



Fármacos como contaminantes emergentes: procedimiento para su cuantificación en aguas residuales

El desarrollo y los hábitos de consumo actuales han dado lugar a la generación de una serie de contaminantes que hasta hace unos años pasaban desapercibidos y para los cuales no se disponía de datos sobre su presencia y sus efectos en el medio ambiente: los contaminantes emergentes. Su principal vía de entrada en el ciclo del agua es a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Una de las familias más importantes de contaminantes emergentes son los fármacos. Llegan al medio ambiente como consecuencia de su fabricación, distribución, consumo y vertidos incontrolados de medicamentos caducados. Su análisis es un proceso complejo debido a la matriz en la que se encuentran, que están en concentraciones muy bajas y debido a sus variadas características fisicoquímicas. Todo esto hace que la identificación y cuantificación de los mismos requiera de técnicas analíticas muy específicas con una instrumentación muy especializada. En este trabajo se describe el procedimiento analítico seguido para la cuantificación de los fármacos en aguas residuales (influyente y efluente) de una planta de tratamiento de aguas residuales que recibe tanto aguas residuales industriales como urbanas, incluyendo aguas hospitalarias.

Palabras clave

Contaminantes emergentes, fármacos, procedimiento analítico, EDAR, cromatografía.

DRUGS AS EMERGING POLLUTANTS: PROCEDURE FOR THEIR QUANTIFICATION IN WASTEWATER

The development and current consumption habits have led to the generation of a number of pollutants that until a few years ago went unnoticed and for which no data on their presence and their effects on the environment were not available: emerging pollutants. The main route of entry of emerging pollutants into the water cycle is through wastewater treatment plants. One of the most important families of emerging pollutants are drugs. Their analysis is a complex process due to the matrix in which they are, which are in very low concentrations and due to their varied physical-chemical characteristics. All this makes their identification and quantification requires very specific analytical techniques with a very specialized instrumentation. This paper describes the analytical procedure followed for the quantification of drugs in wastewater (influent and effluent) of a wastewater treatment plant that receives both industrial and urban wastewater, including hospital waters.

Keywords

Emerging pollutants, drugs, analytical procedure, WWTP, chromatography.

Julio Antonio Pérez Álvarez

director general de Operación en Aguas Tratadas del Valle de México (ATVM-PTAR Atotonilco), Acciona Agua

Susana Fernández

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, e Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo

Miguel Ferrero

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, e Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo

Jesús Sánchez Jimenez

gerente del Departamento de O&M Zona Norte II, Accion Agua

Pilar Suárez Corteguera

jefa de Planta en EDAR Baiña, Acciona Agua

Clara Huerta Rodríguez

técnica del Departamento de Depuración en EDAR Baiña, Acciona Agua

Jesús Fajardo Ibañez

técnico de Automatización y Control O&M Zona Norte II, Acciona Agua

María Remedios López Pacetti

técnica del Departamento de Depuración de Acciona Agua

María Eugenia Hernández

jefa de Servicio Depurar 7B, Acciona Agua

Angelina García Álvarez

jefa de Laboratorio en EDAR Baiña, Acciona Agua



1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo y los hábitos de consumo actuales han dado lugar a la generación de una serie de contaminantes que hasta hace unos años pasaban desapercibidos y para los cuales no se disponía de datos sobre su presencia y los efectos de los mismos sobre el medio ambiente.

Los contaminantes emergentes son contaminantes previamente desconocidos, o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero si la preocupación por las posibles consecuencias de los mismos. Los contaminantes emergentes son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales, razón por la cual y a su vez consecuencia de que no hayan sido regulados. Además, la disponibilidad de métodos para su análisis es limitada y cara.

La Directiva 2013/39/UE establece disposiciones específicas para sustancias farmacéuticas. La Comisión ha desarrollado un enfoque estratégico para la contaminación del agua por dichas sustancias, proponiendo medidas a escala de la Unión y de los Estados miembros, según corresponda, para tratar las posibles consecuencias medioambientales de sustancias farmacéuticas.

2. ANÁLISIS DE FÁRMACOS

2.1. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el análisis de los fármacos se situaron dos tomamuestras en automático a la entrada y a la salida de la planta para poder determinar la eficiencia de la planta en la eliminación de los fármacos objeto del estudio.

