

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN
QUÍMICA**

**“ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO Y
ELIMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y
DISRUPTORES ENDOCRINOS QUÍMICOS EN UN
BIORREACTOR DE MEMBRANA.
IMPLICACIONES AMBIENTALES”**

TESIS DOCTORAL

NOEMÍ ISABEL DORIVAL GARCÍA

GRANADA, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Noemí Isabel Dorival García
D.L.: GR 735-2013
ISBN: 978-84-9028-416-2

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO Y
ELIMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y
DISRUPTORES ENDOCRINOS QUÍMICOS EN UN
BIORREACTOR DE MEMBRANA.
IMPLICACIONES AMBIENTALES**

por

NOEMÍ ISABEL DORIVAL GARCÍA

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Química por
la Universidad de Granada**

**Fdo. Dr. José Luís Vélchez Quero
Catedrático del Departamento de
Química Analítica de la Universidad
de Granada**

**VISADA en Granada a 24 de Octubre
de 2012**

**Fdo. Dr. Alberto Zafra Gómez
Profesor Titular del Departamento de
Química Analítica de la Universidad de
Granada**

**Noemí Isabel Dorival García
Licenciada en Química**

**Fdo. Dr. Jesús González López
Instituto del Agua de la Universidad de
Granada**

La doctoranda Noemí Isabel Dorival García y los directores de la tesis José Luís Vílchez Quero, Alberto Zafra Gómez y Jesús González López, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 24 de Octubre de 2012

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: José Luís Vilchez Quero

Fdo.: Noemí Isabel Dorival García

Director/es de la Tesis

Fdo.: Alberto Zafra Gómez

Director/es de la Tesis

Fdo.: Jesús González López

A la memoria de mi papá Jesús.

A mi mamá Isabel.

A mis hermanos, Daniel y David.

A mi sobrino Mateo

... mi motor, mi motivo, mi fuerza.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que en España, en especial a mis profesores y compañeros; y también a mi familia, amigos, compañeros y alumnos que desde Perú han sido un soporte vital en todo sentido para poder concluir esta Tesis Doctoral.

De manera especial quiero agradecer a mi madre, hermanos, cuñadas, y a Mateo, por su infinito amor, por todo lo que han hecho y hacen por mí, aun a pesar de la distancia, pues el sólo saber que están ahí me anima y me hace recordar todos los días por qué hago esto y por qué vale la pena que siga "*al pie del cañón*" a pesar de todo.

A mi "*familia*" en España. A Pablo Ruiz, a quien considero como mi "*hermano postizo*". A Joaquín Plata, Lorena Sciamparelli y a la pequeña Sofía, así como a sus respectivas familias, a quienes les agradezco por no sólo abrirme las puertas de su casa, sino por hacerme parte de sus vidas. A todos ellos les estoy infinitamente agradecida por el apoyo, amistad y cariño que siempre me han brindado tan generosamente.

A mis directores de tesis, Dr. D. José Luis Vílchez Quero, Dr. D. Alberto Zafra Gómez y Dr. D. Jesús González López, ya que ellos son responsables en gran parte del desarrollo y finalización de este trabajo y de esta memoria, y porque además me brindaron abiertamente su experiencia profesional y orientación, así como su preocupación, apoyo y aliento. Dr. Vílchez, me siento infinitamente agradecida por todo lo que ha hecho por mí, desde mis primeros días en Granada, cuando sólo podía contar con Ud., gracias por darme un lugar en el grupo y en su vida. Alberto, "*gracias*" se queda pequeño. Me siento afortunada de haber sido dirigida por tí, pero sobretodo, agradezco cada palabra de aliento y también las de atención, cada impulso, toda tu paciencia, todos

los gestos que has tenido conmigo, pues todo eso para mí vale un millón de veces más que toda la química que haya podido aprender de tí.

Al Dr. D. Alberto Navalón Montón, a quien considero como mi "*Director de Tesis honorario*", me siento muy honrada de haber contado con su vasta preparación profesional, pero más aún le agradezco el que me haya ofrecido su apoyo en el día a día, desde aquellos pequeños problemas domésticos hasta cada palabra de aliento y consuelo que siempre recibí de Ud. Al Dr. D. Óscar Ballesteros, pues tu apoyo académico fue crucial especialmente en mis inicios, cuando todavía me sentía muy desorientada.

A Bartolomé Oliver, mi compañero en el laboratorio, con el que he trabajado "*hombro a hombro*" durante todos estos años. Te agradezco profundamente el haber podido contar contigo siempre, tu infinita paciencia y por el trabajo conjunto que nos permitió sacar adelante nuestras tesis. También de forma muy especial a Julio César Benítez, Samuel Cantarero, Javier Camino, Cristina Martínez, por el día a día en el laboratorio, gracias por su compañerismo, ánimo, y ayuda constante, pero sobretodo por saber que con ustedes puedo cultivar amigos.

A todos los que fueron y son mis compañeros de laboratorio, Esther Castillo, Carolina Fernández, Arno Goffin, Inmaculada Jiménez, Ana López, Noemí Navea, Rocío Rodríguez, María Silvera, Jalilia Taoufiki y Fernando Vela, a quienes, además del apoyo y colaboración académica, sobretodo les agradezco el haberme brindado su cariño. Gracias por haberme hecho sentir parte del grupo, el haberlos conocido me ha enriquecido desde todo punto de vista.

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se estudian las posibilidades de la tecnología de biorreactores de membrana como alternativa sobre los tratamientos convencionales para la eliminación de dos grupos importantes de microcontaminantes orgánicos durante el tratamiento de aguas residuales: antibióticos de la familia de las quinolonas y los disruptores endocrinos pertenecientes al grupo del bisfenol A y sus derivados clorados. Estos compuestos son causa de una creciente preocupación debido a su gran impacto biológico sobre los ecosistemas acuáticos, incluso a bajas concentraciones. Para cumplir este objetivo, se ha desarrollado metodología analítica de buenas características para la determinación de estas sustancias en aguas residuales y fangos de desecho, usando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem. Los métodos propuestos aportan notables mejoras y en algunos casos representan innovaciones en metodología analítica, cubriendo un rango amplio de microcontaminantes. Se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de los parámetros más influyentes para los procedimientos de tratamiento de muestra y detección cromatográfica en estas matrices complejas, así como un estudio comparativo de las técnicas de extracción más comúnmente usadas para matrices sólidas, con el objeto de determinar sus ventajas y desventajas de acuerdo a requerimientos analíticos específicos y de costos.

Los biorreactores de membrana han generado un gran interés debido a su habilidad para producir efluentes de alta calidad que cumplen las legislaciones más estrictas. Se han realizado estudios cinéticos, de adsorción y microbiológicos, tanto a escala de planta piloto como a escala de laboratorio, teniendo como objeto el establecer las condiciones y variables del proceso más importantes permitan mejorar la eliminación por biodegradación de estas sustancias, hasta ahora consideradas como

sustancias químicas persistentes y con una elevada capacidad de adsorción, lo cual disemina la contaminación tanto a ambientes acuáticos como terrestres. Estos estudios constituyen un paso preliminar hacia la eliminación definitiva de estas sustancias del medio ambiente, así como para el establecimiento en un futuro, de directivas apropiadas para el control de estos contaminantes emergentes.

ABSTRACT

The purpose of this Thesis was to study the feasibility of membrane bioreactor technology as an alternative to conventional methods for the removal of two important groups of organic micropollutants from wastewaters: quinolone derivatives and the endocrine disruptors bisphenol A and its chlorinated derivatives. These chemicals are a cause of increasing concern due to their significant biological impact on aquatic ecosystems, even at low concentrations. In order to achieve this goal, a validated analytical methodology was developed for the determination of these substances in wastewaters and sewage sludge using liquid chromatography tandem mass spectrometry. The methods proposed here represent a significant improvement and, in some cases, an innovation in analytical methodology, covering the determination of a wide range of micropollutants.

An exhaustive study of the most influential parameters that affect sample treatment and of the steps involved in detection of compounds in such complex matrices was performed as well as a comparative study of the most commonly used extraction techniques for solid matrices, to determine their advantages and drawbacks according to specific analytical and cost-related needs.

Membrane bioreactors have attracted great interest due to their ability to produce high quality effluents complying with the most restrictive legislation. Kinetic, sorption and microbiological studies were performed, at pilot plant- and laboratory-scale level, with the aim of establishing the most important conditions and process variables that improve biodegradation of these substances, which are considered as persistent chemicals, with a high sorption potential, and that may ultimately enter into aquatic and terrestrial environments. These studies provide the

basis for the ultimate removal of these chemicals from the environment and for the establishment of appropriate directives for the control of this group of so-called "emergent contaminants".

ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	1
OBJETO DE LA TESIS	9
INTRODUCCIÓN.....	17
1. FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL EN EL MEDIO AMBIENTE	19
1.1. Consumo y Patrones de Uso de Fármacos	26
1.2. Presencia y Fuentes de Contaminantes en el Medio Ambiente	29
1.3. Mecanismos de Eliminación de Contaminantes Orgánicos en el Medio Ambiente	41
1.3.1. Eliminación de Fármacos	41
1.3.2. Eliminación de EDCs	46
1.3.3. Eficacia en la Eliminación de las Aguas Durante el Tratamiento de Aguas Residuales	49
1.3.4. Destino Final de PPCPS Durante el Tratamiento en EDARs	50
1.4. Unión Europea y Contaminantes Emergentes	54
2. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES. DESTINO DE FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL EN EL MEDIO AMBIENTE ...	57
2.1. Calidad y Tratamiento del Agua.....	57
2.2. Descripción de una EDAR	59
2.2.1. Tratamiento Primario	61

2.2.2. Tratamiento Secundario	62
2.2.3. Tratamiento Terciario.....	65
2.2.4. Tratamiento de Fangos.....	70
3. BIORREACTORES DE MEMBRANA (MBR)	73
3.1. Tratamiento Convencional vs Biorreactores de Membrana para el Tratamiento de Aguas Residuales.....	73
3.2. Las Tecnologías de Membrana.....	78
3.3. Los Biorreactores de Membrana (MBR).....	80
3.4. Evolución Histórica e Implantación a Nivel Mundial de los MBRs	82
3.5. Configuraciones de los MBRs.....	83
3.6. Características de las Membranas	89
3.6.1. Materiales de las Membranas	89
3.6.2. Configuraciones de Membrana.....	89
3.7. Ventajas y Desventajas de los MBRs	94
3.8. Descripción y Funcionamiento de la Planta Piloto MBR Empleada.....	97
3.8.1. Descripción y Funcionamiento de la Planta Piloto MBR	97
3.8.2. Funcionamiento de la Planta Piloto Experimental MBR	100
4. SELECCIÓN DE LOS COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO	102
4.1. Quinolonas y Fluoroquinolonas	102
4.1.1. Los Antibióticos	102
4.1.2. Antibióticos de la Familia de las Quinolonas.....	105
4.1.3. Mecanismos de Acción de las Quinolonas	113

4.1.4. Mecanismos de Resistencia Frente a las Quinolonas	115
4.1.5. Relación Estructura-Actividad	117
4.1.6. Propiedades Físicoquímicas de las Quinolonas.....	119
4.1.7. Consumo de Antibióticos y Quinolonas en Europa...	122
4.2. Bisfenol A y sus Derivados Clorados.....	124
4.2.1. Los Disruptores Endocrinos	124
4.2.2. Efectos de EDCs en Diferentes Organismos	127
4.2.3. Clasificación de los Disruptores Endocrinos Químicos.....	131
4.2.4. Mecanismo de Acción de los Disruptores Endocrinos Químicos.....	132
4.2.5. Estructura Química y Uso del Bisfenol A y sus Derivados.....	136
4.2.6. Comportamiento Bioquímico del Bisfenol A como Disruptor Endocrino	141
4.2.7. Efectos de los Derivados Clorados del Bisfenol A	143
4.2.8. Otros Efectos de Bisfenol A y Derivados Clorados ...	145
4.2.9. Propiedades Físicoquímicas del Bisfenol A	146
5. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN AMBIENTAL DE LOS CONTAMINANTES SELECCIONADOS.....	148
5.1. Determinación de Microcontaminantes en Aguas.....	149
5.1.1. Muestreo, Almacenamiento y Estabilidad	149
5.1.2. Pretratamiento de las Muestras	152
5.1.3. Extracción de las Muestras.....	155
5.1.4. Concentración de las Muestras	161
5.2. Determinación de los Microcontaminantes Seleccionados en los Fangos de Desecho	162

5.2.1. Situación Actual de las Técnicas de Extracción en Matrices Sólidas	164
5.2.2. Toma de Muestra	168
5.2.3. Extracción Asistida por Ultrasonidos (USE)	169
5.2.4. Extracción Asistida por Microondas (MAE)	175
5.2.5. Extracción con Líquidos Presurizados (PLE)	180
5.2.6. La Masa de Muestra	187
5.2.7. Tratamiento Post-extracción	187
5.3. Análisis Mediante Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem	188
5.3.1. Analizadores de Masas	198
5.3.2. Efecto Matriz	201
6. MICROBIOLOGÍA DE LOS TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS DE AGUAS RESIDUALES	206
6.1. Fangos Activados. Estructura y Composición	206
6.1.1. Las Bacterias Filamentosas	212
6.2. Principios de Oxidación Biológica	214
6.2.1. Procesos Biológicos Convencionales para la Eliminación de Nitrógeno y Fósforo	217
6.3. Actividad Enzimática de los Fangos Activados	221
6.4. Efecto de Microcontaminantes Orgánicos Sobre el Crecimiento Bacteriano en los Fangos Activados	225
7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS ANALÍTICOS	234
7.1. Diseño Experimental y Optimización de los Métodos de Extracción de Microcontaminantes de Matrices Ambientales	234

7.1.1. Definición del Problema y Selección de las Variables Apropriadadas y Respuesta(s) a Través de Estudios de Diagnóstico	236
7.1.2. Diseño Factorial Fraccionado	237
7.1.3. Elección del Diseño Experimental Usando Metodología de Superficie de Respuesta. Diseño Experimental Doehlert	240
7.2. Cálculo de Parámetros de Calidad del Método Analítico	246
7.2.1. Evaluación de la Exactitud	247
7.2.2. Otros Parámetros de Calidad	248
7.3. Comparación de los Métodos Analíticos.....	252
7.3.1. Procedimientos para la Comparacion de Métodos ...	253

CAPÍTULO I. MICROCONTAMINANTES EN AGUAS RESIDUALES..... 257

1. OBJETIVOS.....	259
2. PUBLICACIÓN I (MICROCHEM J)	260

CAPÍTULO II. MICROCONTAMINANTES EN FANGOS DE DEPURADORA..... 297

1. OBJETIVOS.....	299
2. PUBLICACIÓN II (J CHROMATOGR A)	300
3. PUBLICACION III (TALANTA).....	343
4. PUBLICACIÓN IV (TALANTA)	381

CAPÍTULO III. ESTUDIO DE CONTAMINANTES A ESCALA DE PLANTA PILOTO.....	431
1. OBJETIVOS.....	433
2. PUBLICACIÓN V (INT J ENVIRON SCI TECHNOL).....	434
 CAPÍTULO IV. BIOREACTORES A ESCALA DE LABORATORIO.....	 463
1. OBJETIVOS.....	465
2. PUBLICACIÓN VI (SCI TOTAL ENVIRON)	466
3. PUBLICACIÓN VII (J ENVIRON MANAGE)	513
 CAPITULO V. CONCLUSIONES	 547
 ANEXO. Publicaciones	 559

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

16S-rRNA	Subunit 16S of prokaryotic ribosomal RNA
ANOVA	Analysis of Variance
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
AOB	Ammonium-Oxidizing Bacteria
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BBD	Box-Behnken Design
BBP	Benzyl butyl phthalate
Bis-DMA	Bisphenol A Dimethacrylate
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BFA	Bisfenol A
CAS	Chemical Abstracts Service
CAS	Conventional Activated Sludge treatment
CCD	Central Composite Design
CE	Capillary Electrophoresis
CI	Chemical Ionization
CID	Collision Induced Dissociation
COD	Chemical Oxygen Demand
POP	Persistent organic pollutant
DAD	Diode-array detector
DBP	Di- <i>n</i> -butyl phthalate
DDD	Defined Daily Dose
DEHP	Diethylhexyl phthalate
DES	Diethylstilbestrol
DID	DDD per 1000 inhabitants per day
DM	Doehlert Matrix
E1	Estrone
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EC ₅₀	half maximal Effective Concentration (toxicology)

EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDC	Endocrine disrupting chemical
EE2	Ethinylestradiol
EI	Electron Ionization
EMA	European Medicines Agency
EPA	Environmental Protection Agency
EQS	Environmental Quality Standard
ESAC	European Surveillance of Antimicrobial Consumption
ESI	Electrospray Ionization
EU	European Union
FAB	Fast Atom Bombardment
FDA	US Food and Drug Administration
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
FLD	Fluorescence detector
F/M	Food-to-Microorganism ratio
FMAE	Focused Microwave-assisted extraction
FS	Flat sheet
FT-ICR-MS	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry
GAO	Glycogen-Accumulating Organism
GC	Gas Chromatography
GPC	Gel Permeation Chromatography
GWRC	Global Water Research Coalition
HF	Hollow fibre
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRT	Hydraulic Retention Time
IC ₅₀	half maximal Inhibitory Concentration (toxicology)
ICH	International Conference on Harmonisation
IT	Ion Trap detector

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LAS	Linear Alkylbenzenesulfonate,
LC	Liquid Chromatography
LD ₅₀	Median Lethal Dose
LOD	Limit of Detection
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration (toxicology)
LOQ	Limit of Quantification
LPME	Liquid Phase Microextraction
MAE	Microwave-assisted extraction
MBR	Membrane Bioreactor
MF	Microfiltration
MISPE	Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction
MLSS	Mixed Liquor Suspended Solids
MRM	Multiple Reaction Monitoring
NF	Nanofiltration
NOB	Nitrite-Oxidizing Bacteria
NOEC	No Observed Effect Concentration (toxicology)
NP	Nonylphenol
NRC	US National Research Council
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OP	Octylphenol
OSPAR	The Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic
PAE	Phthalate Acid Esters
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PAO	Phosphorus-Accumulating Organism
PB	Plackett-Burman design
PBDE	Polybrominated diphenyl ether
PCA	Polychlorinated Alkane

PCB	Polychlorinated biphenyl
PCDD	Polychlorinated dibenzodioxin
PCN	Polychloronaphtalenes
PDMS	polydimethylsiloxane
PFC	Perfluorochemical
PLE	Pressurized Liquid Extraction
PMAE	Pressurized Microwave-assisted extraction
PNEC	Predicted No Effect Concentration
POP	Persistent Organic Pollutant
PCDDs/Fs	Polychlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins and dibenzofurans
PPCP	Pharmaceuticals and personal care products
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RO	Reverse Osmosis
RSD	Relative Standard Deviation
RSM	Response Surface Methodology
SBR	Sequencing Batch Reactor
SBSE	Stir-bar Sorptive Extraction
SIM	Selected Ion Monitoring
SLM	Supported Liquid Membrane Extraction
SNC	Sistema Nervioso Central
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction
SRT	Solids Retention Time (Tiempo de retención celular)
TBBA	Tetrabromobisphenol A
TCC	Triclocarban
TCS	Triclosan
THP	Toxicity, Health effects, and Persistency

TMP	Transmembrane Pressure
TOC	Total Organic Carbon
TOF	Time-of-Flight detector
TQP	Triple Quadrupole detector
TSP	Thermospray Ionization
TSS	Total Suspended Solids
UF	Ultrafiltration
UE	Unión Europea
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USE	Ultrasound-assisted extraction
US-EPA	United States Environmental Protection Agency
USP	United States Pharmacopeia
UTI	Urinary Tract Infection
VAP	Value-added Products
VSS	Volatile Suspended Solids
WFD	Water Framework Directive

OBJETO DE LA TESIS

Debido a la escasez de recursos hídricos, que se vislumbra desde hace varios años, hay una necesidad creciente de controlar la calidad del agua a nivel global. El enfoque de la investigación ambiental se ha extendido recientemente más allá de los contaminantes ambientales clásicos, tales como los pesticidas, PCBs o dioxinas, para incluir a compuestos orgánicos polares y con una solubilidad apreciable en agua, como fármacos, productos de cuidado personal y disruptores endocrinos. Este grupo de contaminantes orgánicos, ha sido denominado como "*contaminantes emergentes*". Se trata de compuestos cuya peligrosidad no ha sido considerada hasta hace unos años, a pesar de que forman parte de la vida cotidiana de los seres humanos y que son usados de manera masiva e incluso descontrolada.

En los últimos años se han realizado algunos estudios sobre la presencia y comportamiento de estas sustancias en el medio ambiente, y aunque ya se cuenta con algunos conocimientos que dan indicios de su persistencia ambiental, toxicidad y capacidad para bioacumularse y biomagnificarse en la cadena alimenticia, aun hay mucha información por conocer acerca de las implicaciones reales y riesgos en el medio ambiente de estas sustancias. Es necesario hacer más investigación multidisciplinaria que sienta las bases de futuras directivas específicas para estos contaminantes emergentes, con el objetivo final de regular adecuadamente su presencia en el medio ambiente, su consumo y los patrones de uso por el ser humano.

Las aguas residuales constituyen uno de los principales puntos de ingreso de estas sustancias en el medio ambiente; la investigación por tanto, debe ser enfocada hacia la posibilidad de eliminarlas de las aguas durante el tratamiento en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), principalmente por biodegradación.

Por otro lado, estas sustancias tienen gran tendencia a adsorberse y acumularse en los fangos de desecho, reduciendo su biodisponibilidad para ser degradados, diseminando la contaminación no sólo al medio acuático, sino también a través de la reutilización de estos fangos como fertilizantes para suelos agrícolas.

La tecnología de biorreactores de membrana (MBRs) ha atraído un gran interés en el tratamiento de aguas residuales por su capacidad para producir efluentes de alta calidad en comparación con los sistemas convencionales. Esta tecnología es muy eficiente en la eliminación de materia orgánica, nitrógeno, sólidos en suspensión, iones y patógenos, y aunque existen estudios sobre la eliminación de algunos contaminantes en estos sistemas de depuración, todavía falta mucho por conocer, especialmente para el caso de la eliminación de microcontaminantes persistentes que presentan una elevada tendencia a quedar retenidos en las matrices sólidas, como es el caso de muchos antibióticos.

Este interés creciente por hacer investigación alrededor de los contaminantes emergentes tiene que ir en paralelo con los avances en técnicas analíticas, para poder detectar y cuantificar estas sustancias a concentraciones relevantes en el medio ambiente, a las cuales todavía pueden presentar actividad biológica, y que están en el rango de los $\mu\text{g L}^{-1}$ y ng L^{-1} . Se necesitan metodologías sensibles, exactas, fiables y selectivas, convirtiéndose en un verdadero reto analítico ya que tanto las aguas residuales como los fangos de desecho, son matrices complejas que contienen componentes que habitualmente se coextraen con los analitos y que interfieren con la calidad analítica del método.

En base a estos antecedentes, el objeto de la presente Tesis Doctoral es por un lado el desarrollo de metodología analítica de buenas características para la determinación de los microcontaminantes seleccionados en aguas residuales y en fangos de desecho a niveles

traza; y por otro, realizar estudios utilizando la tecnología de los biorreactores de membrana, para determinar las condiciones y parámetros de operación que permitan optimizar el tratamiento y conseguir una eliminación eficiente de los microcontaminantes de interés, especialmente los que son reconocidos como persistentes.

En esta Tesis, se han estudiado dos de los grupos más importantes de contaminantes emergentes: una familia de antibióticos de uso terapéutico (quinolonas y fluoroquinolonas), y disruptores endocrinos químicos (bisfenol A y sus derivados clorados). La selección se realizó en base a sus altas tasas de consumo, en el caso de los antibióticos, y su alta producción mundial, en el caso del bisfenol A. Además, estos compuestos presentan un bajo grado de metabolización en el cuerpo humano y se encuentran frecuentemente en las aguas residuales y fangos de desecho, hechos que pueden ser evidencia de su persistencia ambiental.

Los objetivos específicos de esta Memoria de Doctorado son los que se enumeran a continuación:

1. Realizar una revisión exhaustiva de la información existente hasta la fecha en relación a los contaminantes elegidos, tanto a nivel de su determinación analítica en las matrices en estudio como en los tratamientos existentes para su eliminación en las EDARs.
2. Desarrollar metodología analítica nueva o mejorar la ya existente para la determinación de los compuestos seleccionados en aguas residuales y fangos de desecho, así como realizar estudios comparativos entre técnicas de extracción, que puedan evaluar tanto sus características analíticas como sus ventajas en relación a simplicidad, tiempo de análisis y costos, ya que los tratamientos

de muestra suelen ser complicados y tediosos debido a la complejidad de las matrices seleccionadas.

3. Hacer estudios de presencia, distribución y mecanismos de eliminación de los contaminantes seleccionados durante el tratamiento en MBRs, tanto a nivel de escala piloto, como a escala de laboratorio, con el objetivo de determinar la influencia de parámetros específicos como MLSS, temperatura, COD inicial del agua residual, grado de aireación y condiciones redox, así como el establecimiento de las condiciones óptimas para mejorar su eliminación por biodegradación, a través de estudios cinéticos, de adsorción y microbiológicos.

Las técnicas y metodologías analíticas que se han empleado para la consecución de los objetivos de la presente Tesis han sido:

- Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (LC-MS/MS(QqQ)), para el análisis de los microcontaminantes seleccionados en ambas matrices ambientales: aguas residuales y fangos de desecho.
- Extracción en fase sólida de muestras acuosas seguida de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (LC-MS/MS(QqQ)).
- Extracción mediante líquidos presurizados (PLE) de los contaminantes orgánicos seleccionados en fangos de desecho.
- Extracción mediante ultrasonidos (USE) de los contaminantes orgánicos seleccionados en fangos de desecho.

- Extracción mediante microondas (MAE) de los contaminantes orgánicos seleccionados en fangos de desecho.
- Herramientas estadísticas para llevar a cabo estudios comparativos de las técnicas de extracción; así como en la realización los balances de masa en los experimentos dinámicos y de tipo "batch" en los MBRs; y para el tratamiento de los datos procedentes de los diseños de experimentos multivariantes empleados en la optimización de los diferentes métodos analíticos.

INTRODUCCIÓN

“Ésta es una sociedad basada en productos químicos. Lo curioso es que sólo una fracción de ellos es realmente necesaria. La manera en cómo nos enfoquemos en sólo unos pocos de ellos con respecto a su peligro y riesgos ya es importante, seamos científicos o no”

**– Christian Daughton
(U.S. Environmental Protection Agency.
National Environmental Research Laboratory)**

1. FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL EN EL MEDIO AMBIENTE.

Cada día, se hace uso del agua en las diversas actividades humanas y se liberan al medio ambiente gran cantidad de compuestos químicos a través de las aguas residuales. La consecuencia más importante observada de esta actividad es la alteración del ciclo del agua, causando gran preocupación en la actualidad, ya que todo ello está relacionado con un eventual impacto sobre la salud humana y los ecosistemas. En los últimos años, se han realizado numerosos estudios que demuestran la presencia de nuevas sustancias químicas en el medio ambiente. Son los denominados *contaminantes emergentes*^{1,2}. La US EPA los define como sustancias químicas nuevas que no poseen una regulación clara y específica, y cuyo impacto sobre el medio ambiente y la salud humana está pobremente entendido.



Figura 1.1. Riesgos de la contaminación en los suministros de agua.

¹ Rosal R, Rodriguez A, Perdigon-Melon JA, Petre A, Garcia-Calvo E, Gomez MJ, Aguera A, Fernandez-Alba AR. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 2010, 44:578–588.

La directiva de la UE 2000/06/CE muestra en el Anexo X una lista de 33 sustancias prioritarias y persistentes, que incluyen metales y compuestos orgánicos (POPs, "*Persistent Organic Pollutants*"), como dioxinas, pesticidas organoclorados, nonilfenol, nonilfenoles etoxilados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PBCs), sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS), di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) y dibenzodioxinas policloradas (PCDDs), para las que se ha fijado como objetivo su eliminación antes del año 2015. La situación en relación a estas sustancias, está relativamente controlada, al igual que la presencia de metales, bacterias, hidrocarburos e iones como nitratos (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) en el agua, ya que todas estas especies han sido muy estudiadas y su impacto sobre la salud humana y el medio ambiente es bastante conocido, estando sujetas a regulación y control. Un ejemplo es el caso de los metales pesados, para los cuales existen numerosas regulaciones nacionales e internacionales (US-EPA y UE)³⁻⁵. En el caso de los contaminantes orgánicos también se ha restringido su uso y toda la legislación desarrollada ha permitido que sus niveles medioambientales hayan disminuido notablemente en el mundo entero a partir de la *Convención de Estocolmo* (2001). Sin embargo, ninguna de estas normativas contempla a la mayoría de los contaminantes emergentes. Desde 2007, el reglamento REACH ("*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances*") busca identificar nuevos contaminantes químicos peligrosos en Europa, y diseñar estrategias para tratar de reemplazarlos por otros menos dañinos y de esta manera reducir su impacto sobre el medio ambiente.

² Vogelsang C, Grung M, Jantsch TG, Tollefsen KE, Liltved H. Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway. *Water Research*, 2006, 40:3559-3570.

³ Directorate-General Environment. Working Document Sludge and Biowaste, European Commission, 2010, 13 pp.

⁴ United States Environmental Protection Agency (USEPA). 40 CFR part 503. Standards for the use or disposal of sewage sludge. *Federal Register*, 1993, 58:9387-9404.

⁵ United States Environmental Protection Agency (USEPA). Standards for the use or disposal of sewage sludge. Proposed rule. *Federal Register*, 1999, 64:72045-72062.

La mayoría de estas sustancias han sido clasificadas como altamente peligrosas y persistentes en el medio ambiente, siendo tóxicas, potencialmente carcinogénicas, y con propiedades como disruptores endocrinos. La situación es muy preocupante si se considera que estas sustancias son parte de nuestra vida cotidiana, y que el desconocimiento de su potencial efecto dañino ha hecho que en algunos casos, a parte masivo, su uso sea incontrolado.

El enfoque de la investigación ambiental se ha extendido desde hace unos años con objeto de incluir a gran parte de estos compuestos, que incluyen desinfectantes, surfactantes, fármacos y productos de cuidado personal ("*Pharmaceuticals and Personal Care Products*", PPCPs) y agentes de diagnóstico. La preocupación por la actividad biológica de estas sustancias radica especialmente en que pueden causar efectos adversos importantes sobre los seres vivos a concentraciones muy bajas, incluso a niveles sub-terapéuticos en el caso de los fármacos⁶. Hoy en día, están registradas en la UE alrededor de 100,000 sustancias químicas diferentes, de las cuales 30,000 son comercializadas de forma masiva⁷. De ellas, alrededor de 4,000 son fármacos (tranquilizantes, analgésicos, antibióticos, contraceptivos, anticonvulsivos, agentes de contraste, β -bloqueadores, reguladores lipídicos, hormonas, agentes quimioterápicos, etc.)^{8,9}.

Durante y después del tratamiento médico, es excretada, a través de la orina y las heces, una combinación del fármaco intacto y sus

⁶ Larsen TA, Lienert J, Adriano J, Siegrist H. How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Biotechnology*, 2004, 113:295-304.

⁷ Beausse J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2004, 23:753-761.

⁸ Halling-Sorensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Lutzhoft HCH, Jorgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere*, 1998, 36:357-394.

⁹ Garric J, Ferrar B. Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effets biologique: que savons-nous?. *Revue des Sciences de l'eau*, 2005, 18:307-330.

metabolitos. En consecuencia, las aguas residuales reciben de modo continuo gran cantidad de compuestos químicos activos¹⁰, pudiendo a partir de aquí reingresar en el medio ambiente (Fig. 1.2).



