

Trabajo Fin de Máster

Facultad de Ciencias Experimentales



Extracción tipo QuEChERS para la determinación de microcontaminantes orgánicos en agua residual mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

QuEChERS extraction for the determination of organic microcontaminants in wastewater by liquid chromatography coupled to mass spectrometry

Álvaro Jesús Gilabert Belmonte

Curso académico 2018-2019

Convocatoria de julio

09/07/2019

Extracción tipo QuEChERS para la determinación de microcontaminantes orgánicos en agua residual mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

Memoria del Trabajo Fin de Máster en Laboratorio Avanzado de Química presentada por
Álvaro Jesús Gilabert Belmonte

Almería, 9 de Julio de 2019

Fdo.: Álvaro Jesús Gilabert Belmonte

Fdo.: Ana María Agüera López

Fdo.: Patricia Plaza Bolaños

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. Microcontaminantes orgánicos en aguas residuales	5
3.2. Legislación	6
3.3. Análisis de MCO en aguas residuales	8
3.3.1. Tratamiento de la muestra	10
3.3.2. Análisis mediante técnicas cromatográficas	16
3.3.3. Cromatografía de líquidos	20
3.3.4. Ionización por electrospray	22
3.3.5. Analizadores de espectrometría de masas	24
3.3.5.1 Analizador híbrido triple cuadrupolo-trampa de iones lineal (QqLIT)	25
4. OBJETIVOS	27
5. MÉTODOS EXPERIMENTALES	27
5.1. Reactivos y aparatos	27
5.2. Extracción de muestra	28
5.3. Análisis mediante LC-QqLIT-MS/MS	29
5.4. Análisis mediante LC-QTOF-MS	31
5.5. Validación del método	32
5.6. Aplicación del método a muestras de agua residual real	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1. Optimización del método espectrométrico	34
6.2. Optimización de la etapa de extracción	35
6.3. Optimización de la etapa de <i>clean-up</i>	37
6.4. Estudio de la aplicación de factores de concentración	38
6.5. Validación	39
6.6. Aplicación a muestras reales	47
7. CONCLUSIONES	49
8. BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS	50
9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	54
ANEXO 1: Parámetros de operación del LC-QqLIT-MS/MS	58

1. RESUMEN

La ineficiencia de las estaciones depuradoras de agua residual (EDAR) a la hora de eliminar microcontaminantes orgánicos (MCO), hace que estos estén presentes en el medioambiente a bajas concentraciones, produciendo efectos adversos para los seres vivos. Por ello, se ha desarrollado un método rápido, fiable y de bajo coste para la determinación de MCO en agua residual. El novedoso tratamiento de muestra consiste en una extracción tipo QuEChERS, inicialmente ideada para la extracción de plaguicidas en muestras sólidas. El análisis se llevó a cabo por cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo-trampa de iones lineal. Los parámetros validados fueron: linealidad, veracidad, precisión, límites de cuantificación y efecto matriz. Dicho método se empleó satisfactoriamente para la determinación de MCO en agua residual, proveniente de la EDAR de El Toyo (Almería).

Palabras clave: *Microcontaminantes orgánicos, QuEChERS, agua residual, LC-MS/MS.*

2. ABSTRACT

The inefficiency of wastewater treatment plants (WWTPs) when removing organic microcontaminants (OMCs), makes them present in the environment at low concentrations, producing adverse effects for living beings. Therefore, a fast, reliable and low-cost method for the determination of OMCs in wastewater has been developed. The novel sample treatment consists of QuEChERS-type extraction, initially designed for the extraction of pesticides in solid samples. The analysis was performed by liquid chromatography coupled to a triple quadruple-linear ion hybrid mass spectrometer. The validated parameters were: linearity, veracity, precision, limits of quantification and matrix effect. This method was successfully applied for the determination of OMCs in wastewater, coming from the WWTP in El Toyo (Almería).

Keywords: *Organic microcontaminants, QuEChERS, wastewater, LC-MS/MS*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Microcontaminantes orgánicos en aguas residuales

Los microcontaminantes orgánicos (MCO) son sustancias químicas que están presentes en el medioambiente (aguas, suelos, etc.) a niveles de ultratrazas ($\mu\text{g/L}$ – ng/L), y que en la mayoría de los casos no están regulados.¹ Este término abarca un amplio rango de compuestos como plaguicidas, fármacos, productos de higiene personal, retardantes de llama, etc., siendo mayoritarios los fármacos y plaguicidas, debido a su frecuente uso por el ser humano.¹

La presencia de MCO en el medioambiente es un tema de actual preocupación, debido principalmente a los efectos adversos que pueden originar sobre los seres vivos, como consecuencia de su distribución en suelos, aguas superficiales, aguas de consumo, etc.^{1,2} Entre estos efectos se pueden citar problemas relacionados con el cáncer, mutaciones genéticas, bioacumulación y/o perturbaciones del sistema endocrino, estas últimas originadas por sustancias conocidas como disruptores endocrinos (*endocrine disrupting chemicals*, EDC).^{3,4} Muchos de estos EDC son plaguicidas organoclorados, los cuales a bajas concentraciones producen efectos como infertilidad, disfunción eréctil y alteraciones en los niveles de hormonas reproductoras.⁴ Otro problema relacionado con la presencia de MCO en el medioambiente, en concreto con los antibióticos, es la aparición de resistencias bacterianas que se puede generar a los mismos. Esto es debido a que parte de las dosis ingeridas por humanos y animales son excretadas sin alteración, llegando al medioambiente y provocando que las bacterias puedan llegar a desarrollar genes resistentes a los antibióticos.⁵ La resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos, por lo que se ha convertido en un tema de alta prioridad para la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Una de las principales vías por la que los MCO alcanzan el medioambiente es a través de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) debido a la ineficiente eliminación de estos compuestos en los procesos de tratamiento convencionales empleados. En la actualidad, es bien conocido que el tratamiento biológico, o tratamiento secundario, aplicado en las EDAR convencionales es insuficiente para la total eliminación de estos MCO. Una eliminación más efectiva de los mismos implica la aplicación y/o desarrollo de procesos de tratamiento terciarios, generalmente más costoso y complejos (como la ozonización, el proceso Fenton y foto-Fenton, los reactores biológicos de membrana, etc.), como continuación al tratamiento secundario,^{1,5} mejorando así la calidad de los efluentes. Aun así, estos procesos pueden no ser suficientes para la eliminación total de los MCO, ya que aunque en algunos casos se produce la degradación del contaminante, pueden generarse productos de transformación que pueden presentar una mayor toxicidad y persistencia que el propio precursor.⁶ El destino de los MCO viene marcado por la liberación del efluente a ríos, mares o lagos o por la reutilización del agua tratada para diversos usos, como el riego, que puede repercutir en el desarrollo de los cultivos irrigados con dicha agua, así como en la calidad del fruto.^{1,5,7}

Debido a la problemática que presentan los MCO, organismos como la Unión Europea (UE) y la Agencia de Protección del Medio Ambiente (*environmental protection agency*,

EPA) de Estados Unidos, promueven regulaciones de estos compuestos para controlar y tratar de eliminarlos.

3.2. Legislación

Uno de los principales temas de preocupación para administraciones públicas y gobiernos, es la escasez y progresivo deterioro de la calidad de las aguas superficiales, dada la creciente necesidad de obtener agua limpia y segura para el consumo.¹ Es por ello que la UE ha trabajado en el desarrollo de una política de protección del agua, que regule las sustancias que suponen un riesgo para la salud y el medioambiente. En el año 2000 se publicó la Directiva Marco del Agua 2000/60/EC (*water framework directive*, WFD),⁸ la cual trata de identificar grupos de sustancias/sustancias prioritarias (*priority substances*, PS) que son reconocidas como contaminantes, es decir, que presentan un riesgo significativo para el medio en el que son vertidas o para la vida que se desarrolla en él.¹ En 2001 se publicó la Decisión 2455/2001/CE,⁹ que incorpora la primera lista de 33 sustancias reconocidas como prioritarias, 13 de ellas consideradas como sustancias prioritarias peligrosas (*priority hazardous substances*, PHS), que han de ser monitoreadas en aguas superficiales. Posteriormente, la Directiva 2008/105/CE¹⁰ da un nuevo paso en la protección de las aguas, definiendo por primera vez estándares de calidad ambiental (*environmental quality standards*, EQS) para dichas sustancias, y promoviendo la creación de listas de observación de nuevas sustancias, “*watch lists*”, que deben ser monitoreadas temporalmente con el objetivo de recabar mayores evidencias sobre el riesgo y exposición a estas sustancias que justifiquen su inclusión como PS. En 2013 se revisa la lista de PS, con la publicación de la Directiva 2013/39/UE¹¹, que amplía dicha lista a 45 sustancias, incluyendo una revisión más restrictiva de los EQS. En la Tabla 1 se muestran las PS actualmente identificadas por la UE.

Tabla 1. Actual lista de sustancias identificadas como PS.

Plaguicidas	Metales, hidrocarburos y otros compuestos
Aclonifeno	1,2-Dicloroetano
Alacloro	Ácido perfluoro-octano-sulfónico y sus derivados
Antrazina	Antraceno
Bifenox	Benceno
Cibutrina	Cadmio y sus compuestos
Cipermetrina	Cloroalcanos C ₁₀₋₁₃
Clorfenvinfós	Derivados de tributilestaño
Clorpirifós (Clorpirifós-etilo)	Diclorometano
Diclorvós	Difeniléteres bromados
Dicofol	Dioxinas
Diurón	Fluoranteno
Endosulfán	Heptacloro y epóxido de heptacloro
Isoproturón	Hexabromociclododecanos
Quinoxifeno	Hexaclorobenceno
Simazina	Hexaclorobutadieno

Terbutrina	Hexaclorociclohexano
Trifluralina	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
	Mercurio y sus compuestos
	Naftaleno
	Níquel y sus compuestos
	Nonilfenoles
	Octilfenoles
	Pentaclorobenceno
	Pentaclorofenol
	Plomo y sus compuestos
	Ftalato de di (2-etilhexilo)
	Triclorobencenos
	Triclorometano

Posteriormente, en 2015, se publica la primera lista de observación (Decisión 2015/495/UE)¹², que recoge 17 sustancias divididas en 10 grupos (Tabla 2), así como un método analítico recomendado para cada sustancia/grupo, asegurando así la comparabilidad de los resultados entre los distintos países miembros de la UE. Recientemente, en 2018, se ha publicado la decisión de ejecución 2018/840/UE,¹³ que establece una nueva lista de 8 sustancias de observación (17-alfa-etinilestradiol, 17-beta-estradiol estrona, antibióticos macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina), metiocarb, neonicotinoides, metaflumizona, amoxicilina y ciprofloxacina). Ambas decisiones recogen por primera vez los CEC como sustancias candidatas a ser reguladas.

Tabla 2. Lista de CEC incluidos en la Decisión de ejecución 2015/495/UE y de los métodos analíticos propuestos para su determinación.

Nombre de la sustancia/grupo de sustancias	Método analítico ^a
17-alfa-Etinilestradiol (EE2)	SPE-LC-MS/MS en grandes volúmenes
17-beta-Estradiol (E2), estrona (E1)	SPE-LC-MS/MS
Diclofenaco	SPE-LC-MS/MS
2,6-di- <i>terc</i> -Butil-4-metilfenol	SPE-GC-MS
4-Metoxicinamato de 2-etilhexilo	SPE-LC-MS/MS o GC-MS
Antibióticos macrólidos ^b	SPE-LC-MS/MS
Metiocarb	SPE-LC-MS/MS o GC-MS
Neonicotinoides ^c	SPE-LC-MS/MS
Oxadiazón	LLE/SPE-GC-MS
Triatato	LLE/SPE-GC-MS o LC-MS/MS

^a Métodos de extracción: extracción en fase sólida (SPE), extracción líquido-líquido (LLE).

Métodos analíticos: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

^b Eritromicina, claritromicina y azitromicina.

^c Imidacloprid, tiacloprid, tiametoxam, clotianidina y acetamiprid.

La finalidad de dichas regulaciones es estandarizar un método analítico para la determinación de los contaminantes mencionados, conocer la toxicidad de estos sobre humanos y ecosistemas, mejorar la calidad de los distintos tipos de agua, y aumentar el número de compuestos regulados, ya que cada vez son más los compuestos orgánicos presentes, tanto en las aguas naturales como en otros compartimentos ambientales. Además, es necesario mejorar el funcionamiento de las EDAR, para que sean capaces de eliminar dichas sustancias orgánicas de una manera más eficiente.¹

Algo similar ocurre en Estados Unidos, donde en 1972 se promulgó la *Federal Water Pollution Control Act Amendments of 1972*, que más tarde se modificó para dar lugar a la que hoy en día se conoce como la Ley de Agua Limpia (*clean water act*, CWA). La CWA persigue mantener la integridad física, química y biológica de las aguas de EE.UU.¹⁴ En comparación con la UE, la EPA ha desarrollado una lista considerablemente más extensa de sustancias prioritarias, que incluye 129 contaminantes recogidos en el *40 CFR Part 426, Appendix A*.¹⁵ Además, ha aprobado una serie de métodos analíticos para la determinación de contaminantes orgánicos (incluidos en *40 CFR Part 141*),¹⁶ cuya aplicación para la determinación de los mismos es de obligado cumplimiento, al contrario que la UE, la cual recomienda (no obliga) aplicar unos métodos analíticos determinados.

Al igual que la UE, la EPA también dispone de una lista de contaminantes no regulados, que no excede los 30 compuestos, publicada en diciembre de 2016. Dichos compuestos deben monitorizarse durante los años 2018-2020.¹⁷

Entre los métodos propuestos por la EPA¹⁸ destaca el uso de la extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE) como etapa de extracción/preconcentración, y el posterior uso de la cromatografía de gases/líquida acoplada a la espectrometría de masas, debido a su alta selectividad, sensibilidad y capacidad de confirmación.

3.3. Análisis de MCO en aguas residuales

Debido al continuo crecimiento de la población humana y de las actividades que contribuyen a su desarrollo, como la agricultura, núcleos de población urbana cada vez más densos, actividades industriales, etc., el deterioro de la calidad agua es cada vez mayor.¹⁹ En consecuencia, el agua residual cada vez transporta una mayor cantidad de sustancias, muchas de las cuales están catalogadas como contaminantes, además, es fácil detectar fármacos y productos de higiene personal a causa de su carácter polar.¹⁹

Por todo ello, es necesario el desarrollo de técnicas de extracción y análisis cada vez más sensibles y eficaces para la determinación de MCO en agua, así como de métodos multiresiduo que faciliten la detección simultánea de un número elevado de MCO.

Tradicionalmente, se han empleado la extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) y la SPE como etapas previas al análisis de MCO en agua, debido a su capacidad de concentración de los analitos y eliminación de interferencias de la matriz.¹⁹ Recientemente, se han desarrollado nuevas modalidades de los métodos clásicos, como la denominada *fabric phase sorptive extraction* (FPSE). Esta técnica es similar a la SPE

convencional, pero utiliza una tela de celulosa (y otros materiales) que funciona como sustrato para la fabricación de un sol-gel. Este sol-gel es introducido en el agua actuando como adsorbente de los analitos, los cuales son eluidos posteriormente con un disolvente orgánico para su análisis.^{20,21} Asimismo, la SPE *online*²² o la microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction*, SPME)²³ son también utilizadas frecuentemente, así como el empleo de SPE secuencial (*sequential solid phase extraction*, SSPE) que emplea múltiples cartuchos que contienen adsorbentes de diferente naturaleza (Oasis HLB, Bond elut C18 y Bond elut ENV), lo que permite una extracción más exhaustiva de analitos de diferente naturaleza y propiedades físico-químicas.²⁰

Por otro lado, la cromatografía de líquidos (*liquid chromatography*, LC) y la cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC) acopladas a espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) son las técnicas más utilizadas para el análisis de MCO en agua residual. Algunos autores también reportan otras técnicas, como el uso de GC bidimensional (GC x GC) acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (*Time Of Flight*, TOF).²⁴ La cromatografía líquida de interacción hidrofílica (*hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC), también está siendo cada vez más utilizada, ya que mejora considerablemente la extracción de compuestos altamente polares, para los que el empleo de columnas C18 convencionales no es adecuado.^{19,20} Aunque en menor proporción, también se utilizan detectores clásicos, como el de captura de electrones (*electron capture detector*, ECD), que presenta una alta sensibilidad para analitos que contienen grupos electronegativos. En definitiva, la utilización de GC o LC estará condicionada por las características del analito, si es polar y no volátil se analizará mediante LC. Si por el contrario es apolar y volátil, se analizará por GC.¹⁹

La MS es la técnica más utilizada para la detección de MCO, siendo la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) la herramienta más potente para el análisis cuantitativo. El triple cuadrupolo (QqQ) es el analizador de masas mayoritariamente empleado para la determinación de MCO diana o *target* en agua residual, debido a su alta sensibilidad y selectividad cuando opera en modo de monitorización de reacciones seleccionadas (*selected reaction monitoring*, SRM). Otro analizador híbrido ampliamente utilizado es el triple cuadrupolo trampa lineal de iones (QqLIT), que mejora la sensibilidad con respecto al QqQ. En cambio, la espectrometría de masas de alta resolución (*high resolution mass spectrometry*, HRMS) es la técnica predominantemente empleada para el análisis de compuestos no diana o *non-target*, destacando los analizadores TOF y Orbitrap, aunque recientemente se han desarrollado nuevas técnicas, como la movilidad iónica-MS, la cual combina la relación m/z y la distinta movilidad que adquieren los iones al ser acelerados por un campo eléctrico como criterio de separación.^{19,20}

En resumen, debido a la baja concentración de los MCO en matrices medioambientales, la SPE es la técnica de preconcentración predominante, seguida de un análisis mediante LC-MS/MS, ya que la mayoría de MCO son relativamente polares y termolábiles, lo que dificultaría su análisis mediante GC. Por ello, es de especial interés profundizar en el fundamento de estas técnicas.¹⁹

3.3.1. Tratamiento de la muestra

Como se ha mencionado con anterioridad, la SPE es la técnica de extracción predominante para el análisis de MCO en agua residual, tal y como muestra el resumen bibliográfico de la Tabla 3. La mayoría de los trabajos publicados emplean la SPE como técnica de extracción, reportando diferentes adsorbentes. También se lleva a cabo la inyección directa del agua en el sistema LC-MS, con un simple filtrado de la muestra utilizando filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) para retener partículas en suspensión y otros interferentes.²⁵ Otro método algo más novedoso, es el empleo de muestreadores pasivos, que permiten acumular los contaminantes a través del tiempo. Estos muestreadores contienen un adsorbente que se introduce en el agua durante un determinado periodo de tiempo. Transcurrido dicho tiempo se eluyen los analitos y el extracto se lleva a sequedad para su análisis.²⁶ Los más comunes para la extracción de analitos polares son los conocidos como POCIS (*polar organic chemical integrative sampler*), si bien actualmente existen otros en el mercado como polar Chemcatcher, Empore disks o Speedisks, entre otros.