TABLA 1	
FÁRMACOS ANALIZADOS.	
Omeprazol	
Ácido salicílico	
Lorazepam	
Acetaminofén	
Atorvastatina	
Alprazolam	
Tramadol en asociación	
Ibuprofeno	
Bromazepam	

Los tomamuestras se programaron para tomar muestras en continuo, de 100 mL cada media hora, lo que suponía disponer de 48 muestras al día. Se trabajó con tomamuestras refrigerados a una temperatura de 4 °C.

Como paso previo al proceso de análisis, las muestras se filtraron con filtros estándar de fibra de vidrio, tipo Millipore AP40, con un tamaño de poro de 0,7 µm.

De las muestras filtradas del influente y efluente se tomaban 4 alicuotas de 125 mL respectivamente. Estas cuatro alicuotas se correspondían:

- Alicuota A. Estudio de contaminantes emergentes.
- Alicuota B. Estudio de contaminantes emergentes.
- Alicuota C. Estudio de parámetros fisicoquímicos.
- Alicuota D. Conservación en laboratorio de la planta.

Los análisis de los fármacos se realizan en el Hospital Militar Gómez Ulla, en Madrid, donde se disponía de la instrumentación necesaria para llevar a cabo los mismos.

TABLA 2		
PATRONES UTILIZADOS.		
Compuesto	Referencia	Estado
Omeprazol	O-021-1ML	Disolución
Ácido acetilsalicílico	PHR1003-1G	Sólido
Lorazepam	L-901-1ML	Disolución
Lorazepam-d ₄	L-902-1ML	Disolución
Acetaminofén	A-064-1ML	Disolución
Acetaminofén-d ₄	P-909-1ML	Disolución
Atorvastatina	A-078-1ML	Disolución
Alprazolam	A-903-1ML	Disolución
Tramadol	T-027-1ML	Disolución
Ibuprofeno	I-009-1ML	Disolución
Bromazepam	B-903-1ML VIS	Disolución

2.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se evaluó la exactitud y la precisión empleando un material de referencia certificado alternando concentraciones en el rango de trabajo. El criterio de aceptación/rechazo fue:

- Exactitud entre el 80 y el 120%.
- Precisión en condiciones de reproducibilidad $\leq 20\%$, expresada en términos de coeficiente de variación (CV).

Los fármacos analizados se recogen en la **Tabla 1**. Se comprobó que para cada uno de los patrones de los fármacos objeto de análisis, en los rangos seleccionados, la exactitud estaba entre el 80 y el 120%, y la precisión en condiciones de reproducibilidad era $\leq 20\%$. Es decir, tanto la precisión como la exactitud estaban dentro de los límites marcados. Por tanto, el ensayo fue apto para su uso previsto.

2.3. RECTAS DE CALIBRADO

Para cada uno de los compuestos descritos se consideraron los patrones comerciales de la **Tabla 2**.

TABLA 3

RANGO DE CALIBRACIÓN DE LOS FÁRMACOS.

Compuesto	Rango de calibración (µg/L)
Ácido salicílico	0,04 - 10
Ibuprofeno	0,04 - 10
Acetaminofén	0,005 - 10
Alprazolam	0,005 - 10
Atorvastatina	0,005 - 10
Bromazepam	0,005 - 10
Lorazepam	0,005 - 10
Omeprazol	0,01 - 10
Tramadol	0,005 - 10

Con los patrones de referencia se hizo una muestra global de patrones, a partir de la cual se prepararon las distintas concentraciones para hacer las correspondientes rectas de calibrado. El rango de calibración para cada fármaco analizado se recoge en la **Tabla 3**.

Como patrones internos se utilizan el lorazepam deuterado (lorazepam-d₄) y el acetaminofén deuterado (acetaminofén-d₄).

Se aceptó que la recuperación del patrón interno en cada lote de trabajo no debía de tener una desviación superior al 30%.

El ajuste de la función de calibrado

fue lineal, aunque con la cantidad de niveles utilizados, se podía haber realizado un ajuste cuadrático. Los criterios de aceptación/rechazo que se utilizaron para evaluar la función de calibrado fueron:

- Coeficiente de regresión: $r^2 \geq 0,99$.
- % Bias (exactitud) $\leq 20\%$.

En cada tanda de trabajo se verificó la función de calibrado.

Con respecto a los ensayos en blanco utilizados, como criterio se consideró que tenían que ser inferiores al límite de cuantificación e

idealmente del orden del límite de detección. El blanco se inyectó en cada tanda de trabajo.