Figura 1.2. Reingreso de los fármacos en el medio ambiente. Presencia final en las aguas superficiales y de consumo humano.

Todo ello ha motivado una creciente investigación, a todos los niveles, con objeto de determinar el comportamiento y los mecanismos de eliminación de los contaminantes durante los procesos y operaciones que se llevan a cabo en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDARs), así como las concentraciones que persisten aun en los efluentes tratados. Sin embargo, a pesar de llevar más de una década de estudio intensivo, todavía hay muchas interrogantes sin resolver, existiendo limitaciones en el conocimiento de ciertos puntos específicos, como la persistencia de estos compuestos, su evolución en las aguas y los suelos agrícolas, los mecanismos de degradación o de transferencia a la cadena trófica, y los efectos adversos sobre la salud humana y los ecosistemas.

¹⁰ Daughton, CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107:907-938.

En cuanto a los *productos de cuidado personal*, en el mundo entero se consumen enormes cantidades de productos manufacturados para el cuidado dental o de la piel, jabones, champús y detergentes, así como agentes protectores solares y productos para el cabello, entre muchos otros. Los surfactantes (detergentes), fragancias (almizcles nitrados y policíclicos), bloqueadores de rayos UV (benzofenonas y canfores), conservantes (parabenos y derivados de isotiazolina) y antisépticos (triclosan y triclocarban) se encuentran habitualmente en las formulaciones de estos productos de cuidado personal¹¹. Una vez usados, los desechos alcanzan las aguas residuales a través de los desagües, habiendo sido su destino final en el medio ambiente muy poco estudiado, aunque existan evidencias de sus propiedades como compuestos persistentes y bioacumulables¹².



Figura 1.3. El ciclo de reingreso de los productos de cuidado personal al medio ambiente y sus peligros sobre los ecosistemas.

¹¹ Ternes TA, Knacker T, Oehlmann J. Körperpflegenmittel in der aquatischen Umwelt. Eine bisher vernachlässigte Stoffgruppe UWSF-Z. *Umweltchemie und Ökotoxikologie*, 2003, 15:169-180.

¹² Geyer HJ, Rimkus GG, Sheuenert I, Kaune A, Schramm K-W, Kettrup A, Zeeman M, Muir DCG, Hansen LG, Mackay D. Bioaccumulation. *The Handbook of Environmental Chemistry: Vol. 2-J*, Beek B, Ed., Springer-Verlag, Berlin, 2000, 166 pp.

Una de las mayores preocupaciones en relación a los PPCPs es que pueden tener propiedades como disruptores endocrinos ("*Endocrine Disrupting Chemicals*", EDCs) sobre los seres vivos, incluyendo los seres



Figura 1.4. Estrogenicidad y PPCPs.

humanos. Este grupo de compuestos incluye familias tan diferentes como los estrógenos sintéticos usados como contraceptivos (e.g. EE2 y 17 α -etinilestradiol), los fitoestrógenos¹³ (e.g. isoflavonoides) y compuestos de síntesis industrial^{14,15} (e.g. bisfenol A, nonilfenol y octilfenol). Recientemente se han incluido fármacos no esteroideos y algunos de sus metabolitos (antibióticos, analgésicos/anti-inflamatorios, antidepresivos, etc.) como potenciales EDCs¹⁶. La incidencia de enfermedades relacionadas con el sistema endocrino de los individuos se ha incrementando vertiginosamente, habiendo claros signos de cambios en la salud reproductiva de los seres vivos, incluyendo una disminución en la fertilidad masculina, defectos de nacimiento e incidencia de cánceres.

¹³ Stopper H, Schmitt E, Kobras K. Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutation Research*, 2005, 574:139–155.

¹⁴ Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127:27–34.

¹⁵ Ying GG, Williams B, Kookana RS. Environmental fate of alkyphenols and alkyphenol ethoxylates—a review. *Environment International*, 2002, 28:215–226.

¹⁶ Ingerslev F, Vaclavik E, Halling-Sorensen B. Pharmaceuticals and Personal Care Products: A Source of Endocrine Disruption in the Environment. *Pure and Applied Chemistry*, 2003, 75, 1881–1893.



Figura 1.5. Productos de cuidado personal de uso frecuente, y potenciales efectos sobre la salud humana.

Los esfuerzos deben encaminarse por tanto, además de en la búsqueda de procesos y mecanismos para mejorar la eliminación de estas sustancias del medio ambiente, hacia la introducción de acciones legales a través de políticas de regulación y prevención orientadas a reducir su presencia en el medio ambiente. En la actualidad no existen políticas serias de "screening" de PPCPs en las aguas residuales, ni regulaciones de su presencia en los efluentes, que serían el punto de partida para el inicio de estudios sobre los potenciales efectos adversos sobre la salud y los ecosistemas. Los procesos de tratamiento de aguas residuales deben enfocarse en mejorar la calidad del agua y en reducir los niveles de contaminantes en los efluentes tratados¹⁷.

¹⁷ Oulton RL, Kohn T, Cwiertyny DM. Pharmaceuticals and personal care products in effluent matrices: A survey of transformation and removal during wastewater treatment and implications for wastewater management. *Journal of Environmental Monitoring*, 2010, 12:1956–1978.

1.1 Consumo y Patrones de Uso de Fármacos.

Los patrones de consumo y aplicación de fármacos varía en función de los distintos países^{18,19}. Por ejemplo, de acuerdo a las Naciones Unidas, el 2.3% de las mujeres japonesas en edad reproductiva consumen píldoras anticonceptivas, mientras que en Norteamérica lo hacen más del 16% y en Europa más del 59%²⁰. La estreptomycinina es usada para estimular el crecimiento de las frutas en los Estados Unidos, mientras que está prohibida para este uso en Alemania²¹. Algunos fármacos son usados sin prescripción médica en algunos países, mientras que en otros solamente con prescripción.

Los antibióticos son el tipo de fármaco más usado en el mundo. Se estima que el consumo mundial por año de antibióticos está entre 100,000 y 200,000 t²². Alrededor de las 10,200 t de antibióticos que se usan en los Estados Unidos, aproximadamente un 50% se emplea en medicina veterinaria, en agricultura y como promotores de crecimiento. Por su lado y de acuerdo a datos suministrados por "The European Federation of Animal Health"²³, en Europa, el 65% de los antibióticos que se usan están destinados a la medicina humana.

Además de la prevención (profilaxis) y tratamiento de infecciones, los antibióticos son ampliamente empleados como promotores del

¹⁸ Schuster A, Hädrich C, Kümmerer K. Flows of active pharmaceuticals ingredients originating from health care practices on a local, regional, and nationwide level in Germany – is hospital effluent treatment an effective approach for risk reduction? *Water, Air & Soil Pollution*, 2008, 8:457–471.

¹⁹ Mölsted S, Lundborg CS, Karlsson AK, Cars O. Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2002, 34: 366–371.

²⁰ United Nations. World Contraceptive Use 2003. United Nations publication, Sales No. E.04.XIII.2, 2004.

²¹ Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment—A review—Part I. *Chemosphere*, 2009, 75:417–434.

²² Wise R. Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, 49:585–586.

²³ European Federation of Animal Health (FEDESA). Antibiotic Use in Farm Animals does not threaten Human Health. FEDESA/FEFANA Press release, Brussels, 2001.

crecimiento de animales²⁴. Se considera que los antibióticos mejoran la calidad de la carne, con un menor porcentaje de grasa y mayor contenido de proteínas²⁵. Hoy en día, ya existen alternativas para conseguir las mismas prestaciones sin el uso de antibióticos²⁶. En Europa, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento fue prohibido hace algunos años. Los antibióticos también se usan para propósitos terapéuticos y como agentes profilácticos en acuicultura; así como en el control de enfermedades en frutas de alto valor económico, verduras y árboles ornamentales, y en apicultura.

Por otro lado, como se puede esperar, los antibióticos están presentes en las aguas residuales procedentes de los hospitales^{18,27}, en concentraciones superiores a las aguas procedentes de residuos domésticos. No obstante, no son los hospitales los que contribuyen en mayor medida a la contaminación de los desechos municipales^{18,28}. El uso de antibióticos en hospitales representa sólo el 5–20% del total de antibióticos que se usan en Europa. Teniendo en cuenta las tasas de metabolización específicas de cada compuesto, de las 305 t de los antibióticos que llegan a las aguas residuales, solamente 92 t provienen de los hospitales²¹. Esto significa, que aunque los hospitales generen efluentes con una elevada contribución en fármacos, a su llegada a las

²⁴ Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs). *Chemosphere*, 2006, 65:725–759.

²⁵ Cromwell GL. Why and how antibiotics are used in swine production. *Animals Biotechnology*, 2002, 13:7–27.

²⁶ Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO): http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/AGRIPPA/555_EN.HTM.

²⁷ Gómez MJ, Petrović M, Fernández-Alba AR, Barceló D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1114:224–233.

²⁸ De Wirth K, Schröder H, Meyer E, Nink K, Hofman S, Steib-Bauert M, Kämmerer R, Rueß S, Daschner FD, Kern WV. Antibiotic use in Germany and Europe. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 2004, 129:1987–1992.

EDARs, se producirá una dilución, que puede llegar a ser hasta más de 100 veces²⁹.

En relación al desecho de medicamentos, una costumbre muy común aunque inapropiada es eliminarlos a través del inodoro. En Europa, se ha descrito que aproximadamente un tercio del volumen total de fármacos son desechados directamente sin utilizar³⁰. De acuerdo a la legislación vigente, el desecho de fármacos caducados o en desuso de manera doméstica está permitido desde 1994³¹. Si la basura es posteriormente incinerada, el problema será eliminado, pero las emisiones al medio ambiente a la larga serán difíciles de manejar. El desecho a través de vertederos no es una buena política, porque simplemente posterga el problema y lo traslada a otro nivel, ya que los contaminantes pueden lixiviar, y éstos y/o sus metabolitos pueden ser transferidos a otro compartimiento ambiental, y aparecer en los efluentes del vertedero³², los cuales si no son gestionados y tratados de manera adecuada, se convertirán en una fuente de contaminación para las aguas subterráneas. Resulta llamativo que la US "Food and Drug Administration" (FDA) recomiende sin ninguna explicación adicional que algunos fármacos puedan ser eliminados directamente por el inodoro³¹.

Finalmente, la emisión de las plantas de producción de fármacos se ha considerado de menor importancia. Solamente se conocen casos puntuales de fábricas productoras de fármacos en Asia donde se han

²⁹ Kümmerer K, Helmers E. Hospital effluents as a source for platinum in the environment. *Science of the Total Environment*, 1997, 193:179–184.

³⁰ Greiner P, Rönnefahrt I. Management of Environmental Risks in the Life Cycle of Pharmaceuticals. European Conference on Human and Veterinary Pharmaceuticals in the Environment, Lyon, 2003.

³¹ Office of National Drug Control Policy: <http://www.whitehouse.gov/ondcp>.

³² Metzger JW. Drugs in municipal landfills and landfill leachates. In: Kümmerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment. Sources Fate Effects and Risks*, second ed. Springer, Berlin Heidelberg New York, 2004.

encontrado niveles del orden de los mg L^{-1} para compuestos específicos^{33,34} especialmente para el caso de antibióticos.

1.2 Presencia y Fuentes de Contaminantes en el Medio Ambiente.

Como se ha dicho anteriormente, la principal fuente de contaminación por fármacos en el medio ambiente ocurre a través de las EDARs³⁵. Las EDARs no ofrecen tratamientos eficientes que permitan eliminar tanto a los fármacos³⁶⁻³⁹, como a los disruptores endocrinos⁴⁰, de modo que estos compuestos eventualmente alcanzarán las aguas superficiales y subterráneas, y plantas de tratamiento de agua potable, que tampoco están diseñadas para eliminar estas sustancias.

En Europa, los fármacos más prescritos son los antibióticos y los analgésicos/anti-inflamatorios. Existe una correlación positiva entre el consumo de fármacos y la frecuencia y concentraciones con los que se encuentran en los influentes que llegan a las EDARs. La Fig. 1.6 muestra

-
- ³³ Larsson DG, De Pedro C, Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 148:751–755.
- ³⁴ Li D, Yang M, Hu J, Ren L, Zhang Y, Chang H, Li K. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27: 80–86.
- ³⁵ Palmer PM, Wilson LR, O'Keefe P, Sheridan R, King T, Chen C-Y. Sources of pharmaceutical pollution in the New York City Watershed. *Science of the Total Environment*, 2008, 394:90–102.
- ³⁶ Ternes TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 1998, 32:3245–3260.
- ³⁷ Nakada N, Shinohara H, Murata A, Kiri K, Managaki S, Sato N, Takada H. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, 2007, 41:4373–4382.
- ³⁸ Xu W, Zhang G, Li X, Zou S, Li P, Hu Z, Li J. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Research*, 2007, 41:4526–4534.
- ³⁹ Lenz K, Mahnik SN, Weissenbacher N, Mader RM, Krenn P, Hann S, Koellensperger G, Uhl M, Knasmüller S, Ferk F, Bursch W, Fuerhacker M. Monitoring, removal and risk assessment of cytostatic drugs in hospital wastewater. *Water Science and Technology*, 2007, 56:141–149.
- ⁴⁰ Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken R-D, Servos M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*, 1999, 225:81–90.

las concentraciones de varias familias de fármacos en influentes de EDARs reportados en publicaciones desde 1998 a la fecha⁴¹. En líneas generales, las concentraciones de fármacos en las aguas superficiales y efluentes de las EDARs se encuentran en el rango de ng L^{-1} a mg L^{-1} .

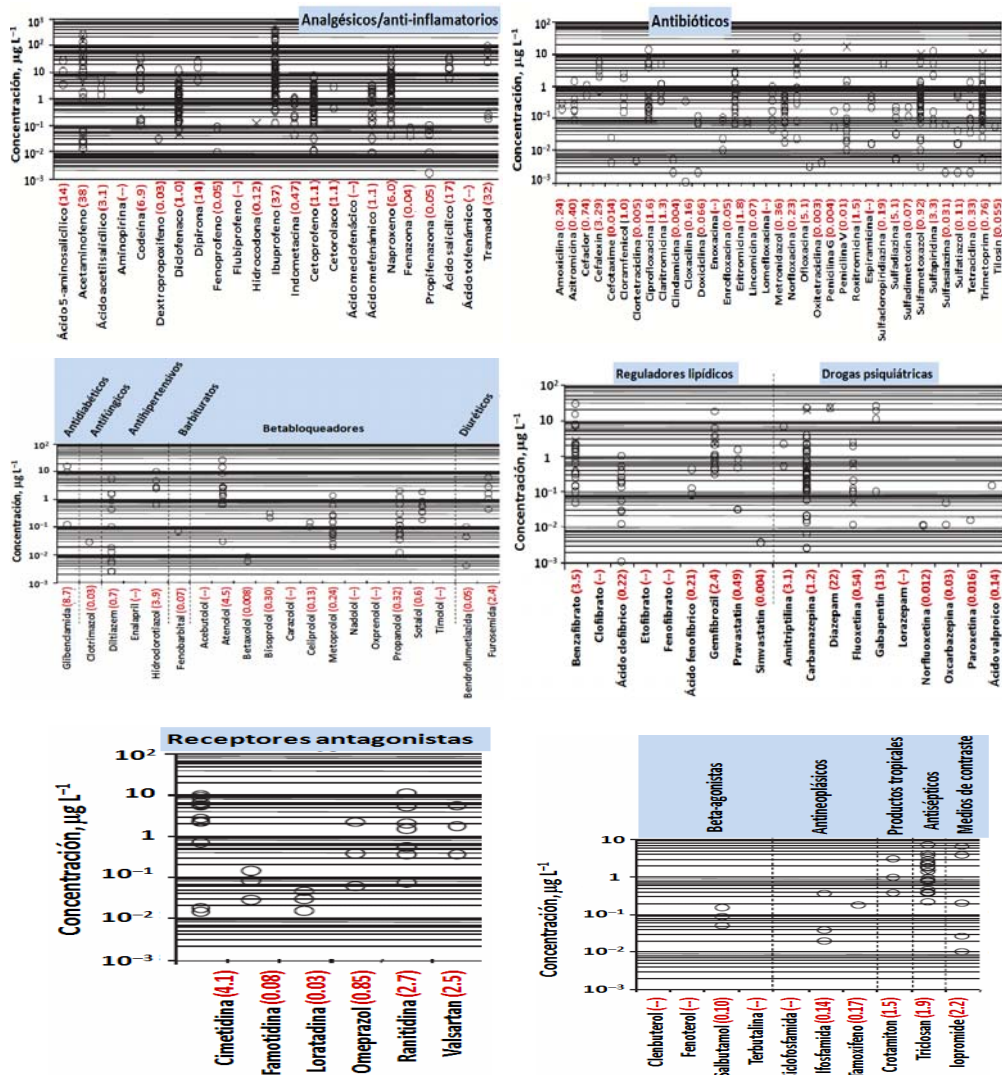


Figura 1.6. Concentraciones de fármacos y productos de cuidado personal agrupados por familias en influentes de EDARs (o se refiere a CAS y x a MBR). Los valores entre paréntesis corresponden al promedio.

⁴¹ Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Science of the Total Environment*, 2012, 429:123–155.

En relación a los disruptores endocrinos, los compuestos más encontrados son hormonas, como el 17β -estradiol, estrona y estriol; así como fármacos estrogénicos como tamoxifeno y noretindrona, siempre en el orden de los cientos de ng L^{-1} . También se suelen encontrar importantes cantidades (del orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$) de triclosan y compuestos químicos de síntesis industrial como el BFA, los ftalatos (DEHP y BBP), el nonilfenol y el octilfenol (también en el rango de los $\mu\text{g L}^{-1}$). La Tabla 1.1 muestra la presencia y destino de importantes disruptores endocrinos en varios sistemas de aguas, encontrados en publicaciones desde 1999 hasta 2009⁴².

⁴² Liu Z-H, Kanjo Y, Mizutani S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Science of the Total Environment*, 2009, 407:731-748.

Tabla 1.1. Presencia y destino de EDCs de importancia en varios sistemas de aguas a concentraciones de ng L^{-1} .

EDCs	Agua superficial	Agua subterránea	Agua potable	EDARs		
				Influentes	Efluentes	Eliminación (%)
E1 (Estrona) Estrógeno natural	< 0.1-3.4	n.d-120	0.2-0.6	25-132	2.5-82	- 22 to 95
	0.2-6.6	n.d-4.5		44	17	61 (media)
	< 0.3-7.2	n.d-1.6		29-670	n.d ^a -72	- 111 to 100
	5-12			19-78	1-96	- 55 to 98
	1.4-12.9			20-130	< 0.3-11	- ^b
	< 17-38			n.d-18.3	n.d-6.7	64-100
	n.d-7.4			57.8-83.3	6.3-49.1	41-89
	n.d-4.6			4-33	0-147	-
	1.1-3.0			230-510	n.d	100
E2 (17 β -etinilestradiol) Estrógeno natural	< 0.3-5.5	n.d-45	0.2-2.1	4.0-25	0.35-3.5	59-98
	0.6-1.0	6-66	2.6	11	1.6	85 (media)
	< 0.8-1.0	13-80	n.d-2.6	35-125	n.d-30	44-100
	2-6	n.d-0.79		2.4-26	0.2-14.7	- 18.5 to 98.8
	n.d-8.8			17-150	< 0.8	-
	< 0.7-1.7			22.0	0.95	96 (media)
	1.6-15.5			n.d-161.6	n.d-5.4	52-99
	n.d-3.8			0-11	0-158	-
17α-E2 (17 α -etinilestradiol) Estrógeno natural	< 0.1-3.0	n.d-0.21	0.3	< 0.7-15	< 0.4	-
	< 0.3-0.4			n.d-1	n.d-38	-
	n.d-25			n.d	n.d	-
	0.15-2.0					
E3 (Estriol) Estrógeno natural	2-5	n.d-0.16	-	24-188	0.43-18	77-99
	n.d-3.3			72	2.3	97 (media)
	n.d-3.1			23-48	n.d-1	96 (media)
	n.d-1.7			23-660	n.d-275	18-100
	n.d-1.9			138-381	< 1-4.9	> 7
	1.0-2.5			2-22	0-29	-
EE2 (Etinilestradiol) Fármaco	< 0.1-4.3	n.d-0.94	0.15-0.5	0.40-13	n.d-1.7	52-100
	< 0.3-0.4			4.9-7.1	2.7-4.5	33-45
	n.d-1			< 0.3-5.9	< 0.3-2.6	-
	5.7-30.8			3-70	n.d-5	33.3-100
	0.1-5.1			< 0.7-14.4	< 0.7-4.1	71-93
	n.d-4.6			n.d-1.2	n.d-0.6	55
	1.1-2.9			0-2	0-178	-
	2060					
Noretindrona Fármaco androgénico	< 872	-	-	26-224	0-159	-
	< 10			n.d	n.d	-
Tamoxifen Fármaco estrogénico	n.d-3			-	53-205	-
	27-212			143-215	146-369	- 158 to 7
BPA Químico industrial	< 8.8-1000	n.d-7	0.5-2.0	332-339	13-36	90 (media)
	0.5-14	n.d-930	5	250-5620	< 43-4090	92 (media)
	n.d-600			720-2376	16-1840	10-99
	15-29			281-3642	6-50	90-98
	65-295			88-438	11-1054	-
	n.d-5.7			450-3300	610-710	53-55
Nonilfenol Químico industrial	< 110-4100	n.d-3.1e6	2.5-16	4194-8768	1120-2235	75 (media)
	6.7-134	n.d-1500		240-19000	550-1500	50 (media)
	n.d-890			1570-27,411	426-4926	33-94
	1289-1466			14,728-41,207	n.d-90,043	-
	1.3-21.3			2100-4500	300-400	84-93
Octilfenol Químico industrial	< 50-4300	n.d-42	0.2-4.9	183-321	281-358	- 96 to 13
	0.8-54			< 270-13000	< 450-1300	0 (media)
	n.d-41			300-> 6704	37.5-180	55-98
	0.04-1.1			n.d-796	n.d-240	- 11 to 100

Por otro lado, los contaminantes orgánicos también pueden encontrarse adsorbidos a los fangos de desecho, siendo éstos, importantes puntos de acumulación en el medio ambiente. La Fig. 1.7 muestra un resumen de las concentraciones publicadas en biosólidos en los últimos 15 años⁴³. Las concentraciones están presentadas en escala logarítmica en orden descendiente de las concentraciones medias, que van desde alcanos policlorados (PCAs, g Kg^{-1} masa seca) hasta naftalenos policlorados (PCNs, $\mu\text{g Kg}^{-1}$ masa seca).

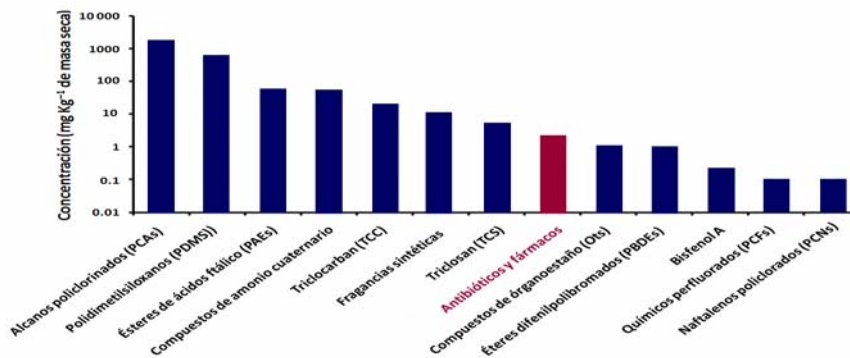


Figura 1.7. Concentraciones típicas de contaminantes orgánicos emergentes en fangos de desecho (mg Kg^{-1} de masa seca).

En cuanto a los PPCPs, un estudio realizado por la US EPA demostró que las concentraciones de estas sustancias en biosólidos es variada, yendo desde unos pocos $\mu\text{g Kg}^{-1}$ hasta mg Kg^{-1} , siendo los contaminantes más abundantes los desinfectantes, triclosan y triclocarban, seguidos de los antibióticos. Aunque este estudio se realizó en los Estados Unidos, representa de una forma correcta también a los niveles de contaminantes en biosólidos para Europa y Australia⁴⁴.

⁴³ Clarke BO, Smith SR. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International*, 2010, 37:226–247.

⁴⁴ Langdon KA, Warne MStJ, Kookana RS. Aquatic hazard assessment for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting compounds from biosolids-amended land. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2010, 6:663–676.

Los antibióticos son metabolizados en mayor o menor extensión por los seres humanos y los animales. La tasa de excreción de los principios activos intactos varía, dependiendo del tipo, en un amplio rango (10–90%). Se estima que como media, los antibióticos se metabolizan en un 30%⁴⁵. A menudo los metabolitos suelen ser más solubles en agua, de modo que se eliminan con mayor frecuencia a través por la orina. La toxicidad de los metabolitos en relación a los compuestos intactos varía dependiendo del tipo de fármaco. Además, los antibióticos se caracterizan por ser sólo parcialmente transformados y eliminados durante el tratamiento en las EDARs, ya que las propiedades de las que depende su actividad farmacológica, son las mismas que los convierten en compuestos resistentes a ser degradados. De forma que si no son eliminados en los tratamientos terciarios, aparecerán en las aguas tratadas y reingresarán en el medio acuático, en todos sus niveles: aguas superficiales, subterráneas y de consumo humano^{46,47}. Se ha determinado la existencia más de 160 antibióticos en los efluentes de las EDAR, en las aguas superficiales y en las subterráneas⁴⁸.

Por otro lado, los fangos de desecho producidos por las EDARs que hayan recibido algún tipo de tratamiento, como digestión o compostaje, pueden ser empleados como fertilizante para suelos agrícolas. De este modo, los residuos de fármacos que quedan adsorbidos a los sólidos son introducidos al suelo, pudiendo experimentar fenómenos de lixiviación por acción del riego o la lluvia, incrementando la concentración de

⁴⁵ Kümmerer K, Henninger A. 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *Clinical Microbiology and Infection*, 2003, 9:1203–1214.

⁴⁶ Christian T, Schneider RJ, Färber HA, Skutlarek D, Meyer MT, Goldbach HE. Determination of antibiotics residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 2003, 31:34–44.

⁴⁷ Heberer T. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 2002, 131:5–17.

⁴⁸ Kümmerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges–Review. *Journal of Environmental Management*, 2009, 90:2354–2366.

fármacos, principalmente antibióticos, en las aguas⁴⁹. Además, en el caso de los residuos de fármacos veterinarios, éstos pueden ingresar a la cadena alimenticia a través de la carne, el marisco, el pescado los huevos y la leche. En este caso específico, le corresponde a la US FDA, la "European Medicines Agency" (EMA) y a otras entidades con funciones similares, ejercer el control correspondiente. Por ejemplo, en 2002, la Unión Europea suspendió la importación de camarones desde Asia por los elevados niveles de antibióticos que se encontraron en ellos^{50,51}. Por otro lado, la presencia de antibióticos en los fangos también inhibe la producción de biogas durante la digestión anaeróbica, elevando el costo del tratamiento de los fangos en las EDAR⁵². Las Fig. 1.8 y 1.9 presentan esquemas que muestran las fuentes, rutas y transformación de los fármacos en el medio acuático y terrestre.

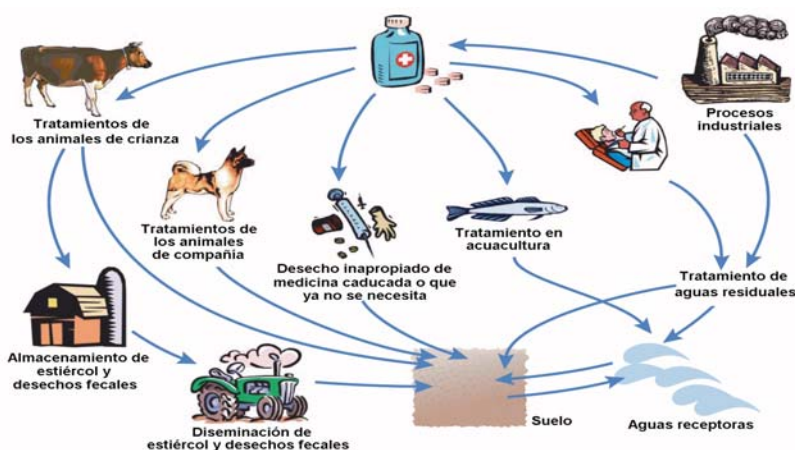


Figura 1.8. Rutas que siguen los fármacos a su llegada al medio ambiente.

⁴⁹ Farré M, Pérez S, Kantiani L, Barceló D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27:991-1007.

⁵⁰ European Commission. Commission decision of 30 January 2002 concerning certain protective measures with regard to products of animal origin imported from China. Official J. L 30, 2002.

⁵¹ European Commission; Commission Decision of 20 December 2002 concerning certain protective measures with regard to the products of animal origin imported from China. Official J. L 348, 2002.

⁵² Lalli A, Mura G, Onnis N. The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry. *Bioresource Technology*, 2002, 82:205-208.

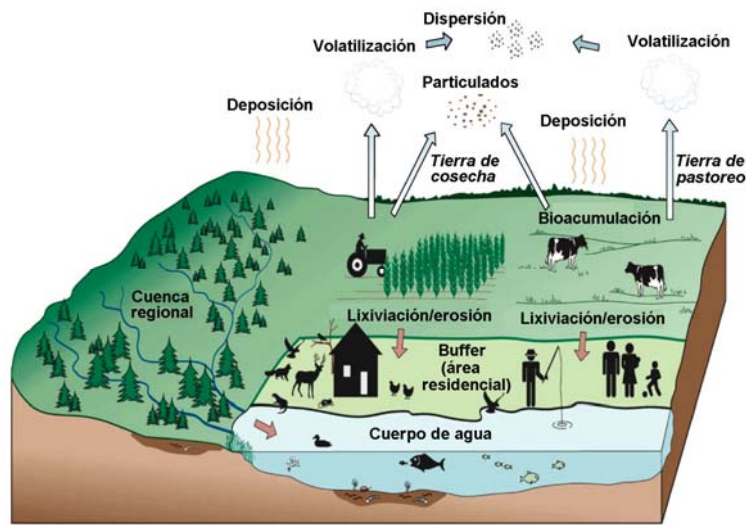


Figura 1.9. Aplicación agrícola de biosólidos (se muestran las 14 rutas de exposición a contaminantes orgánicos en este ambiente establecidas por la US EPA).

Se conoce muy poco sobre la presencia, destino y actividad biológica de los metabolitos. Se desconoce si glucorónidos, metilatos, glicinatos, acetilatos y sulfatos son hidrolizados por las bacterias durante el tratamiento en las EDARs o en el medio ambiente, ya que esto daría lugar a liberación del compuesto activo.

En relación a los disruptores endocrinos que no se encuentran en la categoría de fármacos, como son el bisfenol A y sus derivados, los ftalatos, los retardantes de llama (e.g. tetrabromobisfenol A, TBBPA; y difeniléteres polibromados, PBDE), y los componentes de los plásticos; así como diversos productos de cuidado personal, producen una contaminación directa. Esta situación incrementa su peligrosidad, pues el problema no radica solamente en que los tratamientos de aguas de residuales sean ineficientes, sino del uso directo de un determinado producto, al cual se está habituado y que forma parte indispensable de la vida cotidiana. Además, estos compuestos por su alto carácter lipofílico, tienen gran tendencia a bioacumularse, por lo que la

exposición humana ocurre también a través de la cadena alimenticia, al consumir productos marinos y carne, por contacto con polvo doméstico y por exposición ocupacional⁵³⁻⁵⁵. Algunos químicos ya han sido prohibidos o eliminados de la producción hace muchos años, pero aún persisten en el medio ambiente. Es el caso del Aroclor⁵⁶, prohibido en los Estados Unidos en 1977, y que todavía puede encontrarse en el medio ambiente, incluso en niveles de mg Kg⁻¹. La exposición humana a EDCs ha permitido que se les haya encontrado en tejidos y fluidos biológicos, como líquido amniótico, placenta y cordón umbilical, tejido adiposo, leche materna, saliva y orina, en elevadas concentraciones⁵⁷.