Otra alternativa, hasta el momento poco explorada para la extracción de MCO en agua, es la utilización del método QuEChERS (acrónimo en inglés de *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*). Este método fue inicialmente ideado para la extracción de plaguicidas en muestras sólidas como frutas y hortalizas.²⁷ Tras una intensa búsqueda bibliográfica, solo se han reportado dos artículos que utilizan el método QuEChERS para la extracción de MCO en muestras acuosas, uno en agua residual²⁸ y otro en agua superficial²⁹, por lo que se ha considerado interesante y novedoso ampliar la aplicación de este método para el análisis multiresiduo de MCO en agua residual.

A continuación, se describirán en mayor profundidad la SPE, como técnica predominante en la extracción de MCO en agua residual, así como el método QuEChERS utilizado en este estudio.

a) Extracción en fase sólida (SPE)

Esta técnica se hizo comercial en 1978 como sustituto de la LLE, la cual suponía un mayor gasto de disolvente que la SPE.^{30,31}

Tabla 3. Resumen bibliográfico sobre la extracción de MCO en aguas

Matriz	Clase de analito (N°)	Extracción	Limpieza	Concentración del extracto	Niveles validados (µg/L)	Recuperación (%)	Precisión intra-día	Referencia
Agua residual	Fármacos (35)	SPE (Oasis® HLB)	Sin limpieza	200	5	53-115	RSD < 15%	[32]
Agua residual	Antibióticos, plaguicidas, etc. (115)	Inyección directa	Sin limpieza	0.1	0.02, 0.05, 0.5 y 1	56-142	RSD ^a ≤ 25%	[25]
Agua superficial	Fármacos y productos de higiene	Quechers acetato modificado	Sin limpieza	1	0.5	82-125	RSD < 25%	[29]
Agua residual	Plaguicidas (28)	Quechers citrato EN 15662	Quitina	1	0.01, 0.1 y 2	75-128	RSD < 25%	[28]
Agua residual y de lago	Fármacos (5)	SPE (Varian C18)	Sin limpieza	NA ^c	10 y 100	NA	RSD < 10%	[33]
Agua residual	Fármacos, plaguicidas, etc. (20)	Inyección directa	Filtrado	1	1 y 5	46-149	RSD < 15%	[34]
Agua de río cercana a EDAR	Fármacos (53)	Filtrado y SPE (Oasis® MCX)	Sin limpieza	37.037037	0.2	79-120	RSD < 10%	[35]
Agua residual urbana (U) y de hospital (H)	Fármacos (53)	SPE (Oasis® HLB)	Sin limpieza	8.33333	0.4	20-189 (H) y 20-156 (U)	RSD < 20% (H) y RSD ≤ 20% (U)	[36]

Agua residual	Fármacos (5)	<i>Thin film</i> - SPME	Sin limpieza	NA	$5 \cdot 10^{-4}$	73.4-85.7	RSD < 15%	[23]
Agua residual	Fármacos, plaguicidas, otros CECs (88)	Online SPE (HLB, AW+X-CW+ENV ⁺)	Lavado con acetonitrilo	95	0.5	53-166	RSD < 25%	[22]
Agua residual	Fármacos (81)	SPE ^b (Oasis [®] HLB)	Sin limpieza	50	0.4	55-146	RSD ≤ 20%	[37]
Agua residual	Plaguicidas (11)	SPE (Supelclean LC-18)	Sin limpieza	1	1 y 10	79.8-94.9	RSD < 10%	[38]
Agua residual	Fenoles (13)	SPE (Oasis [®] HLB)	Sin limpieza	50	0.5, 1 y 5	SAC: 70-135 MMC: 30-108	SAC ^e : RSD ≤ 21% MMC ^f : RSD ≤ 114%	[39]
Agua residual	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (24)	SBSE ^g	ACN + sonicar	50	0.1 y 1	19-155	RSD < 25%	[40]
Agua residual	Plaguicidas polares (39) y apolares (139)	SPE y PLE ^h	SPE: Sin limpieza PLE: <i>clean-up</i> con SPE (Florisil)	SPE: 50	0.1 y 1	PLE: 1-374 SPE: 9-324		[41]

Agua residual	Fármacos (73)	SPE (Oasis® HLB)	Sin limpieza	25	0.1	31-121	RSD ≤ 15%	[42]
---------------	------------------	---------------------	--------------	----	-----	--------	--------------	------

^aRSD: Desviación estándar relativa (*relative standard deviation*, RSD)

^bSPE: Extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE)

^cNA: No aplica

^dPOCIS: *Polar Organic Chemical Integrative Sampler*, POCIS

^eSAC: Calibración adición de estándar (*standard addition calibration*, SAC)

^fMMC: Calibración en matriz (*matrix-matched calibration*, MMC)

^gSBSE: Extracción por adsorción sobre barra agitadora (*stir bar sorptive extraction*, SBSE)

^hPLE: Extracción líquida presurizada (*pressurized liquid extraction*, PLE)

La SPE permite la preconcentración y limpieza de muestras ambientales, y se basa en la retención de los analitos de interés en un adsorbente específico, retenido en un cartucho o disco de vidrio o polipropileno, que interactúa con los analitos (generalmente, polar, apolar o iónico) reteniéndolos selectivamente. Posteriormente, se hace pasar un disolvente o mezcla de ellos a través del sorbente, que permite la desorción de los analitos para su análisis. En este método es muy importante la elección del adsorbente adecuado, en función del tipo de analitos a determinar.³¹

Como se observa en la Tabla 3, la mayoría de los artículos reportan la utilización de cartuchos con un relleno polimérico que presentan un balance hidrofílico-lipofílico, tales como los Oasis *hydrophilic lipophilic balance* (Oasis HLB™). Desde su comercialización, este adsorbente alcanzó gran popularidad, ya que permite la extracción simultánea de compuestos polares y apolares, presenta una alta capacidad de carga y una elevada efectividad en la eliminación de interferencias. También destacan otros rellenos, como el clásico C18, que retiene compuestos apolares, o distintas mezclas comerciales de intercambio iónico como Oasis MCX, X-AW, X-CW y ENV⁺, entre otros. En la mayoría de los casos, los disolventes de elución más utilizados son el metanol y el acetonitrilo.⁴³

El proceso se puede realizar de forma *off-line*, manualmente o de forma automatizada, o bien se puede acoplar a sistemas LC-MS, lo que se conoce como SPE *on-line*. La SPE *on-line* reduce tanto el tiempo de extracción como el volumen de muestra empleado con respecto a la SPE *off-line*.³¹ La SPE automática, emplea aparatos capaces de realizar las cuatro etapas básicas de cualquier SPE (acondicionamiento, carga, secado/lavado y elución) de manera automática, de manera que se obtienen extractos listos para ser inyectados o concentrados, según las necesidades.⁴⁴

Adicionalmente, se suele incorporar una etapa de secado del cartucho previa a la elución de los analitos. La mayoría de las veces, el extracto eluido se evapora y se recompone en un volumen menor para concentrar los analitos, lo que permite la detección de compuestos a baja concentración. Los factores de concentración en esta modalidad están en el rango 50-500, generalmente.

b) Método de extracción QuEChERS

El método de extracción QuEChERS fue inicialmente ideado para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos con bajo contenido en grasas, como frutas, hortalizas, cereales y frutos secos. Sin embargo, actualmente se han reportado aplicaciones del mismo, con distintas modificaciones sobre el procedimiento convencional, para el análisis de MCO en distintas matrices medioambientales, como lodos de depuradora (análisis de plaguicidas), suelos (determinación de fenoles), etc.⁴⁵⁻⁴⁷

En un principio, el método QuEChERS empleaba acetonitrilo para hacer una extracción sólido-líquido, seguido de una partición inducida de los analitos en la fase orgánica al añadir las sales MgSO₄ y NaCl (separación de fases orgánica-acuosa). El

extracto obtenido, se sometía a una etapa de limpieza conocida como extracción en fase sólida dispersiva (*dispersive solid-phase extraction*, d-SPE), donde se empleaba $MgSO_4$ para eliminar agua, y amina primaria-secundaria (*primary secondary amine*, PSA) para eliminar ácidos orgánicos y azúcares, entre otros interferentes polares.²⁷

Con el paso del tiempo este método original ha sufrido distintas modificaciones, con el objetivo de mejorar la extracción de diferentes tipos de analitos, así como de eliminar interferentes. Actualmente, las modificaciones más utilizadas son el Método Oficial 2007.01 de la AOAC,⁴⁸ el cual utiliza un tampón acetato, formado por ácido acético y acetato de sodio, que mantiene un pH de aproximadamente 4.8, y el método estándar EN 15662 del Comité Europeo de Normalización (CEN), el cual utiliza las sales citrato trisódico dihidratado y dihidrogenocitrato disódico sesquihidratado para mantener un pH alrededor de 5.⁴⁹

Si extrapolamos al caso de los MCO, hay que considerar que el pH puede jugar un papel importante en la extracción de los mismos utilizando el método QuEChERS, ya que, por ejemplo, muchos plaguicidas son inestables a niveles de pH elevados.⁵⁰ Es por ello que además de los métodos 2007.01 y EN 15662 existen distintas modificaciones que varían el pH del medio en función de los analitos a extraer. Por ejemplo, *Zeying H. et al.*⁵⁰ añade Na_2HPO_4 junto a $MgSO_4$ y ácido cítrico (tampón *McIlvaine*) para mantener un pH de 2.4 y mejorar la extracción de antibióticos en distintas hortalizas. Por otro lado, pero con el mismo objetivo, *Wang-long W. et al.*⁵¹ utiliza acetonitrilo al 1% de ácido acético para mejorar la recuperación de distintos antibióticos.

En lo que respecta a la etapa de limpieza o *clean-up* (*dispersive SPE*, *d-SPE*), además de la PSA utilizada en el método original, se reportan distintos adsorbentes que cumplen con funciones específicas. Por ejemplo, es muy común utilizar C18, el cual retiene compuestos principalmente apolares como grasas. Otro adsorbente más innovador es el comercialmente conocido como Z-sep, que consiste en una mezcla de dos adsorbentes, C18 y sílice recubierto de ZrO_2 , (en proporción $ZrO_2/C18$ de 2/5) permitiendo la eliminación de ácidos grasos y esteroides principalmente. Otro adsorbente muy similar es el Z-sep+, donde la sílice se encuentra recubierta tanto por ZrO_2 como por C18.⁵² Por otro lado, el carbón negro grafitizado (*graphitize carbon black*, GCB) es un adsorbente que retiene pigmentos como la clorofila y los carotenoides. Sin embargo, se ha demostrado que presenta una elevada afinidad por moléculas con estructura plana, por lo que retiene compuestos que presentan insaturaciones como anillos aromáticos, dobles enlaces, etc.^{27,53} Finalmente, el extracto limpio obtenido puede ser evaporado para una concentración previa antes de su análisis.

Actualmente, la técnica de determinación predominante para el análisis de MCO en agua residual tras una extracción tipo QuEChERS, es la LC-MS/MS, por lo que es necesario llevar a cabo una profundización en dicha técnica, que además se utiliza en el presente estudio.

3.3.2. Análisis mediante técnicas cromatográficas

El agua residual es una matriz compleja que contiene cientos de MCO de muy diversos tipos, estructuras y propiedades fisicoquímicas. Es por ello por lo que es necesario el empleo de técnicas cromatográficas con elevada resolución, que posibiliten una adecuada separación de dichos compuestos entre sí y de la matriz, facilitando su posterior detección. La GC capilar posee una elevada capacidad de resolución, sin embargo, no permite el análisis de MCO de elevada polaridad y termolábiles, por lo que su uso ha sido reemplazado paulatinamente por la LC, la cual permite el análisis de un mayor rango de compuestos.¹⁹ No obstante, ambas técnicas cromatográficas son complementarias, ya que aunque la LC es utilizada en la mayoría de los casos, algunos compuestos volátiles o relativamente apolares siguen siendo preferentemente analizados por GC.⁵⁴

Los detectores empleados en las técnicas cromatográficas mencionadas también han experimentado una evolución en el tiempo. En un principio, se utilizaban analizadores clásicos como ECD, detector de nitrógeno-fósforo (*nitrogen phosphorus detector*, NPD) o el detector de ionización de llama (*flame ionization detector*, FID) acoplados a GC. Sin embargo, estos detectores se encuentran actualmente obsoletos debido al desarrollo de los analizadores de MS que presentan una elevada especificidad, sensibilidad y capacidad de confirmación, además de ser un analizador universal. La MS se basa en la separación de los iones en función de su relación masa-carga (m/z), por lo que la separación cromatográfica no resulta tan crítica, debido a la capacidad de obtener espectros de masas y MS^2 de un ion seleccionado. Esto mejora la capacidad de identificación/confirmación en comparación con los detectores clásicos, cuyo criterio de identificación/confirmación es únicamente el tiempo de retención. Los analizadores de masas más utilizados en la actualidad en el análisis cuantitativo de MCO en muestras complejas, como el agua residual, son los sistemas híbridos de triple cuadrupolo (QqQ) o triple cuadrupolo-trampa de iones lineal (QqLIT). La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite aumentar notablemente la selectividad, sensibilidad y el poder de confirmación de estos equipos, en especial en LC, al poder fragmentar los iones analizados.¹⁹ En la Tabla 4, se muestra un resumen bibliográfico relativamente reciente para la determinación de MCO en aguas residuales principalmente.

Tabla 4. Resumen bibliográfico sobre la determinación de MCO en aguas

Matriz	Clase de analito (N°)	Columna cromatográfica	Composición fase móvil	Analizador de masas	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)	Referencia
Agua residual	Fármacos (35)	Atlantis T ₃ (3 x 150 mm, 3 µm)	5mM acetato amónico en agua y 0.1% fórmico en MeOH	TSQ Quantum Ultra QqQ	0.8-172	0.2-21	[32]
Agua residual	Fármacos, antibióticos, plaguicidas (115)	Zorbax eclipse XDB C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 µm)	0.1% fórmico en agua y ACN	QTrap 5500 (QqLIT)	10-500	1-357	[25]
Agua superficial	Fármacos y productos de higiene	Agilent Zorbax SB C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 µm)	Agua y MeOH ambos al 0.1% de fórmico	QTrap 5500	1-167	2-500	[29]
Agua residual	Plaguicidas (28)	SunFire C18 (2.1 x 75 mm, 2.5 µm)	Agua y MeOH ambos al 0.5% de fórmico y 2mM de formiato amónico	6500 QTrap (QqLIT)	10	2-5	[28]
Agua residual y de lago	Fármacos (5)	Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 µm)	Agua al 0.5% ácido fórmico y MeOH	6460 QqQ	0.3-84	0.1-25	[33]
Agua de río cercana a EDAR	Fármacos (53)	Zorbax SB-C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 µm)	Agua y ACN ambos al 0.1% fórmico	6410 QqQ	2	0.07-6.3	[34]
Agua residual	Fármacos, plaguicidas, etc. (20)	Pursuit XRs C8 (2 x 100 mm, 3 µm)	Agua 0.1% fórmico y ACN	6490 QqQ	2-100	NA	[35]

Agua residual urbana (U) y de hospital (H)	Fármacos (53)	Acquity HSS T3 (2.1 x 50 mm, 1.8 μ m)	Agua 0.1% fórmico y ACN	Qtrap 5500 (QqLIT)	3.97-164.02 (HWW), 4.77-258.29 (UWW)	1.19-49.21 (HWW), 1.43-77.49 (UWW)	[36]
Agua residual	Fármacos (5)	Waters C18 (2.1 x 100 mm, 3 μ m)	90% Agua, 10% ACN y 0.1% acético (A), 90% ACN, 10% agua y 0.1% acético.	TSQ Vantage (QqQ)	0.01-0.05	0.002-0.013	[23]
Agua residual	Fármacos (81)	Acquity HSS T ₃ (2.1 x 50 mm, 1.8 μ m)	MeOH, 10mM de ác. fórmico/formiato amónico en agua (pH 3.2).	Qtrap 5500 (QqLIT)	0.6-50	0.2-26	[22]
Agua residual	Fármacos, plaguicidas, otros CECs (88)	Acquity HSS T ₃ (2.1 x 50 mm, 1.8 μ m)	Agua 0.1% fórmico y MeOH	5500 Qtrap (QqLIT)	1-50	0.2-0.5	[37]
Agua residual	Plaguicidas (11)	Ascentis Express RP-amide (2.1 x 100 mm; 2.7 μ m)	Agua con fórmico (pH 2.5) y ACN	6410 QqQ	-	10-250	[38]
Agua residual	Fenoles (13)	VF-5 ms Factor Four (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m)	Helio	1200L QqQ	30-2500	10-1000	[39]
Agua residual	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (24)	VF-17ms Factor Four (2 m x 0.15 mm, 0.05 μ m)	Helio	1200L QqQ	5-100	2-10	[40]

Agua residual	Plaguicidas polares (39) y apolares (139)	<p>Apolares: VF-5 ms Factor Four (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm)</p> <p>Polares: BEH C₁₈ (100 mm x 2.1 mm, 1.7 μm)</p>	<p>Apolares: Helio</p> <p>Polares: Agua al 0.01% de ácido fórmico y Metanol</p>	<p>Apolares: 1200L QqQ</p> <p>Polares: Waters Acquity TQD QqQ</p>	<p>Apolares: 6-500</p> <p>Polares: 20-500</p>	<p>Apolares: 10-200</p> <p>Polares: 2-50</p>	[41]
Agua residual	Fármacos (73)	Eclipse XDB C8 (2.1 x 150 mm, 3.5 μ m)	Agua y MeOH	TSQ Quantum Discovery MAX	45-630	15-210	[42]

Como se observa en la Tabla 4, el analizador QqQ es el más utilizado seguido del QqLIT en lo que respecta al análisis de MCO en aguas. Además, la mayoría utilizan columnas cromatográficas cuyo relleno es apolar (C8/C18), lo que indica que se opera en fase reversa. Con respecto a la composición de la fase móvil, existe un equilibrio entre agua-acetonitrilo y agua-metanol en función del tipo de MCO analizado.