2.4. CRITERIOS CROMATOGRÁFICOS Y ESPECTRALES

Los criterios cromatográficos que se consideraron fueron los siguientes:

- Tolerancia del tiempo de retención para los compuestos por tanda de trabajo: 0,3 por minuto.
- La relación S/N (señal/ruido) ≥ 10 (límite de cuantificación ≥ 10).

Los criterios espectrales considerados fueron:

- Umbral de intensidad mínima (*Intensity Threshold*) y tolerancia de masa < 5 mg/L.
- En el caso de los fragmentos se comparó con la biblioteca de espectros (generada por los autores) y se utilizó como algoritmo de comparación la variable *Score Threshold* ($> 70\%$).

Para el ácido salicílico e ibuprofeno se trabajó en negativo y para el resto de compuestos, en positivo. En la **Tabla 4** y en la **Tabla 5** se re-

TABLA 4

MASAS DEL ADUCTO Y TIEMPO DE RETENCIÓN

Compuesto	Fórmula	Masa	TR (min)
Ácido salicílico	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244	4,08
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	205,1234	6,70
Acetaminofén	C ₈ H ₉ NO ₂	152,0706	2,00
Alprazolam	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	309,0902	5,43
Atorvastatina	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	559,2603	6,57
Bromazepam	C ₁₄ H ₁₀ Br ₃ O	316,0080	4,68
Lorazepam	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	321,0192	5,32
Omeprazol	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	346,1220	4,49
Tramadol	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	264,1958	4,03



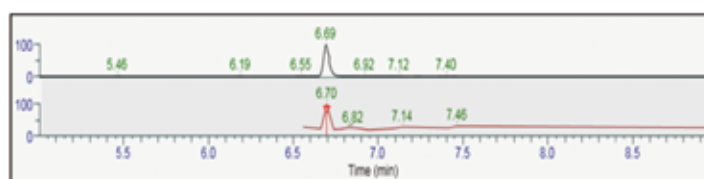
TABLA 5

IONES DE FRAGMENTACIÓN

Compuesto	Aducto	Polaridad	Fragmento	Fragmento	Fragmento	Fragmento
Ácido salicílico	M - H	-	93,0332	65,0382		
Ibuprofeno	M - H	-	159,1170	101,9912	160,1208	
Acetaminofén	M + H	+	110,0602	111,0442	134,0599	92,0499
Alprazolam	M + H	+	281,0709	274,1208	241,0523	165,0212
Atorvastatina	M + H	+	440,2230	441,2266	292,1494	
Bromazepam	M + H	+	182,0836	209,0944	288,0125	261,0016
Lorazepam	M + H	+	275,0132	303,0081	229,0523	163,0055
Omeprazol	M + H	+	198,0583	180,0477	151,0992	137,0758
Tramadol	M + H	+	58,0658			

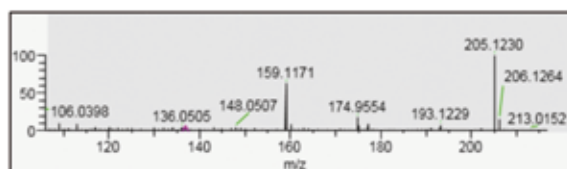
FIGURA 1. Cromatogramas y espectros de referencia para el ibuprofeno a una concentración de 0,1 µg/L.

Cromatogramas HPLC

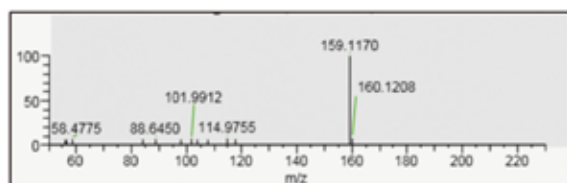


Espectros de masas

Modo FS



Modo MS/MS



Ibuprofeno	Fórmula	Extracto Masa	Aducto	Polaridad	TR
	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	205,1230	M-H	-	6,70
	Fragmento	Fragmento	Fragmento		
	159,1170	101,9912	160,1208		

cogen las masas, los tiempos de retención y los iones de fragmentación teóricos para cada uno de los compuestos analizados.

2.4.1. Cromatogramas y espectros

Los modos típicos de trabajo con un analizador cuadrupolar son:

- Barrido completo o *Full Scan* (FS), en el que se realiza un espectro de masas continuo en un rango definido; se suele usar para detecciones cualitativas.

- Monitorización selectiva de iones o *Selected Ion Monitoring* (SIM), en donde se selecciona uno o más iones específicos y solo se miden éstos, habitualmente con fines cuantitativos.