Muchos EDCs son sustancias químicas de gran producción, que se usan en miles de productos de la vida cotidiana. El bisfenol A, por ejemplo, está presente en los plásticos de los recipientes para bebidas y comidas y en los revestimientos de la comida enlatada⁵⁸. La Tabla 1.2 presenta estimaciones basadas en estudios realizados de la exposición de BFA a través de la comida⁵⁹⁻⁶³.

⁵³ Baccarelli A, Pesatori AC, Bertazzi PA. Occupational and environmental agents as endocrine disruptors: experimental and human evidence. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2000, 23:771-781.

⁵⁴ Hwang HM, Park EK, Young TM, Hammock BD. Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in indoor dust. *Science of the Total Environment*, 2008, 404:26-35.

⁵⁵ Yang CZ, Yaniger SI, Jordan VC, Klein DJ, Bittner GD. Most plastic products release estrogenic chemicals: a potential health problem that can be solved. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119:989-996.

⁵⁶ Wolff MS. Occupational exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs). *Environmental Health Perspectives*, 1985; 60:133-138.

⁵⁷ Talsness CE, Andrade Anderson JM, Kuriyama SN, Taylor JA, Von Saal FS. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 2009, 364:2079-2096.

⁵⁸ Von Goetz N, Wormuth M, Scheringer M, Hungerbühler K. Bisphenol A: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk Analysis*, 2010, 30(3):473-487.

⁵⁹ Geens T, Apelbaum TZ, Goeyens L, Neels H, Covaci A. Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2010, 27(11):1627-1637.

⁶⁰ Higuchi M, Miyata D, Kawamura S, Ueda E, Imanaka M, Tonogai Y. Estimation of daily intake of phenols in hospital meal samples. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2004, 45(6):339-343.

⁶¹ Lim DS, Kwack SJ, Kim KB, Kim HS, Lee BM. Risk assessment of bisphenol a migrated from canned foods in Korea. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues*, 2009, 72(21/22):1327-1335.

Tabla 1.2. Medición de la ingesta de BFA basado en el análisis de alimentos enlatados combinado por estudios de consumo.

País	Tipo de comida	Ingesta promedio (ng/Kg _{masa corporal} /día)	Ingesta elevada (ng/Kg _{masa corporal} /día)
Bélgica	Comida y bebidas enlatadas	15	86 (p.95)
Nueva Zelanda	Comida y bebidas enlatadas	8	290 (max)
Corea	Comida enlatada	25	---
España ^a	Comida enlatada y recipientes para microondas	18	78 (max)
Japón	Comidas preparadas de hospitales	8	---

^a No basado en niveles encontrados en la comida, sino en estudios de migración.

Las botellas de policarbonato también contribuyen notablemente a la exposición de BFA en adultos⁶⁴, mientras que para los niños, la exposición de BFA por los biberones de policarbonato, actualmente ya prohibidos, se considera la más importante⁵⁸. Las condiciones más importantes que favorecen la migración de BFA son la temperatura, el pH del alimento, el tiempo de contacto, la cantidad de revestimiento y las condiciones de fabricación y procesamiento^{65,66}. Por otro lado, no hay consenso acerca de la influencia del envejecimiento del recipiente y la liberación de BFA, sin embargo, se ha demostrado que los residuos de detergente en la superficie del recipiente después del lavado incrementa la liberación de BFA⁶⁵. Sin embargo, en ningún caso se han publicado

⁶² Mariscal-Arcas M, Rivas A, Granada A, Monteagudo C, Murcia MA, Olea-Serrano F. Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47(2):506-510.

⁶³ Thomson BM, Grounds PR. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*, 2005, 22(1):65-72.

⁶⁴ Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang JY, Ye XY, Calafat AM, Michels KB. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environmental Health Perspectives*, 2009, 117(9):1368-1372.

⁶⁵ Aschberger K, Castello P, Hoekstra E, Karakitsios S, Munn S, Pakalin S, Sarigiannis D. Bisphenol A and Baby Bottles: Challenges and Perspectives. European Commission-Joint Research Centre-Institute for Health and Consumer Protection, 2010.

⁶⁶ Goodson A, Robin H, Summerfield W, Cooper I. Migration of bisphenol A from can coatings—effects of damage, storage conditions and heating. *Food Additives and Contaminants*, 2002, 21(10):1015-1026.

valores que excedan el límite de migración legal establecido, incluso en condiciones extremas^{67,68}. Se ha publicado que la concentración de BFA en orina aumenta en un 66% después del consumo de bebidas a través de botellas de policarbonato durante una semana⁶⁹.

Los niveles de BFA son también elevados en la sangre de los pacientes sujetos a tratamientos de hemodiálisis⁷⁰, debido al continuo contacto con el material de plástico de los catéteres y las membranas. Por otro lado, las enzimas de la saliva pueden liberar el BFA de los empastes dentales. Un estudio ha demostrado que el 81.4% del bis-DMA se convierte en BFA tras sólo 24 h de contacto⁷¹. Varios estudios han medido concentraciones de BFA en saliva después de la aplicación de empastes dentales, siendo 1 h el tiempo mínimo de detección^{69,72}.



Figura 1.10. Nuevas alternativas al uso de polímeros a base de BFA.

⁶⁷ Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, Gauthier BR, Lalonde K, Lalonde PJ. Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2009, 26(6):928-937.

⁶⁸ Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters*, 2008, 176(2):149-156.

⁶⁹ Geens T, Goeyens L, Covaci A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2011, 214(5):339-347.

⁷⁰ Murakami K, Nishi S, Sasaki M, Shimozato S, Takahashi H, Takahashi K, Kasugai M, Kawamura N, Asano S, Kushimoto H, Hasegawa M, Tomita M, Nabeshima K, Hiki Y, Sugiyama S. Accumulation of bisphenol A in hemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2005, 20:V316-V317.

⁷¹ Schmalz G, Preiss A, Arenholt-Bindslev D. Bisphenol-A content of resin monomers and related degradation products. *Clinical Oral Investigations*, 1999, 3(3):114-119.

⁷² Zafra A, Del Olmo M, Pulgar, R, Navalón A, Vilchez JL. Determination of bisphenol-A and related compounds in human saliva by gas chromatography mass spectrometry. *Chromatographia*, 2002, 56, (3/4):213-218.

La exposición dérmica y oral al BFA a través del papel térmico también es posible, habiéndose determinado que en algunos casos, esta fuente es más importante que por el uso de recipientes de plástico. La US EPA⁷³ ha iniciado ya programas para evaluar la seguridad y alternativas al uso del papel térmico, ya que también puede constituir una fuente de exposición ocupacional en las personas que trabajan como cajeros⁷⁴, a quienes se les ha detectado concentraciones muy elevadas de BFA en la orina.

Como conclusión, y a la vista de los datos ya publicados y confirmados, la exposición directa del ser humano a los EDCs es ubicua e inevitable, ya que vivimos rodeados de EDCs⁷⁵, por lo que la preocupación creciente que causa está completamente justificada.



Figura 1.11. Vivimos en el "mundo de los plásticos", que constituyen uno de los tipos de desecho más abundantes y persistentes en el medio ambiente.

⁷³ US Environmental Protection Agency. BPA alternatives in thermal paper partnership, 2011.

⁷⁴ Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Bernert JT, Ye X, Silva MJ, Barr DB, Sathyanarayana S, Lanphear BP. Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(1):131-137.

⁷⁵ Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessì-Fulgheri F, Fernández M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC. Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of Neuroendocrinology*, 2012, 24:144-159.

Otra importante fuente de contacto de los seres vivos con los EDCs, es la contaminación del medio ambiente. Muchos compuestos ingresan en las aguas residuales a través de la orina y las heces⁷⁶; y por la hidrólisis de los plásticos o la degradación natural de los mismos, de forma que se pueden encontrar en grandes cantidades en los sistemas acuáticos y en los efluentes de los vertederos⁷⁷. En España, por ejemplo, se han detectado niveles de BFA en el rango de 51.6–207.6 ng L⁻¹ en aguas subterráneas⁷⁸. Otras fuentes importantes de BFA en el medio ambiente son el desecho de productos como el papel higiénico (se han encontrado concentraciones de BFA hasta de 46.1 µg g⁻¹ en este material)⁷⁹ o los desechos de fábricas (en fábricas japonesas se han encontrado concentraciones de próximas a los 370 µg L⁻¹)⁸⁰.

1.3 Mecanismos de Eliminación de Contaminantes Orgánicos en el Medio Ambiente.

1.3.1 Eliminación de Fármacos.

El destino ambiental y la potencia biológica de los fármacos dependen de sus propiedades físicoquímicas específicas. Estas propiedades incluyen el polimorfismo, su introducción al medio ambiente después de ser metabolizados, su estructura química compleja, su capacidad de ionización y la presencia de grupos funcionales. A parte de

⁷⁶ Meesters RJ, Wa HFS. Simultaneous determination of 4-nonylphenol and bisphenol a in sewage sludge. *Analytical Chemistry*, 2002,74:3566–3574.

⁷⁷ Wintgens T, Gallenkemper M, Melin T. Occurrence and removal of endocrine disrupters in landfill leachate treatment plants. *Water Science and Technology*, 2003, 48:127–134.

⁷⁸ Gonzalez-Casado A, Navas N, Del Olmo M, Vilchez JL. Determination of bisphenol-A in water by micro liquid–liquid extraction followed by silylation and gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatographic Science*, 1998, 36:565–569.

⁷⁹ Gehring M, Vogel D, Tennhardt L, Weltin D, Bilitewski B. Bisphenol A contamination of wastepaper, cellulose and recycled paper products. *Waste Management and the Environment*, 2004, Ii:293–300.

⁸⁰ Fukazawa H, Hoshino K, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y. Identification and quantification of chlorinated bisphenol-A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere*, 2001,44:973–979.

la degradación y transformación biológica en las EDARs, otros procesos no biológicos pueden conducir a la eliminación de sustancias químicas de las aguas residuales y superficiales (Fig. 1.12). Entre ellos se encuentran la adsorción (e.g. fangos, suelos y sedimentos), la hidrólisis, la oxidación, la volatilización, la fotodegradación y la complejación con metales y compuestos orgánicos. La volatilización es importante especialmente en el caso de algunos productos de cuidado personal volátiles como las fragancias⁸¹. Para el resto de fármacos, este mecanismo tiene una contribución prácticamente despreciable.

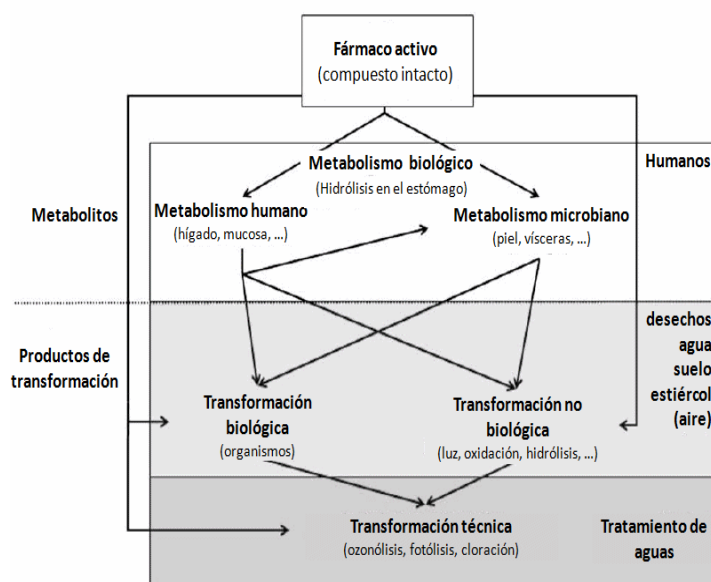


Figura 1.12. Metabolitos y productos de transformación de fármacos en el medio ambiente.

Adsorción. La caracterización de los procesos de adsorción es crucial para el entendimiento de la distribución ambiental y la toxicidad potencial de estos compuestos en sistemas terrestres y acuáticos. La adsorción de contaminantes persistentes en fangos, suelos y sedimentos

⁸¹ Larsen TA, Lienert J, Joss A, Siegrist H. How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Biotechnology*, 2004, 113:295–304.

tiene un efecto crítico sobre su destino ambiental, con impacto directo sobre la biodisponibilidad, transporte por el agua y velocidad de transformación durante el tratamiento de las aguas residuales. El potencial de adsorción depende de la especiación de los compuestos en formas neutras y cargadas, así como de las características físicoquímicas de la matriz sólida a la que se adsorben⁸²⁻⁸⁴.

En el caso de los antibióticos, la adsorción es especialmente afectada por la cantidad y naturaleza de partículas libres y suspendidas en la fase acuosa y la materia orgánica, así como la proporción de iones y los coeficientes de distribución (K_d)⁸³. La unión a las partículas o la formación de complejos puede causar una pérdida en su detectabilidad, así como la pérdida de la actividad antibacteriana. Por ejemplo, se ha demostrado que cuando un antimicrobiano usado en acuicultura llega al mar, forma complejos con los iones magnesio y calcio⁸⁵. Estas características no sólo son importantes desde el punto de vista de que el compuesto pueda o no ser posteriormente (bio)degradado, sino porque muestra la problemática de que los antibióticos puedan potencialmente "inactivarse" cuando son aplicados, lo cual es especialmente importante cuando se usan en ambientes acuáticos (acuicultura).

Por otro lado, $\log K_{ow}$ no es suficiente para establecer la capacidad de adsorción y el comportamiento de distribución de los antibióticos en el medio ambiente. En general, la capacidad de adsorción depende de la estructura química de los compuestos. Los antibióticos son moléculas complejas que pueden contener grupos ácidos y básicos dentro de la

⁸² Tolls J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental Science and Technology*, 2001, 37:3397–3406.

⁸³ Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2003, 166:145–167.

⁸⁴ Ter Laak TL, Wouter AG, Tolls J. The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25:904–911.

⁸⁵ Lunestad BT, Goksøyr J. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1990, 9:67–72.

misma molécula, de modo que las interacciones iónicas se convierten en mecanismos posibles de adsorción. Por esta razón, la medida de la capacidad de adsorción o distribución entre dos fases tales como agua-fango o agua-suelo ($\log K_d$) depende del pH. Algunos fármacos además tienen estructuras aromáticas planas en la molécula, que favorecen los *fenómenos de intercalación*. Estas capacidades de adsorción no son medidas adecuadamente por $\log K_{ow}$, ya que también están gobernadas por factores como el pH, el potencial redox, la estereoquímica de la molécula y la naturaleza química del adsorbente y el fármaco.

Contrario a lo que se indica de acuerdo a su $\log K_{ow}$, las quinolonas (e.g. ciprofloxacina) presentan una gran capacidad para adsorberse a las matrices sólidas⁸⁶, hecho esperable para compuestos con $\log K_{ow}$ por encima de 3 ó 4, y no por debajo de 2, como es el caso para la mayoría de las quinolonas⁸⁷. Estos compuestos son eliminados en una proporción superior al 50% por adsorción a los fangos de desecho durante el tratamiento de las aguas residuales.

Se conoce muy poco sobre los efectos y el comportamiento de los antibióticos adsorbidos a los biosólidos, ni bajo qué condiciones se adsorben o se convierten en (bio)disponibles y activos. Además se tiene mucha menos información en relación a sus metabolitos y conjugados.

Biodegradación/biotransformación. Las sustancias que llegan al medio ambiente pueden sufrir diferentes reacciones, resultando en su transformación parcial o completa y/o degradación (incluyendo la mineralización completa). Las bacterias y los hongos son los dos grupos de microorganismos que tienen la mayor capacidad para degradar

⁸⁶ Golet EM, Alder AC, Giger W. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36:3645-3651.

⁸⁷ Hu J, Wang W, Zhu Z, Chang H, Pan F, Lin B. Quantitative structure-activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(13):4806-4812.

compuestos orgánicos, siendo las bacterias preadaptadas normalmente las más eficientes en los procesos biodegradativos. Sin embargo, la presencia de fármacos en el medio ambiente es una importante evidencia de que su degradación y eliminación es incompleta durante del tratamiento de aguas residuales. Se ha determinado que más de 20 antibióticos pertenecientes a las más importantes familias no son biodegradables en una importante extensión^{88,89}.

Los procesos de biodegradación están íntimamente relacionados con las características de la biomasa; la estructura de los compuestos; el tipo de tratamiento que reciban; la configuración de la planta y los parámetros de operación, por ejemplo, las condiciones de aireación, la existencia de tratamientos terciarios avanzados (e.g. oxidación, radiación); el tiempo de retención hidráulica (HRT) y la edad del fango (SRT), que son los que determinan las diferencias fundamentales que existen entre el tratamiento convencional (CAS) y los basados en la tecnología de membrana (e.g. biorreactores de membrana, MBRs). Los SRT generalmente son más prolongados para los MBRs (15–80 d) con respecto a CAS (7–20 d), hecho determinante para la composición de la microbiota y la concentración de biomasa, que generalmente es mayor para MBR (8–10 Kg m⁻³) con comparación con CAS (3–5 Kg m⁻³).

Finalmente, también se ha demostrado la transformación fotolítica de los fármacos⁹⁰, determinándose que los productos de transformación hidroxilados son los residuos más importantes después del tratamiento fotocatalítico de antibióticos, analgésicos y diuréticos.

⁸⁸ Al-Ahmad A, Daschner FD, Kümmerer K. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of wastewater bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 37:158–163.

⁸⁹ Alexy R, Kämpel T, Kümmerer K. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere*, 2004, 57:505–512.

⁹⁰ Méndez-Arriaga F, Esplugas S, Giménez J. Photocatalytic degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs with TiO₂ and simulated solar irradiation. *Water Research*, 2008, 42:585–594.

1.3.2 Eliminación de EDCs.

La mayoría de estas sustancias no son eliminadas por completo, permaneciendo en los efluentes tratados, de modo que su descarga puede ser la razón principal de su amplia distribución y presencia en los sistemas acuáticos en general. En la tabla 1.1 se ha mostrado la eficiencia en la eliminación de los EDCs más importantes en las EDARs.

Se sabe que la eliminación de EDCs depende de tipo de tratamiento, así como de las condiciones de operación, siendo el tratamiento biológico mucho más efectivo que otros métodos, lo cual ha sido demostrado para el caso de estrógenos⁹¹. También se ha observado que la biodegradación de estrógenos y otros EDCs depende fuertemente de las condiciones redox (grado de aireación) y el tipo de microbiota existente, ya que la eliminación bajo condiciones aeróbicas es mucho más eficiente que en anaeróbicas⁹², y la biodegradación ocurre en mayor extensión bajo condiciones nitrificantes⁹³. Aunque está demostrado que para el caso del BFA, la biodegradación juega un rol importante en su eliminación durante el tratamiento de las aguas residuales, en los estudios contemplados en esta memoria se ha confirmado la mayor eficiencia en su eliminación mediante tecnologías como los biorreactores de membrana (MBRs) en comparación con los tratamientos convencionales, debido a que las condiciones de operación favorecen grandemente los procesos biológicos⁹⁴⁻⁹⁸, logrando inclusive

⁹¹ Johnson AC, Williams RJ, Simpson P, Kanda R. What difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers. *Environmental Pollution*, 2007;147:194-202.

⁹² Ermawati R, Morimura S, Tang YQ, Liu K, Kida K. Degradation and behavior of natural steroid hormones in cow manure waste during biological treatments and ozone oxidation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 103:27-31.

⁹³ Yi T, Harper WF. The link between nitrification and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41:4311-4316.

⁹⁴ Chen J, Huang X, Lee D. Bisphenol A removal by a membrane biorreactor. *Process Biochemistry*, 2008, 43:451-456.

⁹⁵ Lyko S, Wintgens T, Melin T. Estrogenic trace contaminants in wastewater-possibilities of membrane bioreactor technology. *Desalination*, 2005, 178:95-105.

⁹⁶ Schröder HFr. The elimination of the endocrine disrupters 4-nonylphenol and bisphenol A during wastewater treatment-Comparison of conventional and membrane assisted

que más del 90% del BFA sea eliminado de las aguas por microorganismos nativos de los fangos activados. Sin embargo, se propone para estudios futuros, la aplicación de microorganismos específicos en el sistema para degradar EDCs, hecho que junto al uso de tratamientos más eficientes, podría favorecer la degradación completa de los EDCs. Se han aislado ya muchas cepas de bacterias capaces de degradar BFA en aguas residuales⁹⁹, muchas de las cuales lo utilizan como única fuente de carbono, por ejemplo la cepa MV-1¹⁰⁰. Otra cepa de *Pseudomonas paucimobilis*, la FJ-4, aislada de una fábrica de resinas epoxi¹⁰¹, es capaz de producir metabolitos de BFA con una actividad biológica considerablemente menor.

Debido a que durante los procesos de transformación biológica, muchos EDCs pueden transformarse en otras sustancias biológicamente activas¹⁰², además de la determinación analítica directa, se debe recurrir a la medida de la actividad estrogénica, a través de ensayos biológicos *in-vitro*, que aportan información directa de la actividad estrogénica, indistintamente de los compuestos que los causan. Los tests más usados son el ensayo de unión al receptor de estrógenos ("ER-binding")¹⁰³, el

biological wastewater treatment followed by an ozone treatment. *Water Practice & Technology*, 2006, 1:1–9.

⁹⁷ Spring AJ, Bagley DM, Andrews RC, Lemanik S, Yang P. Removal of endocrine disrupting compounds using a membrane bioreactor and disinfection. *Journal of Environmental Engineering Science*, 2007, 6:131–137.

⁹⁸ Zhou Y, Huang X, Zhou H, Chen J, Xue W. Removal of typical endocrine disrupting chemicals by membrane bioreactor: in comparison with sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 2011, 64:2096–2102.

⁹⁹ Spivack J, Leib TK, Lobos JH. Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269:7323–7329.

¹⁰⁰ Lobos JH, Leib TK, Su TM. Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58:1823–1831.

¹⁰¹ Ike M, Jin CS, Fujita M. Isolation and characterization of a novel bisphenol A-degrading bacterium *Pseudomonas paucimobilis* strain FJ-4. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 1995, 31:203–212.

¹⁰² Johnson A, Sumpter J. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatmentworks. *Environmental Science and Technology*, 2001, 35:4697–4703.

¹⁰³ Leusch FD, Chapman HF, Heuvel V, Tan BL, Gooneratne SR, Tremblay SA. Bioassay derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 65:403–411.

ensayo de E-screen¹⁰⁴, el de "Yeast Estrogen Screen" (YES)¹⁰⁵ o el MVLN¹⁰⁶.

Todas las ventajas tecnológicas que se pueden tener en la innovación en la biodegradación de EDCs de las aguas, se encuentran limitadas por la elevada tendencia que tienen estas sustancias a quedar adsorbidas a los fangos activados, por lo que la mayor problemática radica en su eliminación durante el tratamiento de los fangos. Entre las tecnologías que se emplean se encuentran procesos térmicos, químicos y mecánicos que aunque son bastante eficientes en la eliminación de BFA y otros EDCs, demandan el uso de mucha energía por lo que son costosos, además de ser complejos en su ejecución¹⁰⁷. La mayoría de los tratamientos están limitados a costosos métodos como la oxidación fotocatalítica, la oxidación Fenton¹⁰⁸, la ozonización o la cloración¹⁰⁹⁻¹¹¹. Además normalmente se requiere del uso secuencial o en paralelo de varios de estos tratamientos, lo cual incrementa aun más los costos.

Una alternativa en estudio actualmente es el uso directo de enzimas; como las *lacasas*, eficientes en la degradación de derivados

¹⁰⁴ Soto AM, Lin TM, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C. Ed. *Princeton Scientific Publishing* 295 (1992). Patente USA 4,859,585.

¹⁰⁵ Spengler P, Körner W, Metzger JW. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants. Chemical analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20:2133-2141.

¹⁰⁶ Cargouet M, Perdiz D, Asmaa MS, Sara TK, Levi Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment*, 2004, 324:55-66.

¹⁰⁷ Weemaes M, Verstraete W. Evaluation of current wet sludge disintegration techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1998, 73:83-92.

¹⁰⁸ Gözmen B, Oturan MA, Oturan N, Erbatur O. Indirect electrochemical treatment of bisphenol A in water via electrochemically generated Fenton's reagent. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37:3716-3723.

¹⁰⁹ Deborde M, Rabouan S, Duguet JP, Legube B. Kinetics of aqueous ozone induced oxidation of some endocrine disruptors. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39:6086-6092.

¹¹⁰ Zhan MJ, Yang X, Xian QM, Kong LR. Photosensitized degradation of bisphenol A involving reactive oxygen species in the presence of humic substances. *Chemosphere*, 2006, 63:378-386.

¹¹¹ Korshin GV, Kim J, Gan L. Comparative study of reactions of endocrine disruptors bisphenol A and diethylstilbestrol in electrochemical treatment and chlorination. *Water Research*, 2006, 40:1070-1078.

fenólicos en las aguas residuales¹¹²; o *esterasas*, en la degradación de contaminantes orgánicos componentes de los plásticos. Sin embargo, se piensa que estos tratamientos serían más efectivos, incluyendo los aspectos económicos, en el tratamiento de fangos para la producción de VAPs, y no para su uso en el tratamiento de aguas residuales, ya que los microorganismos que producen estas enzimas podrían ser aislados a partir de la gestión de los fangos.

1.3.3 Eficiencia en la Eliminación de PPCPs de las Aguas Durante el Tratamiento de Aguas Residuales.

La Fig 1.13 muestra la eficiencia de eliminación de los grupos más importantes de fármacos.

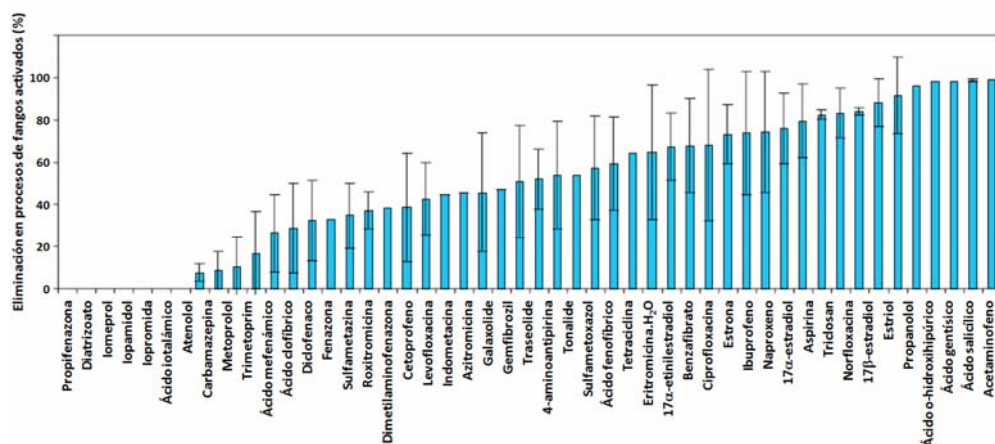


Figura 1.13. Eficiencia de eliminación promedio (%) de PPCPs de las aguas en EDARs (procesos CAS).

En líneas generales, la mayor parte de estas observaciones se basan en estudios con el tratamiento CAS, ya que sólo el 8% de los estudios sobre eliminación de PPCPs se han hecho en MBRs.

¹¹² Bollag JM, Shuttleworth KL, Anderson DH. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54:3086–3091.

Entre los compuestos que son eliminados más eficientemente de las aguas residuales destacan triclosan, norfloxacin, 17 β -estradiol y estriol (80–90%). El BFA se elimina en alrededor del 70%¹¹³. Los antibióticos, en líneas generales, constituyen el grupo de fármacos más persistentes que existe, lo cual se concluye principalmente a partir de estudios en CAS, ya que la investigación en MBRs es muy escasa.

Por otro lado, casos como la ciprofloxacina, tetraciclinas o norfloxacin, modifican su comportamiento de adsorción a lo largo del proceso de depuración¹¹⁴. Además, muchos de los metabolitos que se encuentran en las aguas residuales sufren rupturas enzimáticas durante el tratamiento para liberar a los compuestos originales biológicamente activos. Esto explicaría por qué en algunos casos, las concentraciones de fármacos en los efluentes pueden llegar a ser mayores que lo que ingresó con las aguas residuales.

En relación a los disruptores endocrinos, la eliminación de las hormonas es bastante elevada, en promedio entre 67–80% para CAS y 60–90% en MBRs. El estradiol es el compuesto más eliminado (80% en promedio para CAS y 99% en MBRs). Triclosan también es eliminado en gran extensión, superando el 98% en ambos, CAS y MBR.

1.3.4 Destino Final de PPCPs Durante el Tratamiento en EDARs.

En la Tabla 1.3 se muestra el destino final de algunos fármacos y EDCs durante los tratamientos secundarios, adsorción a fangos y descarga en los efluentes secundarios.

¹¹³ Gomez MJ, Martnez Bueno MJ, Lacorte S, Fernandez-Alba AR, Agüera A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 2007, 66:993–1002.

¹¹⁴ Plósz BG, Leknes H, Thomas KV. Impacts of competitive inhibition, parent compound formation and partitioning behaviour on antibiotic micro-pollutants removal in activated sludge. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44:734–742.

Tabla 1.3. Eliminación de fármacos durante tratamientos secundarios, adsorción a fangos y descarga en los efluentes secundarios.

Clase terapéutica	Compuesto	Edad del lodo	Transformación biológica (%)	Adsorción al lodo (%)	% en efluente
Analgésicos y anti-inflamatorios	Diclofenaco	4-60	5-45	<5	55-95
		6	25	<5	70-75
		16	10	5	85
		<20	5	0	95
		>50	10-30	0	70-90
	Ibuprofeno	4-60	90-100	<5	0-10
		2	<5	<5	95-100
		10-55*	95-100	<5	0-5
		<20	35-40	0	60-65
		>50	95	0	5
	Indometacina	6	27	0	73
		16	40	<5	58-60
	Cetoprofeno	6	70	0	30
		16	<95		5-10
	Ácido mefenámico	6	65	7	28
		16	55-58	<30	<20
	Naproxeno	10-30	55-85	<5	15-45
		6	77	0	23
		16	95-98	0	<5
		<20	5	0	95
>50		85-90		10-15	
Antibióticos	Aztromicina	10-30	<40	<10	60-90
		6	0	0	100
	Cloramfenicol	10-12	<10	70-80	≤30
		20	<10	77	<4
	Ciprofloxacina	<20	<10	<5	75-90
		>50	90	<5	10
	Claritromicina	<20	<10	≤10	>90
		6	0	18	82
		16	0	<45	55-60
		20-25	19	65	17
		<20	20		80
	Lomefloxacina	20-25		60	40
		6	15-18		100
	Norfloxacina	16			82-85
		10-12	<10	80-90	≤20
	Ofloxacina	20	<10	72	<4
		20-25		60	40
	Roxitromicina	4-30	<60	<5	>35
		<20	18	2	80
	Sulfametazina	6	<85	0	<20
16		15-18	20	60-65	
Sulfametoxazol	4-12	50-90	<5	10-50	
	<20	20	0	80	
Sulfapiridina	10-30	≤70	<10	≥30	
	<50	~90	≤5	~10	
Trimetoprim	<20	<10	≤5	>90	
	6	40	<5	<60	
Antidiabéticos	Glibenclamida	16	38-40	5-10	50-55
		<20	18		72
Antihipertensivos	Enalapril	6	95-98	<10	90-95
		16	95-98	60	40
Betabloqueadores	Hidroclorotiazida	6		100	2-5
		16		100	2-5
Betabloqueadores	Atenolol	6	<70	<5	<35
		6	~35	0	~65
	Metoprolol	16	0	0	100
		6	35-40	<5	60
	Nalodol	16	70	30	
		6	10	<5	<90
	Timolol	16	<50	<5	50
6		<40	<5	<65	
Diuréticos	Furosemida	16	40-45	0	55-60
		6	35-40	<5	60-65
Reguladores lipídicos	Benzafibrato	16	75-80	2-5	20
		6	12	2	86
		16	<80	<5	20-25
	Fenofibrato	2	45-50	<5	50
		6	0	100	0
	Gemfibrozil	16	25-30	65-70	
		6	0	3	97
	16	90	<5	5-10	

Tabla 1.3 (continuación)

Clase terapéutica	Compuesto	Edad del lodo	Transformación biológica (%)	Adsorción al lodo (%)	% en efluente
Drogas psiquiátricas	Pravastatin	6	45	0	55
		16	62	2	<40
	Carbamazepina	4-60	<40	<5	>60
		6	22	3	75
		16	0	5	95
	Diazepam	6	0	42	58
		16		65	35
	Fluoxetina	<20	80	0	20
Receptores antagonistas		>50	90	0	10
	Lorazepam	6	30	<5	65-70
		16	30	5-8	65
	Cimetidina	6	42	4	54
		16	60	5-8	32-35
	Famotidina	6	<10	10	85
		16	80	20	0
	Ranitidina	6	<20	<5	80
Hormonas		16	75	<5	20-25
	Estradiol	10-30	85-99	<5	<15
	Estrona	10-30	35-97	≤5	5-60
	Etinilestradiol	10-30	45-95	≤5	5-50
		<20	25	5	70
Beta-agonistas		>50	80-90	0	10-20
	Salbutamol	6	<60	<5	<45
Agentes de contraste		16	40-42	2	55-60
	Iopromida	10-30	20-95	<5	5-80

* Los datos con asterisco corresponden a sistemas MBR.