En el presente estudio, se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos acoplado a un analizador de masas híbrido triple cuadrupolo-trampa lineal de iones (LC-QqLIT) para la determinación de MCO en agua residual, el cual combina la elevada selectividad de un triple cuadrupolo con la alta sensibilidad que aporta la trampa lineal de iones. A continuación, se explica en más detalle el funcionamiento de la técnica empleada.

3.3.3. Cromatografía de líquidos

En términos generales, la cromatografía consiste en la separación física de los analitos de una muestra entre dos fases inmiscibles. Los analitos son transportados mediante una fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria, en la que los diferentes analitos son separados en base a su diferente interacción con ambas fases. La cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography*, HPLC) es un tipo de cromatografía en columna en la que la fase móvil es un líquido (de ahí su nombre) que se bombea a través de una columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria, y que es el lugar donde se produce la separación de los componentes de la muestra en base a sus propiedades fisicoquímicas.

En LC en fase reversa, los analitos se separan en base a su polaridad. La fase móvil tiene carácter polar y está generalmente constituida por la mezcla de uno o más disolventes orgánicos (por lo general, metanol o acetonitrilo) y agua. En ocasiones, la adición de sales inorgánicas volátiles a la fase móvil o el control del pH mediante disoluciones tampón volátiles ayudan a mejorar la separación cromatográfica.⁵⁵

Por su parte, la fase estacionaria en fase reversa tiene carácter apolar. El relleno de la columna consiste en un soporte sólido, generalmente sílice, químicamente modificado con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos, como cadenas hidrocarbonadas de 8 o 18 átomos de carbono (columnas C8 y C18).

Los principales parámetros a considerar a la hora de seleccionar una columna son:

- La longitud de la columna. En general, a menor longitud se realizan análisis más rápidos, pero disminuye la eficacia de separación, pues el número de platos teóricos es menor.
- El diámetro interno, que es proporcional a la eficacia de separación, siendo menor la pérdida de carga cuanto menor es el diámetro.
- El tamaño de partícula del relleno de la columna. Un menor tamaño de partícula proporciona mayor eficiencia de separación entre dos compuestos (mayor resolución). El empleo de columnas con muy bajo tamaño de partícula ($< 2 \mu\text{m}$) ha sido posible gracias al desarrollo de la LC de ultra alta eficacia (*ultrahigh-performance liquid chromatography*, UHPLC), que mejora la sensibilidad minimizando el volumen de inyección con respecto a la HPLC y aumenta la

velocidad de flujo alcanzando presiones de hasta 1000 bar. También se reducen las dimensiones de la columna, lo que permite reducir el tiempo de análisis y ahorrar disolvente orgánico.⁵⁴

- El tipo de partícula, siendo las partículas de sílice porosas y las de núcleo sólido las más utilizadas. Las partículas de núcleo sólido, al ser superficialmente porosas, produce un menor ensanchamiento de banda en comparación con las partículas totalmente porosas y, por lo tanto, proporciona niveles de eficacia extremadamente altos a la vez que reducen el tiempo de análisis y los costes de disolvente utilizados.

Mientras que la naturaleza de las partículas del soporte del relleno de la columna influye en factores como la retención y la eficiencia, diferentes tipos de fases estacionarias tendrán un mayor efecto en la selectividad de la columna. La selección de la fase estacionaria es esencial para la optimización de un método, ya que puede alterar sustancialmente el orden de elución de los analitos en los cromatogramas. Las columnas más habituales en fase reversa son las C8 y C18, de carácter marcadamente apolar y en las que los analitos son retenidos en base a interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, debido al carácter polar o ionizable de muchos de los MCO y/o de sus productos de transformación, se están desarrollando nuevas fases estacionarias de carácter más polar que incluyen grupos bifenilo, pentafluorofenilo, etc.

También de creciente aplicación para compuestos muy polares es la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), en la que la fase móvil está constituida por mezclas de agua o solución tampón (< 40%) con disolventes orgánicos, y la fase estacionaria por adsorbentes polares muy hidrofílicos como la sílice, fases enlazadas polares, rellenos poliméricos polares o intercambiadores iónicos, que son susceptibles de adsorber fácilmente agua. En el modo HILIC los gradientes de fase móvil parten de una elevada proporción de eluyente orgánico, normalmente el 95%, y hay un cambio progresivo a una mayor proporción de eluyente acuoso.

Otros parámetros que deben ser optimizados para obtener una buena separación cromatográfica, sobre todo en un análisis multiresiduo, son el volumen de inyección y la velocidad de flujo. El volumen de inyección tiene que ser pequeño para evitar la saturación del detector, así como ser inyectado en el menor tiempo posible para evitar el ensanchamiento de banda.⁵⁵ La velocidad de flujo afecta principalmente al tiempo de retención de los analitos y a la anchura de pico cromatográfico, a mayor velocidad, menor retención y picos más estrechos.

Una vez separados, los analitos pasan al espectrómetro de masas. Sin embargo, el estado de la muestra en el cromatógrafo es incompatible con el espectrómetro de masas, que trabaja con iones en fase gaseosa. Por ello es necesario el empleo de una interfase que elimine el disolvente de la fase móvil, vaporice las sustancias y las transforme en iones antes de ser introducidos en el sistema.

Las interfases más utilizadas para el análisis de MCO son las de ionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure ionization*, API), como la ionización por electronebulización o electrospray (*electrospray ionization*, ESI) o la ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). La fuente de fotoionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure photoionization*, APPI), tiene

un uso más restringido para el análisis de analitos apolares. Aunque ESI es la técnica de ionización más utilizada para el análisis de agua residual mediante LC-MS, existen otras técnicas relativamente novedosas que evitan la separación cromatográfica y el pretratamiento de la muestra, como las técnicas de ionización ambiental tales como la ionización por electrospray/desorción (*desorption electrospray ionization*, DESI) y el análisis directo en tiempo real (*direct analysis in real time*, DART). Estas técnicas utilizan un gas ionizante (en DART) o un aerosol (en DESI) que incide sobre la superficie de la muestra para llevar a cabo la desorción e ionización de los analitos. Aunque la DESI no se ha aplicado para el análisis de muestras ambientales, no ocurre lo mismo para DART, la cual se ha aplicado junto a un analizador TOF para el análisis de MCO polares en suelos y filtros ultravioleta en muestras acuosas.⁵⁴

Dado que el equipo utilizado en este trabajo emplea una fuente de ionización ESI, se incluye a continuación una descripción más detallada sobre las características de esta.

3.3.4. Ionización por electrospray

Esta interfase tiene su origen en el departamento de ingeniería química de la Universidad de Yale (*New Haven*, CT, E.E.U.U), donde fue desarrollada por John B. Fenn *et al.* en el año 1985.⁵⁶

Se trata de una técnica de ionización blanda, en comparación con la ionización electrónica (*electron ionization*, EI), comúnmente utilizada en GC-MS. Esto se traduce en una escasa fragmentación del ion molecular y, por tanto, en una baja información estructural. La ESI produce iones pseudo-moleculares, por lo que se suele observar en el espectro de masas el ion molecular protonado ($[M+H]^+$) si la polaridad es positiva, o el ion molecular desprotonado ($[M-H]^-$) si se opera en modo negativo. Además, muchos compuestos pueden formar aductos, siendo los más comunes el aducto de sodio ($[M+Na]^+$) y el de amonio ($[M+NH_4]^+$). La fuente de ionización por electrospray utilizada en este estudio se puede observar en la Figura 1:

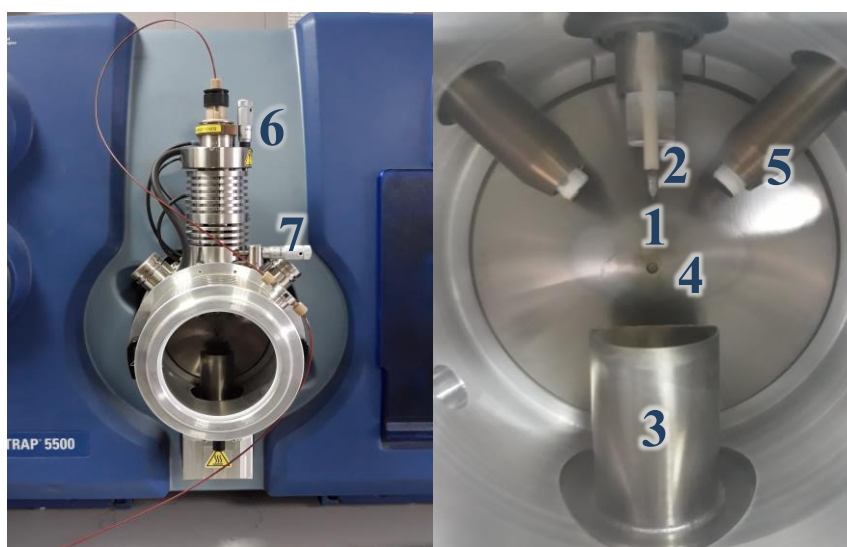


Figura 1. Fuente de ionización por electrospray Turbo V™. Ampliación del interior en la imagen derecha

En primer lugar, la muestra es introducida a través del capilar (Nº1, Fig. 1) en el que se aplica una diferencia de potencial entre él y el cono de entrada o *curtain plate* (Nº 4, Fig. 1), que oscila entre 3000-6000 V, por lo que la muestra emerge en forma de aerosol formando el conocido como cono de Taylor. El resultado es la formación de especies cargadas en disolvente, el cual es necesario eliminar. Para ello se introduce N₂ que actúa como gas de secado, además de intervenir en la formación del aerosol. Conforme disminuye la cantidad de disolvente, aumentan las fuerzas de repulsión coulombianas entre iones, que finalmente vencen a la tensión superficial del líquido formando iones en fase gaseosa. Para facilitar la evaporación del disolvente y la formación de iones en fase gas, se aumenta la temperatura mediante dos calentadores (Nº 5, Fig. 1). El disolvente y los iones que no son de interés, salen de la fuente de ionización a través del tubo de escape (Nº 3, Fig. 1), ayudados por el gas de cortina (*curtain gas*, CUR) cuya dirección es opuesta al aerosol, y que además elimina moléculas neutras y aductos iónicos. Finalmente, los iones entran al espectrómetro de masas a través del orificio situado en el cono de entrada (Nº4, Fig. 1).⁵⁷

Esta fuente de ionización permite operar en polaridad positiva o negativa, en función del tipo de analito a ionizar. Si un determinado analito contiene grupos funcionales de carácter básico, como las aminas, es preferible la polaridad positiva ya que serán capaces de captar un protón. Si por el contrario una molécula contiene grupos ácidos, como ácidos carboxílicos o fenoles, se opera en polaridad negativa, puesto que serán capaces de liberar más fácilmente un protón.⁵⁷ Además, esta fuente de ionización permite trabajar en modo APCI, por lo que incluye una aguja de descarga (Nº2, Fig. 1) para formar el gas reactivo.

En algunos casos, es necesario aumentar la sensibilidad de la ionización, como a la hora de perfundir un compuesto. Para ello, se utiliza un tornillo vertical (Nº6, Fig. 1) y un tornillo horizontal (Nº 7, Fig. 1), que regula la distancia entre el capilar y el orificio de entrada.

Por último, esta fuente presenta una serie de parámetros que deben ser optimizados para una correcta ionización:

- IonSpray Voltage (IS): Regula el voltaje que se aplica en el capilar e ioniza la muestra que emerge del capilar. Depende de la polaridad del analito y afecta a la sensibilidad.
- Gas 1 (GS1): Es el gas de nebulización (N₂). Ayuda a generar el aerosol y afecta a la estabilidad de este y a la sensibilidad.
- Gas 2 (GS2): Controla el gas auxiliar o turbo (N₂). Evita que el disolvente entre en el espectrómetro de masas y facilita la evaporación de las gotas del aerosol.
- Temperatura (TEM): Es necesario controlar la temperatura de la fuente de ionización para facilitar la evaporación del disolvente y producir iones en estado gaseoso.
- CUR: Es el gas que fluye entre el orificio de entrada al espectrómetro de masas y el *curtain plate*. Evita la contaminación de las lentes ópticas.⁵⁸

La interfaz ESI presenta un uso bastante extendido, pues es útil para el análisis de moléculas polares y termolábiles como determinados MCO.

3.3.5. Analizadores de espectrometría de masas

Tras una separación cromatográfica, en base a la polaridad de los analitos, y una posterior etapa de ionización, los iones generados son separados en el analizador, en función de su relación m/z , obteniéndose los correspondientes espectros de masas. El empleo de la MS en el análisis de compuestos orgánicos a nivel traza en muestras complejas, como la ambientales, supuso un gran avance con respecto a los detectores clásicos empleados tradicionalmente en GC o LC, debido al incremento de selectividad y sensibilidad acompañado de un elevado poder de confirmación.⁵⁹

Actualmente, se encuentran disponibles comercialmente distintos tipos de analizadores de masas, tanto de baja resolución, como los cuadrupolares, los de sector magnético, los de trampa de iones, como de alta resolución, como el Orbitrap y el TOF, que proporcionan medidas de masa exacta. Asimismo, se han desarrollado configuraciones híbridas, que combinan en un mismo dispositivo más de un analizador simple. Aunque la mayoría de los análisis de espectrometría de masas se realizan con QqQ, como se observó en la Tabla 4, cada vez se reportan más estudios que utilizan QqLIT para el análisis de MCO en muestras medioambientales. Por otro lado, la tendencia a utilizar analizadores de alta resolución, como QqTOF u Orbitrap, para el análisis de compuestos desconocidos en aguas y otras matrices, está en aumento.⁵⁴

El analizador híbrido de QqQ es el más utilizado en el análisis dirigido o *target* de MCO en aguas. Este analizador consta de tres cuadrupolos (cuatro barras de oro equidistantes entre sí), donde el primer y tercer cuadrupolo (Q1 y Q3) actúan de filtro de m/z aplicando voltajes de corriente continua y radiofrecuencia determinados, mientras que el segundo cuadrupolo (q2) es realmente una celda de colisión, donde se lleva a cabo la fragmentación de los iones. Dependiendo del fabricante y el modelo del equipo, algunos presentan un cuadrupolo Q0 para eliminar interferencias.⁵⁸

Los analizadores de QqQ permiten operar utilizando diversos modos de adquisición, lo que les confiere una gran versatilidad.

Barrido de iones totales (*full scan*). Se realiza un barrido de m/z en Q1 que analiza todos los iones que se han generado en la fuente. Tanto la celda de colisión, como Q3, no participan en la selección de iones, con lo que se obtiene un espectro en *full scan* para todos los compuestos. Dicho modo es utilizado para obtener información acerca de los analitos presentes en una muestra.

Monitorización de reacciones seleccionadas (*selected reaction monitoring, SRM*). Este modo de trabajo es ampliamente utilizado en análisis cuantitativo. En dicho método, se selecciona un ion característico del analito en Q1, generalmente el ion molecular (des)protonado, con una m/z determinada. Seguidamente, dicho ion es fragmentado en q2 dando lugar a los llamados iones producto, uno de los cuales se selecciona en el segundo cuadrupolo (Q2). La combinación ion precursor/ion producto se denomina transición y puede ser altamente específica para un analito determinado. Así, el modo SRM proporciona una elevada selectividad y sensibilidad, debido a la reducción del ruido y consecuente mejora en la relación S/N.^{54,59}

Barrido de iones producto (*product ion scan*). Todos los iones producto que provienen de un ion precursor seleccionado en Q1 y fragmentado en q2, son analizados en Q3, dando lugar a un espectro rico en fragmentación, que proporciona más información estructural.

Barrido de iones precursores (*precursor ion scan*). En q2 se fragmentan los iones precursores y Q3 solo analizará aquellos iones precursores que fragmenten para dar un ion producto seleccionado.

Barrido de pérdidas neutras (*neutral loss scan*). En Q1 se selecciona un ion precursor que es fragmentado en q2, y Q3 solo analiza los iones precursores que hayan perdido un fragmento neutro con respecto al precursor, es decir, pérdida de moléculas como CO₂, H₂O, etc. Este modo es útil para la identificación de compuestos pertenecientes a una misma familia o de metabolitos o productos de transformación que comparten una estructura química común.⁵⁶

Un analizador QqQ operando en modo SRM, es una potente herramienta analítica para el análisis cuantitativo de MCO diana a nivel traza en matrices complejas. Los espectrómetros de triple cuadrupolo son capaces de monitorizar múltiples transiciones en un mismo análisis (*monitorización de múltiples reacciones*, MRM). En general, se utiliza el algoritmo de MRM dinámico (*Dynamic multiple reaction monitoring*, DMRM), que aumenta la sensibilidad y selectividad al registrar las transiciones en el tiempo de retención que eluyen, incrementando el *dwell time*. Con este algoritmo el instrumento es capaz de organizar la adquisición de las decenas de transiciones que componen el método, maximizando la sensibilidad.