- Monitorización de reacción múltiple o *Parallel Reaction Monitoring* (PRM), en el que se realizan espectros masas/masas (MS/MS) en cada punto; se utilizan con fines cuantitativos.

Se pueden utilizar uno o más modos de trabajo simultáneamente, la limitación más importante es disponer de suficientes números de puntos por pico cromatográfico. El modo de trabajo utilizado en el estudio fue el de barrido completo o *Full Scan* con experimento de dato dependiente (FS-ddE) (**Figura 1**).

El equipo trabaja en modo FS y en cada espectro obtenido comprueba, mediante un algoritmo de búsqueda, si alguno de los iones que están en la lista de inclusión aparecen en dicho espectro, para que pueda rea-

lizar el experimento de dato dependiente. Si el ion cumple con los criterios establecidos entonces realiza un espectro de MS/MS (PRM).

Este método de trabajo permite obtener toda la información de FS, incluida la cuantificación de los compuestos seleccionados, y, además, la confirmación de los mismos mediante un espectro MS/MS, que se identifica mediante la biblioteca.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPOS UTILIZADOS

Se trabajó con un equipo LC-Q-Exactive, formado por un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), marca Thermo Dionex modelo Ultimate 3000, donde se realiza la separación cromatográfica, y su posterior detección con el equipo de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) de la marca Thermo modelo Q Exactive.

3.2. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES

Los patrones internos utilizados fueron el lorazepam deuterado y el acetaminofén deuterado.

Se añaden en todos los niveles y en todas las muestras (muestra de agua de entrada y salida de la planta), la misma cantidad de patrón interno.

3.3. CONDICIONES DE ACEPTACIÓN/RECHAZO DE LAS MUESTRAS

Las condiciones de aceptación y rechazo de las muestras fueron:

- La muestra tenía que venir congelada.
- El espacio en cabeza de la muestra tenía que ser mínimo.
- El volumen mínimo de la muestra que se necesita para la realización del ensayo debía ser de 50 mL.

TABLA 6

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Variable	Condición de trabajo
Temperatura	40 °C
Flujo	0,5 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Eluyente A	0,1% HCO ₂ H/H ₂ O
Eluyente B	Acetonitrilo
Gradiente eluyentes	5-100% B/A

3.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se agitaba la muestra hasta garantizar su homogeneidad, se tomaba una alícuota de aproximadamente 1,5 mL y se introducía en un tubo Eppendorf, que se centrifugaba a 16.873 x g. Una vez centrifugada la muestra, se cogía con una micropipeta una alícuota de 980 µL y se le añadían 20 µL de patrón interno. Se introducían en el muestreador automático, que estaba refrigerado a 6 °C, hasta su inyección.

3.5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones de trabajo se señalan en la **Tabla 6**. Se utilizó una columna cromatográfica ACE Excel 2 C18-PFP, de dimensiones 100 x 2.1 mm id.

4. CONCLUSIONES

Después de la evaluación de la validación, se considera que el ensayo es apto para el uso previsto.

El haber utilizado un analizador como el orbitap, frente al triple cuadrupolo permite:

- Mayor resolución de masas, lo que significa mayor especificidad. Es difícil tener interferencias en el orbitap, mientras que en triple cuadrupolo es posible.

- Gracias a la alta resolución del orbitap se puede trabajar en modo *Full Scan* (no MS/MS) y en el triple cuadrupolo no; consecuentemente, se puede volver sobre los cromatogramas y buscar otros compuestos que, a priori, no se habían buscado. Esto permite dejar abierto el estudio para futuras investigaciones.

- El orbitap, trabajando en modo MS/MS (PRM), siempre funciona en modo FS de iones producto y se puede hacer la comparación espectral con bibliotecas de espectros de alta resolución, mucho mejor que comparar las áreas de las transiciones, que es como se cualifica espectralmente en el equipo de triple cuadrupolo (este tipo de cualificación falla con razonable facilidad en los límites bajos).

Bibliografía

- [1] Pérez, J.A. (2017). Fármacos como contaminantes emergentes: caracterización, cuantificación y eliminación en plantas de tratamiento de aguas residuales. Universidad de Oviedo. Tesis Doctoral.
- [2] Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea, 2013, L 226/9-L226/10.
- [3] International Standard ISO 5725-1 (1994). First Edition.
- [4] EPA (1996). Method 8000B. Determinative Chromatographic Separations. 