Se puede observar que la adsorción a los fangos es la ruta de menor importancia para el grupo de fármacos seleccionados en la tabla, debido a sus características hidrofílicas ($\text{Log } K_{ow} < 2.5$)⁴¹, por lo que su eliminación por adsorción es bastante baja ($< 20\%$). Los compuestos con $K_d > 500 \text{ L Kg}^{-1}$ ($\text{Log } K_d > 2.7$) tienen la potencialidad de adsorberse a las partículas de los lodos¹¹⁵. Para el caso de la mayoría de las moléculas seleccionadas en la tabla, los valores de $\text{Log } K_d$ son menores de 2.7, lo que confirma su poca tendencia a adsorberse a la matriz sólida.

Sin embargo, debido a que a los valores de pH de los tratamientos biológicos está alrededor de 7, algunos de estos compuestos presentan carga neta, y por tanto poseen potencial para formar interacciones iónicas con la superficie de la biomasa. Para los antibióticos de la familia de las quinolonas (e.g. lomefloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin y ofloxacin), la eliminación por adsorción está en el rango de 60-100%. Existen muchas evidencias que permiten concluir que los

¹¹⁵ Ternes TA, Joss A. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances. The challenge of micropollutants in urban water management. IWA Publishing, London, 2006, 468 pp.

antibióticos son altamente resistentes a ser degradados¹¹⁶, y su eliminación durante el proceso en los fangos activados se asume que se debe a la formación de flóculos por la actividad microbiana, a través de interacciones hidrofóbicas e iónicas¹¹⁶. Estos antibióticos tienen elevados $\text{Log } K_d (> 4)$. Para compuestos con un elevado potencial de adsorción, la eficiencia de eliminación por este mecanismo en un MBR puede ser ligeramente mayor debido a la ausencia de sólidos suspendidos en el efluente¹¹⁷, pero también porque la biodegradación es mayor. Existe un particular interés en estudiar este tipo de compuestos, ya que el que se queden retenidos en las fracciones sólidas durante el tratamiento no logra eliminarlos definitivamente del medio ambiente, por lo que se han realizado estudios exhaustivos al respecto en la presente memoria.

Finalmente, y de acuerdo al estudio de una gran variedad de compuestos orgánicos, se ha relacionado la estructura química de la molécula con la capacidad de eliminación de un compuesto por biodegradación. Así, los grupos funcionales como ésteres, nitrilos y alcoholes aromáticos pueden incrementar la biodegradabilidad de los compuestos orgánicos, mientras que las aminas aromáticas, yoduros y nitro- o azocompuestos incrementan la persistencia del mismo¹¹⁸. También se ha publicado¹¹⁹ que las cadenas laterales largas y altamente ramificadas, las estructuras aromáticas complejas y los grupos halogenados, hacen al compuesto más persistente. Sin embargo, estas tendencias son sólo aproximaciones y compuestos que pertenecen a la misma clase pueden comportarse de manera diferente.

¹¹⁶ Jia A, Wan Y, Xiao Y, Hu J. Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, 2012, 46:387-394.

¹¹⁷ Clara M, Strenn B, Ausserleiter M, Kreuzinger N. Comparison of the behaviour of selected micropollutants in a membrane bioreactor and a conventional wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, 2004, 50:29-36.

¹¹⁸ Tunkel J, Howard PH, Boethling RS, Stiteler W, Loonen H. Predicting ready biodegradability in the Japanese ministry of international trade and industry test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19:2478-2485.

¹¹⁹ Jones OAH, Voulvoulis N, Lester JN. Human pharmaceuticals in wastewater treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2005, 35:401-427.

1.4 Unión Europea y Contaminantes Emergentes.

Se ha demostrado que en los influentes que llegan a las EDARs, se encuentran una gran variedad de contaminantes, y que las EDARs comunes (CAS) no son capaces de eliminarlos de manera eficiente. Por tanto, los efluentes secundarios que se descargan están contaminados.

Desde un punto de vista legislativo, es importante tener en cuenta que las Directivas que tienen que ver con la protección de los ambientes acuáticos y los organismos relacionados, como la "*Water Framework Directive 2000/60/EC (WFD)*"¹²⁰, la Directiva 2006/118/EC (GWD)¹²¹ para protección de aguas subterráneas, y la Directiva 2008/105/EC (PSD)¹²², para aguas superficiales; no incluyen a los fármacos entre los compuestos dentro de los planes de seguimiento. Probablemente debido a la falta de conocimiento de sus efectos. De modo que el siguiente paso debe ser la revisión de estas listas y la definición de nuevos estándares de calidad ambiental ("*Environmental Quality Standards*", EQS) basados en los riesgos importantes en los ambientes acuáticos de acuerdo al Art.16 de la WFD.

La reciente inclusión de fármacos y estrógenos sintéticos dentro de la lista de la Unión Europea para sustancias prioritarias es un paso importante e implica la definición de los correspondientes EQSs y la necesidad de que estén sujetos a un plan de seguimiento completo en el medio ambiente (agua, sedimentos y biota) en diferentes países de la Unión Europea, de ahí la importancia del desarrollo de técnicas analíticas

¹²⁰ Directive 2000/60/EC of October 23, 2000 of the European Parliament and of the Council establishing a framework for community action in the field of water policy O.J. L 327, December 22, 2000 (FWD).

¹²¹ Directive 2006/118/EC of December 12, 2006 of the European Parliament and of the Council on the protection of groundwater against pollution and deterioration.

¹²² Directive 2008/105/EC (PSD) of December 16, 2008 of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of European parliament and of the Council.

altamente sensibles, así como estudios de campo que evalúen todas sus posibilidades de eliminación en las EDARs, y las rutas potenciales de reingreso al medio ambiente.

Adicionalmente, grupos como la Comisión de Oslo y París (OSPAR) ya han incluido antibióticos, drogas psiquiátricas y receptores antagonistas en sus listados de sustancias prioritarias. La "*Global Water Research Coalition*" (GWRC)¹²³, incluye en su lista a antibióticos como la ciprofloxacina. También se han definido procedimientos de priorización nacional en diversos países europeos que consideran a los fármacos en base a su riesgo potencial que poseen en los ambientes acuáticos^{124,125}. Todos estos intentos proporcionan un buen comienzo para reenfocar los esfuerzos de control de la contaminación hacia los compuestos orgánicos emergentes, los cuales, requerirán que se realicen nuevos estudios que ofrezcan datos sobre mutagenicidad, ecotoxicidad y toxicidad aguda, crónica o letal. Estas investigaciones no sólo permitirán confirmar la presencia y los niveles en los que se encuentran estas sustancias en el medio ambiente, sino que en combinación con la ecotoxicidad permitirán refinar los datos de establecimiento de riesgo ambiental.

En relación a la presencia de contaminantes en los fangos de desecho, aunque existen regulaciones para el uso de estos fangos como fertilizantes agrícolas¹²⁶, los requerimientos están limitados a estudios de patógenos, metales y algunos compuestos orgánicos, sin incluir al grueso de contaminantes emergentes. En los últimos tiempos, se han incluido algunas mejoras, como por ejemplo, el limitar la reutilización de

¹²³ GWRC. Development of an international priority list of pharmaceuticals relevant for the water cycle. Available from: <http://edepot.wur.nl/138086>, 2008.

¹²⁴ Ashton D, Hilton M, Thomas KV. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, 2004, 333:167-184.

¹²⁵ Richardson SD, Ternes TA. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 2011, 83:4614-4648.

¹²⁶ Council of the European Communities (1986) Council directive 86/278/EEC of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. Official J L 181:0006-0012

los fangos a aquellos que hayan recibido tratamientos avanzados, como compostaje, digestión aeróbica o la estabilización con caliza¹²⁷.

La Unión Europea está desarrollando proyectos para promover la aplicación de los fangos de desecho en agricultura, pero para ello debe ganarse el interés y la confianza de la seguridad de su uso a través del desarrollo de metodología analítica validada para determinar la concentración de contaminantes emergentes, considerando que existen muy pocas que cubren un gran espectro de sustancias y que cumplen con los requerimientos de ser sensibles y fiables.

Toda investigación que se haga a partir de ahora hace necesario prestar especial atención a varios puntos como: (i) el desarrollo de métodos analíticos que permitan determinar una amplia variedad de contaminantes a niveles traza en todos los compartimientos ambientales (aguas residuales, efluentes, fangos de desecho, sedimentos, suelos); (ii) evaluar los mecanismos de eliminación de estas sustancias mediante tecnologías que resulten ser más eficientes que CAS; (iii) definir tipos de tratamientos avanzados y condiciones de operación que favorezcan la eliminación definitiva de estas sustancias del medio ambiente, especialmente de las más persistentes; (iv) definir PNECs para un amplio espectro de compuestos; (v) evaluar el impacto ambiental de las mezclas de diferentes contaminantes en distintos ambientes; (vi) evaluar el efecto crónico de las mezclas para la vida acuática; y (vii) sugerir opciones para controlar las fuentes de contaminación para reducir la cantidad y variedad de estos contaminantes en el ciclo del agua.

¹²⁷ Matthews P (1997) Transatlantic comparison of biosolids practices. Proceedings Water Residuals and Biosolids Management: Approaching the Year 2000 WEF/AWWA Joint Conference, Aug 3-6, Philadelphia, Pennsylvania, 16-9/32.

2. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES. DESTINO DE FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL EN EL MEDIO AMBIENTE.

2.1. Calidad y Tratamiento del Agua.

El agua es parte del ciclo vital de los seres vivos y un recurso económico de gran importancia. La protección de los recursos hídricos es por lo tanto una de las piedras angulares de la salud y la seguridad ambiental. Desde la época romana existe una conciencia de la importancia de la gestión del agua residual para mejorar la higiene. Por eso, para proteger la salud pública, y posiblemente, aunque en menor extensión, para mejorar la calidad de vida en las ciudades, ellos crearon lo que es probablemente el sistema de alcantarillado más antiguo de la historia. La "*Cloaca Maxima*", una alcantarilla de 600 m de largo, fue construida alrededor del año 600 A.C. con el objeto de drenar los pantanos locales y eliminar los desechos de Roma¹²⁸. Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX, época en la que las consecuencias sobre la salud de las descargas de agua residuales no tratadas se volvieron evidentes, cuando se comenzaron a diseñar y construir los sistemas de alcantarillado modernos. A pesar de las grandes mejoras que se han realizado desde el siglo XIX, los problemas relacionados con las aguas residuales son inherentes a la existencia de las mismas; por ejemplo, se observan problemas de eutrofización (por encima del 40%) en mares, ríos y lagos¹²⁹ como consecuencia de los vertidos realizados.

¹²⁸ Hopkins JNN. The Cloaca Maxima and the monumental manipulation of water in archaic Rome. *The Waters of Rome*, 2007, 4:1-15.

¹²⁹ Commission of the European Communities. Implementation of Council Directive 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment, as amended by

El tratamiento de aguas residuales es actualmente regulado en Europa por la directiva del consejo 91/271/EEC¹³⁰. En este documento, se establece la calidad mínima requerida para el agua que procede de los efluentes de las EDARs. Sin embargo, dicha norma no es cumplida satisfactoriamente por todos los países. Por ejemplo, en el caso de España, de acuerdo a datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en 2009, sólo el 21% de las EDARs cuentan con tratamientos terciarios y/o avanzados, a diferencia de países escandinavos como Dinamarca, donde las EDARs con tratamiento terciario se encuentra en alrededor de un 86%¹³¹.

La calidad del agua se mide en términos de sólidos suspendidos totales (TSS), carbono orgánico total (TOC), iones amonio, fosfato, nitratos y nitrito, demanda bioquímica de oxígeno (BOD), pH, metales, microorganismos (e.g. bacterias coliformes fecales)¹³². Sin embargo, como ya se ha mencionado, sólo algunas leyes regulan el nivel máximo de los contaminantes orgánicos, no incluyéndose en ellas a la mayoría de los PPCPs. La falta de un amplio conocimiento acerca de estas sustancias, especialmente el que no existan técnicas analíticas sensibles para detectar su presencia en matrices ambientales y sobre todo en las diferentes etapas del tratamiento de las aguas residuales, hace que las EDAR no hayan sido diseñadas específicamente para eliminar estos fármacos y productos de cuidado personal de manera efectiva y definitiva de las aguas, haciendo que aparezcan compuestos como los fármacos en los ambientes acuáticos a niveles de concentración de los ng L^{-1} .

Commission Directive 98/15/EC of 27 February 1998. Report COM (2004) 248 final. European Commission, Brussels, 2004.

¹³⁰ The Council of the European Communities. Council Directive concerning urban waste water treatment (91/271/EEC), 1991: <http://ec.europa.eu/environment/water/water-urbanwaste/directiv.html>.

¹³¹ European Environmental Agency. Effectiveness of urban wastewater treatment policies in selected countries: an EEA pilot study. EEA Report No 2/2005. European Commission, Copenhagen, 2005.

¹³² Lindquist A. Chemical Water and Wastewater Treatment. Iwa Publishing, 1st Ed., United Kingdom, 2007, 416 pp.

2.2. Descripción de una EDAR.

Una EDAR tiene dos líneas principales de trabajo; *la línea de agua*, donde se realiza el tratamiento de depuración de las aguas residuales y *la línea de fangos* donde se da tratamiento a los fangos de desecho, para convertirlos en materia prima para la producción de fertilizantes para suelos agrícolas, combustibles, para recibir tratamientos avanzados como el compostaje o para la producción de productos de valor añadido¹³³. Algunas depuradoras también tienen una *línea de gas*, donde se produce biogas que sirve como fuente de energía para los mismos procesos que ocurren en la EDARs, logrando autoabastecerse y conseguir un ahorro energético. En la figura 2.1 se presenta una vista aérea de una EDAR de la ciudad de Granada, donde se ha realizado parte del trabajo de investigación contemplado en esta memoria, así como también se presentan los esquemas generales de depuración de aguas residuales y tratamiento de los fangos de desecho.

¹³³ Productos de valor añadido ("Value-added products", VAPs) incluyen a biopesticidas u otros agentes para control biológico, enzimas industriales, bioplásticos y otros biopolímeros, que se pueden utilizando fangos de desecho que han recibido un tratamiento adecuado.

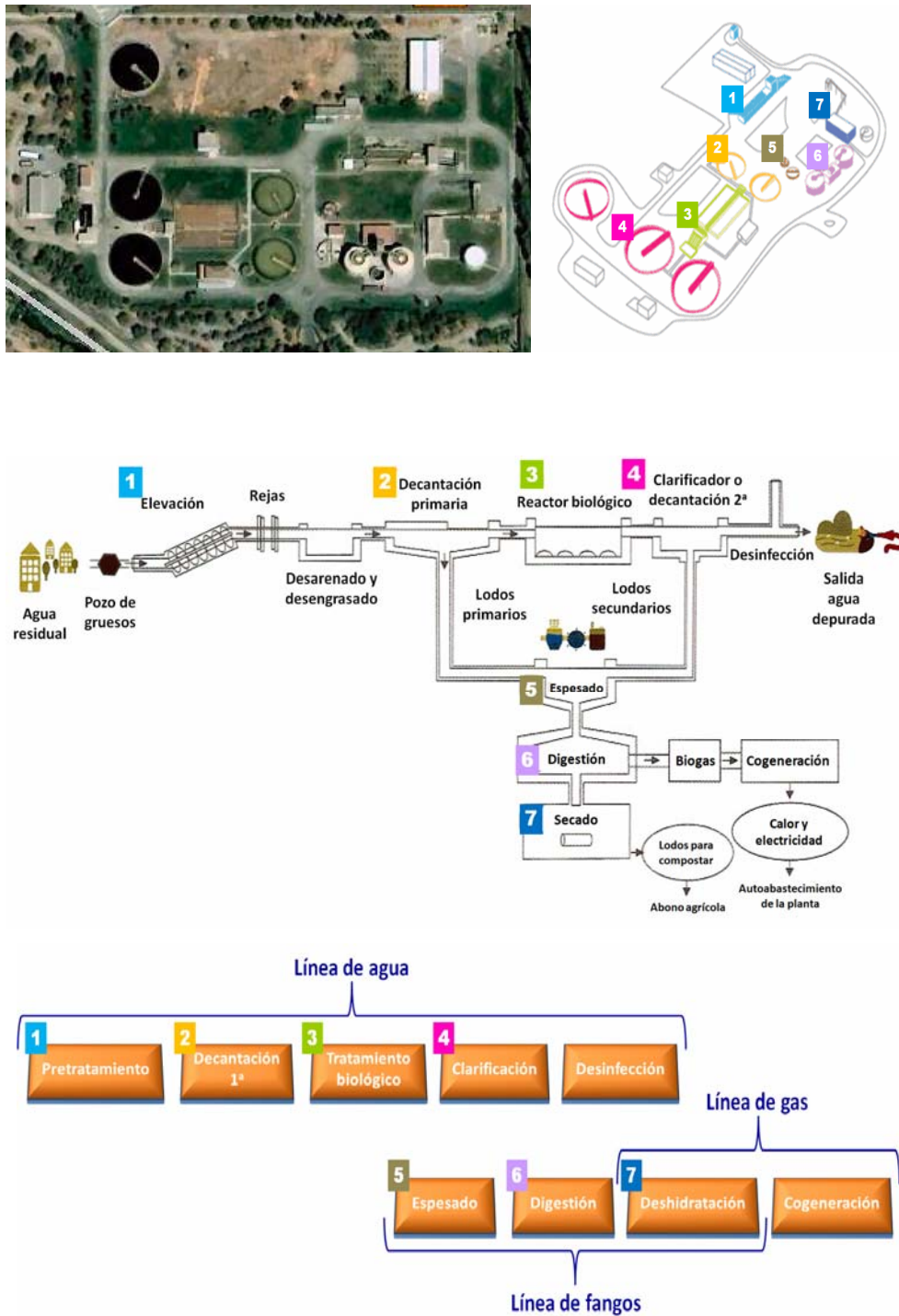


Figura 2.1. Vista aérea y esquema de una EDAR de la ciudad de Granada. Tratamientos que tienen lugar.

Las EDARs pueden estar equipadas con etapas de tratamientos primario, secundario y terciario. El *tratamiento primario*, también llamado tratamiento físico, incluye la eliminación de las aguas de objetos de gran tamaño, sólidos flotantes y sólidos suspendidos (de ambos tipos, finos y gruesos). Este tratamiento puede también eliminar las grasas. El *tratamiento secundario* consiste en el proceso biológico donde se produce la separación de los efluentes de los fangos de desecho que contiene a los microorganismos junto con los contaminantes residuales que no fueron degradados durante el proceso. El *tratamiento terciario* elimina contaminantes que no fueron degradados por el tratamiento secundario, especialmente compuestos de nitrógeno y fósforo, e incluye tratamientos químicos y filtros de arena, entre otros métodos. Durante este tratamiento, microorganismos tales como patógenos y virus son también eliminados mediante procedimientos de desinfección¹³⁴.

2.2.1. Tratamiento Primario.

Este tratamiento conlleva a la eliminación de objetos grandes, habitualmente mediante tratamiento mecánico automático. El proceso se lleva a cabo en dos pasos: *i)* eliminación de contaminantes gruesos, y *ii)* etapa de sedimentación. En la primera etapa, los objetos grandes son retirados, como latas, restos de frutas, ramas, hojas, etc. A continuación, se eliminan las arenas para evitar un daño posterior de la maquinaria que tratará el agua, como por ejemplo, las bombas. En este proceso, la gravedad, la velocidad y la aireación se usan para separar la arenilla de los sólidos orgánicos. Este paso se lleva a cabo en una cámara, donde el flujo del agua que entra es controlado para permitir que la arena y las piedras pequeñas sedimenten, quedando la mayoría del material orgánico en el agua. Al final del tratamiento mecánico, muchas plantas cuentan con una etapa de sedimentación, donde el agua

¹³⁴ Spellman FR. Handbook of Water and Wastewater Plant Operations. CRC Press, 2nd Ed., Boca Raton, 2009, 826 pp.

pasa a través de tanques grandes (llamados clarificadores primarios o decantadores primarios) (Fig 2.2). La función de este tanque de sedimentación es eliminar las partículas en suspensión (entre el 40–60% de TSS)¹³⁵. Dado que en la composición de dichas partículas hay materia orgánica, su eliminación lleva asociada una reducción de la BOD de entrada en aproximadamente un 35%. El flujo lento del agua permite que las partículas suspendidas sedimenten, mientras que los aceites y las grasas de la superficie también son retirados.

En resumen, el objetivo del tratamiento primario es producir un líquido más homogéneo, que pueda ser tratado biológicamente, y un fango que también pueda ser tratado posteriormente. En algunos casos, el tratamiento primario incluye un tratamiento químico.



Figura 2.2. Tratamiento primario. (a) Sistema de desarenado y desengrasado. Poza de decantación primaria, (b) llena y (c) vacía.

2.2.2. Tratamiento Secundario.

Este tratamiento está diseñado para separar y degradar la materia orgánica remanente (*e.g.* azúcares, grasas, compuestos orgánicos de cadena corta, *etc.*), a través de procesos biológicos mediados por microorganismos que emplean los desechos orgánicos como fuente de

¹³⁵ Chereisinoff NP. Handbook of Water and Wastewater Technologies. Butterworth-Heinemann, Boston, 2002, 654 pp.

carbono, convirtiendo la mayoría de materia orgánica en compuestos estables de baja energía¹³⁵. El contenido biológico existente es derivado de los desechos humanos, de los alimentos y detergentes. Los procesos biológicos aeróbicos usualmente son más eficientes que los anaeróbicos, y por lo tanto, son más extensamente usados¹³⁴.

Esta etapa de tratamiento biológico es la que es básica para el éxito en la eliminación de microcontaminantes orgánicos en una EDAR. En Europa, el tratamiento biológico de aguas residuales ha sido adaptado paso a paso durante los últimos 40 años en respuesta a los ajustes impuestos por las regulaciones de la calidad de las descargas. La Fig. 2.3 describe los cambios que han experimentado los tratamientos de agua residual por fangos activados.

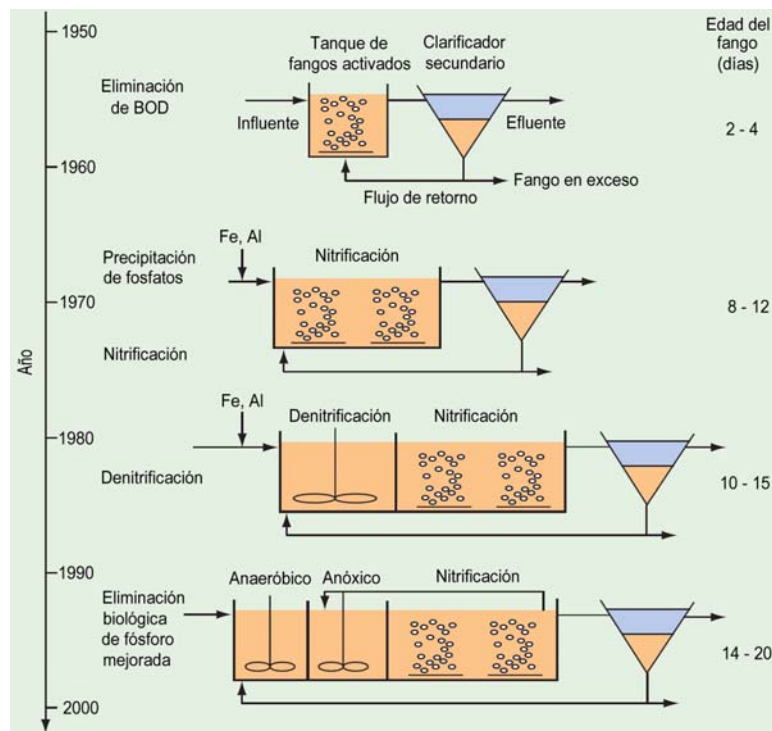


Figura 2.3. Desarrollo histórico del tratamiento de fangos activados en Europa.

En los años 50, las EDARs fueron diseñadas solamente para la eliminación de la BOD. En los años 60, la precipitación química de fosfatos fue incorporada para reducir la carga de este contaminante en las descargas. En los años 70, se incorporaron procesos para convertir el amonio (principalmente derivado de la orina, y que presenta una alta toxicidad para los seres vivos) en nitrato (una forma menos tóxica de nitrógeno). En los años 80, los ingenieros incluyeron métodos para convertir parcialmente el nitrato en nitrógeno molecular. Una mejora en la eliminación biológica de fosfato fue incorporada en los años 90, cuando fue implementada una región anaeróbica.

Hay diferentes diseños para procesos biológicos aeróbicos como tratamiento de fangos activados, biorreactores de membrana (MBR), y tratamiento de película fija o suspendida. El tratamiento secundario debe producir un efluente con no más de 30 mg L^{-1} de BOD y de 30 mg L^{-1} TSS¹³⁴. A continuación se describirán brevemente el tratamiento de fangos activados, que es el más comúnmente usado, y posteriormente el de MBR, que constituye el tratamiento central en el que se basa esta Tesis Doctoral.

A. Tratamiento Convencional de Fangos Activados (CAS). El proceso de fangos activados (Fig. 2.4) hace uso de un fango biológico rico en microorganismos, combinado con el suministro de aire u oxígeno para reducir el contenido de materia orgánica del desecho^{134,135}. Bajo condiciones ideales, se producen procesos de nitrificación, en los que el ion amonio es convertido a nitrato y posteriormente a nitrógeno gaseoso. Esto ocurre comúnmente en el tanque de aireación. Los microorganismos crecen y se reproducen usando el material orgánico como alimento, y al mismo tiempo son mezclados por acción del aire, produciéndose agregación. Estos sólidos biológicos o fangos son más rápidamente sedimentables en los clarificadores secundarios donde son separados del agua residual

tratada. Una fracción del fango es devuelto a la cabeza del sistema de aireación (del 40% al 60% del flujo de agua residual), mientras que el resto se convierte en desecho¹³⁵. Este fango activado de desecho es eliminado del proceso para mantener la razón de biomasa a alimento suministrado (desecho o agua residual) en balance.



Figura 2.4. Tratamiento secundario convencional con fangos activados: reactores biológicos.

2.2.3. Tratamiento Terciario.

El tratamiento terciario suele ser un proceso químico y constituye una etapa final que tiene por objeto incrementar la calidad del efluente, antes de que reingrese en el medio ambiente (mares, ríos, lagos, aguas subterráneas, etc.). En una planta de tratamiento se puede usar más de un tipo de tratamiento terciario. Floculación, carbón activado, ósmosis

inversa, cloración, radiación UV y/o ozonización son ejemplos de estos procesos. Normalmente también se lleva a cabo un tratamiento de filtración con arena al final del tratamiento terciario, con objeto de eliminar la materia suspendida remanente. Estos tratamientos avanzados ayudan además a disminuir las descargas de contaminantes orgánicos, aunque esto repercute en un aumento del coste del proceso por el incremento en el consumo de energía y en las emisiones de CO₂.

A. Coagulación y Floculación. El objetivo es eliminar TSS, BOD, fuentes de fósforo y otras sustancias. En este tratamiento químico se lleva a cabo la coagulación o formación de sólidos, así como la floculación o agregación de partículas^{134,135}. Los agentes floculantes, tales como FeCl₃ o Al(SO₄)₃, son sustancias químicas que se emplean para promover la agregación por generación de coloides, así como la formación de "flóculos", que consisten en la aglomeración de partículas suspendidas en la fase líquida. Los agentes floculantes mejoran por tanto la sedimentación o filtrabilidad de las partículas pequeñas. Generalmente, a una etapa de sedimentación le sigue al proceso de floculación. Durante este proceso, también ocurre la eliminación de las fuentes de fósforo. Después de la floculación y el paso del agua por los tanques de sedimentación, los sólidos remanentes flotantes en el agua son eliminados mediante filtración¹³⁵.

B. Carbón Activo. Este tratamiento consiste en la reducción de materia orgánica, incluyendo compuestos químicos, por adsorción. El principal mecanismo para la eliminación de microcontaminantes orgánicos usando carbón activo es la interacción hidrofóbica. Sin embargo, pueden ocurrir también interacciones de intercambio iónico en la eliminación de solutos polares¹³⁶. La presencia de materia orgánica natural, como ácidos húmicos o fúlvicos, interfiere por competencia

¹³⁶ Crittenden JC, Sanonraj S, Bulloch JL, Hand DW, Rogers TN, Speth TF, Ulmer M. Correlation of aqueous-phase adsorption isotherms. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33:2926-2933.

directa con los sitios de adsorción, disminuyendo la capacidad del carbón activo para adsorber a las sustancias de interés¹³⁷. Otro factor que afecta negativamente a la capacidad de adsorción del carbón activo de algunos microcontaminantes y por tanto a la efectividad del proceso, es la presencia de surfactantes¹³⁷. Las propiedades de estos compuestos los hacen buenos disolventes para compuestos orgánicos poco solubles y por lo tanto, es obligatorio considerar su presencia en este tipo de sistemas.

C. Ósmosis Inversa. Es el proceso por el cual el agua atraviesa una membrana semipermeable por aplicación de presión a una disolución concentrada mientras que las sales y otras sustancias químicas son retenidas por la membrana¹³⁸. La ósmosis inversa puede eliminar más del 99% de los compuestos disueltos en el agua, incluyendo coloides. Las principales desventajas de esta técnica son los procesos de ensuciamiento de la membrana y fundamentalmente, el alto costo.

D. Pantanos Artificiales (“Wetlands”). La aplicación de los efluentes secundarios a tratamientos por pantanos artificiales se ha presentado como alternativa efectiva a los costosos y complicados tratamientos avanzados¹³⁹, aunque tiene como inconveniente el requerir áreas extensas¹⁴⁰. El suelo y el clima pueden ser factores críticos en el éxito de este tratamiento¹³⁴. Los pantanos incluyen cañaverales que han sido diseñados específicamente, proporcionando un alto grado de mejora en el tratamiento biológico aeróbico.

¹³⁷ Zhang YP, Zhou JL. Removal of estrone and 17 β -estradiol from water by adsorption. *Water Research*, 2005, 39:3991–4003.

¹³⁸ Russell DL. *Practical Wastewater Treatment*, Wiley-Interscience, 1st Ed., Hoboken, 2006, 288 pp.