El analizador QqLIT utilizado en este estudio, mejora la sensibilidad respecto al QqQ al incorporar una trampa lineal de iones (*linear ion trap*, LIT), cuyo funcionamiento se describe a continuación.

3.3.5.1 Analizador híbrido triple cuadrupolo-trampa de iones lineal (QqLIT)

Un analizador de masas QqLIT tiene un diseño muy similar al analizador QqQ, siendo la principal diferencia que el Q3 es sustituido por una LIT. También es conocida como trampa de iones 2D, y consiste en cuatro barras cuadrupolares que terminan en unas lentes que repelen los iones, aplicando un potencial positivo para iones positivos y viceversa. En la LIT, los iones son enfriados con nitrógeno moviéndose a lo largo del eje *z* y oscilando en el plano *xy* debido a la aplicación de radiofrecuencia. Además, se puede aplicar un voltaje de corriente continua al final de las barras que atrapa los iones en la trampa. Este confinamiento de iones previo a la detección se traduce en un aumento de la sensibilidad.⁶⁰

Puesto que una LIT puede operar como un cuadrupolo, un analizador QqLIT puede realizar las mismas funciones que un QqQ, además de otros modos de adquisición exclusivos de QqLIT. Por lo tanto, los modos de adquisición *full scan*, MRM, barrido de iones producto y precursores y barrido de fragmentos neutros están disponibles en QqLIT. Además, se pueden utilizar otros modos de adquisición como *enhanced multiply charged* (EMC), utilizado para mejorar la relación señal-ruido (S/N) en iones de carga múltiple y en el cual se aplica un voltaje determinado que desvía de la trayectoria a los iones

monocargados. Otro modo es el *enhanced product ion* (EPI), cuya finalidad es mejorar la calidad del espectro de masas en compuestos *target*. En Q1 se selecciona un ion precursor que es fragmentado en q2, seguidamente los iones producto son analizados en Q3 operando en *full scan*. Una peculiaridad de un analizador QqLIT, es la posibilidad de realizar espectros MSⁿ, es decir, permite fragmentar un ion producto obteniendo otro espectro de masas, por lo que se obtiene una elevada información estructural.^{49,61} En la Figura 2, se muestra un esquema general de un analizador QqLIT:

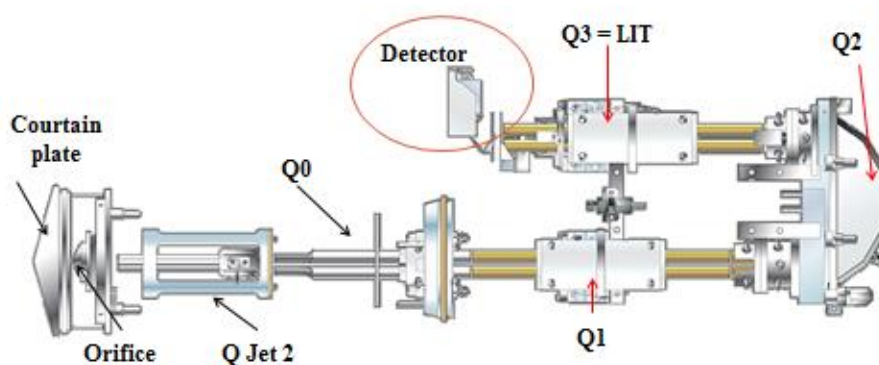


Figura 2. Esquema general de un analizador QqLIT⁶¹

Para asegurar que los iones analizados mantienen una adecuada trayectoria a través del analizador, es necesario optimizar una serie de parámetros que dependen del equipo y que se detallan a continuación:

- **CAD (*collisionally activated dissociation*)**: Dicho parámetro controla la presión del gas de colisión dentro de la celda de colisión. En modo MRM, este gas fragmenta los iones precursores.
- **DP (*declustering potential*)**: Este voltaje controla la diferencia de potencial entre Q0 y el orificio de entrada a Q1. Su función es minimizar la formación de aductos, siendo menor cuanto mayor es el voltaje aplicado. Sin embargo, si el voltaje es muy elevado puede llegar a fragmentar el analito.
- **Potencial de enfoque (*focusing potencial, FP*)**: Ayuda a enfocar los iones a través de la región de skimmer en la interfaz.
- **Potencial de entrada (*entrance potential, EP*)**: Corresponde con el potencial de entrada, el cual focaliza los iones para guiar su trayectoria a través de Q0.
- **Potencial de entrada de la celda de colisión (*cell entrance potential, CEP*)**: Voltaje que enfoca y acelera los iones hacia la celda de colisión (Q2)
- **Potencial de salida de la celda de colisión (*cell exit potential, CXP*)**: Dicho voltaje enfoca y acelera los iones hacia la salida de la celda de colisión.
- **Energía de colisión (*collision energy, CE*)**: Corresponde con la energía aplicada a los iones precursores para acelerarlos en Q2, donde impactan con las moléculas de gas y se fragmentan.

La elevada especificidad aportada por un analizador cuadrupolar combinada con la alta sensibilidad aportada por la trampa lineal de iones, hacen del analizador QqLIT una excelente herramienta para el análisis multiresiduo de compuestos *target* en diversas matrices.⁵⁸

4. OBJETIVOS

La presencia de MCO en las aguas residuales urbanas es un tema actual de preocupación, ya que pueden ser perjudiciales tanto para el medioambiente como para la salud humana. Por ello, se investigan alternativas al tratamiento del agua residual convencional, capaces de eliminar MCO en agua. Para evaluar la eficiencia de los nuevos tratamientos, es necesario monitorizar los MCO presentes en el agua, tanto para saber si el tratamiento en las EDAR es efectivo, como para conocer la persistencia y toxicidad de los distintos tipos de MCO. Es para ello necesario disponer de métodos rápidos, sencillos, eficientes y económicos, que permitan una óptima evaluación de los procesos. En base a ello, los objetivos específicos propuestos en este Trabajo Fin de Máster se pueden resumir en:

- Optimizar un método de extracción de MCO en agua residual.
- Optimizar la etapa de *clean-up* del método.
- Validar el método de extracción optimizado.
- Aplicar el método validado al análisis de muestras reales de agua residual.

5. MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.1. Reactivos y aparatos

Los patrones analíticos de los MCO incluidos en el estudio tenían una pureza mínima del 96 % y fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). Los disolventes utilizados para el análisis cromatográfico fueron ácido fórmico (pureza > 98 %), metanol y acetonitrilo, calidad espectrometría de masas (pureza > 99.9 %), de Fluka (Buchs, Alemania) y agua Milli-Q producida por un sistema de agua ultrapura Millipore (Bedford, MA, EE. UU.).

Con respecto a las sales y adsorbentes utilizados en la extracción mediante el método QuEChERS, se empleó MgSO_4 anhidro (pureza > 96%) y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pureza > 99%) suministrados por Panreac (Castellar del Vallès, Barcelona), cloruro de sodio de J.T. Baker (Deventer, Países Bajos), citrato trisódico dihidrato (pureza \geq 98%), suministrado por Fluka (Steinheim, Alemania), acetato de sodio trihidrato, ácido acético, ácido cítrico monohidrato, ácido etilendiaminotetraacético disódico dihidrato y citrato sódico dibásico sesquihidrato (pureza > 99%), suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los adsorbentes PSA, C18, Supel QuE Z-Sep y Supel QuE Z-sep+ fueron suministrados por Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.).

Para el control de la inyección se añadió ^{13}C -cafeína (pureza > 99%) suministrada por Sigma-Aldrich.

Para la extracción se emplearon tubos Falcon de politetrafluoroetileno (PTFE) de 50 mL y para la limpieza tubos de 15 mL. Para la agitación se utilizó un vórtex VELP Scientifica modelo Classic. La centrifugación tras la extracción se llevó a cabo utilizando una centrífuga P-selecta modelo Mixtasel y para la centrifugación tras la etapa de limpieza se utilizó una centrífuga P-selecta modelo Mixtasel-BL.

5.2. Extracción de muestra

La extracción de los MCO seleccionados en agua residual se llevó a cabo empleando el método QuEChERS. Los estudios de optimización de las condiciones de extracción se realizaron, en todos los casos, utilizando agua residual real procedente del efluente de la EDAR de El Toyo (Almería).

Para optimizar el procedimiento de extracción, se realizaron distintas pruebas con varias modificaciones:

Método 1: Se toman 10 mL de agua residual y se adicionan 10 mL de acetonitrilo en un tubo Falcon de 50 mL. Se agita en vórtex durante 2.5 min. A continuación, se añaden 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidrato y 0.5 g de citrato sódico dibásico sesquihidrato, agitando rápidamente en vórtex durante 3 min. Seguidamente, se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min.

Método 2: En un tubo Falcon de 50 mL, se toman 10 mL de agua residual y se adicionan 10 mL de acetonitrilo al 1% de ácido acético. Se agita en vórtex durante 2.5 min. A continuación, se añaden 4g $MgSO_4$ y 1g de acetato de sodio agitando la mezcla durante 3 min en vórtex. Seguidamente, se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min.⁵¹

Método 3: Se toman 10 mL de agua residual y se adicionan 10 mL de acetonitrilo en un tubo Falcon de 50 mL. Se agita en vórtex durante 2.5 min. A continuación, se añaden 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidrato y 49 mg de Na_2HPO_4 , agitando 3 min en vórtex. Seguidamente se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min.⁵⁰

Método 4: En un tubo Falcon de 50 mL se toman 10 mL de agua residual y se adicionan 10 mL de acetonitrilo. Se agita la mezcla en vórtex durante 2.5 min. Se añaden 10 mL de EDTA 0.1 M y se agita en vórtex durante 1 min. A continuación, se añaden 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidrato, 0.5 g de citrato sódico dibásico sesquihidrato y se agita en vórtex durante 3 min. Seguidamente se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min.⁶²

Método 5: Se toman 10 mL de agua residual y se adicionan 10 mL de acetonitrilo:metanol (85:15). Se agita en vórtex durante 2.5 min. A continuación, se añaden 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g de ácido cítrico monohidrato, 0.5 g de citrato trisódico dihidrato y se agita en vórtex durante 3 min. Seguidamente se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min.⁶³

Finalmente, se decidió seleccionar y validar el método 5 en base a los resultados obtenidos. En la Figura 3 se muestra un esquema del método seleccionado.

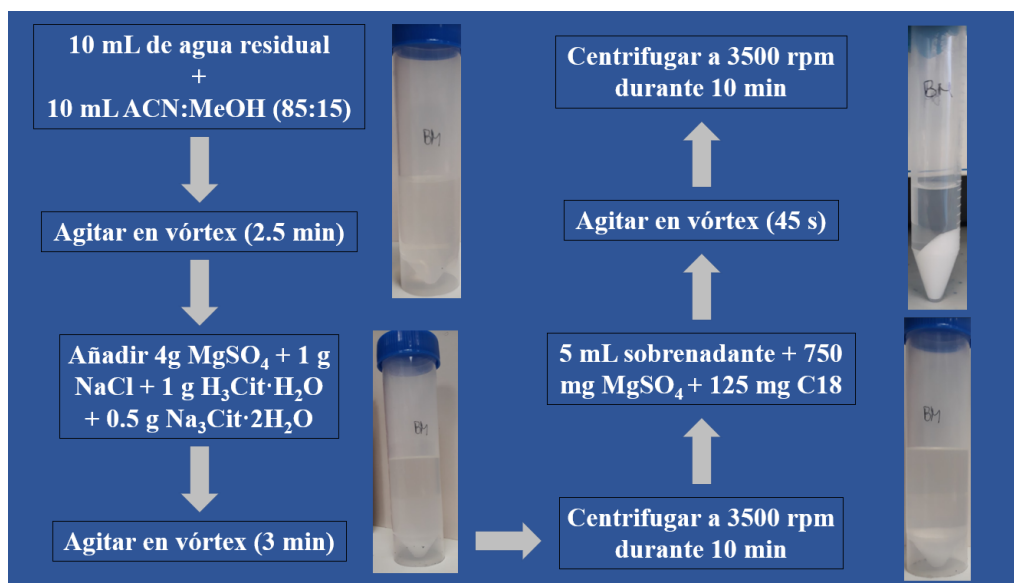


Figura 3. Esquema del método QuEChERS empleado para la extracción de MCO

En todos los métodos, tras centrifugar, se toman 5 mL del sobrenadante y se vierten en un tubo de PTFE de 15 mL que contiene 750 mg de MgSO₄ y 125 mg de C18 para realizar la etapa de limpieza. Se agitan durante 45 s y se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min, obteniendo el extracto final. Por último, se evaporan con una corriente de N₂ 150 µL del extracto, y se recompone con 150 µL de agua:acetonitrilo (90:10), incluyendo el estándar de inyección (¹³C-cafeína) a 1 µg/L.

5.3. Análisis mediante LC-QqLIT-MS/MS

El análisis de los MCO seleccionados se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Foster City, CA, EE. UU) acoplado a un espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo/trampa de iones lineal QTRAP® 5500 (AB Sciex instruments, Wilmington, DE, EE. UU). Dicho sistema se muestra en la Figura 4.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Kinetex C18 (150 x 4.6 mm, tamaño de partícula 2.6 µm).



Figura 4. Equipo LC-QqLIT-MS/MS utilizado para los análisis

La composición de la fase móvil fue (A) agua Milli-Q al 0.1% de ácido fórmico y (B) metanol. La elución de los analitos se llevó a cabo en gradiente, cuyos porcentajes de fase móvil se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Gradiente de fase móvil empleado para la elución.

Tiempo total (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
0.5	90	10
3	50	50
7	10	90
9.5	0	100
14	0	100
14.1	90	10
21	90	10

La velocidad de flujo durante la adquisición fue de $500 \mu\text{L min}^{-1}$. La duración total del método fue de 21 min, con un volumen muerto de $40 \mu\text{L}$ y un volumen de inyección de $10 \mu\text{L}$.

La interfase *Turbo IonSpray* operó en polaridad positiva en todos los casos. Los parámetros de la fuente de ionización optimizados para este método de adquisición se presentan en la Tabla 6. Se utilizó nitrógeno como gas de colisión y de nebulización.

Tabla 6. Parámetros de la interfase ESI

Parámetro	Valor
CUR	25 (unidades arbitrarias)
CAD	Alto
IS	5000 V

Temperatura (TEM)	500°C
GS1	50 psi
GS2	40 psi

El modo de trabajo del espectrómetro de masas fue MRM, empleando el algoritmo *Scheduled MRM*TM, el cual lleva a cabo la monitorización de cada transición en una ventana de tiempo de ± 0.5 min del tiempo de retención de cada analito, lo que produce un aumento de sensibilidad y selectividad. Para la adquisición de los datos se utilizó el software Analyst 1.6.2 y para la cuantificación MultiQuant 3.0.2.

Los voltajes optimizados del espectrómetro de masas, así como el tiempo de retención de cada analito, se muestran en el Anexo 1, en la Tabla A.1.1. Para una mejor lectura de los datos de dicha tabla: 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenil-1-pirrolidina (EDDP), 4-aminoantipirina (4-AA), 4-formilantipirina (4-FAA), además, los MCO se encuentran clasificados en fármacos, plaguicidas y antibióticos.

El método espectrométrico utilizado en este trabajo había sido previamente desarrollado por el grupo de investigación, exceptuando 7 compuestos que se perfundieron y optimizaron durante este trabajo: ácido niflúmico, ciantraniliprol, espirotetramato, metiocarb, oxadiazón, tiacloprid y valsartán.

5.4. Análisis mediante LC-QTOF-MS

Se realizaron distintos análisis en *full scan* para comprobar el grado de interferencias que presenta el método, lo que fue de utilidad a la hora de optimizar la etapa de limpieza del método QuEChERS.

El método analítico utilizado había sido previamente desarrollado por el grupo de investigación, y se encuentra descrito en bibliografía.⁷ Para la separación cromatográfica de los analitos, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1260 *Infinity system* (Agilent Technologies, Foster City, CA, E.E.U.U.), equipado con una columna Poroshell 120 EC-C18 (50 x 4.6 mm, 2.7 μ m). La composición de la fase móvil fue agua calidad LC-MS al 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B). El gradiente utilizado se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Gradiente de fase móvil empleado en el análisis mediante LC-QTOF-MS

Tiempo total (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
1	90	10
12	0	100
14	0	100
14.1	90	10
22	90	10

El cromatógrafo de líquidos está acoplado a un Triple TOF 5600+ (AB Sciex instruments, Wilmington, DE, EE. UU.), con una fuente de ionización que puede operar tanto en modo ESI como en APCI. La fuente de ionización operó en polaridad positiva en todos los casos, y se utilizó nitrógeno como gas de nebulización, colisión y como *curtain gas*. Los parámetros de dicha fuente se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros de la fuente de ionización en QTOF

Parámetro	Valor
CUR	25 (unidades arbitrarias)
CAD	Alto
IS	4500 V
Temperatura (TEM)	575°C
GS1	60 psi
GS2	60 psi

La velocidad de flujo durante la adquisición fue de $500 \mu\text{L min}^{-1}$, un volumen de inyección de $20 \mu\text{L}$, un volumen muerto de $40 \mu\text{L}$ y una duración total de 22 min. Se emplearon los softwares Analyst TF 1.5 y PeakView™ 2.2 para la adquisición y el procesamiento de los datos, respectivamente.

