of Pharmaceuticals and Related Contaminants in Wastewater. *Analytical Chemistry*, 2007. 79(24): 9372-84.

Mezcua, M., O. Malato, J. F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, and A. R. Fernández-Alba. Accurate-Mass Databases for Comprehensive Screening of Pesticide Residues in Food by Fast Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2009. 81(3): 913-29.

Migliore L., Civitareale C., Cozzolino C., Casoria P., Brambilla G., Gaudio L. Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants. *Chemosphere* 1998. 37:2957–61.

Muñoz .I, Gómez-Ramos M.J., Agüera A., García-Reyes J.F., Molina-Díaz A, Fernández-Alba R. Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture. *Trends Anal Chem* 2009. 28:676–94.

Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. 387: 1225-1234.

*OECD 1999 OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Simulation Test-Aerobic Sewage Treatment 303A*

Pavlovic D. M., Babic S., Horvat A. J. M., Kastelan- Macan M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007.26:1062–1075.

Pignatello J.J. Dark and photoassisted iron<sup>3+</sup>-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology*, 1992. 26 :944

Real Decreto 1315/1992, de 30 de octubre por el que se modifica parcialmente el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril. Pp. 40563-40565.

Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.

Redshaw, C.H., Wootton, V.G., Rowland, S.J. Uptake of the pharmaceutical Fluoxetine Hydrochloride from growth medium by Brassicaceae. *Phytochemistry* 2008. 69, 25: 10-2516.

Ruppert G., Bauer R., Heisler G. The photo-Fenton reaction - an effective photochemical wastewater treatment process. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1993. 73 -75.

Sanchez-Rojas F., Bosch-Ojeda C., Cano-Pavon J. M. A review of stir bar sorptive extraction. *Chromatographia*, 2009. 69: 79– 94.

Schneider R.J. Plant uptake of pharmaceuticals from soil: determined by ELISA. In: *Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems*. Aga D, editor CRC Press: 2008. 181 pp

Shemer H., Y.K Kunukcu Y.K, Linden K.G. Degradation of the pharmaceutical Metronidazole via UV, Fenton and photo-Fenton processes *Chemosphere*,2006. 63 :269–276

Shenker, M., Harush, D., Ben-Ari, J., Chefetz, B.. Uptake of carbamazepine by cucumber plants - A case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* 2011. 82: 905-910.

Thiele-Bruhn, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 2003. 166: 145-167.