¹³⁹ Verhoeven JTA, Meuleman AFM. Wetlands for wastewater treatment: opportunities and limitations. *Ecological Engineering*, 1999, 12:5–12.

¹⁴⁰ Matamoros V, Garcia J, Bayona JM. Organic micropollutan removal in a full-scales surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Research*, 2008, 42:653–660.

E. Desinfección. El propósito de la desinfección en el tratamiento de aguas residuales es proteger la salud pública reduciendo el número de microorganismos en las aguas que retornan al medio ambiente. Los métodos comunes de desinfección incluyen cloración, luz ultravioleta, y en menor extensión, ozonización.

La **cloración** constituye la forma más común de desinfección de aguas residuales a nivel mundial, debido a su bajo costo y su efectividad^{134,141}. A pesar de que es bien conocido que la cloración puede contribuir a la eliminación de muchos compuestos orgánicos (e.g. disruptores endocrinos), también tiene algunas desventajas, como la generación de subproductos o compuestos orgánicos clorados perjudiciales para los seres humanos y el medio ambiente, ya que existen evidencias de que pueden ser carcinogénicos y mutagénicos¹⁴²⁻¹⁴⁴, pudiendo presentar además propiedades estrogénicas¹⁴⁵. Por tanto, se hace necesario identificar los metabolitos o productos de las reacciones de cloración y evaluar la magnitud de los posibles perjuicios^{146,147}. Se ha observado que en algunos casos los subproductos de reacción son más tóxicos que los compuestos de origen, y se generan incluso a mayores

¹⁴¹ Lenz K, Beck V, Fuerhacker M. Behaviour of bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (4-NP) and oxidative water treatment processes. *Water Science & Technology*, 2004, 50(5): 141-147.

¹⁴² McGeehin MA, Reif JS, Becher JC, Mangione EJ. Case control study of bladder cancer and water disinfection methods in Colorado. *American Journal of Epidemiology*, 1993, 138:492-501.

¹⁴³ Cantor KP, Hoover R, Hartge P, Mason TJ, Silverman DT, Altman R, Austin DF, Child MA, Key CR, Marrett LD, Myers MH, Narayana AS, Levin LI, Sullivan JW, Swanson GM, Thomas DB, West DW. Bladder cancer, drinking water source, and tap water consumption - a case control study. *Journal of National Cancer Institute*, 1987, 79:1269-1279.

¹⁴⁴ Park JH, Kang KS, Lee YS. Mutagenicity of water samples from five cities in Korea. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2001, 63:767-771.

¹⁴⁵ Itoh S, Yoshimura Y, Okada T, Tsujimura Y. Detection of estrogenic effect formation potential in chlorinated drinking water. 2nd IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Treatment Technologies. IWA, Prague, Czech Republic, 2004, 60-62.

¹⁴⁶ Moriyama K, Matsufuji H, Chino M, Takeda M. Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol. *Chemosphere*, 2004, 55:839-847.

¹⁴⁷ Hu JY, Cheng SJ, Aizawa T, Terao Y, Kunikane S. Products of aqueous chlorination of 17 beta-estradiol and their estrogenic activities. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37:5665-5670.

concentraciones. Este hecho ha sugerido que todos estos esfuerzos puestos en la utilización de la cloración como medio para eliminar contaminantes orgánicos, pueden ser a la larga, nocivos¹⁴⁸. A pesar de que se han propuesto alternativas para eliminar los compuestos tóxicos después de la cloración, como el uso de sulfito de sodio¹³⁴, se debe tener en cuenta que de acuerdo a las políticas y regulación de la EU y la conservación de la vida en los ríos, la cloración debe ser aplicada solamente en los suministros de agua potable como agente desinfectante y no en las descargas directas de los efluentes EDAR.

La **luz ultravioleta (UV)** puede ser usada también como desinfectante bacteriano. La luz UV reduce un número de microorganismos (bacterias, patógenos, virus, etc.) generalmente por daño a su ADN¹³⁸. Una ventaja sobre la cloración o la ozonización es que no quedan concentraciones residuales del agente desinfectante. Sin embargo, su principal desventaja es el costo del mantenimiento de la lámpara y la necesidad de una elevada calidad en el efluente tratado (que no sea turbio), para asegurar que los microorganismos a ser eliminados no sean protegidos de la radiación UV^{134,138}.

Por otro lado, muchos contaminantes pueden experimentar transformaciones durante el tratamiento UV, ya que muchos son cromóforos con capacidad de absorber luz a las longitudes de onda UV¹⁴⁸. La fotólisis usualmente conduce a reacciones de ruptura y oxidación, pudiéndose en algunos casos, lograr la completa mineralización¹⁴⁹. Existe evidencia de que la fotocatalisis con TiO₂ puede incluso disminuir/eliminar la actividad estrogénica de

¹⁴⁸ Snyder SA, Westerhoff P, Yoon Y, Sedlak DL. Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: Implications for the water industry. *Environmental Engineering Science*, 2003, 20:449–469.

¹⁴⁹ Mizuguchi T, Shibayama Y, Mitamura K, Shimada K. Contribution of glucuronic acid and sulfonic acid moieties during photocatalytic degradation of estrogen conjugates. *Journal of Health Science*, 2005, 51:447–452.

estrógenos naturales y sintéticos en las aguas residuales¹⁵⁰, siendo este procedimiento mucho más efectivo que la luz UV sola¹⁵¹. También se ha demostrado que el uso de luz UV acoplado con ozono es más efectivo que solamente el uso de ozono¹⁵². La luz UV reduce el consumo de ozono y el tiempo de transformación. Existen otros ejemplos de acoplamiento de tratamientos avanzados, como el uso de luz UV/H₂O₂¹⁵³, o incluso tratamientos con otro tipo de radiación, como rayos gamma procedentes de ⁶⁰Co¹⁵⁴.

La **ozonización** es una técnica relativamente reciente. El ozono es generando por paso del oxígeno gaseoso a través de un potencial de alto voltaje¹³⁸. El ozono se caracteriza porque es muy inestable y reactivo, oxidando la mayor parte de material orgánico que entra en contacto con él, destruyendo microorganismos patógenos y contaminantes orgánicos¹³⁴. Como en la cloración, una preocupación en el uso del ozono es la generación de subproductos de reacción. No está claro cuáles son los efectos de estos compuestos en los seres humanos o en los ecosistemas a su llegada al medio ambiente. El alto costo de esta tecnología se considera como su mayor desventaja. Además, considerando la naturaleza selectiva del ozono, es necesario acoplarlo a otros tratamientos avanzados si se desea emplearlo,

¹⁵⁰ Ohko Y, Iuchi KI, Niwa C, Tatsuma T, Nakashima T, Iguchi T, Kubota Y, Fujishima A. 17 beta-estradiol degradation by TiO₂ photocatalysis as means of reducing estrogenic activity. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36:4175–4181.

¹⁵¹ Coleman HM, Abdullah MI, Eggins BR, Palmer FL. Photocatalytic degradation of 17 beta-oestradiol, oestriol and 17 alpha-ethynylloestradiol in water monitored using fluorescence spectroscopy. *Applied Catalysis B*, 2005, 55:23–30.

¹⁵² Irmak S, Erbatur O, Akgerman A. Degradation of 17 beta-estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 2005, 126:54–62.

¹⁵³ Rosenfeldt EJ, Linden KG. Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol A, ethinyl estradiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38:5476–5483.

¹⁵⁴ Kimura A, Taguchi M, Ohtani Y, Shimada Y, Hiratsuka H, Kojima T. Treatment of wastewater having estrogen activity by ionizing radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 2007, 76:699–706.

además de como desinfectante, en la degradación de contaminantes orgánicos. Ejemplo de estos tratamientos son O_3/H_2O_2 ¹⁵⁵ u O_3/UV ¹⁵².

2.2.4. Tratamiento de Fangos.

Durante la decantación primaria del proceso de depuración de aguas residuales, se genera un conjunto de sólidos sedimentados (fangos primarios), y posteriormente a partir del licor mezcla en exceso del reactor biológico (fangos secundarios). Por ello en toda EDAR paralela a la *línea de agua* ha de existir una *línea de fangos*. Dado su elevado contenido en agua (superior a un 95%), se hace necesario un tratamiento de cara a reducir su volumen y facilitar su manejo y transporte posterior. El tratamiento que reciben consta de las siguientes etapas: *i*) espesamiento, *ii*) estabilización, *iii*) acondicionamiento, y *iv*) desaguado. La materia sólida es floculada (*espesamiento*) vía gravedad o por flotación con aire disuelto. El siguiente paso, la *estabilización*, ocurre generalmente a través del uso de digestores anaeróbicos y aeróbicos. Los digestores anaeróbicos reducen el contenido de sólidos volátiles en aproximadamente 60–65% y reduce significativamente a los patógenos. El fango de desecho digerido, con aproximadamente un 2% de sólidos, es luego acondicionado por la adición de sustancias químicas inorgánicas y orgánicas (inorgánicas: cloruro férrico o cal; orgánicas: polímeros), para finalmente ser *desaguados* y producir el fango de desecho como producto final (ver Fig. 2.5)^{156,157}.

Un número importante de EDARs envían los fangos de desecho desaguados a *tratamientos de compostaje*, donde el fango es tratado bajo condiciones aeróbicas de manera conjunta con desechos agrícolas,

¹⁵⁵ Lee J, Park H, Yoon J. Ozonation characteristics of bisphenol A in water. *Environmental Technology*, 2003, 24:241–248.

¹⁵⁶ McFarland M. Biosolids Engineering. McGraw-Hill, New York, 2001, 800 pp.

¹⁵⁷ EWRI. Conveyance of residuals from water and wastewater treatment. ASCE manuals and reports on engineering practice N° 98. American Society of Civil Engineers, Reston, 2000, 182 pp.

vegetación u otros agentes de relleno para producir un compost con aproximadamente un 50% de sólidos. Alternativamente, los fangos pueden ser secados al calor, lo cual genera un material con un 95% de sólidos que es usado como fertilizante o combustible. La cantidad y características de los fangos de desecho generados en una EDAR depende de la composición del agua residual, el tipo de tratamiento que recibe (*i.e.* primario, secundario, terciario), y los tipos de tratamientos posteriores aplicados al fango de desecho. Incluso dentro de una misma planta, las características de los fangos de desecho producidos pueden cambiar anualmente, estacionalmente o diariamente basados en la composición del agua residual entrante y de las variaciones en el día a día de los procesos de tratamiento¹⁵⁸. Estos cambios en la composición de los fangos de desecho que se producen constituyen un reto añadido para su caracterización química por los químicos analíticos.

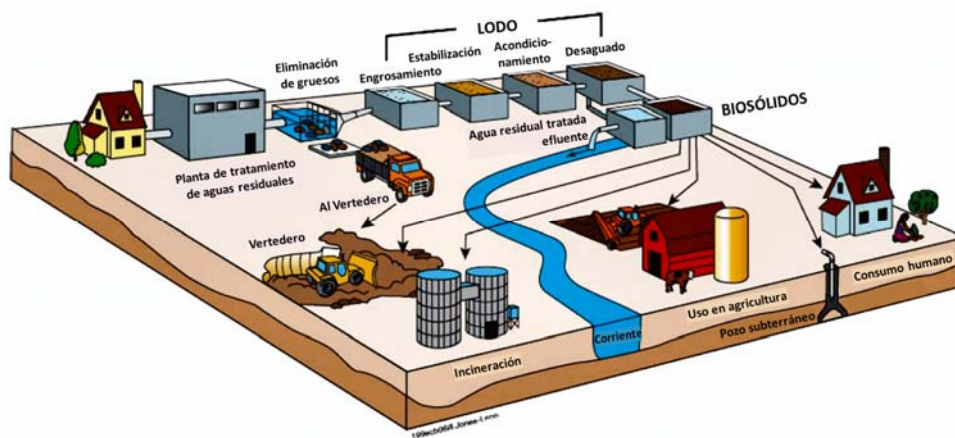


Figura 2.5. Producción, distribución y destino de los fangos de desecho.

¹⁵⁸ Municipal and Industrial Solid Waste Division, Office of Solid Waste. Biosolids generation, use, and disposal in the United States. EPA530-R-99-009. US Environmental Protection Agency, United States, 1999.

3. BIORREACTORES DE MEMBRANA (MBR).

3.1. Tratamiento Convencional vs Biorreactores de Membrana para el Tratamiento de Aguas Residuales.

Las técnicas biológicas de tratamiento de aguas residuales son muy antiguas y se vienen usando desde hace aproximadamente cien años. De todos los procesos que se han desarrollado para el tratamiento de las aguas residuales el sistema convencional de fangos activados ha sido el más extendido, especialmente cuando se desea llevar a cabo un proceso intensivo. Este tratamiento está basado en la reducción de (i) sólidos en suspensión por procesos físicos (sedimentación y/o filtración), y (ii) compuestos solubles principalmente por procesos biológicos cuando los compuestos son biodegradables, o procesos físicos y térmicos (oxidación química, intercambio iónico, desorción, etc.) cuando no son biodegradables. Sin embargo, desde los años 90, este sistema encuentra cada vez más limitaciones, especialmente para lograr el cumplimiento de una cada vez más restrictiva legislación ambiental, por lo que se está generando una necesidad creciente de tecnologías capaces de lograr tasas elevadas de depuración, es decir, reducción del cociente superficie requerida/kg COD eliminada¹⁵⁹, nitrógeno y fósforo, así como la eliminación de microcontaminantes orgánicos, incluyendo ya al grupo de contaminantes emergentes, muchos de los cuales presentan la característica de ser persistentes, todo ello para lograr el cumplimiento de los estándares de calidad requerido para los efluentes, y que en el caso de los contaminantes emergentes permita adelantarse a la legislación que aun no ha establecido límites máximos.

¹⁵⁹ Lopetegui J, Trouvé E. Criterios técnico-económicos para la implantación de la tecnología de biorreactores de membrana. *Tecnología del Agua*, 2004, 253, 62-69.

Aunque el tratamiento convencional de fangos activados es un proceso robusto y seguro, presenta tres desventajas principales¹⁶⁰:

- La calidad del agua tratada depende de la capacidad de sedimentación de la suspensión biológica. Una mala floculación, por causa de alguna modificación en las variables del proceso, como por ejemplo, en las características del influente, por escasez de oxígeno, y nutrientes, presencia de sustancias tóxicas, *etc.*, provocará una mala sedimentación y presencia de sólidos en suspensión en el agua tratada, así como una pérdida progresiva de la biomasa del biorreactor, lo cual a la larga afectará la eficiencia del proceso.
- Dado que la separación del agua tratada de la biomasa depende de la sedimentación por gravedad, existen limitaciones en cuanto a la concentración de biomasa que puede operar en este tipo de proceso. La clarificación se lleva a cabo generalmente con concentraciones de biomasa menores de 5 Kg MLSS/m³.
- La eliminación de los fangos activados del agua tratada siempre será insuficiente, lo que hará que la reutilización del agua sea limitada, excepto para condiciones específicas de irrigación, o cuando el uso de tratamiento terciario incluya procesos extensivos o algún paso de oxidación drástico.

En la actualidad, debido a la escasez de los recursos hídricos y su continua disminución en calidad, es de vital importancia que las innovaciones en los procesos de tratamiento de aguas residuales logren en definitiva lo siguiente:

¹⁶⁰ Wisniewski C. Membrane bioreactor for water reuse. *Desalination*, 2007, 203:15–19.

- La desinfección de las aguas tratadas sin necesidad del uso de ningún paso de oxidación que induzca la formación potencial de moléculas cancerígenas.
- Que los nuevos procesos de tratamiento requieran la disposición de menos espacio (sistemas compactos), que reduzcan el impacto ambiental (olor y ruido).
- Que se constituya en un proceso de tratamiento fiable, independiente de las características del agua de entrada.
- Que forme parte de un proceso sostenible y "amigable" con el medio ambiente (en términos de energía consumida, de manejo responsable de sustancias químicas y de producción de desechos).

La tecnología de membrana, en un principio, tenía un uso limitado y solamente se empleaba como tratamiento de refinado o terciario en el proceso convencional. La microfiltración, ultrafiltración y la ósmosis inversa se utilizaron en áreas donde había requerimientos de vertido muy rigurosos o donde se pretendía reutilizar el agua depurada. Los factores principales que limitaron el desarrollo de la tecnología de membrana fueron el elevado coste de inversión y de operación (el costo del sistema de filtración, incluidas bombas, tuberías e instrumentación necesaria oscila entre un 10% y un 35% del total de la instalación) y un inadecuado conocimiento de las ventajas potenciales de las membranas en el tratamiento de las aguas residuales. Sin embargo, con la aparición de módulos de membrana menos costosos y más efectivos junto con el endurecimiento de los requisitos de vertido, la tecnología de membrana ha vuelto a cobrar interés.

En este contexto, la tecnología de *Biorreactores de Membrana (MBR)* (Fig. 3.1) aparece como una de las tecnologías disponibles más

adecuadas. De forma genérica, los biorreactores de membrana pueden ser definidos como sistemas en los que se integra la degradación biológica de los efluentes con la filtración de membrana¹⁶¹. Este sistema es bastante eficiente en la eliminación de compuestos orgánicos e inorgánicos, así como de microorganismos de las aguas residuales. No sólo se han desarrollado estudios en plantas piloto sino que en varias partes del mundo ya hay plantas a escala real que utilizan esta tecnología. Los usos actuales incluyen el tratamiento y reciclado de agua en comunidades y edificios, el tratamiento de aguas residuales municipales y el tratamiento de efluentes en determinadas industrias. Existen varias áreas de aplicación muy prometedoras que están todavía en fase de desarrollo y que requieren una mayor evaluación experimental. Entre ellas se encuentra el tratamiento de efluentes procedentes de actividades ganaderas, aguas residuales de industrias alimentarias, la eliminación de herbicidas y pesticidas de las corrientes de aguas residuales y la eliminación biológica de los nitratos. Además, el desarrollo de nuevas configuraciones de biorreactores los puede convertir en multifuncionales e integrar así varias secuencias de tratamiento, lo cual expandiría su aplicabilidad y viabilidad.

Los MBRs han alcanzado un importante desarrollo en los últimos años. Dada la elevada calidad del efluente y lo extraordinariamente compactas que son las plantas, se puede afirmar que están particularmente bien adaptadas para:

- Aplicación en áreas de elevada sensibilidad ambiental.
- Tratamiento de efluentes industriales complejos que requieran un sistema que permita operar a edades del fango elevadas.

¹⁶¹ Cicek N, Winnen H, Suidan MT, Wrenn BE, Urbain V, Manem J. Effectiveness of the membrane bioreactor in the biodegradation of high molecular weight compounds. *Water Research*, 1998, 32(5), 1553–1563.

- Aplicación en áreas donde existen limitaciones espaciales.
- Aplicaciones específicas donde el proceso convencional de fangos activados no puede producir un efluente de calidad adecuada a un costo razonable.
- Ampliaciones de plantas convencionales.

Se ha publicado¹⁶² que el valor en el mercado de la tecnología de los MBR en 2005 fue de aproximadamente US 217 millones, elevándose a una tasa de crecimiento anual promedio de 10.9%, lo cual es mucho más rápido que otras tecnologías avanzadas para el tratamiento de aguas residuales (e.g. filtros biológicos aireados y "sequencing batch reactors", SBR), y también mucho más rápido que en los mercados por otras tecnologías de membrana¹⁶³.

La mayor ventaja potencial de esta tecnología está en el campo de la *reutilización*, ya que las membranas de los reactores pueden ser de ultrafiltración y retener así sustancias y microorganismos que frecuentemente son encontrados en los efluentes de los tratamientos biológicos convencionales. Por tanto, dependiendo del uso que se le quiera dar, el efluente de un MBR puede ser adecuado para la reutilización directa o como agua de suministro para un proceso de ósmosis inversa. En la actualidad, el uso del agua depurada con diferentes fines supone en España un 0.75% (270 hm/m³) de la demanda nacional. El Plan Hidrológico Nacional incluye proyectos de reutilización de aguas residuales que actualmente son vertidas al mar.

¹⁶² Judd S. The status of membrane bioreactor technology. *Trends in biotechnology*, 2008, 26(2):109–116.

¹⁶³ Hanft S. Membrane Bioreactors in the Changing World Water Market, Business Communications Company Inc. report C-240, USA, 2006.

Se prevé conseguir un porcentaje de uso en torno al 3% de la demanda nacional en el año 2012¹⁶⁴.



Figura 3.1. Biorreactores de Membrana, instalados por ATM (Asistencia Tecnológica Medioambiental, España). Izquierda: Vista MBR, sector químico; Derecha: Detalle del módulo UF, sector agroalimentario.

3.2. Las Tecnologías de Membrana.

La membrana es una barrera selectiva que permite que sólo entidades específicas puedan atravesarla, mientras que restringe el paso a otras. Exhiben propiedades de transporte selectivo bajo la influencia de una fuerza externa directriz. El grado de selectividad depende del tamaño de poro, de modo que las membranas se pueden clasificar como: microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (RO). De acuerdo a los requisitos de calidad del efluente final, se puede emplear durante el proceso una sola membrana o una combinación de diferentes tipos. En el tratamiento de aguas residuales, se puede usar una separación gruesa por microfiltración (para la eliminación de coloides/sólidos suspendidos) como etapa inicial, seguido por una segunda etapa de separación más selectiva, por nanofiltración / ósmosis inversa (para la eliminación de sales, iones o materia orgánica). En la figura 3.2 se muestran los procesos mediados por membrana.

¹⁶⁴ Fundación Centro Canario del Agua. Introducción a los Biorreactores de Membranas. Editado por el Centro Canario del Agua, 2003, 1-27.

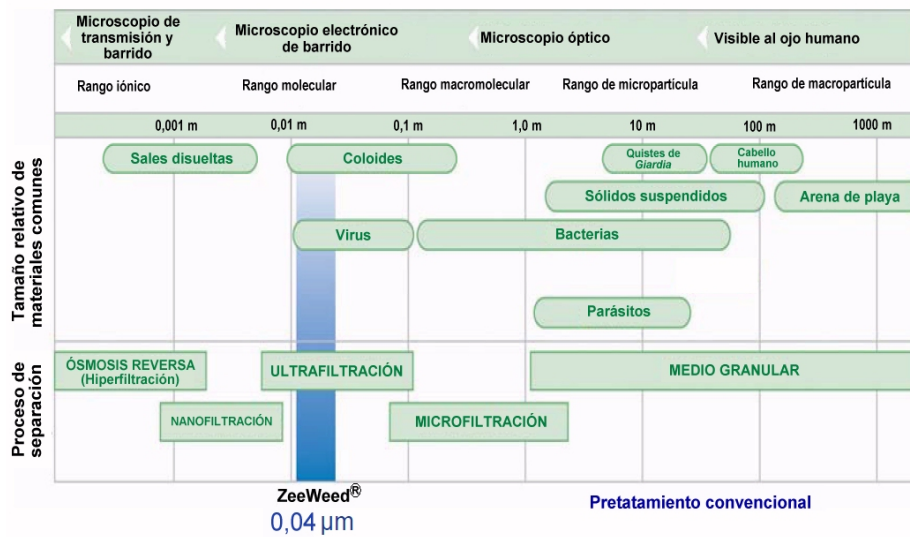


Figura 3.2. Distintos tipos de procesos de separación que cada tipo de membrana realiza dependiendo del tamaño de poro que presente.

Las ventajas del uso de la separación directa por membrana son las que se detallan a continuación:

- No están involucrados sistemas biológicos, por lo que la operación se puede detener rápidamente y ser reiniciada cuando se requiera sin pérdida en la calidad del agua.
- Son sistemas cerrados, de modo que los olores desagradables pueden ser eliminados.
- La automatización del sistema es tarea sencilla por lo que el control del proceso es mucho mejor.
- La calidad del agua de salida no depende de la alimentación.
- Las tecnologías de membrana son muy eficientes en cuanto al uso y disposición del espacio.

- Una instalación típica de tratamiento de aguas consiste en que procesos de microfiltración y ósmosis inversa podrían ocupar simplemente un área de 400 m² para una carga de 2,400 m³/día¹⁶⁵.

La segunda etapa (NF/RO) opera a elevada presión, con un gran consumo de energía, lo cual la convierte en inviable, especialmente si se trata de grandes volúmenes de agua. El principal objetivo de incorporar esta segunda etapa en el caso de aguas residuales es la eliminación de materia orgánica soluble. La tecnología de los biorreactores de membrana se propone entonces como una alternativa que incluye la combinación de la primera etapa con un sistema biológico que pueda eliminar la segunda etapa reduciendo de forma notable los costos y la energía necesaria para el proceso.

3.3. Los Biorreactores de Membrana (MBR).

Los biorreactores de membrana son sistemas basados en la combinación de un reactor con biomasa suspendida (como en el tratamiento con fangos activados) que recibe el nombre de licor mezcla y un paso de separación física por filtración con una membrana porosa a baja presión¹⁶¹, ya sea microfiltración o ultrafiltración (Fig. 3.3) (*i.e.* barrera física que impide el paso de partículas más grandes que su tamaño de poro, entre 0.05 a 0.4 μm) (Fig. 3.2). La integración de los dos procesos en uno solo tiene además un efecto sinérgico derivado de la influencia que tiene el paso por las membranas sobre el estado fisiológico de la biomasa por un lado, y de la mayor capacidad del sistema para eliminar COD coloidal por otro.

¹⁶⁵ Johnson WT, Phelps RW, Beatson PJ. "Water Mining" Using Membranes Proceedings of the "Water Reuse for the community and Industry - Latest Developments and Future Directions". Symposium, University of South Wales, Sydney, Australia, 1996.

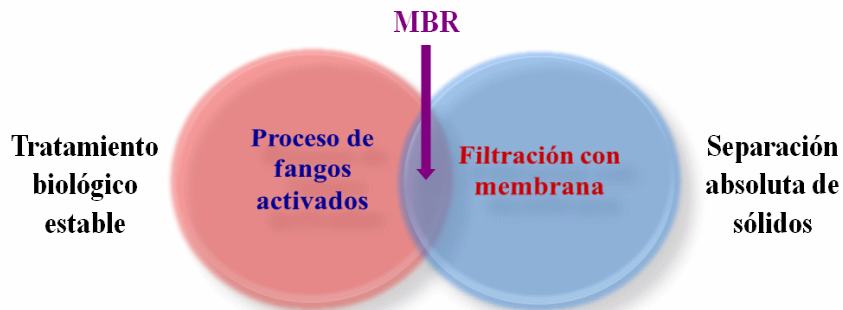


Figura 3.3. Ubicación de los Biorreactores de membrana dentro las tecnologías convencionales de tratamiento de aguas.

Estas características conducen a importantes ventajas cuando se comparan los MBRs con el tratamiento convencional de fangos activados (Fig. 3.4). Los MBRs permiten eliminar las dificultades del proceso asociados con la sedimentación, la cual es la etapa más problemática del tratamiento de aguas residuales.

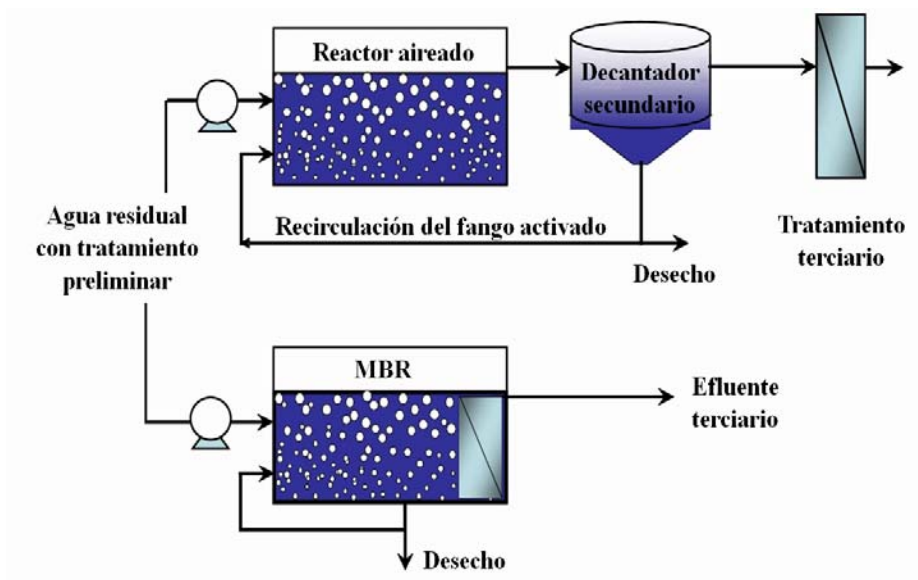


Figura 3.4. Comparación entre el tratamiento de fangos activados (superior) y los biorreactores de membrana (inferior).

3.4. Evolución Histórica e Implantación a Nivel Mundial de los MBRs.

A pesar de que esta tecnología se presenta como novedosa, la investigación de los MBR comenzó hace aproximadamente 30 años cuando se empezó a considerar la combinación de membranas con un proceso biológico como un sistema óptimo para el tratamiento de aguas residuales¹⁶⁶. La primera idea de sustituir el sedimentador por un proceso de ultrafiltración dentro del proceso convencional de fangos activados fue de Smith y colaboradores en 1969¹⁶⁷. Otra de las primeras aportaciones fue la de Hardt y colaboradores en 1970¹⁶⁴.

El concepto de procesos de fangos activados acoplado a un sistema de ultrafiltración por membrana para separación de biomasa fue desarrollado y comercializado por primera vez a fines de los años 60 por la Compañía norteamericana Dorr-Oliver¹⁶⁸, los cuales desarrollaron un sistema para el tratamiento de aguas residuales utilizando membranas llamado "*Membrane Sewage Treatment*" (MST). En este sistema, el agua de alimentación entraba en un biorreactor desde donde se enviaba de forma continua al módulo de ultrafiltración. En los años 70, esta tecnología entró por primera vez al mercado japonés a través de un acuerdo de licencia entre Dorr-Oliver y *Sanki Engineering Co. Ltd.* En los años 80, ya se usaba en Japón para el tratamiento de aguas residuales domésticas y la reutilización descentralizada de aguas residuales en rascacielos. Durante las primeras etapas de desarrollo, la configuración usada fue la de tipo de membrana externa que se describirá en la siguiente sección. Sin embargo, este tipo de MBR fue asociado con un elevado costo y un elevado gasto de energía. A finales de los años 80

¹⁶⁶ Stephenson T, Judd S, Jefferson B, Brindle K. Membrane bioreactors for wastewater treatment. IWA Publishing, UK, 2000, 150 pp

¹⁶⁷ Smith CV, Gregorio DO, Talcott RM. The use of ultrafiltration membranes for activated sludge separation. Proceedings of the 24th Industrial Waste Conference, Purdue University, Ann Arbor Science, USA, 1969.

¹⁶⁸ Judd S. The MBR Book. Editorial Elsevier Ltd., London, 2006, pp. 342.

fueron introducidas las membranas sumergidas con el objeto de reducir costos de energía, y a partir de aquí, esta tecnología de MBR comenzó a desarrollarse rápidamente¹⁶⁹. En 1989, el Gobierno Japonés junto a una serie de importantes compañías invirtió en el desarrollo de un sistema que fuese compacto y que produjese efluentes de elevada calidad para poder reutilizar el agua. La compañía *Kubota* desarrolló un sistema en el que una membrana de placas estaba inmersa el biorreactor y comenzó a desarrollar MBRs de "flat sheet", mientras que por otro lado, la compañía canadiense *Zenon Environmental* desarrolló MBRs capilares. La introducción en Europa de MBRs aeróbicos ocurrió a mediados de la década de los 90.

Actualmente existen en torno a 500 MBRs operando en diversas partes del mundo con muchos otros en fase de proyecto o construcción. Las áreas en las que más se ha extendido esta tecnología son Japón (66% de los procesos a nivel mundial), Norte América y Europa. Más del 98% de los sistemas complementan el proceso de separación de membrana con un proceso biológico aerobio. Aproximadamente el 55% de estos sistemas comerciales tienen la membrana sumergida dentro del biorreactor mientras que el otro 45% restante presenta configuración de membrana externa al biorreactor.