5.5. Validación del método

La cuantificación de los MCO incluidos en el método analítico se llevó a cabo mediante la preparación de curvas de calibrado en matriz de agua de salida de la EDAR de El Toyo, con el fin de reducir las interferencias ocasionadas por la matriz, y dada la imposibilidad de obtener un blanco de matriz. De esta manera se consigue que cada analito sea afectado de igual manera por la matriz. A continuación, se describen los parámetros de validación estudiados:

- *Linealidad*: Definida como la capacidad de proporcionar una señal directamente proporcional a la concentración de analito presente en una muestra determinada. Para evaluar dicho parámetro se prepararon muestras de agua residual conteniendo 10, 50, 100, 500 y 1000 ng/L de cada analito. El área de pico fue la respuesta seleccionada para la determinación. Se consideró una linealidad adecuada cuando el coeficiente de determinación obtenido del correspondiente ajuste por mínimos cuadrados era superior a 0.9800.
- *Veracidad*: La veracidad se define como la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos por el método analítico) a un valor conocido. Para su evaluación, se adicionaron cinco muestras de agua residual con los MCO seleccionados a dos niveles de concentración (0.05 y 0.5 $\mu\text{g/L}$) antes de la extracción. El valor obtenido dependerá de la complejidad de la matriz, del disolvente empleado en la extracción y de las sales y adsorbentes

empleados tanto en la etapa de extracción como en el *clean-up*. Debido a que existen pérdidas de analito durante la extracción, la veracidad se expresa en porcentaje de recuperación.⁶⁴

- **Precisión:** La precisión es una medida de la similitud que presentan una serie de datos entre sí. Se denomina precisión intra-día o repetibilidad cuando las determinaciones se realizan en un mismo día por el mismo analista y utilizando el mismo equipo. Por otro lado, en la precisión inter-día se realizan las mismas determinaciones, pero en días consecutivos. Todos los resultados se expresan en términos de RSD.

Para evaluar la precisión intra-día, se emplearon muestras fortificadas ($n=5$) de agua residual con los MCO seleccionados a los niveles de concentración estudiados (0.05 y 0.5 $\mu\text{g/L}$). Para la precisión inter-día se calculó la RSD durante 3 días consecutivos para cada nivel de concentración. En cada uno de los casos los analitos fueron adicionados antes de la extracción.⁶⁴

- **Límites de cuantificación:** El límite de cuantificación (*limits of quantification*, LOQ) se define como la concentración más baja de analito que permite ser cuantificada de forma exacta y precisa. Para ello es necesario una relación S/N superior o igual a 10. Para su determinación experimental se adicionaron MCO en un extracto de matriz a niveles de concentración decrecientes 10, 7, 5, 3, 1, 0.5 y 0.1 ng/L .
- **Efecto matriz:** Para evaluar la presencia de efecto matriz (EM) en las muestras de agua residual, se preparó una recta de calibrado con los MCO seleccionados en el disolvente de inyección ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 90:10) a las concentraciones de 10, 50, 100, 500 y 1000 ng L^{-1} . Por otro lado, se preparó una recta de calibrado en matriz con los mismos niveles de concentración, de manera que se puedan comparar las pendientes de las rectas obtenidas. El efecto matriz expresado en tanto por ciento se calcula utilizando la siguiente ecuación: $\text{EM} (\%) = (\text{Pendiente}_{\text{matriz}}/\text{Pendiente}_{\text{disolvente}} - 1) \times 100$. Si se obtiene un valor negativo, la matriz tendrá un efecto de supresión iónica sobre la señal del analito, si por el contrario es positivo, se produce un aumento de la señal del analito en matriz con respecto al disolvente.

5.6. Aplicación del método a muestras de agua residual real

Una vez desarrollado y validado, el método propuesto se aplicó en la determinación los MCO seleccionados en aguas residuales reales, procedentes del efluente del tratamiento secundario de la EDAR de El Toyo, en Almería (36°51'30" N, 2°19'48" O). Dicha estación depuradora tiene capacidad para tratar las aguas residuales producida por una población de 52.000 habitantes equivalentes. En la Figura 5 se muestra la localización de la EDAR en cuestión.

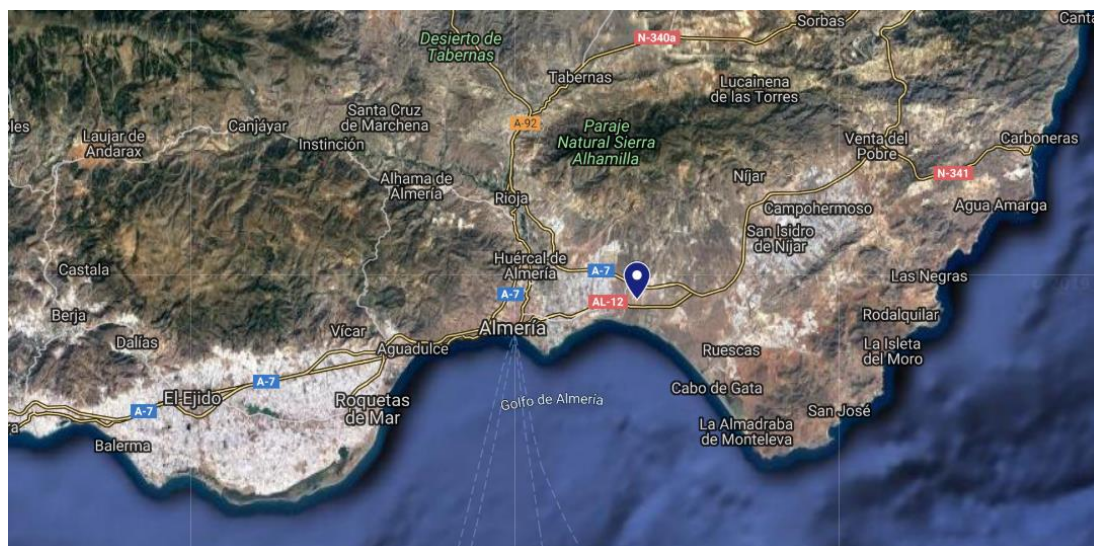


Figura 5. Localización de las EDAR de El Toyo

Debido a su localización, la EDAR de El Toyo recibe agua principalmente procedente de las viviendas de la zona y de un hospital situado en las cercanías de la misma. La línea de tratamiento consiste en un pretratamiento (filtración, cribado y desengrasado), un tratamiento primario (decantación primaria) y un tratamiento biológico que consiste en una aeración extendida seguida de una decantación secundaria. El agua residual fue tomada a la salida de la depuradora, tras finalizar el tratamiento secundario. Las muestras se almacenaron en botellas de vidrio de 1L y se congelaron a -20°C hasta su análisis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Optimización del método espectrométrico

Tanto la composición como el gradiente de fase móvil del método cromatográfico utilizado en este estudio habían sido optimizados previamente por el grupo de investigación que ha hecho posible este trabajo. Sin embargo, durante este estudio, el método fue ampliado, incluyendo 7 nuevos compuestos que se muestran en la Tabla 9, siendo necesaria la optimización del método espectrométrico para dichos compuestos.

Tabla 9. Lista de los compuestos añadidos al método

Compuesto	Concentración perfundida ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ácido niflúmico	10
Ciantraniliprol	100
Espirotetramato	100
Metiocarb	10
Oxadiazón	100

Tiaclopid	100
Valsartán	100

En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica en bases de datos, como *Scopus*, *Pubchem*, *Chemspider* o *EURL data pool*,⁶⁵⁻⁶⁸ para recabar información sobre los iones precursores y producto característicos de cada compuesto. A continuación, se llevó a cabo la perfusión de los compuestos en el espectrómetro de masas, inyectando una disolución de 10 µg L⁻¹, o 100 µg L⁻¹ si no se observa el ion precursor (Tabla 9). Todos ellos se perfundieron en polaridad positiva.

Para seleccionar las transiciones ion precursor/ion producto más adecuadas, se estableció un compromiso entre abundancia relativa y relación *m/z*, teniendo en cuenta que a mayor abundancia relativa se obtenía una mayor sensibilidad y a mayor relación *m/z* una mayor selectividad.

Tras elegir el ion precursor más adecuado, que en todos los casos correspondió con el ion [M+H]⁺, se optimizó el DP para dicho ion, y se procedió a optimizar los voltajes CE, EP y CXP para cada ion producto seleccionado.

Una vez optimizado el método espectrométrico, y obtenido el tiempo de retención de los nuevos analitos en el método cromatográfico, se procedió a evaluar el método de extracción y su etapa de *clean-up*.

6.2. Optimización de la etapa de extracción

Para la optimización de la etapa de extracción del método QuEChERS, se evaluó el porcentaje de recuperación de cada MCO, que se obtenía al fortificar una muestra de agua residual, previamente a la extracción. Se evaluó la eficacia de los métodos 1-5 descritos en el apartado 5.2. de esta memoria:

- Método 1: QuEChERS citrato EN 15662
- Método 2: QuEChERS acetato
- Método 3: QuEChERS con tampón McIlvaine
- Método 4: QuEChERS citrato + EDTA 0.1M
- Método 5: QuEChERS citrato modificado

La principal diferencia entre los distintos métodos evaluados es el pH de la extracción. Para variar dicho parámetro, comprobando así su influencia en la extracción de MCO, se probaron en cada una de las extracciones distintas combinaciones de sales con efecto tampón que mantienen el pH a un valor determinado.

Se realizaron tres réplicas de agua residual fortificada a 0.5 µg L⁻¹ para evaluar la veracidad y precisión de cada método, empleando en la etapa de *clean-up* MgSO₄ y C18, en todos los casos. El principal objetivo de esta optimización fue mejorar la extracción de los antibióticos, por ser el grupo de compuestos que se ven más afectados por el pH de la extracción.⁶³ En la Tabla 10 se muestra un resumen de los resultados globales obtenidos con cada método.

Tabla 10. Resultados de las recuperaciones obtenidas con los métodos 1-5.

Recuperaciones	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
>130%	1	3	6	8	9
<60%	17	40	14	8	4
60-130%	102	71	98	101	109
n.r.	4	10	6	7	2

n.r.: No recuperados

Como se puede observar, con el método 5 se recupera un mayor número de compuestos (solo 2 no pudieron extraerse: 4-AA y salbutamol), siendo también mayor el número de compuestos con recuperaciones entre 60-130%. Este método sustituye el citrato sódico dibásico sesquihidrato del QuEChERS citrato convencional por el ácido cítrico monohidrato, que junto al citrato trisódico dihidrato forma una disolución tampón de pH más ácido en comparación con el QuEChERS citrato EN 15662 (pH alrededor de 5).^{49,63} Además, el disolvente de extracción consiste en una mezcla de ACN:MeOH (85:15) en lugar de ACN exclusivamente, mejorando así la recuperación de compuestos más polares.⁶³ Por el contrario, el método 2 (QuEChERS acetato) fue el que proporcionó peores resultados.

Los resultados muestran una clara dependencia del pH en la extracción de algunos MCO. La utilización del EDTA-Na₂ en el método 4 mejora la extracción de algunos antibióticos, como josamicina, doxiciclina, o las sulfamidas, ya que este actúa como agente quelatante, coordinándose con los cationes metálicos que forman un complejo con determinados antibióticos, dificultando su extracción.⁶² En la Tabla 11, se muestran las recuperaciones obtenidas para los antibióticos con cada método:

Tabla 11. Recuperaciones obtenidas con cada método para los antibióticos

Compuesto	Recuperaciones (%)				
	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
Ac. nalidíxico	94	n.r.	12	78	n.r.
Cefalexina	86	154	25	122	77
Cefotaxima	86	56	84	80	78
Clindamicina	n.r.	18	53	3	71
Doxiciclina	18	n.r.	n.r.	36	140
Eritromicina	82	44	3	97	126
Flumequina	70	n.r.	90	74	58

Josamicina	55	n.r.	n.r.	101	267
Lincomicina	91	77	111	88	86
Metronidazol	71	39	4	94	140
Roxitromicina	74	55	95	42	77
Sulfadiazina	15	n.r.	125	62	97
Sulfametazina	22	63	118	88	92
Sulfametizol	19	63	94	65	98
Sulfatiazol	20	64	83	64	84
Trimetoprim	103	56	97	89	98

Si se comparan los resultados de los métodos 1, 2 y 3 con los resultados de los métodos 4 y 5 (especialmente el método 5), se puede observar en general una mejora en la extracción de los antibióticos con éstos últimos. Por ejemplo, véase el caso de las sulfamidas, doxiciclina, josamicina etc. Esto es debido, en el caso del método 4 a la adición de EDTA-Na₂, como se ha mencionado anteriormente, y en el caso del método 5 a un pH de extracción más ácido, como reporta Hu *et al.*⁶³

6.3. Optimización de la etapa de *clean-up*

Tras la optimización del disolvente y las sales de extracción, se continuó evaluando el efecto en la eliminación de interferencias de distintos adsorbentes en la etapa de *clean-up*. Para ello, se realizaron distintas extracciones utilizando el método 5, analizando por cada *clean-up* un blanco matriz, un fortificado a 0.5 µg L⁻¹ y un punto en matriz a 0.5 µg L⁻¹. Se evaluaron 4 combinaciones de adsorbentes diferentes que se detallan a continuación (en todos los casos se adicionaron también 750 mg de MgSO₄):

- i. 125 mg C18
- ii. 125 mg C18 + 125 mg PSA
- iii. 125 mg Z-sep
- iv. 125 mg Z-sep+

Para tomar una decisión se hallaron las recuperaciones obtenidas con cada *clean-up*. En la Tabla 12 se muestran los resultados:

Tabla 12. Recuperaciones obtenidas con los diferentes *clean-up* ensayados.

Recuperaciones	C18	C18+PSA	Z-sep	Z-sep ⁺
>130%	43	6	9	6
<60%	2	6	1	10
60-130%	79	111	112	103

n.r ^a	0	1	2	5
------------------	---	---	---	---

^an.r: No recuperados

Además de evaluar las recuperaciones obtenidas con cada *clean-up*, se realizó un análisis mediante LC-QTOF-MS en *full-scan*, a fin de determinar el efecto de las distintas combinaciones de adsorbentes en la eliminación de interferencias. En la Figura 6, se muestran los cromatogramas de iones totales (*total ion chromatogram*, TIC) para cada uno de los ensayos realizados:

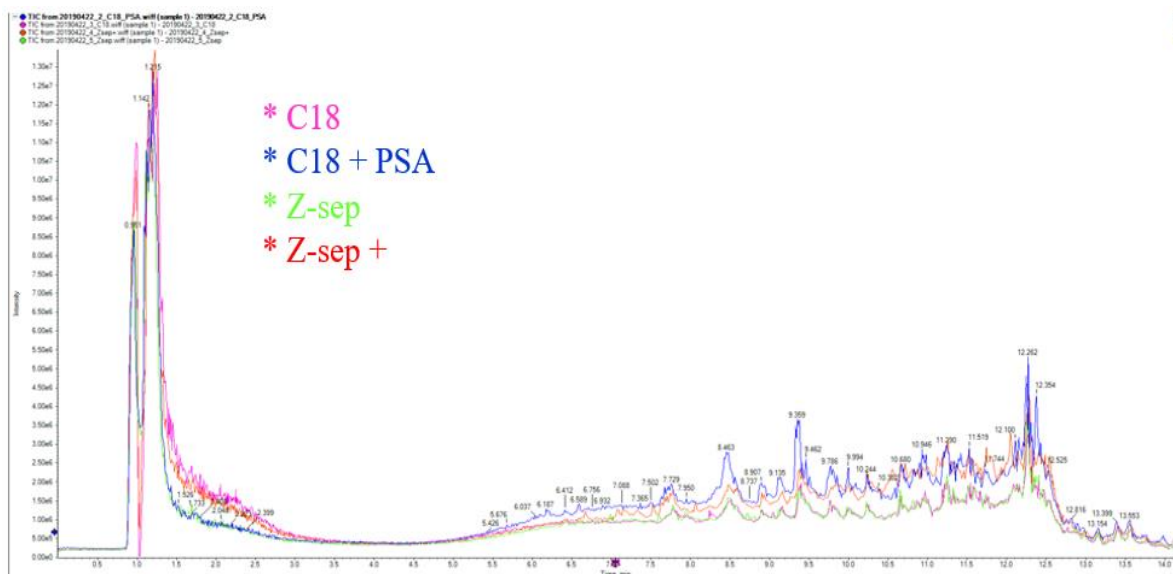


Figura 6. Superposición de los TIC obtenidos para una muestra de agua residual con cada *clean-up*

Como se puede observar, una gran cantidad de interferencias predominantemente polares son eluidas al inicio del cromatograma, si bien éstas desaparecen antes de la elución del primer compuesto de interés (cotinina, 3.64 min). La mayor limpieza de esta zona del cromatograma se obtuvo utilizando Z-sep y la mezcla C18+PSA, mientras que Z-sep⁺ y C18, proporcionaban una eliminación menos eficiente de estas interferencias polares. En la región central del cromatograma, en la que eluyen la mayor parte de los compuestos, los mejores resultados se obtuvieron con C18 y Z-sep, si bien el C18 fue descartado en base a las peores recuperaciones obtenidas, como se muestra en la Tabla 11. Por ello se eligió finalmente el *clean-up* con Z-sep como óptimo.

6.4. Estudio de la aplicación de factores de concentración

Una vez optimizado el método de extracción, se evaluó la posibilidad de aplicar algún factor de concentración que permitiera mejorar la respuesta de los analitos, disminuyendo así los LOQ. Dado que en el método optimizado el factor de concentración es de 1, se probaron distintos factores de concentración: 10, 6 y 2, evaporando en una corriente de N₂ los volúmenes de 1000, 600 y 200 μL del extracto final y recomponiendo en 100 μL

de H₂O:ACN (90:10). Se observó que, al aumentar el volumen de extracto, la evaporación no era completa, quedando una pequeña cantidad residual de agua al final del proceso, lo que no permitía conocer exactamente el factor de concentración empleado. Por ello se realizaron distintas pruebas con objetivo de eliminar el agua residual:

- Aumento de la cantidad de MgSO₄ en la etapa de extracción: Se realizaron cuatro extracciones añadiendo 5, 6, 7 y 8 g de MgSO₄ (junto al resto de sales). Se tomaron 5 mL del extracto y se sometieron a la limpieza con 750 mg de MgSO₄. Las cantidades de 7 y 8 g se descartaron, ya que al adicionarlas se producía un aumento apreciable de la temperatura de la disolución que podría degradar compuestos sensibles a la misma. Las cantidades de 5 y 6 g no cumplían con el objetivo deseado, ya que seguían quedando restos de agua.
- Aumento de la cantidad de MgSO₄ en la etapa de *clean-up*: Para ello, en la extracción se adicionaron 6g de MgSO₄ y se tomaron 5 mL para realizar la etapa de *clean-up*. Se realizaron dos pruebas, empleando 1 y 1.5 g de MgSO₄. Tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios.
- Reducción del volumen empleando en la etapa de *clean-up*: Puesto que seguía quedando agua, la siguiente prueba fue reducir la cantidad de extracto sometido a la etapa de *clean-up* hasta 3 mL. En esta prueba se emplearon 6 y 1.5 g de MgSO₄ en la extracción y *clean-up*, respectivamente. Si bien se observó una disminución en la cantidad de agua que quedaba tras evaporar el extracto, no se consiguió la total eliminación de la misma.

Esta pequeña cantidad de agua presente en el extracto final puede ser debida a que el pequeño porcentaje de metanol (junto al acetonitrilo), arrastra una mayor cantidad de agua que cuando se emplea únicamente acetonitrilo como disolvente de extracción.²⁷

Finalmente, como no fue posible determinar con exactitud el factor de concentración a causa del agua residual, se optó por realizar la validación del método empleando un factor de concentración 1.

6.5. Validación

Para asegurar que el método propuesto proporciona resultados lo suficientemente exactos y precisos como para aplicarlo al análisis de muestras reales, es imprescindible evaluar una serie de parámetros de validación, comentados anteriormente en el apartado 5.6. Dichos parámetros tienen que estar dentro de un rango de aceptabilidad, asegurando así que el método se ajusta a la intención propuesta. El estudio de validación se realizó con agua residual real en todos los casos.

- **Linealidad:** Dicho parámetro se evaluó según la descripción realizada en el apartado 5.6. Para elaborar la recta de calibrado, se empleó el área de la transición más intensa. Los resultados de la Tabla 13 muestran que la mayoría MCO presentan un buen ajuste lineal ($R^2 > 0.9900$), excepto citalopram que presenta un valor de $R^2 > 0.9800$.

- Veracidad: La veracidad se expresó en términos de recuperación, es decir, calculando el porcentaje de recuperación resultante de la extracción. Se evaluó la recuperación a dos niveles de concentración (50 y 500 ng/L). En la Tabla 13 se muestran los resultados de recuperación de cada MCO, expresados como la media aritmética de cinco determinaciones por cada nivel de concentración.

En la mayoría de los casos, las recuperaciones obtenidas están en el rango de 70-120 %, excepto para cefalexina, cetirizina, clotrimazol, eritromicina, terbutrin y trazodona cuyos valores se sitúan entre 60-130%. Solamente josamicina y nitrendipina a 50 ng/L y doxiciclina a 500 ng/L presentan valores promedio de recuperación fuera de rango.

- Precisión: La precisión inter-día o repetibilidad, se obtuvo calculando la RSD correspondiente a un mínimo de 5 réplicas de cada nivel de concentración (50 y 500 ng/L). En todos los casos la RSD fue menor o igual al 25%, excepto para cefalexina a 500 ng/L. Por otro lado, la precisión inter-día se obtuvo calculando la RSD en 3 días consecutivos para cada nivel de fortificación. Todos los valores de RSD calculados son iguales o inferiores al 25%, excepto para cetirizina a ambos niveles de concentración y para los antibióticos doxiciclina, eritromicina y lincomicina. Los resultados de precisión se muestran en la Tabla 13.

- LOQ: Debido a la complejidad y variabilidad de la matriz, únicamente se estimó el valor del límite de cuantificación, a causa del elevado error que se comete al calcular estos límites en especial en ausencia de blancos. Para los compuestos presentes en el blanco, se halló su concentración mediante la técnica de adición de patrón. A partir de la S/N que proporciona dicha concentración, se obtuvo una estimación de la concentración que proporciona una S/N de 10 (LOQ). Los compuestos que no estaban presentes en el blanco se determinaron según el procedimiento descrito en el apartado 5.6.

Los límites de cuantificación oscilan entre 1-50 ng/L, presentando la mayoría de compuestos un LOQ de 50 ng/L. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

- Efecto matriz: Cuando la ionización de los MCO se produce en una fuente ESI, suele producirse una disminución de la señal en matriz con respecto a la señal en disolvente, efecto conocido como supresión iónica. Es por ello, que en la Tabla 13 la mayoría de MCO presentan un efecto matriz negativo.

La mayoría de los compuestos validados no presentan efecto matriz ($EM < |20\%|$), aproximadamente un tercio de los compuestos validados presentan un efecto matriz moderado ($|20\%| < E.M. < |50\%|$) y 6 compuestos presentan un fuerte efecto matriz ($E.M. > |50\%|$), entre ellos 3 antibióticos, 1 plaguicida y 2 fármacos.

Tabla 13. Resultados de la validación del método

Compuesto	Linealidad R ²	Recuperación (% Rec)				Precisión inter-día (RSD, %)		EM (%)	LOQ (ng/L)
		Precisión intra-día (RSD, %)				50 ng/L	500 ng/L		
		50 ng/L		500 ng/L					
% Rec	RSD	%Rec	RSD	50 ng/L	500 ng/L				
<i>Fármacos</i>									
Acetanilida	0,9997	73	21	96	7	19	1	17	12
Ácido fenofibrico	0,9994	99	20	96	7	17	10	-24	5
Ácido mefenámico	0,9998	112	9	114	2	14	15	-14	1
Ácido niflúmico	0,9997	105	5	100	2	12	3	9	3
Acridona	0,9997	102	4	105	6	5	2	17	12
Alfuzosina	0,9999	108	13	111	7	14	6	-15	50
Amisulprida	0,9996	81	11	93	8	13	4	-20	10
Amitriptilina	0,9983	107	12	103	7	11	9	-12	8
Atenolol	0,9996	108	6	91	6	13	6	11	14
Betametasona	0,9990	88	15	95	6	11	4	-16	10
Carbamazepina	0,9991	104	18	83	9	10	7	-23	5
Cetirizina	0,9998	105	11	126	7	31	32	8	21
Ciclofosfamida	0,9973	86	7	107	3	11	6	-28	50
Citalopram	0,9882	82	18	106	6	13	4	-23	13
Clomipramina	0,9999	86	12	107	3	10	7	-18	7
Clotrimazol	0,9998	125	5	98	1	1	1	-4	50

Diazepam	0,9982	85	10	100	8	15	6	-30	6
Difenhidramina	0,9984	101	3	88	6	5	6	-17	3
Domperidone	0,9989	94	10	105	8	13	11	14	50
Donepezilo	0,9939	85	11	112	6	3	7	-21	50
EDDP	0,9997	103	8	91	5	6	5	-10	4
Famotidina	0,9981	83	12	79	17	13	3	-25	3
Fenofibrato	0,9986	95	3	102	5	3	3	-39	50
Flecainida	0,9939	105	19	104	24	5	5	-15	3
Fluoxetina	0,9998	107	10	93	6	6	5	-28	2
Ifosfamida	0,9997	85	10	89	6	9	10	-47	50
Iminoestilbeno	0,9995	85	6	98	9	18	3	-17	34
Indometacina	0,9991	101	7	89	4	9	6	-16	3
Labetalol	0,9998	95	9	103	4	8	4	-5	50
Lidocaína	0,9999	95	16	105	6	17	5	-8	9
Loratadina	1,0000	104	7	107	5	12	9	-2	7
Memantina	0,9997	108	6	89	5	12	7	-31	27
Mepivacaína	0,9999	96	3	101	4	6	3	-21	2
Metadona	0,9984	90	7	102	3	2	9	-4	4
Metoclopramida	0,9999	100	9	98	3	11	1	-17	2
Metoprolol	0,9997	101	1	93	6	1	4	-28	50
Mevastatina	0,9996	95	17	95	6	14	12	-59	50
Nadolol	0,9994	83	18	82	13	14	11	-32	50

N-desmetilcitalopram	0,9999	102	22	100	4	5	3	-44	12
Nitrendipina	0,9997	184	21	97	5	11	3	-27	50
N-óxido tramadol	0,9999	102	6	96	7	5	5	-13	50
O-desmetiltramadol	0,9964	138	21	83	19	15	12	-25	50
Paroxetina	0,9988	99	6	98	10	8	2	-24	50
Pentoxifilina	0,9998	88	11	96	8	8	2	-26	50
Primidona	0,9997	-	-	104	8	1	7	-43	50
Propafenona	0,9995	87	8	90	4	5	6	-18	1
Propanolol	0,9999	110	7	104	3	19	6	-22	6
Propifenazona	0,9999	97	9	93	9	2	3	-2	50
Ranitidina	0,9999	111	8	71	22	3	12	-44	6
Salbutamol	0,9997	86	5	95	7	3	1	-11	50
Simvastatina	0,9997	87	7	89	5	5	7	-57	50
Sotalol	0,9977	97	9	102	10	12	6	2	10
Tamoxifeno	0,9999	94	7	98	4	21	10	-8	50
Terbutalina	0,9995	99	5	93	6	10	10	13	50
Trazodona	1,0000	66	18	83	9	13	8	-21	3
Triamtereno	0,9981	94	8	94	7	9	7	-39	10
Valsartán	0,9968	81	7	74	8	12	17	-25	32
Velaflaxina	0,9999	111	5	74	7	22	13	-14	9
Verapamil	0,9988	98	6	87	4	6	7	-3	10

Plaguicidas

Acetamiprid	0,9994	80	21	109	7	17	6	-52	2
Atrazina	0,9989	89	12	98	5	6	2	8	10
Azoxystrobina	0,9999	97	7	96	5	1	2	-17	2
Boscalida	0,9982	91	25	106	3	14	5	-30	18
Buprofezin	0,9984	87	9	99	3	6	3	-8	1
Carbendazima	0,9988	117	10	91	7	14	7	14	6
Clorfenvinfos	0,9996	80	12	99	5	15	2	-19	50
Clorpirifós	0,9991	97	8	105	4	9	2	-47	6
Ciantraniliprol	0,9996	95	9	85	14	1	13	-22	50
Ciprodinil	0,9999	93	4	97	3	5	2	18	21
Dimetoato	0,9993	86	7	103	2	15	2	-39	50
Dimetomorf	0,9996	89	7	90	4	7	6	-24	10
Diurón	0,9995	81	2	100	3	11	6	-13	20
Espirotramato	1,0000	110	7	105	3	9	4	-24	3
Fenhexamida	0,9988	85	14	88	3	15	8	-15	50
Imazalil	0,9987	106	5	101	2	24	7	-11	50
Isoproturón	0,9996	96	16	109	4	9	7	-3	1
Metalaxil	0,9979	96	4	98	4	2	6	-23	3
Metiocarb	0,9995	98	5	90	4	12	14	-19	50
Miclobutanil	0,9994	103	4	103	3	4	0	-12	50
Oxadiazón	0,9999	103	4	103	2	3	1	-37	10
Pirimicarb	0,9998	102	5	96	6	12	2	0	5

Procloraz	0,9992	91	3	101	3	6	6	4	7
Propamocarb	0,9996	91	5	99	2	11	6	-6	50
Propiconazol	0,9997	101	9	101	3	10	2	4	1
Pirimetanil	0,9985	105	6	102	4	5	0	-1	5
Quinmerac	0,9993	94	5	93	7	3	5	-12	50
Quinoxifen	1,0000	112	10	104	1	16	8	-1	3
Simazina	0,9995	106	4	92	6	12	6	10	10
Tebuconazol	0,9995	85	17	96	4	6	2	-8	3
Terbutrin	0,9989	69	22	90	5	20	6	7	5
Tiacloprid	1,0000	100	6	91	6	14	6	-43	10
Tiabendazol	0,9956	79	8	102	6	23	2	7	2

Antibióticos

Ácido nalidíxico	0,9998	96	11	97	1	16	2	18	50
Cefalexina	0,9997	112	8	61	60	15	5	-57	50
Cefotaxima	0,9977	86	14	103	7	20	12	4	50
Clindamicina	0,9987	97	5	94	8	26	4	-5	2
Doxiciclina	0,9999	105	13	145	6	25	43	-10	50
Eritromicina	0,9981	65	20	61	20	46	28	-58	50
Flumequina	0,9999	90	12	82	3	18	14	-15	50
Josamicina	0,9999	56	7	74	11	24	5	-28	10
Lincomicina	0,9997	79	9	78	19	30	5	21	1
Metronidazol	0,9997	97	10	91	10	22	6	-36	50

Roxitromicina	0,9990	77	15	120	13	10	17	-75	50
Sulfadiazina	0,9997	101	8	87	13	5	10	-20	10
Sulfametazina	0,9996	85	11	91	10	22	6	-6	10
Sulfametizol	0,9996	92	8	86	6	9	11	-37	50
Sulfatiazol	0,9999	96	6	83	9	11	16	-22	10
Trimetoprim	0,9999	90	12	78	11	18	14	-28	50

6.6. Aplicación a muestras reales

Para determinar y evaluar los niveles de concentración de los MCO en muestras reales de agua residual, se analizaron 7 muestras diferentes de agua residual de la EDAR de El Toyo que fueron colectadas en distintos días entre los meses de marzo y mayo: 4 de marzo de 2019 (4/03), 2 de abril de 2019 (2/04), 23 de abril de 2019 (23/04), 29 de abril de 2019 (29/04), 7 de mayo de 2019 (7/05), 13 de mayo de 2019 (13/05) y 21 de mayo de 2019 (21/05).

Para poder cuantificar aquellos compuestos que presentan una concentración superior al rango lineal validado, se llevaron a cabo diluciones tanto de la recta de calibrado como de las muestras. En la Tabla 14, se muestran los resultados del análisis de muestras reales.

Tabla 14. Resultados del análisis de muestras reales en ng/L.

Compuesto	4/03	2/04	23/04	29/04	7/05	13/05	21/05
Ácido mefenámico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10
Acridona	53	119	68	91	43	51	1125
Amisulpride	82	222	37	20	39	64	232
Atenolol	<LOQ	54	48	78	35	56	80
Carbamazepina	32	77	76	109	57	100	116
Cetirizina	191	424	408	575	292	578	677
Citalopram	82	178	163	187	130	192	235
Diazepam	9	14	<LOQ	12	<LOQ	11	16
Diphenhidramina	24	43	40	45	34	36	35
EDDP	37	75	83	94	61	80	46
Ácido fenofíbrico	22	49	28	19	14	12	17
Flecainida	36	269	141	305	319	425	676
Fluoxetina	39	37	37	<LOQ	<LOQ	<LOQ	147
Iminostilbene	<LOQ	<LOQ	<LOQ	114	108	135	118
Indometacina	16	32	26	34	22	26	22
Lidocaína	57	114	110	129	84	112	123
Memantina	32	109	54	89	67	90	120
Mepivacaína	12	26	19	23	10	30	21
Metadona	32	61	60	69	53	51	52
Metoclopramida	18	33	27	22	27	29	20
N-Desmetilcitalopram	87	142	112	135	105	117	85
O-Desmetiltramadol	408	961	927	1149	553	1055	1512
Propranolol	23	48	32	54	36	34	44
Propafenona	10	14	12	12	10	13	7

Ranitidina	72	133	99	128	35	95	105
Sotalol	42	83	67	83	20	48	73
Trazodona	27	47	44	50	38	45	58
Valsartán	158	302	365	340	260	287	222
Velafaxina	172	382	324	375	244	308	269
Acetamiprid	47	80	62	72	59	143	10
Azoxistrobina	38	70	41	53	42	36	13
Boscalida	261	619	212	274	245	194	148
Carbendazima	46	106	42	45	63	120	64
Clorpirifos	97	111	58	50	53	53	57
Ciprodinil	<LOQ	<LOQ	<LOQ	20	<LOQ	<LOQ	29
Diurón	95	223	59	105	109	76	174
Fenhexamida	<LOQ	80	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Isoproturón	<LOQ	12	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	22
Propiconazol	15	30	8	<LOQ	10	<LOQ	4
Pirimetanil	45	68	50	53	43	35	34
Tebuconazol	43	84	26	25	32	28	24
Terbutrín	34	72	85	98	66	93	98
Tiabendazol	7	31	27	8	<LOQ	29	89
Clindamicina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	30
Lincomicina	35	37	44	37	129	36	10

Los resultados muestran la presencia de un gran número de MCO (46) en el agua residual, lo que verifica el ineficiente tratamiento del agua residual que se lleva a cabo en las EDAR convencionales.

Cabe destacar la presencia de los MCO más concentrados como: O-desmetiltramadol, presente a más de 1000 ng/L los días 29/04, 13/05 y 21/05, valsartán cuya concentración oscila entre 158-365 ng/L o velflaxina, que oscila entre 172-375 µg/L. La abundancia de estos compuestos se justifica debido a la cercanía de un hospital a la EDAR de El Toyo. El resto de compuestos presentan concentraciones muy similares entre los distintos días, aunque hay excepciones como la lincomicina, que presenta una concentración de 129 ng/L el día 7/05 mientras que el resto de días no supera los 50 ng/L. Esto puede ser explicado por la variabilidad de los efluentes, o puede ser un indicador de los hábitos de consumo de la población.