3.5. Configuraciones de los MBRs.

Como ya se ha mencionado con anterioridad en esta memoria, los biorreactores de membrana están compuestos por dos partes principales: la unidad biológica (biorreactor) y el módulo de membrana. Según su configuración, se pueden distinguir dos tipos principales (Fig. 3.5), los de membrana externa y con recirculación al biorreactor (denominada comúnmente configuración "sidestream") y los de

¹⁶⁹ Yamamoto K, Hiasa M, Mahmood T, Matsuo T. Direct Solid-Liquid Separation using Hollow Fibre Membrane in an Activated-Sludge Aeration Tank. *Water Science and Technology*, 1989, 21 (4-5):43-54.

membrana integrada o sumergida. La principal diferencia entre ellas es la disposición del módulo de membrana. El MBR que será objeto de los estudios presentados en esta memoria corresponde al primer tipo. En esta configuración, el módulo de membrana está separado del biorreactor. El fango en el biorreactor es bombeado a través del módulo de membrana a alta velocidad (de 0.5 a 4 m s⁻¹). La fuerza impulsora es la presión creada por la alta velocidad del flujo a través de la superficie de la membrana¹⁷⁰. Por eso la operación de filtración generalmente se lleva a cabo bajo condiciones de alta presión (1 a 4 bares). Por otro lado, el permeado es generado y separado, así como el fango concentrado es retenido por la membrana y devuelto al biorreactor.

En los primeros años de desarrollo de los MBRs con configuración "*sidestream*", tanto la presión de transmembrana (TMP) como la velocidad de flujo cruzado, eran generadas por una bomba de recirculación. Se desarrollaron algunas modificaciones con el objetivo de reducir el elevado consumo de energía. En primer lugar, se agregó una bomba de succión en el lado del permeado, para incrementar la flexibilidad de la operación y reducir la velocidad de flujo cruzado y con ello el consumo de energía¹⁷¹. Los modelos más modernos de este tipo de MBR han introducido un flujo de aire en el módulo de membrana, que intensifica la turbulencia en el lado de alimentación de la misma y reduce su ensuciamiento ("*fouling*"), y con ello los costes de operación.

Con objeto de disminuir el consumo de energía asociado a la bomba de recirculación en la configuración "*sidestream*", se introdujeron

¹⁷⁰ Urbain V, Mobarry B, de Silva V, Stahl DA, Rittmann BE, Manem J. Integration of performance, molecular biology and modeling to describe the activated sludge process. *Water Science and Technology*, 1998, 37(4-5):223-229.

¹⁷¹ Shimizu Y, Okuno Y, Uryu K, Ohtsubo S, Watanabe A. Filtration characteristics of hollow fiber microfiltration membranes used in membrane bioreactor for domestic wastewater treatment. *Water Research*, 1996, 30(10):2385-2392.

en 1989, los llamados MBRs de configuración sumergida¹⁷². En éstos, el módulo de membrana está directamente sumergido en el biorreactor, eliminándose así la necesidad de una bomba de recirculación, de modo que la fuerza directriz a través de la membrana es la creación de una presión negativa en el lado del permeado por una bomba de succión¹⁷³, que crea la TMP, que tiene valores más bajos que en la configuración anterior (0.05 a 0.5 bares). En algunos casos, (e.g. uso de membranas de microfiltración y flujos de filtración muy bajos), el lado del permeado está en una posición más baja, por lo que la gravedad por sí misma es la única fuerza directriz de la filtración¹⁷⁴. La limpieza de la membrana se lleva a cabo a través de pulsos frecuentes de retrolavado y limpieza química ocasional. Además, se coloca un difusor directamente debajo del módulo de membrana para evitar el ensuciamiento de la superficie. La aireación y el mezclado se llevan a cabo en la misma unidad. Se pueden incorporar compartimientos anóxicos o anaeróbicos para permitir la eliminación biológica y de nutrientes¹⁷⁵.

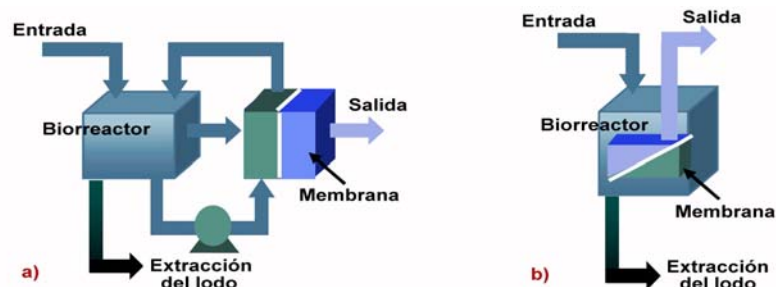


Figura 3.5. Configuraciones de MBRs: a) Con membrana externa, o "sidestream", y b) Con membrana integrada y sumergida.

¹⁷² Yamamoto K, Hiasa M, Mahmood T, Matsuo T. Direct Solid-Liquid Separation Using Hollow Fiber Membrane in an Activated-Sludge Aeration Tank. *Water Science and Technology*, 1989, 21(4-5):43-54.

¹⁷³ Rosenberger S, Kruger U, Witzig R, Manz W, Szewzyk U, Kraume M. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water. *Water Research*, 2002, 36(2):413-420.

¹⁷⁴ Ueda T, Hata K. Domestic wastewater treatment by a submerged membrane bioreactor with gravitational filtration. *Water Research*, 1999, 33(12):2888-2892.

¹⁷⁵ Cote P, Buisson H, Praderie M. Immersed membranes activated sludge process applied to the treatment of municipal wastewater. *Water Science and Technology*, 1998, 38(4-5):437-442.

En la tabla 3.1 se comparan los parámetros principales de ambos tipos de configuración.

Tabla 3.1. Comparación entre ambas configuraciones de MBRs.

	Con membrana integrada o sumergida	Con membrana externa o presurizada
Complejidad	Simple	Complicada
Flexibilidad	Poco flexible	Flexible
Robustez	Poco robusta	Robusta
Inversión inicial	Fuerte	Menor
Costos de operación	Menores	Elevados
Costos de aireación	Altos (90%)	Bajos (20%)
Costos de bombeo	Muy bajos	Altos (60 – 80%)
Flujo	Bajo (10–30 L m ⁻² h ⁻¹) (compactación menor)	Alto (40–100 L m ⁻² h ⁻¹) (mayor compactación)
Tamaño	Mayor	Menor
Volumen que ocupa	Ocupa mayor volumen	Ocupa menor volumen
Frecuencia de limpieza	Baja	Mayor
Facilidad de limpieza química	Menor facilidad: <ul style="list-style-type: none"> • Agitación con burbujas de aire • Retrolavado (no siempre posible) • Limpieza química 	Mayor facilidad: <ul style="list-style-type: none"> • Flujo cruzado • Propulsión con aire • Retrolavado • Limpieza química
Carga orgánica de trabajo	Baja	Mayor
MLSS	MLSS menores (4 – 12 g/L)	MLSS mayores (7 – 40 g/L)
Producción de fangos	Mayor	Menor
Tiempo de vida media de las membranas	Menor (9 a 24 meses)	Mayor (30 a 84 meses)
Consumo energético en el módulo de membranas	Menor consumo (0.2–0.4 kW h m ⁻³)	Mayor consumo (2–10 kW h m ⁻³)
Mantenimiento: acceso a los componentes y solución problemas	Menor facilidad	Mayor facilidad

Los MBRs sumergidos tienen una configuración más simple, y necesitan de menos equipamiento. La aireación de burbuja gruesa en el biorreactor/módulo de membrana es multifuncional. En adición al control de ensuciamiento de membrana, también suministra oxígeno al proceso biológico (aunque la eficiencia de utilización del oxígeno en este módulo es baja en comparación al modelo "sidestream"). La mayor ventaja de la configuración sumergida en comparación a la de "sidestream" es el ahorro de energía por el uso de aireación de burbuja gruesa y flujos menores ($10\text{--}30 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), en lugar de una bomba de recirculación de alta velocidad y alto flujo ($40\text{--}100 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) en los MBRs "sidestream".

Las membranas capilares y de fibra hueca (HF, "hollow fibre") empleadas en muchos MBRs sumergidos tienen una densidad de empacamiento muy alto y bajo costo, lo cual hace posible el uso de más unidades de membrana y operar a flujos menores. Por otro lado, las membranas tubulares típicas de los MBR "sidestream" tienen baja densidad de empaquetamiento y son muy costosas; sin embargo, su eficiencia de filtración y calidad del efluente resultante es mucho mayor. En suma al ahorro de energía, los MBRs sumergidos sufren menos ensuciamiento de la membrana, siendo éstas más fáciles de limpiar¹⁶¹. Por otro lado, los MBRs "sidestream" tienen la ventaja de presentar una fuerza física mayor y un control de velocidad de flujo cruzado y de carga hidráulica más flexible. Se emplean comúnmente en el tratamiento de aguas industriales y residuales muy complejas, donde la velocidad de flujo del influente y su composición presentan variaciones muy grandes, así como condiciones de operación extremas (e.g. alta temperatura), donde un sistema sumergido no proporcionaría la eficiencia y calidad requerida para el proceso.

Si bien es cierto que en el caso del sistema "sidestream" o externo existe un consumo energético importante asociado a la recirculación, en los sistemas sumergidos existe también un coste energético asociado a

sobre-aireación del módulo y agitación, pero sobre todo, un coste de recambio de membranas muy superior a la configuración "sidestream". Además, el control que se tiene sobre la instalación en los sistemas "sidestream" es un factor importante a considerar, así como otras ventajas asociadas al tamaño de instalación, compacidad, modularidad, etc. Por otro lado, la configuración "sidestream" es claramente ventajosa en lo referente a la producción de fangos biológicos.

En cuanto a la evolución de los sistemas, la configuración "sidestream" se presenta como la más adaptable a los nuevos desarrollos. El empleo de oxígeno líquido por ejemplo, supone una mejora en la transferencia de oxígeno y capacidad de tratamiento del sistema. Su aplicación con MBR "sidestream" es favorable porque se aprovecha la presión de retorno del circuito de recirculación para conseguir la inyección y mezcla del oxígeno sin consumo energético asociado.

En resumen, el balance técnico-económico favorece a los MBRs "sidestream" especialmente cuando se trata de concentraciones de materia orgánica elevadas en el agua ($\text{COD} > 500 \text{ mg L}^{-1}$). Para aguas urbanas y en general, para el tratamiento de grandes caudales con bajas concentraciones de materia orgánica, los consumos energéticos pueden hacer inclinar el balance hacia las membranas sumergidas aunque el costo de recambio de membranas puede llegar a ser insostenible. La suma entre los costes energéticos unido al recambio de membranas es siempre favorable a los sistemas "sidestream".

3.6. Características de las Membranas.

3.6.1. Materiales de las Membranas.

Hay dos tipos principales de materiales para la fabricación de las membranas, poliméricos y cerámicos. También existen los filtros de membrana metálicos, pero tienen aplicaciones muy específicas que no están relacionadas con la tecnología de los MBRs. Los polímeros de uso más común son difluoruro de polivinilideno (PVDF), polietilsulfona (PES), polietileno (PE) y polipropileno (PP).

3.6.2. Configuraciones de Membrana.

La configuración de la membrana, es decir, su geometría y forma en la que ésta es montada y orientada en relación al flujo de agua, es crucial en el establecimiento del funcionamiento del proceso total. Se llama módulo de membrana al conjunto de unidades individuales discretas de membranas que son organizadas en "armazones", que es la estructura completa que se emplea para el proceso de filtración.

Hay 6 configuraciones principales que se emplean actualmente para los procesos de membrana. La clasificación se basa en el hecho de presentar geometría plana o cilíndrica:

- "Plate- and- fram/flat sheet" (FS).
- Fibra hueca ("Hollow fibre", HF).
- (Multi)tubular (MT).
- Tubo capilar ("Capillary tube", CT).
- Cartucho de filtro plegado ("Filter cartridge", FC).
- "Spiral-wound" (SW)

De estas configuraciones, sólo las primeras tres son adecuadas para las tecnologías MBR (Fig. 3.6 y 3.7), principalmente porque los módulos deben ser capaces de permitir la promoción de turbulencia, limpieza, o preferiblemente, ambos. La promoción de turbulencia se puede incrementar a través del paso de agua de alimentación o una mezcla de agua/aire a lo largo de la superficie de la membrana, lo cual al mismo tiempo favorezca el paso de permeado a través de los poros de la membrana. Esta operación, llamada de "flujo cruzado" es utilizada en muchas tecnologías de membrana, y su eficacia aumenta con el incremento de la distancia intersticial de membrana (*i.e.* la separación de la membrana).

La membrana usada en un determinado sistema MBR debe satisfacer varios criterios, como por ejemplo, tipo de material, tamaño de poro y configuración, lo cual determinará el flujo de agua y la presión de transmembrana.

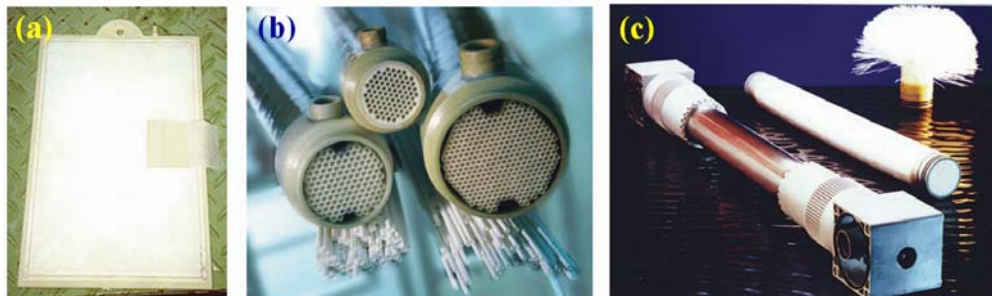


Figura 3.6. Módulos (a) FS, (b) MT, y (c) HF.

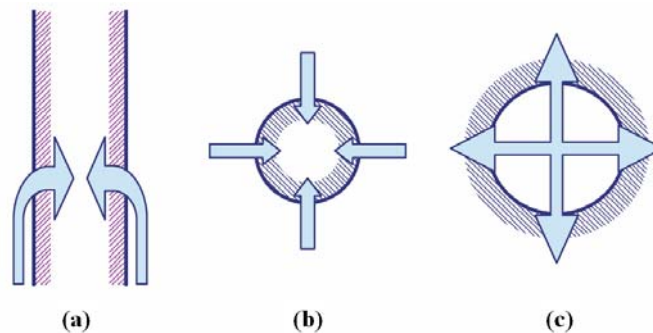


Figura 3.7. Esquema mostrando el flujo a través de las membranas configuradas como: (a) FS, (b) CT o MT y (c) HF.

Actualmente los fabricantes de membranas más extendidos a nivel mundial de membranas son Zenon y Kubota. Aunque ambos sistemas permiten conseguir un efluente de alta calidad, hay varias diferencias en relación a cómo se configuran las membranas, así como el equipo auxiliar (bombas, sistemas de limpieza, válvula), que se adaptan para cada tipo de membrana.

Kubota es una membrana de tipo FS, mientras que ZeeWeed[®] de Zenon es de tipo HF. Ésta última es la que se ha empleado en la planta piloto del MBR donde se han realizado los experimentos de los trabajos de investigación presentados esta memoria de doctorado. El tamaño de poro de ZeeWeed[®] es $0.1 \mu\text{m}$ ($0.04 \mu\text{m}$ efectivo), mientras que Kubota es $0.4 \mu\text{m}$ ($0.1 \mu\text{m}$ efectivo). Como tal, en teoría, la eficiencia de Kubota no será tan buena como la membrana HF de Zenon. Sin embargo, se ha demostrado que ésta cumple con los estándares de la USEPA para poder ser reutilizada, así como tiene una capacidad de eliminación mejor que los filtros convencionales de arena o de tela, además de que tienen la capacidad para eliminar bacterias.

Sistema Kubota



(a)

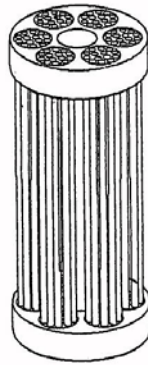


(b)

Sistema Zenón



(c)



(d)



(e)

Figura 3.8. Configuraciones comerciales de membrana más conocidos: Kubota y Zenón. En el sistema Kubota se muestra una placa, (a); así como una "armazón", (b) conteniendo un conjunto de placas. En el sistema Zenón, se observa una foto, (c); y un esquema, (d) de una "armazón" conteniendo las membranas capilares, así como la disposición de dos unidades dentro del módulo de membrana del MBR empleado en los experimentos, (e).

Las fibras (capilares) de membrana Zenon forman unidades (llamadas "armazón"), y su manipulación implica necesariamente la unidad entera, tal como se muestra en la figura 3.8c. En cambio, el sistema Kubota está formado de 50 a 400 placas en cada "armazón", pero en este caso, las placas pueden ser manipuladas de manera individual, como se observa en la figura 3.8a.

El sistema Zenon HF tiene la ventaja de que puede operar a presiones de succión mucho mayores que el sistema en placa de Kubota. Por otro lado, como las membranas Kubota están más sueltas, pueden manejar mayores velocidades de flujo, o mayor volumen de agua al día por metro cuadrado de membrana. Además, la mecánica de los sistemas Kubota es mucho más simple que los de Zenon.

Otra diferencia clave entre ambos sistemas es cómo se realiza la limpieza de las membranas. Ambos sistemas ocasionalmente (entre 3–6 meses) requerirán una limpieza intensa para eliminar residuos de crecimiento bacteriano sobre ella ("*biofouling*") así como grasa que puede reducir la eficiencia de funcionamiento. Las membranas se limpian remojándolas en una solución diluida de hipoclorito sódico durante algunas horas. En ciertos casos, una solución moderadamente ácida o cáustica puede ser también necesaria.

En el caso de los sistemas Zenon, la cámara donde se encuentran los módulos de membrana debe ser previamente drenada y las membranas se retiran para ser remojadas en una disolución de lejía ($200\text{--}1000\text{ mg L}^{-1}$) durante 24–48 horas. Una vez limpias, el cloro remanente en la cámara es rápidamente desactivado por la adición sulfito de sodio seco.

A diferencia del sistema Zenon, el ciclo de limpieza Kubota puede realizarse en el mismo licor mezcla sin necesidad de drenar el tanque, lo cual es posible por la configuración de tipo FS. Esto permite ahorrar una cantidad importante de tiempo. La disolución de lejía se hace pasar a través de las líneas de permeado, la cual remoja las membranas por 1–2 horas, y luego es eliminada del sistema. Sólo una pequeña fracción de biomasa (*i.e.* la que está creciendo sobre la membrana) muere durante el proceso debido a la solución de lejía empleada (0.5–1.0%).

3.7. Ventajas y Desventajas de los MBRs.

La tecnología MBR resuelve de forma clara las limitaciones del tratamiento convencional CAS. El sistema convencional solo emplea la gravedad para sedimentar las aglomeraciones de biomasa (*flóculos*) y separarla del agua tratada. Sin embargo, la similitud de la gravedad específica del fango activado (1.02)¹⁷⁶ con la del agua hace que se produzca una pobre sedimentación en un tiempo normal de retención hidráulica (2–3 h) en el clarificador secundario. El problema de sedimentación se debe a la presencia de flóculos pequeños ($< 10 \mu\text{m}$). La llamada "aglomeración del fango" es uno de los problemas más comunes en la operación del proceso de fangos activados, que se produce a altas concentraciones de fango ($> 5 \text{ g L}^{-1}$), dificultándose la sedimentación¹⁷⁷.

La filtración por membrana tiene una mayor capacidad de separación que la sedimentación por gravedad, especialmente para la separación de flóculos pequeños y partículas coloidales, mejorando notablemente la calidad del efluente producido, cumpliendo con los requerimientos más exigentes para aguas tratadas y abriendo la puerta para múltiples posibilidades para la reutilización de las aguas, no siendo necesarios tratamientos avanzados posteriores¹⁷⁸. La tecnología MBR permite la retención de toda la materia en suspensión, los flóculos bacterianos y la mayor parte de compuestos solubles dentro del biorreactor. La retención de todas las bacterias y virus genera un efluente estéril, eliminando procedimientos intensivos de desinfección posteriores, y los riesgos debidos a la formación de subproductos de

¹⁷⁶ Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD. Wastewater engineering: treatment and reuse. McGraw-Hill, Boston, 2003, 1848 pp.

¹⁷⁷ Eikelboom DH, Andreadakis A, Andreasen K. Survey of filamentous populations in nutrient removal plants in four European countries. *Water Science and Technology*, 1998, 37(4–5):281–289.

¹⁷⁸ Chiemchaisri C, Wong YK, Urase T, Yamamoto K. (1992) Organic stabilization and nitrogen removal in membrane separation bioreactor for domestic wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 1992, 25 (10):231–234.

reacción tóxicos¹⁷⁹. Experimentalmente, se ha confirmado la buena capacidad de desinfección que se logra en un MBR¹⁸⁰. Además, la membrana retiene no sólo a la biomasa sino que también previene el escape de enzimas exocelulares y de oxidantes solubles que crean un licor mezcla más activo capaz de degradar una gama más amplia de compuestos¹⁸¹.

La retención total del fango activado en el biorreactor también permite la operación a altos valores de concentración de tiempo de retención celular (SRT), que pueden ser superiores a 40 días. En consecuencia, se pueden aplicar valores más altos de cargas volumétricas a los sistemas MBR. Valores prolongados para SRT permitirán mayor crecimiento y diversidad de microorganismos en el biorreactor y por tanto una mayor eficiencia de depuración¹⁸².

El potencial del MBR para operar a elevadas edades de fango sin tener el obstáculo de la sedimentación, permite que se pueda trabajar a concentraciones más altas de biomasa en el biorreactor (MLSS entre 15–30 g L⁻¹). Se puede por tanto tratar agua residual de composición más compleja de una forma más eficiente¹⁸³. Esto también repercute en el uso de sistemas más compactos que en los procesos convencionales.

¹⁷⁹ Cicek N, Franco JP, Suidan MT, Urbain V. Using a membrane bioreactor to reclaim wastewater. *Journal American Water Works Association*, 1998, 90 (11):105–113.

¹⁸⁰ Hirani ZM, Decarolis JF, Adham SS, Jacangelo JG. Peak flux performance and microbial removal by selected membrane bioreactor systems. *Water Research*, 2010, 44(8):2431–2440.

¹⁸¹ Cicek N, Franco JP, Suidan MT, Urbain V, Manem J. Characterization and comparison of a membrane bioreactor and a conventional activated sludge system in the treatment of wastewater containing high-molecular weight compounds. *Water Environment Research*, 1999, 71 (1):64–70.

¹⁸² Cicek N, Macomber J, Davel J, Suidan MT, Audic J, Genestet P. Effect of solids retention time on the performance and biological characteristics of a membrane bioreactor. *Water Science and Technology*, 2001, 43(11):43–50.

¹⁸³ Muller EB, Stouthamer AH, Verseveld HW, Eikelboom DH. Aerobic domestic waste water treatment in a pilot plant with complete sludge retention by cross-flow filtration. *Water Research*, 1995, 29(4):1179–1189.

Como consecuencia de todo lo mencionado, los compuestos solubles de alto peso molecular, poco biodegradables en los sistemas convencionales, son retenidos en los MBR. Al incrementar su tiempo de residencia, la posibilidad de que sean degradados también aumenta. El sistema también es capaz de manejar las fluctuaciones en las concentraciones de nutrientes debido a la aclimatación biológica extensiva y retención de la biomasa que ha comenzado a morir¹⁸⁴.

La operación a valores elevados de SRT y el mantenimiento de una razón baja F/M (food-to-microorganisms ratio) conduce a una menor producción de fangos (hasta en un 80% menos), que es un subproducto inevitable del proceso y que representa en la actualidad un verdadero problema ambiental. Por consiguiente, se producirá una disminución en los costes de operación, al reducir el tratamiento, la gestión de los mismos y la mano de obra.

Por otro lado, al reemplazar los decantadores (clarificadores) secundarios por módulos de membrana más compactos, el espacio que se requiere para que el tratamiento completo se reduce notablemente (hasta en 5 veces). Además el sistema es más fácil de operar y mantener. La compactibilidad de las instalaciones facilita la gestión de ruidos, molestias, olores e impacto visual, y permite la integración del MBR en el medio, pudiendo estar ubicados cerca de áreas residenciales. Además en términos de gasto energético, los estudios comparativos realizados hasta ahora confirman que los consumos, en el caso de membranas sumergidas, son similares en ambos sistemas¹⁵⁹.

Las grandes desventajas de los MBR radican principalmente en relación a los costos. A pesar de la reducción en los costos de las membranas, todavía se requieren elevadas inversiones en ellas. Otra

¹⁸⁴ Cicek N, Franco JP, Suidan MT, Urbain V. Effect of phosphorus on operation and characteristics of MBR. *Journal of Environmental Engineering*, 1999, 125(8):738–746.

parte de la inversión se debe destinar para cubrir los costos energéticos debido a la necesidad de lograr los gradientes de presión que caracterizan al sistema. Problemas de ensuciamiento de las membranas ("fouling") pueden conducir a procedimientos de limpieza frecuentes de las mismas, lo cual requiere que se detenga la operación y se emplee agua limpia y sustancias químicas. Otra desventaja importante es la disposición y/o eliminación de los fangos de desecho generados. Debido a que los MBR retienen todos los sólidos suspendidos y la mayor parte de la materia orgánica soluble, el fango activado de desecho puede exhibir propiedades de pobre filtrabilidad y sedimentabilidad¹⁸¹. Otra limitación de los MBR, cuando operan a valores altos de SRT, es la posible acumulación de compuestos inorgánicos no filtrables en el biorreactor, como metales pesados. Éstos pueden alcanzar niveles de concentración que puedan ser dañinos para las poblaciones microbianas o afectar la integridad de la membrana¹⁸⁵.

3.8. Descripción y Funcionamiento de la Planta Piloto MBR Empleada.

3.8.1. Descripción y Funcionamiento de la Planta Piloto MBR.

Los principales elementos del sistema experimental diseñado son un biorreactor cilíndrico de 385 L de volumen operativo, donde se aplica oxígeno puro de burbuja fina, y un biorreactor rectangular de 89 L de volumen operativo, donde se encuentran instalados los dos módulos de membrana de ultrafiltración con 1.86 m² de superficie de filtración y 0.04 µm de tamaño de poro (ZW-10, Zenon). La extracción del agua tratada (efluente) tiene lugar por succión mecánica. El sistema cuenta con sondas que monitorizan la temperatura y la concentración de sólidos

¹⁸⁵ Cicek N, Dionysiou D, Suidan MT, Ginestet P, Audic JM. Performance deterioration and structural changes of a ceramic membrane bioreactor due to inorganic abrasion. *Journal of Membrane Science*, 1999, 163(1):19-28.

en suspensión en el biorreactor cilíndrico y en la cámara del módulo de membranas. Además el biorreactor posee una sonda que mide la concentración de oxígeno disuelto y el pH; y en el módulo de membranas hay dispositivos que miden la presión de transmembrana (TMP). En la figura 3.9 se muestra la Planta Piloto MBR, un diagrama de flujo de la instalación y los parámetros de trabajo utilizados.

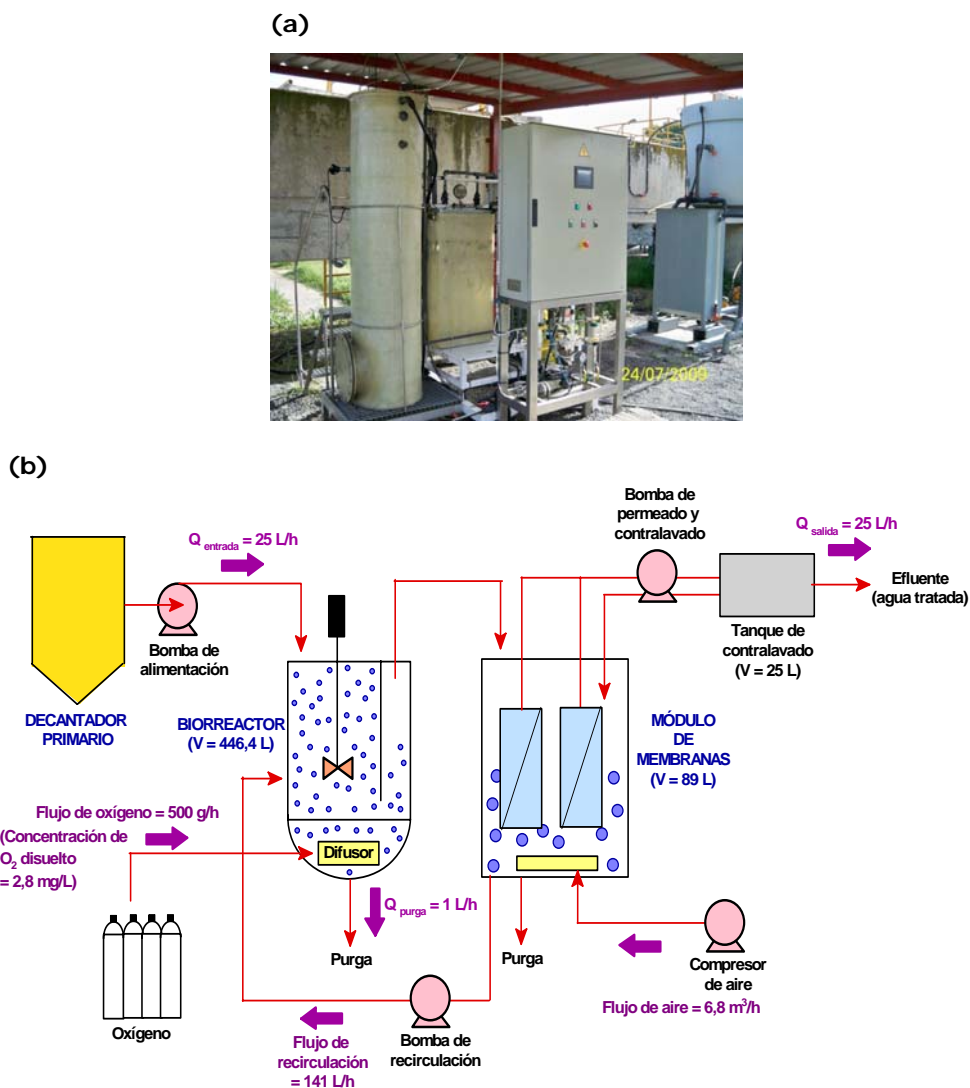


Figura 3.9. (a) Planta Piloto MBR ubicada en una EDAR de Granada. (b) Diagrama de flujo y parámetros de trabajo de la planta piloto MBR empleada.

La membrana empleada (Zenon®) está compuesta por un polímero de difluoruro de polivinilideno (PVDF) semipermeable, con carga neutra y con características hidrofílicas¹⁸⁶. Tiene una configuración HF, el filtrado pasa al interior de la fibra, dejando lo que es retenido en el exterior.

El módulo de membranas y el biorreactor están separados para evitar la interferencia entre el aire suministrado a las membranas y el oxígeno puro que se introduce en el biorreactor que suministra las condiciones aerobias del sistema. También existe un tabique deflector para asegurar un recorrido máximo al oxígeno y con ello una mayor transferencia del gas. La aplicación de oxígeno puro al biorreactor tiene como objetivo mantener la máxima cantidad posible de biomasa activa, para beneficiar y mejorar los procesos de eliminación de nitrógeno y de materia orgánica; sin embargo, este hecho podría afectar de manera negativa a las poblaciones bacterianas del biorreactor, dado que una alta concentración de oxígeno estimula procesos oxidativos indeseables que conducen a la muerte celular, además se podría afectar en mayor o menor medida el funcionamiento de la membrana. Sin embargo, los experimentos que se llevaron a cabo en esta planta piloto y que forman parte de esta memoria, permitirán despejar esta interrogante sobre el efecto de la inyección de oxígeno puro en lugar de aire para proporcionar condiciones aeróbicas a la biomasa del biorreactor.