En la revisión bibliográfica realizada, solo se han encontrado dos artículos que emplean el método QuEChERS para la extracción de MCO en agua residual, seguido de un posterior análisis mediante LC-MS/MS. En el caso de Łozowicka B. *et al.*²⁸ analizan 28 plaguicidas en agua residual, de los que acetamiprid, tebuconazol y tiacloprid también están presentes en nuestro método. En dicho estudio, se analizaron 30 muestras de agua

residual entre Junio-Octubre durante los años 2014-2015. Se detectó a niveles relativamente bajos acetamiprid a 70 ng/L y tiacloprid a 40 ng/L, excepto tebuconazol a concentraciones más elevadas (1200 ng/L). En nuestro caso, acetamiprid fue cuantificado alrededor de 70 ng/L todos los días excepto el 13/05 y 21/05. Por el contrario, tebuconazol estuvo presente a concentraciones más bajas, que oscilan entre los 24-84 ng/L. No se detectó tiacloprid en las muestras reales analizadas en este estudio.

Por otro lado, Kachhawaha A.S. *et al.*²⁹ realiza una extracción tipo QuEChERS para el análisis de 19 fármacos y productos de higiene personal, entre los cuales destacan valsartán, atenolol, propranolol, carbamazepina, eritromicina, fluoxetina y trimetoprim. En agua superficial se detectaron atenolol y carbamazepina entre otros, a concentraciones que oscilan entre 100-1400 ng/L. Estos dos compuestos también fueron detectados en agua residual, a concentraciones comprendidas entre 100-13400 ng/L. En nuestro caso atenolol fue detectado en todas las muestras menos una, en concentraciones que oscilan entre 48-80 ng/L, carbamazepina fue detectada en todas las muestras, a concentraciones entre 32-115 ng/L.

El método multiresiduo desarrollado muestra la capacidad para analizar MCO en agua residual satisfactoriamente. Además, la presencia de estos MCO en el agua residual demuestra la ineficiencia del tratamiento convencional de aguas residuales.

7. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado y validado un método para la extracción de 108 MCO en agua residual, basado en una extracción tipo QuEChERS seguida de un análisis mediante LC-QqLIT-MS/MS.
- Se ha optimizado la etapa de extracción, seleccionando las sales ácido cítrico monohidrato y citrato trisódico dihidrato como óptimas para favorecer la extracción de MCO.
- Se ha optimizado la etapa de *clean-up*, eligiendo el adsorbente Z-sep como mejor opción, en base a un compromiso entre eliminación de interferencia de matriz y recuperaciones máximas.
- Se ha validado el método de extracción obteniendo buenos resultados en los distintos parámetros validados, con recuperaciones superiores al 60% excepto para josamicina. Los límites de cuantificación están comprendidos entre 1-50 ng/L
- La aplicación del método desarrollado al análisis de muestras de agua residual reales procedentes de la EDAR de El Toyo, se ha llevado a cabo satisfactoriamente.
- Los resultados obtenidos a raíz del análisis de muestras reales, manifiestan la presencia de MCO en agua residual, en concentraciones que oscilan entre los 4 ng/L de propiconazol hasta los 1149 ng/L del O-desmetiltramadol. Por ello, es necesario una mejora en el tratamiento de aguas residuales convencional que permita el posterior uso del agua residual tratada con garantías.

8. BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS

- (1) Sousa, J. C. G.; Ribeiro, A. R.; Barbosa, M. O.; Pereira, M. F. R.; Silva, A. M. T. A Review on Environmental Monitoring of Water Organic Pollutants Identified by EU Guidelines. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *344*, 146–162. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.058>.
- (2) Garrido, E.; Camacho-Muñoz, D.; Martín, J.; Santos, A.; Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Monitoring of Emerging Pollutants in Guadiamar River Basin (South of Spain): Analytical Method, Spatial Distribution and Environmental Risk Assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23* (24), 25127–25144. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7759-x>.
- (3) Murray, K. E.; Thomas, S. M.; Bodour, A. A. Prioritizing Research for Trace Pollutants and Emerging Contaminants in the Freshwater Environment. *Environ. Pollut.* **2010**, *158* (12), 3462–3471. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.009>.
- (4) Mordwinkin, N. M.; Lee, A. S.; Wu, J. C. Patient-Specific Stem Cells and Cardiovascular Drug Discovery. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2013**, *310* (19), 2039–2040. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.07.015>.
- (5) Christou, A.; Agüera, A.; Bayona, J. M.; Cytryn, E.; Fotopoulos, V.; Lambropoulou, D.; Manaia, C. M.; Michael, C.; Revitt, M.; Schröder, P.; et al. The Potential Implications of Reclaimed Wastewater Reuse for Irrigation on the Agricultural Environment: The Knowns and Unknowns of the Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes – A Review. *Water Res.* **2017**, *123*, 448–467. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.004>.
- (6) Pedrazzani, R.; Bertanza, G.; Brnardić, I.; Cetecioglu, Z.; Dries, J.; Dvarionienė, J.; García-Fernández, A. J.; Langenhoff, A.; Libralato, G.; Lofrano, G.; et al. Opinion Paper about Organic Trace Pollutants in Wastewater: Toxicity Assessment in a European Perspective. *Sci. Total Environ.* **2019**, *651*, 3202–3221. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.027>.
- (7) Martínez-Piernas, A. B.; Plaza-Bolaños, P.; García-Gómez, E.; Fernández-Ibáñez, P.; Agüera, A. Determination of Organic Microcontaminants in Agricultural Soils Irrigated with Reclaimed Wastewater: Target and Suspect Approaches. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1030*, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.049>.
- (8) Unión Europea. UE. Directiva 2000/60/CE Del Parlamento Europeo y Del Consejo de 23 de Octubre de 2000, Por La Que Se Establece Un Marco Comunitario de Actuación En El Ámbito de La Política de Aguas. *D. Of. las Comunidades Eur.* **2000**, *Nº L 327* (7), 1–72. [https://doi.org/10.1016/S0959-6526\(03\)00126-4](https://doi.org/10.1016/S0959-6526(03)00126-4).
- (9) Decisión, N.; Del, C. E.; Europeo, P.; Consejo, Y. D. E. L. Decisión Nº 2445/2001/CE Del Parlamento Europeo. **2006**, *4* (9), 9–16.
- (10) Europea, U. Directiva 2008/105/CE. Relativa a Las Normas de Calidad Ambiental En El Ámbito de La Política de Aguas. *D. Of. la Unión Eur.* **2008**, *348*, 84–97.
- (11) Ue, D.; Parlamento, D. E. L.; Del, E. Y. EU 2013:39:EU Directive Dicofol. **2013**, *2013*, 1–17.
- (12) European Commission (EU). DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2015/495 DE LA COMISIÓN de 20 de Marzo de 2015 Por La Que Se Establece Una Lista de Observación de Sustancias a Efectos de Seguimiento a Nivel de La Unión En El Ámbito de La Política de Aguas, de Conformidad Con La Directiva 200. *Doce* **2015**, *L78* (3), 40–42.
- (13) Comisi, L. A.; Europeo, P.; Europeo, P. DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2018/840 DE LA COMISIÓN de 5 de Junio de 2018, Por La Que Se Establece Una Lista de Observación de Sustancias a Efectos de Seguimiento a Nivel de La Unión En El Ámbito de La Política de Aguas, de Conformidad Con La Directiva 2008. **2018**, *2018* (6), 5–8.
- (14) USEPA. Federal Water Pollution Control Act. **2002**, 234. <https://doi.org/00024720-200608000-00007> [pii].
- (15) Environmental Protection Agency (EPA). Priority Pollutant List, 40 CFR Part 423, Appendix A.Pdf. 2–3.
- (16) Environmental Protection Agency (EPA). Analytical Methods Approved for Drinking Water Compliance Monitoring of Organic Contaminants and Other Organic Constituents. *Water* **2009**, No. December, 1–56.
- (17) Contaminant, U.; Rule, M.; List, C. C.; Safe, T.; Water, D.; Contaminant, N.; Database, O.; Considerations, D. The Fourth Unregulated Contaminant Monitoring Rule (UCMR 4): Data Summary , October 2018. **2020**, 1–14.
- (18) <https://www.epa.gov/dwanalyticalmethods/analytical-methods-developed-epa-analysis->

- unregulated-contaminants (15/02/2019, 9:56).
- (19) Kauffmann, J.-M.; Çipa, M.; Zafra-Gómez, A.; de Alarcón-Gómez, B.; Rodríguez-Gómez, R.; Martín-Pozo, L.; García-Córcoles, M. T. Chromatographic Methods for the Determination of Emerging Contaminants in Natural Water and Wastewater Samples: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2018**, *0* (0), 1–27. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1496010>.
 - (20) Richardson, S. D.; Ternes, T. A. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (1), 398–428. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04577>.
 - (21) Santana-Viera, S.; Guedes-Alonso, R.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J. J.; Kabir, A.; Furton, K. G. Optimization and Application of Fabric Phase Sorptive Extraction Coupled to Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Cytostatic Drug Residues in Environmental Waters. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1529*, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.070>.
 - (22) Huntscha, S.; Singer, H. P.; McArdell, C. S.; Frank, C. E.; Hollender, J. Multiresidue Analysis of 88 Polar Organic Micropollutants in Ground, Surface and Wastewater Using Online Mixed-Bed Multilayer Solid-Phase Extraction Coupled to High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1268*, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.032>.
 - (23) Togunde, O. P.; Cudjoe, E.; Oakes, K. D.; Mirnaghi, F. S.; Servos, M. R.; Pawliszyn, J. Determination of Selected Pharmaceutical Residues in Wastewater Using an Automated Open Bed Solid Phase Microextraction System. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1262*, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.011>.
 - (24) Gómez-Ramírez, P.; Jiménez-Montalbán, P. J.; Delgado, D.; Martínez-López, E.; María-Mojica, P.; Godino, A.; García-Fernández, A. J. Development of a QuEChERS Method for Simultaneous Analysis of Antibiotics in Carcasses for Supplementary Feeding of Endangered Vultures. *Sci. Total Environ.* **2018**, *626*, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.060>.
 - (25) Campos-Mañas, M. C.; Plaza-Bolaños, P.; Sánchez-Pérez, J. A.; Malato, S.; Agüera, A. Fast Determination of Pesticides and Other Contaminants of Emerging Concern in Treated Wastewater Using Direct Injection Coupled to Highly Sensitive Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1507*, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.053>.
 - (26) Mirasole, C.; Di Carro, M.; Tanwar, S.; Magi, E. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Passive Sampling: Powerful Tools for the Determination of Emerging Pollutants in Water for Human Consumption. *J. Mass Spectrom.* **2016**, No. June, 814–820. <https://doi.org/10.1002/jms.3813>.
 - (27) Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Schenck, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86* (2), 412–431.
 - (28) Łozowicka, B.; Kaczyński, P.; Szabuńko, J.; Ignatowicz, K.; Warentowicz, D.; Łozowicki, J. New Rapid Analysis of Two Classes of Pesticides in Food Wastewater by QuEChERS-Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Ecol. Eng.* **2016**, *17* (3), 97–105. <https://doi.org/10.12911/22998993/63478>.
 - (29) Kachhawaha, A. S.; Nagarnaik, P. M.; Jadhav, M.; Pudale, A.; Labhasetwar, P. K.; Banerjee, K. Optimization of a Modified QuEChERS Method for Multiresidue Analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Surface Water by LC-MS/MS. *J. AOAC Int.* **2017**, *100* (3), 592–597. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0060>.
 - (30) Liška, I. Fifty Years of Solid-Phase Extraction in Water Analysis - Historical Development and Overview. *J. Chromatogr. A* **2000**, *885* (1–2), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01144-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01144-9).
 - (31) Sabik, H.; Jeannot, R.; Rondeau, B. Multiresidue Methods Using Solid-Phase Extraction Techniques for Monitoring Priority Pesticides, Including Triazines and Degradation Products, in Ground and Surface Waters. *J. Chromatogr. A* **2000**, *885*, 217–236.
 - (32) Rivera-Jaimes, J. A.; Postigo, C.; Melgoza-Alemán, R. M.; Aceña, J.; Barceló, D.; López de Alda, M. Study of Pharmaceuticals in Surface and Wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and Environmental Risk Assessment. *Sci. Total Environ.* **2018**, *613–614*, 1263–1274. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.134>.
 - (33) Lindholm-Lehto, P. C.; Ahkola, H. S. J.; Knuutinen, J. S.; Herve, S. H. Occurrence of

- Pharmaceuticals in Municipal Wastewater, in the Recipient Water, and Sedimented Particles of Northern Lake Päijänne. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22* (21), 17209–17223. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4908-6>.
- (34) Anumol, T.; Wu, S.; Marques Dos Santos, M.; Daniels, K. D.; Snyder, S. A. Rapid Direct Injection LC-MS/MS Method for Analysis of Prioritized Indicator Compounds in Wastewater Effluent. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **2015**, *1* (5), 632–643. <https://doi.org/10.1039/c5ew00080g>.
- (35) Aminot, Y.; Litrico, X.; Chambolle, M.; Arnaud, C.; Pardon, P.; Budzindki, H. Development and Application of a Multi-Residue Method for the Determination of 53 Pharmaceuticals in Water, Sediment, and Suspended Solids Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (28), 8585–8604. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9017-3>.
- (36) Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. Rapid Analysis of Multiclass Antibiotic Residues and Some of Their Metabolites in Hospital, Urban Wastewater and River Water by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1292*, 173–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>.
- (37) Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. Fast and Comprehensive Multi-Residue Analysis of a Broad Range of Human and Veterinary Pharmaceuticals and Some of Their Metabolites in Surface and Treated Waters by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1248*, 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.084>.
- (38) Cahill, M. G.; Caprioli, G.; Stack, M.; Vittori, S.; James, K. J. Semi-Automated Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method for Basic Pesticides in Wastewater Effluents. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400* (2), 587–594. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4781-1>.
- (39) Romero-gonzález, R.; Barco-bonilla, N.; Martínez-vidal, J. L. Simultaneous Analysis of Chlorophenols, Alkylphenols, Nitrophenols and Cresols in Wastewater Effluents, Using Solid Phase Extraction and Further Determination by Gas Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2011**, *85*, 2397–2404. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.081>.
- (40) Fernández-moreno, J. L.; Frenich, A. G.; Luis, J.; Vidal, M. Comprehensive Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Wastewater Using Stir Bar Sorptive Extraction and Gas Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *693*, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.010>.
- (41) Barco-Bonilla, N.; Romero-González, R.; Plaza-Bolaños, P.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L. Analysis and Study of the Distribution of Polar and Non-Polar Pesticides in Wastewater Effluents from Modern and Conventional Treatments. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (50). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.011>.
- (42) Gros, M.; Petrovi, M.; Barceló, D.; Petrovic, M.; Barcelo, D.; Petrović, M.; Barceló, D. Tracing Pharmaceutical Residues of Different Therapeutic Classes in Environmental Waters by Using Liquid Chromatography / Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Automated Library Searching Tracing Pharmaceutical Residues of Different Therapeuti. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (3), 898–912. <https://doi.org/10.1021/ac801358e>.
- (43) Gilart, N.; Borrull, F.; Fontanals, N.; Marcé, R. M. Selective Materials for Solid-Phase Extraction in Environmental Analysis. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2014**, *1*. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2013.11.002>.
- (44) SPE automático <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/071385> (acceso 18 de abril de 2019).
- (45) Ponce-Robles, L.; Rivas, G.; Esteban, B.; Oller, I.; Malato, S.; Agüera, A. Determination of Pesticides in Sewage Sludge from an Agro-Food Industry Using QuEChERS Extraction Followed by Analysis with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (26), 6181–6193. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0558-5>.
- (46) Padilla-Sánchez, J. A.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido-Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L. Application of a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe-Based Method for the Simultaneous Extraction of Chlorophenols, Alkylphenols, Nitrophenols and Cresols in Agricultural Soils, Analyzed by Using Gas Chromatography-Triple Quadrupole-Mass Spectr. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (36), 5724–5731. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.004>.
- (47) Larivière, A.; Lissalde, S.; Soubrand, M.; Casellas-Français, M. Overview of Multiresidues

- Analytical Methods for the Quantitation of Pharmaceuticals in Environmental Solid Matrixes: Comparison of Analytical Development Strategy for Sewage Sludge, Manure, Soil, and Sediment Samples. *Anal. Chem.* **2017**, 89 (1), 453–465. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04382>.
- (48) Lehotay, S. AOAC Official Method 2007 . 01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate [Applicable for the Following Pesticides in Grapes , Lettuces , and Oranges : Atrazine , Azoxystrobin , Bifenthrin , Carbaryl ,. *J. AOAC Int.* **2007**.
- (49) Desmarchelier, A.; Fan, K.; Minh Tien, M.; Savoy, M. C.; Tarres, A.; Fuger, D.; Goyon, A.; Bessaire, T.; Mottier, P. Determination of 105 Antibiotic, Anti-Inflammatory, Antiparasitic Agents and Tranquilizers by LC-MS/MS Based on an Acidic QuEChERS-like Extraction. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2018**, 35 (4), 646–660. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1429677>.
- (50) He, Z.; Wang, Y.; Xu, Y.; Liu, X. Determination of Antibiotics in Vegetables Using QuEChERS-Based Method and Liquid Chromatography-Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods* **2018**, 11 (10), 2857–2864. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1252-8>.
- (51) Wang, Y.; Liu, Z.; Ren, J.; Guo, B. Development of a Method for the Analysis of Multiclass Antibiotic Residues in Milk Using QuEChERS and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Foodborne Pathog. Dis.* **2015**, 12 (8), 693–703. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1916>.
- (52) Lozano, A.; Rajska, Ł.; Uclés, S.; Belmonte-Valles, N.; Mezcuca, M.; Fernández-Alba, A. R. Evaluation of Zirconium Dioxide-Based Sorbents to Decrease the Matrix Effect in Avocado and Almond Multiresidue Pesticide Analysis Followed by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2014**, 118, 68–83. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.053>.
- (53) Kim, L.; Lee, D.; Cho, H.-K.; Choi, S.-D. Review of the QuEChERS Method for the Analysis of Organic Pollutants: Persistent Organic Pollutants, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Pharmaceuticals. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2019**, e00063. <https://doi.org/10.1016/J.TEAC.2019.E00063>.
- (54) Pérez-Fernández, V.; Mainero Rocca, L.; Tomai, P.; Fanali, S.; Gentili, A. Recent Advancements and Future Trends in Environmental Analysis: Sample Preparation, Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2017**, 983, 9–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.029>.
- (55) Niessen, W. M. A. Liquid Chromatography and Sample Pretreatment. In *Liquid chromatography-Mass Spectrometry*; Taylor & Francis Group: Boca Ratón, 2006; pp 3–22.
- (56) Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. **1985**, No. Figure 3, 675–679. <https://doi.org/10.1021/ac00280a023>.
- (57) Niessen, W. M. A. Interfaces for Atmospheric-Pressure Ionization. In *Liquid chromatography-Mass Spectrometry*; Taylor & Francis Group: Boca Ratón, 2006; pp 105–133.
- (58) Guide, S. 5500 Series of Instruments. **2017**, No. April, 1–195.
- (59) Hoffmann, E.; Stroobant, V. Tandem Mass Spectrometry. In *Mass Spectrometry - Principles and Applications.*; Chichester, England, 2007; pp 189–216. <https://doi.org/10.1002/mas.20296>.
- (60) Hoffmann, E.; Stroobant, V. Mass Analyser. In *Mass Spectrometry - Principles and Applications.*; Chichester, England, 2007; pp 85–174. <https://doi.org/10.1002/mas.20296>.
- (61) Guide, S. 5500 Series of Instruments. **2017**, No. December, 1–195.
- (62) Aguilera-Luiz, M. M.; Vidal, J. L. M.; Romero-González, R.; Frenich, A. G. Multi-Residue Determination of Veterinary Drugs in Milk by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1205 (1–2), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.066>.
- (63) Hu, F.; Bian, K.; Liu, Y.; Su, Y.; Zhou, T.; Song, X.; He, L. Development of a Modified QUICK, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Method for the Determination of Multi-Class Antimicrobials in Vegetables by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1368, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.074>.
- (64) Morrillas, P.; Barwick, V.; Ellison Stephen; Engman, J.; Magnusson, B. *Guía Eurachem: La Adecuación Al Uso de Los Métodos Analíticos – Una Guía de Laboratorio Para La Validación de Métodos y Temas Relacionados*; 2016. <https://doi.org/ST/NAR/41>.
- (65) Web oficial de EURL, disponible en: <https://www.eurl-pesticides-datapool.eu/>.

- (66) Base de datos Chemspider, disponible en: <http://www.chemspider.com/> (acceso 15 de mayo de 2019).
- (67) Base de datos pubchem, disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (acceso 15 de mayo de 2019).
- (68) Base de datos scopus, disponible en: <https://www.scopus.com/> (acceso de mayo de 2019).

9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- Estaciones depuradoras de agua residual (EDAR)
- Microcontaminantes orgánicos (MCO)
- Disruptores endocrinos (*endocrine disrupting chemicals*, EDC)
- Organización mundial de la salud (OMS)
- Agencia de protección del medio ambiente (*environmental protection agency*, EPA)
- Directiva marco del agua (*water framework directive*, WFD)
- Sustancias prioritarias (*priority substances*, PS)
- Sustancias peligrosas (*priority hazardous substances*, PHS)
- Contaminantes de preocupación emergente (*contaminants of emerging concern*, CEC)
- Ley de agua limpia (*clean water act*, CWA)
- Extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE)
- Extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE)
- *Fabric pase sorptive extraction* (FPSE)
- Microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction*, SPME)
- SPE secuencial (*sequential solid phase extraction*, SSPE)
- Cromatografía de líquidos (*liquid chromatography*, LC)
- Cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC)
- Espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS)
- Tiempo de vuelo (*time of flight*, TOF)
- Cromatografía líquida de interacción hidrofílica (*hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC)
- Detector de captura electrónica (*electron capture detector*, ECD)
- Monitorización de reacciones seleccionadas (*selected reaction monitoring*, SRM)
- Espectrometría de masas de alta resolución (*high resolution mass spectrometry*, HRMS)
- Politetrafluoroetileno (PTFE)
- POCIS (*polar organic chemical integrative sampler*)
- QuEChERS (acrónimo en inglés de *Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*)

- Desviación estándar relativa (*relative standard deviation*, RSD)
- Calibración adición de estándar (*standard addition calibration*, SAC)
- Calibración en matriz (*matrix-matched calibration*, MMC)
- Extracción por adsorción sobre barra agitadora (*stir bar sorptive extraction*, SBSE)
- Extracción líquida presurizada (*pressurized liquid extraction*, PLE)
- Oasis *hydrophilic lipophilic balance* (Oasis HLB)
- Extracción en fase sólida dispersa (*dispersive SPE*, *d-SPE*)
- Carbón negro grafitizado (*graphitize carbon black*, GCB)
- Detector de nitrógeno-fósforo (*nitrogen phosphorus detector*, NPD)
- Detector de ionización de llama (*flame ionization detector*, FID)
- Analizador híbrido de triple cuadrupolo (QqQ)
- Analizador híbrido triple cuadrupolo-trampa lineal de iones (QqLIT)
- Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)
- Cromatografía de líquidos acoplada a un analizador híbrido triple cuadrupolo-trampa lineal de iones (LC-QqLIT)
- Cromatografía de líquidos de alta resolución (*high performance liquid chromatography*, HPLC)
- Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (*ultrahigh-performance liquid chromatography*, UHPLC)
- Ionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure ionization*, API)
- Ionización por electronebulización o electrospray (*electrospray ionization*, ESI)
- Ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI)
- Ionización por electrospray/desorción (*desorption electrospray ionization*, DESI)
- Análisis directo en tiempo real (*direct analysis in real time*, DART)
- Ionización electrónica (*electron ionization*, EI)
- Gas cortina (*curtain gas*, CUR)
- Monitorización de múltiples reacciones (*multiple reaction monitoring*, MRM)
- *Enhanced product ion* (EPI)
- *Enhanced multiply charged* (EMC)
- *Collisionally activated dissociation* (CAD)
- *Declustering potential* (DP)
- Potencial de enfoque (*focusing potential*, FP)
- Potencial de entrada (*entrance potential*, EP)
- Potencial de entrada de la celda de colisión (*cell entrance potential*, CEP)

- Potencial de salida de la celda de colisión (*cell exit potential*, CXP)
- Energía de colisión (*collision energy*, CE)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenil-1-pirrolidina (EDDP)
- Efecto matriz (EM)
- Límites de cuantificación (*limits of quantification*, LOQ)

ANEXOS

ANEXO 1: Parámetros de operación del LC-QqLIT-MS/MS

Tabla A.1.1. Parámetros de operación del LC-QqLIT-MS/MS para la determinación de MCO en agua residual

Compuesto	Tr (min)	Ion precursor (Da)	DP (V)	SRM1 (Da)	EP ₁ (V)	CE ₁ (V)	CXP ₁ (V)	SRM2 (Da)	EP ₂ (V)	CE ₂ (V)	CXP ₂ (V)
<i>Fármacos</i>											
4-AA	6.20	204.2	45	56.2	5	30	2	159.2	5	16	2
4-FAA	6.98	232.2	60	77	5	50	2	214.2	5	18	2
Acetanilida	8.18	136	70	94	10	24	15	77	11	40	10
Ácido fenofíbrico	11.00	319.1	65	233.1	5	22	2	139.1	5	42	2
Ácido mefenámico	11.75	242.2	36	224.2	5	34	2	180.2	5	53	2
Ácido niflúmico	11.41	282.9	70	265.2	13	30	14	145.1	8	58	7
Acridona	9.50	196.1	125	167	10	48	11	166	10	61	15
Alfuzosina	7.38	390.3	50	235.1	12	40	12	156.1	12	37	10
Amisulprida	6.43	370.3	80	242.1	12	39	14	196	12	55	10
Amitriptilina	9.05	278.4	30	233.1	5	22	2	91.2	5	35	2
Antipirina	7.65	189.2	48	77.1	5	51	2	104.1	5	32	2
Atenolol	5.67	267.3	70	145.2	5	35	2	190.2	5	27	2
Betametasona	9.83	393.3	70	373.1	10	13	20	355	11	18	20
Carbamazepina	9.45	237.2	80	194.3	5	25	2	192.1	5	35	2
Cetirizina	9.43	389.4	48	201	12	30	12	166.2	12	55	8
Ciclofosfamida	8.85	261.2	40	140	12	23	12	233.2	8	30	8
Citalopram	8.04	325.3	100	109.1	5	30	2	232.1	5	25	2
Clomipramina	9.30	315.2	40	86.1	5	27	2	58.1	5	60	2
Clotrimazol	9.24	344.9	30	165	5	43	2	277.3	5	15	2
Cotinina	3.64	177	45	80	5	36	2	98	5	26	2
Diazepam	10.43	285.2	100	154.2	12	36	10	193.2	12	42	10
Difenhidramina	8.35	256.4	40	167.2	12	21	9	152	12	50	7
Domperidone	7.72	426.2	37	147.1	11	55	7	175	12	35	10
Donepezilo	7.68	380.4	65	91	12	63	9	151.1	14	40	8

EDDP	8.31	278.6	30	234	11	42	14	249.2	12	31	12
Famotidina	5.77	338	25	189.3	5	24	2	259.4	5	15	2
Fenofibrato	11.90	361.2	60	233.1	5	25	2	139.1	5	42	2
Flecainida	8.01	415.2	48	398.1	12	35	9	301	12	49	7
Fluoxetina	8.86	310.3	30	44.2	5	25	2	148.2	5	10	2
Ifosfamida	8.62	261.1	60	91.9	5	33	2	154.3	5	29	2
Iminoestilbeno	9.46	194	38	179	8	41	12	152	12	54	8
Indometacina	10.96	358.2	50	139.1	5	25	2	174.3	5	15	2
Ketorolaco	9.83	256.2	70	105.1	5	25	2	178.1	5	34	2
Labetalol	7.66	329.1	32	311.2	12	21	7	162.1	12	33	9
Lidocaína	6.97	235	70	86	7	20	5	58	8	50	4
Loratadina	10.73	383.1	50	337.3	5	29	2	267.2	5	40	2
Memantina	8.32	180.3	28	163.1	12	22	10	107.1	12	36	9
Mepivacaína	7.06	247.4	28	98.1	5	23	2	70.1	5	53	2
Metadona	8.75	310.2	70	265.1	13	22	7	105	11	40	20
Metoclopramida	7.06	300	80	184	6	42	11	141	11	66	10
Metoprolol	7.15	268.2	30	116.2	5	25	2	159.2	5	28	2
Mevastatina	11.39	391.3	55	185.2	5	25	2	159.3	5	30	2
Nadolol	6.59	310.2	45	201.2	5	30	2	254.4	5	30	2
N-desmetilcitalopram	8.06	311.3	66	109.1	12	31	7	262.1	11	23	13
Nitrendipina	10.57	361	80	315	10	18	17	329.1	10	15	15
N-óxido tramadol	7.28	280.4	70	135.1	13	32	11	58	14	47	15
O-Desmetiltramadol	6.47	250.3	70	58.1	12	45	7	232.2	13	17	11
Paroxetina	8.60	330.3	70	192.2	5	25	2	151.2	5	30	2
Pentoxifilina	8.12	279	60	181	10	23	10	138	10	35	10
Primidona	8.18	219.2	35	91.1	5	35	2	162.3	5	16	2
Propafenona	8.64	342.4	69	116	8	32	7	98.1	12	29	6
Propanolol	8.04	260	35	116.2	5	23	2	183.2	5	23	2
Propifenazona	9.48	231.3	55	189.2	5	22	2	201.2	5	30	2
Ranitidina	5.68	315.3	38	176.2	5	21	2	130.1	5	30	2

Salbutamol	5.62	240.3	44	148.2	5	26	2	222.2	5	14	2
Simvastatina	11.98	419.1	45	285.3	5	15	2	199.1	5	15	2
Sotalol	5.56	273.3	45	255.2	6	14	2	133.2	6	37	2
Sulpirida	5.59	342.3	47	112	11	34	15	214.1	12	48	11
Tamoxifeno	9.93	372	50	72	10	32	8	70	8	75	10
Telmisartán	9.26	515.5	40	276.2	12	60	7	497.3	12	47	11
Terbutalina	5.61	226.3	47	152.2	5	20	2	107.1	5	40	2
Trazodona	7.63	372.4	73	148.1	12	48	8	176	12	35	10
Triamtereno	7.00	254.6	29	238.1	12	39	12	168.1	12	47	10
Valsartán	10.28	436	100	207	7	37	11	291.2	7	23	6
Velaflaxina	7.88	278.4	50	58.1	5	45	2	260.4	5	15	2
Verapamil	8.22	455.5	52	303.3	10	36	8	260	12	41	14

Plaguicidas

Acetamiprid	8.01	223	100	126	10	30	4				
	8.01	225.3	50	128	13	25	7				
Aclonifen	11.19	265	182	248	11	28	14	182	8	38	9
Atrazina	10.00	216	100	174	13	25	10				
	10.00	218	40	176	8	25	10				
Azoxystrobina	9.99	404.1	100	372.2	10	20	10	329	10	42	6
Boscalida	10.28	343.1	100	307	12	31	12	140	11	30	10
Buprofezin	11.75	306	20	201	11	17	5	116	13	22	6
Carbendazima	6.72	192.3	100	160.1	10	27	4	132.2	10	41	4
Clotianidina	7.84	250.1	75	132	8	23	7	169.2	11	17	9
Clorantraniliprol	9.94	484	65	453	12	30	10	286	12	30	11
Clorfenvinfos	11.02	359.1	60	99	10	50	6	155	8	18	10
Clorpirifós	12.23	352	55	97	10	55	7				
	12.23	350	96	197.9	10	26	6				
Ciantraniliprol	9.37	475	50	286	12	20	7	444	12	25	12
Ciprodinil	10.88	226	120	77	12	63	9	93	12	80	9
Dimetoato	8.17	230	100	199.1	10	13	4	125.1	10	28	4

Dimetomorf	10.30	388	100	301	10	30	8	165	10	45	8
Diurón	10.11	233	60	72	7	50	12				
	10.11	235	110	72	6	36	10				
Espiroetramato	10.50	374.2	85	216.1	12	48	11	302.2	10	25	7
Fenhexamida	10.55	302	80	97	14	30	12	55	8	60	7
Imazalil	8.75	297	80	159	12	31	8	255	12	25	7
Imidacloprid	7.66	256.1	100	175.1	10	27	4	209.2	10	25	4
Isoproturón	9.95	207	60	72	8	25	12	165	8	20	10
Metalaxil	9.83	280	85	220	12	20	12				
	9.83	280.1	100	220	12	19	9				
Methiocarb	10.39	226	44	169	14	13	9	121	9	25	6
Miclobutanil	10.44	289.2	100	70.2	10	36	4	125.1	10	44	4
Oxadiazón	11.92	345	150	303	9	20	8	220	9	29	12
Pirimicarb	8.35	239	100	72.1	10	38	4	182.1	10	23	4
Procloraz	10.97	376.1	80	308	10	18	4	266	10	23	4
Propamocarb	6.19	189.1	29	101.9	10	25	4	144.1	10	16	4
Propiconazol	11.10	342.1	100	159	10	45	12	69	13	25	10
Pirimetanil	10.22	200.1	246	107	12	33	6	82.1	8	35	7
Quinmerac	8.61	222	47	204	10	25	12	141	13	45	10
Quinoxifen	12.31	308	300	197	12	49	5	162	12	61	8
Simazina	9.44	202.1	45	132	5	26	2	124.2	5	23	2
Tebuconazol	11.01	308	80	70	7	50	11				
	11.01	310	80	70	10	63	10				
Terbutrin	10.11	242	100	186	13	27	10	68	12	60	4
Tiacloprid	8.34	253	80	126	11	28	7	89.9	5	53	10
Tiabendazol	7.26	202	150	131.1	10	47	11	175.1	10	47	11
<i>Antibióticos</i>											
Ácido nalidíxico	9.33	233.2	45	187	10	35	12	104	10	55	11
Cefalexina	6.81	348	60	158.1	12	13	8	106.1	12	51	14
Cefotaxima	7.08	456.1	40	324.1	5	15	3	396.1	5	10	2

Claritromicina	8.97	748.4	45	158.4	5	35	2	590.4	5	26	2
Clindamicina	8.01	425.2	80	126.1	11	35	7	377.1	12	28	9
Doxiciclina	8.10	445.3	90	428.2	10	28	9	410.2	10	34	10
Eritromicina	8.57	734.6	58	158.3	5	40	2	576.5	5	28	2
Flumequina	9.46	262.3	50	244.1	5	21	14	202.3	5	41	12
Josamicina	8.89	828.6	54	174.2	12	46	13	229.1	11	43	11
Levofloxacino	6.67	362.1	80	261.2	8	40	10	318.2	8	26	15
Lincomicina	6.41	407.1	50	126.3	5	45	2	359.3	5	23	2
Metronidazol	6.41	1721	35	128.1	5	20	2	82.1	5	30	2
Oxitetraciclina	6.93	461.3	90	426.1	10	27	11	443.1	10	19	11
Roxitromicina	9.04	837.5	150	158	10	47	11	679.4	10	47	11
Sulfadiazina	6.44	251.2	40	92.1	5	35	2	108.1	5	30	2
Sulfametazina	7.16	279	42	186.2	5	20	2	156.1	5	26	2
Sulfametizol	7.10	271.1	80	156.1	6	20	8	92	6	37	10
Sulfametoxazol	7.46	254.2	47	156.1	5	21	2	108.1	5	30	2
Sulfapiridina	6.56	250.1	47	156.1	5	21	2	108.3	5	34	2
Sulfatiazol	6.48	256.2	45	156	5	18	2	92.2	5	34	2
Trimetoprim	6.46	291.3	45	230.2	5	28	2	123.2	5	30	2