La eliminación de contaminantes es un factor limitante en el proceso que tiene lugar en las membranas, ya que los elementos que son retirados del agua tienden a acumularse sobre la superficie de la misma, produciendo ensuciamiento (*fouling*) y en consecuencia una reducción del flujo de agua y un incremento de la TMP.

¹⁸⁶ United States Patent. Patent Number 4,810,384. Hydrophilic PVDF Semipermeable Membrane, 1989.

La naturaleza y la dimensión del ensuciamiento dependen tanto de la calidad del agua de alimentación como de factores específicos del sistema de separación de membrana. Para evitarlo, el fango activado se conserva constantemente en suspensión por medio de un sistema de aireación con flujo tangencial de aire de burbuja gruesa que se sitúa en el módulo de membranas. Adicionalmente se dispone de un tanque de 25 L para almacenar el agua tratada, la cual también es usada de forma periódica como contralavado de la membrana.

3.8.2. Funcionamiento de la Planta Piloto Experimental MBR.

El agua residual de entrada procede de la una EDAR de la provincia de Granada. Esta planta trabaja con la tecnología de fangos activados. El agua que entra al reactor biológico procede de la poza de decantación primaria (clarificador primario), donde llega agua que ya ha recibido el tratamiento que ha sido descrito en la sección 2.2.1. El agua decantada de esta poza es conducida a las balsas de aireación, que son los reactores biológicos de la tecnología de los fangos activados.

El flujo de entrada en el biorreactor es controlado por un indicador de nivel que está conectado a una bomba de alimentación de manera que las membranas siempre están cubiertas por el licor mezcla. El agua que entra al biorreactor experimenta el proceso de depuración biológica, que consiste básicamente en proporcionar oxígeno a las bacterias aeróbicas para que degraden la materia orgánica presente, y oxiden a otros tipos de compuestos que puedan existir en el agua para facilitar después su eliminación definitiva.

El agua del biorreactor pasa al módulo de membranas por un sistema de rebose, y luego la aspiración de una bomba fuerza al líquido a pasar por la membrana de ultrafiltración, dejando los sólidos retenidos en el reactor y generando un aumento gradual de los sólidos en

suspensión. Cuando se alcanza la concentración deseada, se aplica un caudal de purga o salida para mantener las condiciones deseadas dentro del reactor. Existe además, una bomba de recirculación del contenido del módulo de membranas hacia el biorreactor, para mantener constante la concentración de sólidos en suspensión en ambos reactores. La bomba que succiona el agua para que atraviese la membrana invierte su flujo regularmente y manda el agua tratada que es almacenada en un tercer tanque a modo de contralavado. Así, se retiran los agregados y partículas de la superficie de la membrana, y se asegura que la TMP no sobrepase los 35 kPa.

El funcionamiento de la planta consiste en ciclos de 10 minutos, de forma que cada ciclo incluye 9 minutos y 45 segundos de filtración, y un ciclo de 15 segundos de contralavado. Si la TMP sobrepasara en algún momento el valor crítico, se tendría que efectuar un procedimiento de limpieza química de los módulos de membrana. Sin embargo, en principio la limpieza química se realizó cada 2 meses aproximadamente.

El agua tratada (efluente) producida es conducida desde el tanque donde es almacenada hacia un pozo ciego.

4. SELECCIÓN DE LOS COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO.

En esta Tesis Doctoral se han estudiado dos tipos de contaminantes emergentes:

- Fármacos: antibióticos de la familia de las quinolonas.
- Disruptores endocrinos: bisfenol A (BFA) y sus derivados clorados.

Los compuestos se han seleccionado de acuerdo a que una serie de propiedades que les confiere relevancia a nivel de los riesgos sobre la salud y ambientales que representan:

- Niveles de consumo y uso.
- Persistencia ambiental, bioacumulación y (eco)toxicidad.
- Riesgos potenciales de ingreso en la cadena alimenticia.
- Propiedades como disruptores endocrinos.

4.1. Quinolonas y Fluoroquinolonas.

4.1.1. Los Antibióticos.

Un antibiótico, en un sentido muy amplio, es un agente quimioterapéutico que inhibe o suprime el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos o protozoos. Se les suelen asociar los términos *quimioterapéutico* o *antimicrobiano*, aunque no son exactamente sinónimos.



Figura 4.1. Uso de los antibióticos en medicina.

El término antibiótico en su origen se refiere a cualquier agente con actividad biológica contra los organismos vivos; pero de manera específica con actividad antibacteriana, antifúngica o antiparasitaria. Actualmente hay alrededor de 250 diferentes entidades químicas registradas para ser usadas como antibióticos en medicina humana y veterinaria¹⁸⁷. Las clases más importantes y los grupos incluyen a los antibióticos β -lactámicos (e.g. penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos), macrólidos, tetraciclinas, aminoglicósidos, glicopéptidos, sulfonamidas y quinolonas. Las tasas de excreción y otros detalles sobre las propiedades y metabolismo se encuentran en la literatura científica tanto médica como farmacéutica¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

La definición clásica de antibiótico habla de un compuesto que es producido por un microorganismo capaz de inhibir el crecimiento de otro microorganismo. Sin embargo, aunque los primeros antibióticos fueron de origen natural, actualmente, los antibióticos también son obtenidos por síntesis química, tales como las drogas sulfa (e.g. sulfametoxazol), que han dado lugar al desarrollo de los antibióticos de la familia de las sulfamidas. Los antibióticos también se producen por modificación química de compuestos de origen natural, como las cefalosporinas y carbapenémicos, que son β -lactámicos derivados de la penicilina.

Los antibióticos se utilizan en dosis muy bajas para inhibir o matar microorganismos, presentando una toxicidad muy baja para el huésped, por lo que sirve para el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas en humanos, animales y plantas¹⁹⁰. En algunos animales, se

¹⁸⁷ Kümmerer K, Henninger A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *Clinical Microbiology and Infection*, 2003, 9:1203–1214.

¹⁸⁸ Lorian V (Ed.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 2005, 832 pp.

¹⁸⁹ National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

¹⁹⁰ Segura PA, François M, Gagnon C, Sauvé S. Review of the Occurrence of Anti-infectives in Contaminated Wastewaters and Natural and Drinking Waters. *Environmental Health Perspectives*, 2009, 117(5):675–684.

emplean cantidades subterapéuticas de antibióticos como aditivos en su alimentación¹⁹¹. Los antibióticos han sido reconocidos como los agentes terapéuticos que causaron el hito más importante en la historia de la medicina¹⁹². Se estima que entre 100 y 200 x 10⁶ Kg de estos compuestos son consumidos anualmente en el mundo entero¹⁹³.

Cada una de estas sustancias actúa selectivamente sobre un grupo determinado de microorganismos, pero esta actividad puede disminuir como consecuencia de la habituación del antibiótico, lo que se denomina *resistencia bacteriana*.

Muchos antibióticos todavía se siguen aislando a partir de organismos vivos, como por ejemplo los aminoglicósidos (e.g. estreptomina, kanamicina y gentamicina). Sin embargo, en la actualidad, el desarrollo de la síntesis orgánica ha permitido la producción de muchos antibióticos de origen sintético. Además de las penicilinas sintéticas, ya en los años 50 se inició la síntesis de los nitroimidazoles. Un grupo muy importante de antibióticos sintéticos son las quinolonas, que son los antimicrobianos seleccionados como analitos en la presente Tesis Doctoral.

4.1.2. Antibióticos de la Familia de las Quinolonas.

El prolífico desarrollo de las quinolonas se inició en 1962, cuando Leshner y colaboradores¹⁹⁴ descubrieron accidentalmente la primera quinolona, el ácido nalidíxico (1,8-naftiridina) (Fig. 4.2), como

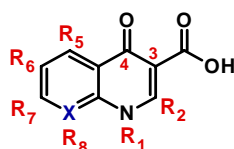
¹⁹¹ Kumar K, Gupta SC, Chander Y, Singh AK. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy*, 2005 87:1-54.

¹⁹² Levy SB. *The Antibiotic Paradox: How Miracle Drugs Are Destroying the Miracle*, 1st ed. Plenum Press, New York, 1992, 279 pp.

¹⁹³ Wise R. Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, 49(4):585-586.

¹⁹⁴ Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-Naphthyridinederivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 1962, 5:1063-1068.

subproducto de la síntesis de la cloroquina, un compuesto para combatir la malaria¹⁹⁵. Con el ácido nalidíxico comenzaron 5 décadas de uso y desarrollo de este nuevo grupo de antibióticos sintéticos (Fig. 4.3). El compuesto descubierto tenía una baja actividad antibacteriana frente a organismos gram-negativos y mostraba una baja absorción oral. Desde un punto de vista farmacocinético, mostraba una baja distribución sistémica y elevadas concentraciones en orina, factores que determinaron su empleo principalmente en infecciones no complicadas del tracto urinario (UTIs) causadas por bacterias entéricas gram-negativas¹⁹⁶. Después a la introducción del ácido nalidíxico, las quinolonas se convirtieron en un grupo olvidado de antibióticos hasta el desarrollo de las fluoroquinolonas en las décadas de los 70 y 80.



X = N; Naftiridona

X = CH; "4 - quinolona"

Ácido nalidíxico: R₁ = CH₂CH₃

R₂ = piridil

R₃ = H

X = N

Figura 4.2. Estructura del núcleo de quinolona y naftiridona.

¹⁹⁵ Appelbaum PC, Hunter PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 16:5-15.

¹⁹⁶ Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, 46:17-24.

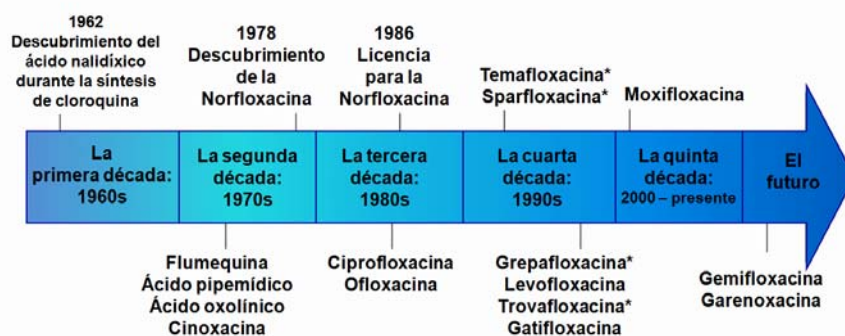


Figura 4.3. Quinolonas: décadas de descubrimiento y uso.
(*)Retirada del mercado.

El núcleo de naftiridona del ácido nalidíxico se convirtió en la base de una serie de derivados más activos; por un lado, la sustitución con un anillo de piperazina en la posición 7 condujo a moléculas como el ácido pipemídico; por otro lado, la fluoración en posición 6, dio lugar a la aparición de las fluoroquinolonas. Además, se introdujeron diferentes modificaciones en las cadenas laterales con objeto de incrementar la actividad contra bacterias gram-positivas, obteniéndose perfiles farmacocinéticos mejorados, y tiempos de vida media más largos en suero¹⁹⁷. Estos hechos han convertido a estas familias de antibióticos en fármacos de dosis “una-vez-al-día”.

De este modo, en dos décadas, las quinolonas pasaron de ser un grupo relativamente pequeño y poco importante de fármacos, a lograr volúmenes de ventas del orden de billones de dólares a finales de los años 90¹⁹⁵, cifra que ha seguido aumentando a lo largo de los últimos años. Sin embargo, y aunque a nivel global, muchas fluoroquinolonas nuevas y mejoradas ya se encuentran en el mercado y otras en desarrollo, ha habido algunos inconvenientes. Determinados compuestos han tenido que ser retirados del mercado poco tiempo después de su

¹⁹⁷ Ball P, Fernald A, Tillotson G. Therapeutic advances of new fluoroquinolones. *Expert Opinion in Investigational Drugs*, 1998, 7:761–783.

lanzamiento, o su desarrollo debido a efectos colaterales imprevistos. Por ejemplo, en algunos casos se han visto problemas de fototoxicidad, asociados a la presencia de un átomo de flúor adicional (lomefloxacina, sparfloxacina), o a la sustitución de cloro en la posición 8 (clinafloxacina o sitafloxacina); así como problemas en el sistema nervioso central, hecho que suele ser habitual en los compuestos derivados no sustituidos de la 7-piperazina^{198,199}. Otras reacciones adversas, como el síndrome hemolítico-urémico asociado a temafloxacina²⁰⁰, y las reacciones hepáticas impredecibles asociadas con la trovafloxacina¹⁹⁶ no parecen tener alguna relación estructural específica.

Las estructuras de las quinolonas se han desarrollado siguiendo dos rutas paralelas a lo largo de varias generaciones (Tabla 4.1); las naftiridonas (con el núcleo original de naftiridina del ácido nalidíxico) y las fluoroquinolonas, en las cuales el átomo de nitrógeno de la posición 8 del núcleo de naftiridona es sustituido por un átomo de carbono. Además, las fluoroquinolonas tienen un átomo de flúor en la posición 6 (a quien debe principalmente su actividad).

La primera fluoroquinolona fue la flumequina²⁰¹, usada sólo de forma temporal hasta que fue retirada debido a problemas de toxicidad ocular. Poco tiempo después, apareció una segunda generación. En 1986, la norfloxacina fue autorizada en los Estados Unidos para su uso en infecciones genitourinarias. Entre 1979 y 1982 se patentaron muchas otras fluoroquinolonas, incluyendo a la ciprofloxacina en 1981, la cual es considerada como la más importante de esta generación. Este compuesto marcó un hito mundial en el desarrollo de antibióticos en

¹⁹⁸ Ball P, Mandell L, Niki Y, Tillotson G. Comparative tolerability of the newer fluoroquinolone antibacterials. *Drug Safety*, 1999, 21:407-421.

¹⁹⁹ Domagala J M. Structure-activity and structure-side- effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1994, 33: 685-706.

²⁰⁰ Blum M D, Graham D J, McCloskey CA. Temafloxacin syndrome: review of 95 cases. *Clinical Infectious Disease*, 1994, 18:946-950.

²⁰¹ Rohlfing SR, Gerster JR, Kvam DC. Bioevaluation of the antibacterial flumequine for urinary tract use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1976, 10:20-24.

general, ya que se caracteriza por tener un amplio espectro de acción, en particular contra bacterias gram-negativas, así como una gran efectividad en muchos tipos de infección²⁰²⁻²⁰⁴, obteniéndose excelentes resultados en el tratamiento de infecciones respiratorias²⁰⁵ y en el tratamiento profiláctico del ántrax. Posteriormente, se desarrollaron nuevas moléculas, como la sparfloxacin y la grepafloxacin, con el objeto de incrementar y ampliar la actividad antimicrobiana, sobre todo contra patógenos gram-positivos. La sparfloxacin ha sido retirada debido a la aparición de problemas de fototoxicidad y de potenciales arritmias cardíacas severas.

La tercera generación, se caracteriza por tener una actividad mucho mayor contra bacterias gram-positivas. Dentro de este grupo se encuentran compuestos clorados en la posición 8 (clinafloxacin y sitafloxacin) que son mucho más activos, pero también fotoreactivos. Solamente la sitafloxacin permanece en un desarrollo limitado. Moxifloxacin y gatifloxacin, ambas 8-metoxiquinolonas, son dos fluoroquinolonas de las más recientes y potentes. Las naftiridonas se han desarrollado en paralelo al desarrollo de la moxifloxacin. Enoxacin y tosufloxacin (disponible en Japón) fueron las primeras naftiridonas, de ahí siguieron la trovafloxacin, que ha sido retirada del mercado, y más recientemente la gemifloxacin.

²⁰² Campoli-Richards DM, Monk JP, Price A, Benfield P, Todd PA, Ward A. Ciprofloxacin. A review of its anti-bacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, 1988, 35:373-447.

²⁰³ Ball P. New fluoroquinolones: real and potential roles. *Current Infectious Disease Reports*, 1999, 1:470-479.

²⁰⁴ Krumpe PE, Cohn S, Garreltes J, Ramirez J, Coulter H, Haverstock D. Intravenous and oral mono- or combination-therapy in the treatment of severe infections: ciprofloxacin versus standard antibiotic therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, 43, Suppl. A:117-128.

²⁰⁵ Ball AP. Clinical evidence for the efficacy of ciprofloxacin in lower respiratory tract infections. *Reviews of Contemporary Pharmacotherapy*, 1992, 3:133-142.

Tabla 4.1. Clasificación de quinolonas de acuerdo a su generación y estructura del núcleo.

Generación	Estructura del núcleo	
	Fluoroquinolona	Naftiridona
I	Flumequina, ácido oxolínico, cinoxacina	Ácido nalidíxico Ácido pipemídico Ácido piromídico
IIa	Ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, lomefloxacina, sarafloxacina*, difloxacina*, marbofloxacina*, danofloxacina*, enrofloxacina*	Enoxacina
IIb	Grepafloxacina, sparfloxacina, orbifloxacina*	Tosufloxacina
IIIa	Moxifloxacina, gatifloxacina, sitafloxacina, clinafloxacina, levofloxacina	Trovafloxacina
IIIb	Balofloxacina, pazufloxacina	Gemifloxacina

* Quinolonas veterinarias

En la tabla 4.2 se muestra el espectro de acción específico y las características clínicas y farmacocinéticas de cada generación de quinolonas.

Tabla 4.2. Clasificación de quinolonas de acuerdo su espectro de acción antimicrobiana.

Generación	Características
I	Predominantemente usado para el tratamiento de infecciones urinarias.
IIa	<p>Actividad incrementada, principalmente contra patógenos gram-negativos; potencia limitada contra patógenos gram-positivos (<i>pneumococcus</i> (MIC 1–4 mg L⁻¹ y <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina); ciprofloxacina es la más activa contra <i>P. aeruginosa</i>.</p> <p><u>Indicaciones:</u> infecciones de tracto urinario, pielonefritis, gonorrea, infecciones por clamidia, prostatitis, infecciones en tejidos suaves y piel, osteomielitis, fiebres entéricas, cólera y salmonelosis, infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i>, exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, neumonía nosocomial, enfermedad del legionario.</p> <p><u>Reacciones adversas:</u> efectos a nivel del SNC, gastrointestinales, erupciones cutáneas y reacciones alérgicas, fototoxicidad (usualmente < 2%), daño de cartílagos en animales jóvenes, tendinitis, usualmente síndromes renales y hepáticos menores. Interacción con el citocromo P450 (teofilina, cafeína).</p> <p><u>Emergencia de resistencia</u> en patógenos con MICs elevados, e.g. > 0.5 mg L⁻¹: <i>P. aeruginosa</i>, estafilococos, neumococos, bacilos gram-negativos.</p>
IIb	<p>Actividad balanceada de amplio espectro; potencia incrementada contra neumococos (MIC 0.25–0.5 mg L⁻¹); menos potente para <i>P. aeruginosa</i>.</p> <p><u>Modo de acción:</u> frecuentemente tiene dos sitios de acción, contra girasa y topoisomerasa IV.</p> <p>Indicado para infecciones de tracto respiratorio (más otras de acuerdo al lugar de licencia).</p> <p><u>Perfil farmacocinético</u> (tiempo de vida media): permite dosis de una vez al día.</p> <p>Reacciones adversas más reacciones inesperadas de casos específicos: síndrome hemolítico-urémico, daños cardíacos prolongados, fototoxicidad. Interacción variable con el citocromo P450 (teofilinas).</p>

Tabla 4.2 (cont). Clasificación de quinolonas de acuerdo su espectro de acción antimicrobiana.

Generación	Características
IIIa	<p>Actividad incrementada contra patógenos gram-positivos (neumococos 0.12–0.25 mg L⁻¹).</p> <p>Farmacocinética favorable que permite dosis de una vez al día; la eliminación resulta de un balance renal y hepato-biliar.</p> <p>Indicada para infecciones del tracto respiratorio, algunas son indicada para uso quirúrgico y ginecológico.</p> <p><u>Perfil de reacciones adversas:</u> no hay interacción con el citocromo P450. Reacciones adversas específicas, por ejemplo con la trovafloxacina, ya retirada del mercado, e.g. muy alta incidencia de efectos sobre el SNC y a nivel hepático, reacciones alérgicas y pancreatitis; reacciones específicas con la clinafloxacina que incluyen hipoglicemia, incidencia incrementada y fototoxicidad severa.</p>
IIIb	<p>Actividad marcadamente incrementada contra bacterias gram-positivas (neumococos MIC 0.012 mg L⁻¹); actividad retenida contra neumococos resistentes a la ciprofloxacina; muy altamente activo contra patógenos que causan infecciones atípicas en el tracto respiratorio; actividad retenida contra patógenos gram-negativos.</p> <p>Farmacocinética favorable que también permite dosis de una vez al día: elevado V_d y penetración tisular; eliminación balanceada (30% renal).</p> <p>La farmacodinámica predice una elevada eficacia en infecciones del tracto respiratorio.</p> <p>Las reacciones adversas son más favorables, disminuyen los efectos negativos en el SNC, no hay fototoxicidad.</p>

El desarrollo de nuevas fluoroquinolonas debe tener en cuenta no sólo el hecho de mejorar la actividad de amplio espectro, sino de reducir los perfiles de reacciones adversas, para que se produzcan moléculas más eficientes que puedan incluso sobrevivir a las “mutaciones” moleculares y que superen los defectos de las anteriores. Para alguno de estos compuestos existen ya estudios clínicos de eficacia que, aunque

están en etapas tempranas, evidencian un futuro prometedor. Las quinolonas de tercera generación presentan mejores perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos, aunque su futuro estará determinado por la prudencia de los médicos en su empleo.

Por otro lado, además de su uso en medicina humana, varias fluoroquinolonas están disponibles en la actualidad como agentes antibacterianos para ser usados en medicina veterinaria, en el tratamiento de infecciones pulmonares, urinarias, y digestivas. Son importantes representantes de este grupo de quinolonas, la enrofloxacin, marbofloxacin, difloxacin, orbifloxacin y sarafloxacin. La flumequina puede ser empleada tanto en seres humanos como en animales. La pradofloxacin es una de las fluoroquinolonas que se han desarrollado más recientemente para medicina veterinaria, habiendo sido aprobada en Australia en 2007, pero que está aún en revisión en Estados Unidos y Europa²⁰⁶.

Muy pocos descubrimientos científicos han tenido tanto efecto en el campo de la medicina como el descubrimiento de los antibióticos. Pero el abuso en su consumo, principalmente debido a problemas de automedicación y de la incorrecta gestión de los mismos por parte de los médicos, ha conducido a un aumento de la resistencia bacteriana. Actualmente a nivel mundial y regional, se están presentando campañas divulgativas para concientizar a la población y frenar el uso inadecuado de los antibióticos. En el caso específico de España, se sabe que ocupa el segundo lugar en la Unión Europea, después de Francia, en cuanto al consumo y automedicación.

Para llevar a cabo el trabajo de investigación que constituye la presente Tesis Doctoral se han seleccionado aquellos derivados de las

²⁰⁶ Pallo-Zimmerman LM, Byron JK, Graves TK. Fluoroquinolones: Then and Now. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, 2010, 1–9.

quinolonas que presentan una mayor incidencia medioambiental por causa de su consumo. La figura 4.4 muestra las estructuras de los compuestos seleccionados.

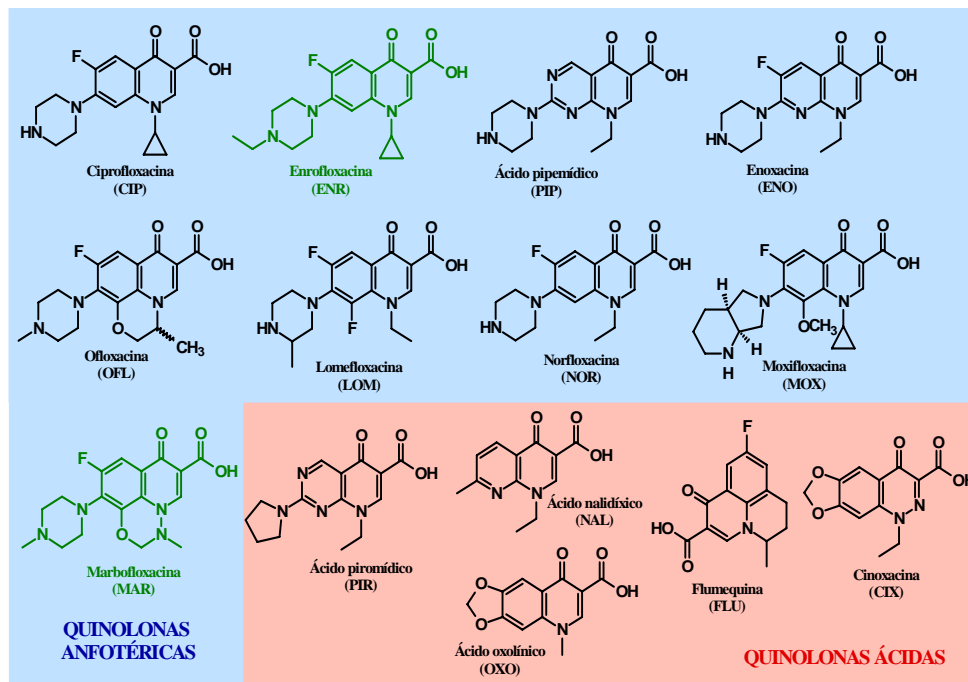


Figura 4.4. Estructura de las quinolonas y fluoroquinolonas objeto de estudio, clasificadas de acuerdo a sus propiedades ácido-base. En verde: fluoroquinolonas de uso veterinario exclusivo.

4.1.3. Mecanismo de Acción de las Quinolonas.

Los antibióticos pueden actuar de dos maneras distintas; a través de una acción *bacteriostática*, que inhiben la multiplicación de las bacterias; o como *bactericida*, con un efecto letal sobre las bacterias. Algunos son únicamente bactericidas, pero otros pueden ser bactericidas y bacteriostáticos dependiendo de su concentración, el medio en el que actúen o los nutrientes presentes en el medio. Los antibióticos pueden inhibir la síntesis de la pared celular, alterar la membrana celular, inhibir

de la síntesis de ácidos nucleicos e interrumpir la síntesis de proteínas. Las quinolonas actúan inhibiendo la síntesis del ADN bacteriano. Este mecanismo está relacionado con la interacción de dos enzimas implicadas en la replicación del ADN, la topoisomerasa II (ADN girasa) y la topoisomerasa IV²⁰⁷⁻²⁰⁹. La toxicidad de quinolonas en células de mamíferos es muy baja, porque el análogo de la enzima ADN girasa en eucariotes es de 100 a 1,000 veces menos susceptible a los inhibidores de la girasa, esto explica la especificidad y el alto nivel de seguridad del uso de estos compuestos en terapia humana y animal. La Fig. 4.5 muestra el mecanismo de acción de las dos enzimas "blanco" principales de las quinolonas.

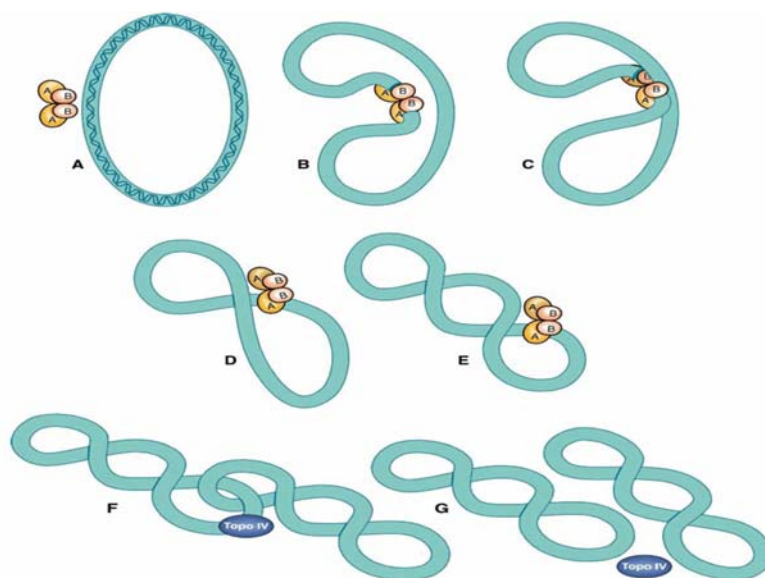


Figura 4.5. "Blancos" de quinolonas: (A-E): el "blanco" primario de las quinolonas es la ADN-girasa, la cual relaja y "superenrolla" el ADN bacteriano durante la replicación, cortando el ADN, pasándolo a través de otra hebra y volviéndolo a sellar. (F - G): el "blanco" secundario es la topoisomerasa IV, la cual desune la nueva hebra de ADN replicada de la hebra "padre".

²⁰⁷ Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51:29-35.

²⁰⁸ Hopper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: Focus on fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 32:9-15.

²⁰⁹ Andriole VT. The quinolones: Past, present and future. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 41:113-119.

4.1.4. Mecanismos de Resistencia Frente a las Quinolonas.

Las quinolonas tienen que penetrar a través de la membrana bacteriana y unirse a la ADN girasa o a la topoisomerasa IV, para provocar la muerte de la bacteria. La principal resistencia a las quinolonas se produce por mutaciones que afectan a cualquier parte de este proceso²¹⁰⁻²¹². Las quinolonas más recientes pueden actuar sobre las dos enzimas, de manera que si se produce una mutación en una de ellas, aumentando así su resistencia frente a la quinolona, queda su acción sobre la otra, por lo que el antibiótico puede seguir ejerciendo su efectividad²¹³.

Otros mecanismos de resistencia pueden ser producidos por alteraciones en la membrana externa bacteriana que disminuyen la penetración intracelular del fármaco y por la expulsión de antimicrobianos desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores endógenos activos²¹⁴.

Es importante destacar que existen diversos estudios que ponen de manifiesto la transferencia de cepas resistentes seleccionadas en animales a los seres humanos, por ejemplo, el caso de las fluoroquinolonas y el *Campylobacter* o *Escherichia coli*. Diferentes estudios han relacionado el consumo de quinolonas en animales con el

²¹⁰ Schmitz FJ, Higgins PG, Mayer S, Fluit AC, Dalhoff A. Activity of quinolones against gram-positive cocci: Mechanism of drug action and bacterial resistance. *European Journal of Microbiology & Infectious Diseases*, 2002, 21:647-659.

²¹¹ Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 42:120-126.

²¹² Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drugs Delivery Reviews*, 2005, 57:1471-1485.

²¹³ Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 2000, 31:24-28.

²¹⁴ Lapeña López de Armentia S. Resistencias a antibióticos en nuestro medio. Visión global del problema. *Boletín de Pediatría*, 1999, 39:243-247.

desarrollo de resistencias en *Campylobacter*^{215,216}. El incremento vertiginoso en la resistencia a la ciprofloxacina producida por *Campylobacter* en la década de los 90 parece difícilmente explicable por el consumo exclusivo de esta quinolona en humanos. Otros estudios refieren altos grados de resistencia a las quinolonas en cepas de *E. coli* procedentes de pollos²¹⁷. El uso indiscriminado de quinolonas veterinarias produce cepas de bacterias resistentes a este grupo de antibióticos. El consumo de carne cruda o poco cocida, o de leche no pasteurizada produce la transmisión a los seres humanos de cepas resistentes de bacterias, siendo el caso más conocido el de *Campylobacter jejuni*, uno de los principales responsables de la gastroenteritis bacteriana a nivel mundial. Aunque las bacterias transmitidas sean resistentes a quinolonas veterinarias, las grandes similitudes estructurales con las quinolonas humanas las hacen también resistentes a éstas, aunque no haya habido un contacto específico con ellas²¹⁸ (Fig. 4.6).



Figura 4.6. Transmisión de resistencia a quinolonas de animales a seres humanos.

²¹⁵ Endtz HP, Ruijs GJ, Van Klingeren B. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1991, 27:199–208.

²¹⁶ Reina J. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella* non-typhi and *Campylobacter* spp. *Lancet*, 1992, 340:1035–1036.

²¹⁷ Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemia and healthy chickens in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35:2184–2185.

²¹⁸ Mc Dermott PF, Bodeis SM, English LL, White DG, Walker RD, Zhao S, Simjee S, Wagner DD. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* evolves rapidly in chickens treated with fluoroquinolones. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 185:837–840.

4.1.5. Relación Estructura–Actividad.

Como ya se ha indicado, existen dos tipos de estructura de anillo: los núcleos de naftiridona (átomos de nitrógeno en posición 1 y 8) y de quinolona (un solo átomo de nitrógeno en posición 1) (Fig. 4.2). Todos los compuestos contienen un grupo cetónico en la posición 4, un ácido carboxílico en posición 3, y un átomo de nitrógeno en posición 1. El anillo de piridona es la parte de la molécula que tiene actividad farmacológica, y es importante no interferir alrededor de esta área.

Para aumentar el espectro de actividad y la buena absorción en los tejidos, a partir del ácido nalidíxico se sintetizaron nuevos compuestos basados en el anillo de quinolona²¹⁹. Con objeto de obtener una mayor actividad, a finales de los años 70, se pensó en introducir un sustituyente pequeño, lipofílico y alifático, como el grupo etilo, en el átomo de nitrógeno heterocíclico de la *posición 1*. Sin embargo se observó que eran los sustituyentes más voluminosos, como los grupos ciclopropilo o el *tert*-butilo, los que provocaban este aumento de actividad²⁰⁸.

Por otro lado, se ha comprobado que las sustituciones en *posición 5* influyen en la actividad de la molécula contra bacterias gram-positivas, aunque los sustituyentes deben ser pequeños y deben favorecer los puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas del ADN, como los grupos haluro o amino¹⁹⁵.

La incorporación de un átomo de flúor en la *posición 6* ha sido la modificación más importante llevada a cabo, puesto que ha permitido

²¹⁹ Martínez M, McDermott M, Walter, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 2006, 172:10–28.

aumentar la penetración intrabacteriana de las quinolonas aumentando su potencia como antibacterianos.

La *posición 7* influye tanto en la actividad biológica como en las características farmacocinéticas de las quinolonas. Los sustituyentes óptimos deben poseer un grupo básico no muy voluminoso, ya que están implicados directamente en la unión con la enzima. Los grupos más frecuentes son los anillos de piperazina y pirrolidino²²⁰. La introducción de una cadena lateral al anillo de piperazina aumenta la actividad contra bacterias gram-negativas y la habilidad de las quinolonas para penetrar en la pared bacteriana²¹⁹.

Los sustituyentes pequeños e hidrofóbicos, como los grupos metilo y metoxilo en *posición 8*, provocan un aumento de actividad frente a especies anaeróbicas. Sin embargo, se ha observado que la presencia de halógenos en esta posición provoca fototoxicidad e inestabilidad de la molécula a la luz UV a pesar de mostrar una excelente actividad antibacteriana¹⁹⁵. En la Fig. 4.7 se ilustran los sitios activos de las quinolonas.

²²⁰ Tillotson GS. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *Journal of Medical Microbiology*, 1996, 44:320-324.

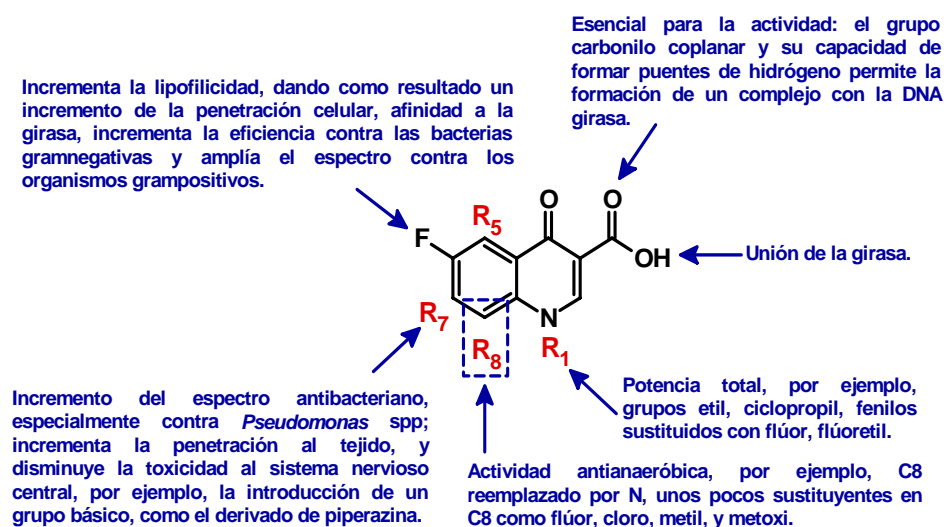


Figura 4.7. Sitios activos de las fluoroquinolonas.

4.1.6. Propiedades Físicoquímicas de las Quinolonas.

Para el desarrollo de metodologías analíticas de determinación de quinolonas es importante tener en cuenta las propiedades físicoquímicas más relevantes. Las quinolonas se caracterizan por ser químicamente estables y resistentes a la hidrólisis y a las altas temperaturas. Sin embargo, presentan como parte de su estructura, diferentes grupos ionizables que determinan sus propiedades ácido-base, de modo dependiendo del pH, las moléculas pueden ser neutras, catiónicas, aniónicas o zwitteriónicas. Debido a la presencia de estos grupos funcionales, otras propiedades físicoquímicas, como por ejemplo el coeficiente octanol-agua ($\log K_{ow}$) y de adsorción ($\log K_d$), su fotoreactividad, su actividad antibiótica y su toxicidad también pueden estar influenciadas por el pH.

Todas las quinolonas presentan propiedades ácidas, debido al grupo carboxilo en posición 3 (pK_a entre 5.5 y 6.5). Además, aquellas quinolonas que presenten el anillo de piperazina en posición 7 (las 7-piperazinilquinolonas), presentan propiedades básicas, pues un grupo

amino alifático forma parte de este anillo (pK_a entre 7.5 y 8.5)²²¹. Estas características permiten clasificar a las quinolonas en dos grupos;

- *Quinolonas ácidas*. Aquellas que no presentan el anillo de piperazina y por lo tanto sólo tienen propiedades ácidas, pudiendo existir solamente bajo las formas neutra y aniónica.
- *Quinolonas zwitteriónicas o piperazinílicas*. Aquellas que al presentar también grupos básicos, pueden existir bajo 3 formas: catiónicas, zwitteriónicas y aniónicas.

En la figura 4.4 se muestran las quinolonas agrupadas de acuerdo a esta clasificación. Por ejemplo, la ciprofloxacina es una quinolona anfotérica. Sus valores de pK_a son 6.16 y 8.63. A pH 7.4, su punto isoeléctrico, la molécula existe predominantemente bajo la forma *zwitteriónica*. La Fig. 4.8 muestra la distribución de especies para la ciprofloxacina como función del pH. Mientras que la Fig. 4.9 muestra los equilibrios ácido-base para ambos tipos de quinolonas.

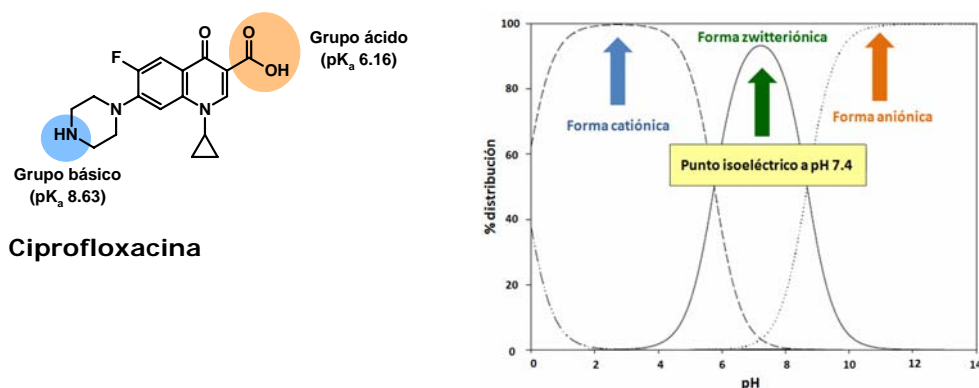


Figura 4.8. Distribución de especies en la ciprofloxacina a diferentes valores de pH.

²²¹ Volmer DA, Mansoori B, Locke SJ. Study of 4-Quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1997, 69:4143–4155.

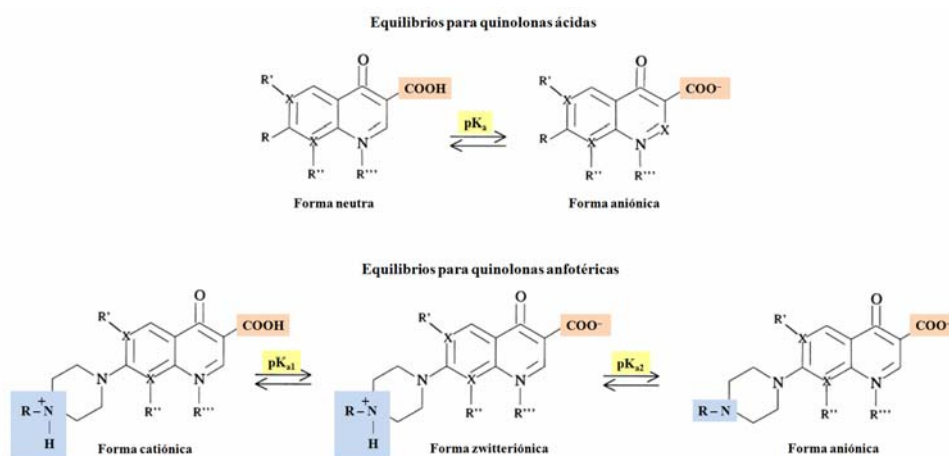


Figura 4.9. Estructuras y equilibrios de ionización para las quinolonas ácidas y anfotéricas.

Los valores de pKa asociados al ácido carboxílico de las quinolonas son mayores que los observados generalmente para ácidos carboxílicos. Esta disminución en la acidez se puede atribuir a la formación de un enlace por puente de hidrógeno intramolecular con el grupo carbonilo en posición 4, que da como resultado la estabilización de la especie protonada^{222,223}. La formación de este puente de hidrógeno se ha comprobado por IR y UV. La asignación del valor de pKa al grupo piperazina viene apoyada por medidas RMN²²⁴.

La mayoría de las quinolonas presentan una solubilidad disminuida en agua a pH entre 6 y 8, ya que a valores entre el pKa₁ y pKa₂, la especie predominante es la zwitteriónica, cuya carga neta es cero. Estas características hacen que puedan atravesar libremente las membranas biológicas.

²²² Ross DL, Riley CM. Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials III. 1-octanol/water partition coefficients and their relationships to structure. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, 88:379-389.

²²³ Barrón D, Jiménez-Lozano E, Irlés A, Barbosa J. Influence of pH and pKa values on electrophoretic behaviour of quinolones in aqueous and hydro-organic media. *Journal of Chromatography A*, 2000, 871:381-389.

²²⁴ Jelkic M, Veselinovic D, Djurdjevic P. Acid-base equilibria in substituted 4-quinolonecarboxylic acid solutions. *Talanta*, 1992, 39:665-670.

El grupo cetónico y de ácido carboxílico presentes en las quinolonas son susceptibles de formar complejos con cationes metálicos. La formación de estos complejos provoca la disminución de la absorción de las quinolonas, y por lo tanto, una disminución de su actividad bactericida. Se ha investigado la especiación de la ciprofloxacina como función del pH en una solución acuosa y en la presencia de iones férricos disueltos y goetita²²⁵.

Otra propiedad que presentan las quinolonas es que absorben radiación UV, mostrando dos bandas de absorción: una entre 300 y 350 nm, que es común para todas las quinolonas, y una segunda banda entre 245 y 290 nm que es más específica para cada sustancia²²⁶.

Las quinolonas también se caracterizan por presentar fluorescencia nativa, su espectro de excitación coincide con el espectro de absorción molecular, mientras que su espectro de emisión consta de una banda ancha centrada entre 350 y 400 nm en el caso de quinolonas ácidas, y entre 440 y 500 nm para las quinolonas anfotéricas. Hay que remarcar que a medida que aumenta el pH del medio, la intensidad de fluorescencia disminuye, hasta un punto en que la especie aniónica de las quinolonas no presenta fluorescencia nativa²²⁷.

²²⁵ Trivedi P, Vasudevan D. Spectroscopic investigation of ciprofloxacin speciation at the goethite-water interface. *Environmental Science and Technology*, 2007, 4:3153–3158.

²²⁶ El Walily AFM, Belal SF, Bakry RS. Spectrophotometric and spectrofluorimetric estimation of ciprofloxacin and norfloxacin by ternary complex formation with eosin and palladium (II). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1996, 14:561–569.

²²⁷ Liu Z, Huang Z, Cai R. Study on three-dimensional fluorescent spectral characteristics of fluoroquinolones in varying media. *Spectrochimica Acta, Part A*, 2000, 56:1787–1793.

4.1.7. Consumo de Antibióticos y Quinolonas en Europa.

Las quinolonas se usan principalmente para el tratamiento de enfermedades respiratorias²²⁸, pero, excepto la ciprofloxacina, no han sido tradicionalmente los antibióticos de primera opción. Sin embargo, esta tendencia ha ido cambiando en los últimos años, principalmente debido a la generación de resistencia a otros antibióticos.

Diariamente, son prescritas grandes cantidades de antibióticos para uso primario. El proyecto "*European Surveillance of Antimicrobial Consumption*" (ESAC), patrocinado por la Comisión Europea ha diseñado una base de datos sobre el consumo de antibacterianos en Europa y en Estados Unidos. Uno de los estudios más recientes corresponde al uso de antibióticos en 27 países europeos y Estados Unidos en el 2004²²⁹. En este año, se registró el uso de 81 antibióticos diferentes en Estados Unidos, en comparación con 153 en 27 países europeos.

Dentro del grupo de las quinolonas, a partir de los datos de un estudio realizado entre 1997 y 2003 en 25 países de Europa por la ESAC²³⁰, se obtuvieron los resultados que se ilustran en la Fig. 4.10.

²²⁸ McCaig LF, Hughes JM. Trends in antimicrobial drug prescribing among office-based physicians in the United States. *Journal of the American Medical Association*, 1995, 273:214-219.

²²⁹ Goossens H, Ferech M, Coenen S, Stephens P. Comparison of Outpatient Systemic Antibacterial Use in 2004 in the United States and 27 European Countries. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 44: 1091-1095.

²³⁰ Ferech M, Coenen S, Malhotra-Kumar S, Dvorakova K, Hendrick E, Suetens C, Goossens H. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58: 423-427.

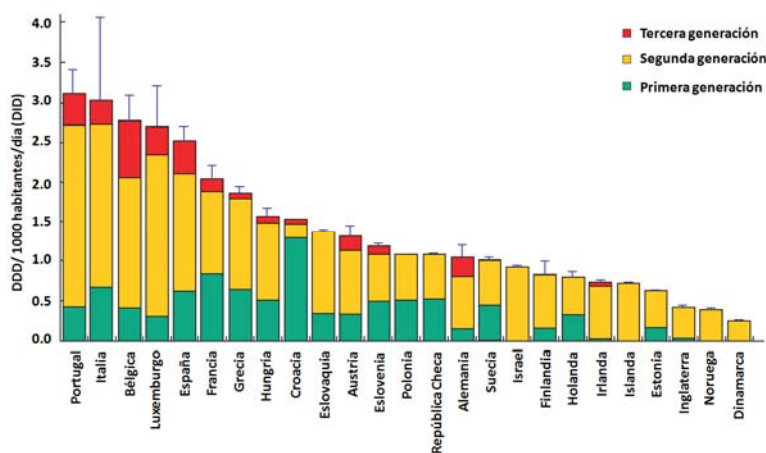


Figura 4.10. Uso de quinolonas en 25 países europeos en 2003. Las barras de error representan las diferencias entre las quinolonas de uso nacional en 2003 de acuerdo a las versiones ATC/DDD de 2003 y 2004, respectivamente, i.e. debido al cambio de DDD para levofloxacina desde 0.25 a 0.5 g. Para Islandia se usaron los datos totales. Para Polonia se usaron los datos del 2002.

Este estudio demuestra que los representantes de la segunda generación constituyen más del 50% (63% de mediana) del uso de este tipo de antibióticos, destacándose la ciprofloxacina, excepto en Croacia. El porcentaje de uso de esta quinolona es del 41% en 25 países. Le sigue en porcentaje de uso la norfloxacina, que representa el 85% del uso total de quinolonas en Croacia, más del 40% en República Checa, Suecia, Francia y Slovenia; y más del 10% en todos los demás, excepto 6 países (Dinamarca, Islandia, Israel, Irlanda, Noruega e Inglaterra). Ofloxacina es el más usado en dos países (Israel y Eslovaquia), mientras que su enantiómero S puro, levofloxacina, es el más usado en Italia.

Aunque en la mayoría de los países europeos, el porcentaje de uso de quinolonas de segunda y/o tercera generación es superior al de primera generación, antibióticos como el ácido pipemídico y el ácido nalídixico, pertenecientes a la primera generación, todavía son muy utilizados. Entre otros representantes de esta primera generación, la cinoxacina se usa principalmente en Italia, la flumequina en Francia, el

ácido oxolínico en República Checa, Polonia y Eslovaquia, y el ácido piromídico en Italia. Entre las quinolonas de tercera generación, la levofloxacin y la moxifloxacin, representan más del 10% del uso total en 12 países, observándose variaciones estacionales marcadas. Estas quinolonas son prescritas con mayor frecuencia en países con elevado consumo de antibióticos.

4.2. Bisfenol A y sus Derivados Clorados.

4.2.1. Los Disruptores Endocrinos.

La aparición de una serie de efectos adversos sobre todas las clases de organismos vivos, que comenzaron a describirse a partir de la década de los años 80, dirigieron la atención hacia lo que posteriormente fueron definidos como disruptores endocrinos químicos ("*Endocrine Disrupting Chemicals*", EDCs). Durante los años 80, Theo Colborn, que trabajaba para la *World Wildlife Fund* (WWF), realizó estudios sobre los vertebrados en los Grandes Lagos²³¹. Colborn hizo mediciones y contabilizó todos los efectos

negativos que iban siendo observados, no sólo por ella, sino por otros colegas y concluyó que los animales estaban siendo afectados de varias maneras: tasa de reproducción reducida, problemas de tiroides, comportamientos alterados y cambios de metabolismo. Todos ellos conducían al deterioro serio de la salud de los animales. Cada síntoma sugería que las alteraciones eran producidas a nivel del sistema



Figura 4.11. Theo Colborn y su obra "Nuestro futuro robado", uno de los primeros tratados que describen los efectos de los disruptores endocrinos.

²³¹ Colborn T, Dumanoski D, Myers JP. *Our stolen future*. Penguin Books, New York, 1996, 336 pp.

endocrino. Quizá la observación más importante fue que estos problemas también eran observados en la progenie de los animales y no sólo sobre los adultos.

A partir de estas observaciones se llevaron a cabo una serie de estudios que permitieron adjudicar responsabilidades para estos efectos. La definición de un disruptor endocrino como "*una sustancia exógena o una mezcla que altera las funciones del sistema endocrino y que causa en consecuencia efectos adversos sobre la salud, en un organismo intacto o en su progenie, o en (sub)poblaciones*", fue dada por la Organización Mundial de la Salud en 1996. En ese mismo año, se publicó el *Informe Weybridge* a partir del "*European Workshop: On the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife*". La conclusión fue que no sólo es necesario conocer qué sustancias pueden constituirse como disruptores endocrinos o qué otros efectos pueden tener, sino qué tipo de precauciones tomar para reducir o eliminar la exposición a los EDCs²³².

En ese momento aun no se sabía que muchos de los compuestos químicos que usamos diariamente tienen potencial como disruptores endocrinos químicos. Por este motivo, en 1999, la Comisión del Consejo y el Parlamento Europeo acordaron que había una necesidad de tener mayor conocimiento acerca de estos compuestos y se creó el "*Research Cluster into Endocrine Disruption*" (CREDO), en 2001. Posteriormente, la Comisión Europea publicó una lista de sustancias prioritarias para su posterior evaluación en relación a su rol como disruptores endocrinos (COM 1999)²³³. Esta lista que contenía 553 sustancias fue concluida un año después. De todas estas sustancias, 66 ya habían sido probadas en

²³² European Commission. European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Report Eur 17549, Environment and Climate Research Programme, DG XII. Weybridge, 1996.

²³³ COM. 706 final, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Community Strategy for Endocrine Disruptors. A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, 1999.

organismos intactos, y 52 presentaban potencialidad como disruptores endocrinos en ensayos *in vitro*^{234,235}.

La influencia de los EDCs sobre el sistema endocrino forma parte de un proceso complejo y por lo tanto la evaluación de EDCs potenciales no es sencilla. Una dificultad es que estos compuestos pueden utilizar rutas completamente diferentes para provocar efectos adversos sobre el sistema endocrino. En conclusión, es difícil predecir la actividad estrogénica basándose solamente en la estructura química. Los EDCs pueden tener propiedades físicoquímicas muy diferentes y pertenecer a diferentes familias químicas. Sin embargo, la estructura del anillo aromático, en la mayor parte de los casos, el anillo fenólico, parece ser una subestructura común de los compuestos con actividad estrogénica (con algunas excepciones: progesterona, sitosterol o mirex). Lo contrario no es necesariamente cierto, la presencia de grupos fenólicos no implica que la sustancia tenga propiedades estrogénicas²³⁶.

4.2.2. Efectos de EDCs en Diferentes Organismos.

Uno de los primeros efectos de los EDCs, observado en el medio acuático, que causó alarma fue el paulatino adelgazamiento de las cáscaras de los huevos de diferentes peces, que a la vez son el alimento de numerosas aves. Este efecto, que había sido observado en diferentes países fue causado por el insecticida DDT/DDE²³⁷. Posteriormente, se

²³⁴ COM. 262 final, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Community Strategy for Endocrine Disrupters. A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Bruxelles, 2001, 55 pp.

²³⁵ BKH. Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption - preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. European commission DG ENV. Delft, 2000, 29 pp.

²³⁶ Fang H, Tong, WD, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chemical Research in Toxicology*, 2001, 14(3):280–294.

²³⁷ King KA, Zaun BJ, Schotborgh HM, Hurt C. DDE-induced eggshell thinning in white-faced ibis: A continuing problem in the western United States. *Southwestern Naturalist*, 2003, 48(3):356–364.

reconocieron otros efectos en todos los niveles taxonómicos de organismos tanto vertebrados (mamíferos terrestres y acuáticos, reptiles, anfibios y peces) como en invertebrados (moluscos, crustáceos, insectos y nematodos).

Los efectos causados por los EDCs son múltiples. Los más alarmantes están relacionados con el sistema reproductivo, porque la reproducción, de la que depende la sobrevivencia de las especies, puede verse amenazada. Un ejemplo es el desarrollo alterado de los órganos reproductivos que conduce a la adquisición de características genéticas y fenotípicas masculinas y femeninas de



Figura 4.12. EDCs están relacionados con efectos negativos sobre el desarrollo de los órganos sexuales en el esturión

manera simultánea y en grado variable, que es lo que antiguamente se llamaba hermafroditismo. Se ha observado que este efecto puede ser causado por EDCs en peces gonocorísticos (que son especies de peces con diferenciación sexual genética)²³⁸. Otros efectos son la reducción del éxito reproductivo debido a problemas de desarrollo en la siguiente generación²³⁹, cambios en la expresión de las características sexuales secundarias, tales como los tubérculos de desove, que son estructuras epidérmicas cuya función primaria es facilitar el contacto entre los peces durante el desove²⁴⁰, o incluso problemas de comportamiento que conducen a la disminución en las actividades de cortejo²³⁹. La inducción

²³⁸ Liney KE, Jobling S, Shears JA, Simpson P, Tyler CR. Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to effluents from wastewater treatment works. *Environmental Health Perspectives*, 2005 113(10):1299–1307.

²³⁹ Gray MA, Teather KL, Metcalfe CD. Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, 18(11):2587–2594.

²⁴⁰ Parrott, JL, Wood CS, Boutot P, Dunn S. Changes in growth and secondary sex characteristics of fathead minnows exposed to bleached sulfite mill effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(12):2908– 2915.

del precursor específico de la proteína vitelogenina en el huevo (óvulo) es un biomarcador bien establecido frente a la exposición a EDCs²³⁸.

En Florida, en los caimanes del lago Apopka aparecieron importantes anomalías reproductivas posiblemente producidas por el efecto de los EDCs²⁴¹. La población de gaviotas del sur de California también ha sufrido los efectos de los EDCs desviándose la "ratio" sexual de estos animales considerablemente respecto de la normalidad, con un notable incremento del número de hembras, y con conductas anómalas en la etapa de nidificación²⁴². También se han observado anomalías en la "ratio" sexual de peces y una importante disminución del contenido en testosterona de los machos, por el efecto del vertido residual de plantas de tratamiento de papel. Estos fenómenos se han registrado en distintas partes del mundo^{243,244}.



Figura 4.13. El lago Apopka estuvo expuesto a DDT y dicofol en los años 80. Actualmente amenaza la vida de los caimanes que viven en est lago.

En los seres humanos, existen numerosos indicios que ponen de manifiesto el carácter xenobiótico de los EDCs. Así, por ejemplo, en Taiwan los elevados niveles de PCBs que ingirió la población a través de aceites contaminados dieron como resultado importantes desórdenes en

²⁴¹ Clark DR. Dicofol (Kelthane) as an environmental contaminant. U.S. Fish and Wildlife Technical Report W.D.C.U.S.F.a.W. Service, 1990.

²⁴² Fox GA. Epidemiological and pathobiological evidence of contaminant-induced alterations in sexual development in free-living wildlife. Chemical-induced Alterations in Sexual and Functional Development. *The wildlife/human connection*, 1992, 23:147-158.

²⁴³ Munkittrick KR, Port CB, Van der Kraak GJ, Smith IR, Rokosh DA. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991, 48:1371-1380.

²⁴⁴ Jobling SaS JP. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 1993, 27:361-372.

los hijos de las madres expuestas a dichas sustancias²⁴⁵. También se sospecha que un elevado número de enfermedades son causadas por EDCs. Por ejemplo, se piensa que el cáncer de mama en mujeres está relacionado con la exposición a EDCs clorados²⁴⁶. Otro efecto que, en los últimos años se está relacionando con dicha exposición, es la llegada temprana de la menstruación²⁴⁷. En los hombres, la criptorquidia y baja calidad espermática son ejemplos comunes de efectos causados por EDCs^{248,249}.

Sin embargo, los EDCs no sólo afectan a los animales. Las plantas también pueden sufrir sus efectos, tal como ocurre con las leguminosas. Las plantas leguminosas viven en simbiosis con las bacterias del suelo del género *Rhizobium*. La comunicación funciona vía fitoestrógenos, donde el "blanco" de estos fitoestrógenos es la proteína activadora transcripcional "*nodulation D*" (NodD), que puede ser considerada como el homólogo del receptor de los estrógenos de los vertebrados²⁵⁰. Es posible que los EDCs interfieran con la comunicación bacteria-planta por su interacción con los fitoestrógenos y por lo tanto afecten a la simbiosis. Este hecho ha sido probado en estudios²⁵¹⁻²⁵³ que evaluaron la

²⁴⁵ Rogan WJ, Gladen BC, Hung KL, Shih LY, Taylor JS, Wu YC, Yang D, Ragan NB, Hsu CC. Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants. *Science*, 1988, 241:334-336.

²⁴⁶ Munoz-De-Toro M, Durando M, Beldomenico PM, Beldomenico HR, Kass L, García SR, Luque EH. Estrogenic microenvironment generated by organochlorine residues in adipose mammary tissue modulates biomarker expression in ER alpha-positive breast carcinomas. *Breast Cancer Research*, 2006, 8(4):1-9.

²⁴⁷ Ouyang F, Perry MJ, Venners SA, Chen C, Wang B, Yang F, Fang Z, Zang T, Wang L, Xu X, Wang X. Serum DDT, age at menarche, and abnormal menstrual cycle length. *Occupational and Environmental Medicine*, 2005, 62(12):878-884.

²⁴⁸ Bay K, Asklund C, Skakkebaek NE, Andersson AM. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 20(1):77-90.

²⁴⁹ Saradha B, Mathur PP. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2006, 21(1):34-41.

²⁵⁰ Gyorgypal Z, Kondorosi A. Homology of the ligand-binding regions of *Rhizobium* symbiotic regulatory protein NodD and vertebrate nuclear receptors. *Molecular & General Genetics*, 1991, 226(1-2):337-340.

²⁵¹ Fox JE. Non-traditional targets of endocrine disrupting chemicals: The roots of hormone signaling. *Integrative and Comparative Biology*, 2005, 45(1):179-188.

²⁵² Fox JE. Chemical communication threatened by endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(6):648-653.

²⁵³ Fox JE, Starcevic M, Jones PE, Burow ME, McLachlan JA. Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(6):672-677.

comunicación simbiótica entre la planta leguminosa, alfalfa (*Medicago sativa*) y la bacteria del suelo *Sinorhizobium meliloti*, que es responsable de la fijación de nitrógeno en presencia de bisfenol A.

Las opiniones concernientes a los efectos de los EDCs son contradictorias; algunos científicos consideran que no hay evidencia indiscutible que los efectos de los disruptores endocrinos causan serios efectos a nivel de los seres vivos²⁵⁴, mientras que otros establecen que hay evidencia considerable para establecer conexiones entre la exposición a compuestos estrogénicos con los defectos reproductivos y neuroendocrinos observados²⁵⁵.

Fuera de esto, la elevada persistencia de estos contaminantes puede incrementar el peligro de bioacumulación²⁵⁶. Por ejemplo, se han encontrado niveles de filtros UV orgánicos, que cada vez son más usados para prevenir problemas en la piel, en la biota en cantidades comparables a los PCBs. Se ha determinado que algunos de estos filtros como el octocrileno y el canfor 4-metilbenzilideno pueden acumularse en animales en concentraciones en el rango de 0.040 a 1.8 mg Kg⁻¹, y que el potencial de biomagnificación no se puede excluir²⁵⁷.

4.2.3. Clasificación de los Disruptores Endocrinos Químicos.

Ya se ha mencionado que los EDCs representan un grupo de sustancias que no están definidas principalmente por su estructura química, ya que muchos no presentan similitudes estructurales o

²⁵⁴ Mathiessen P. Is Endocrine disruption a significant ecological issue?. *Ecotoxicology*, 2000, 9:21–24.

²⁵⁵ Dickerson SM, Gore AC. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life-cycle. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2007, 8:143–159.

²⁵⁶ Paterson G, Metcalfe CD. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, 2008, 74:125–130.

²⁵⁷ Diaz-Cruz MS, Llorca M, Barceló D. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites, and disinfection by-products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27:873–887.

propiedades químicas comunes, sino más bien se distinguen o reconocen a través de sus efectos biológicos. Se pueden clasificar en dos grupos, de acuerdo a su origen, naturales y antropogénicos o sintéticos.

Entre los EDCs antropogénicos se incluyen fármacos y productos de cuidado personal, así como compuestos químicos industriales sintetizados con diversos fines, pero que accidentalmente tienen propiedades como disruptores endocrinos²⁵⁸. Actualmente, se sospecha que puedan presentar actividad como EDCs, alrededor de 38,000 sustancias químicas y algunos metales pesados. Además, de acuerdo a la US-EPA, 87,000 compuestos químicos necesitan ser evaluados para descartar o confirmar esta actividad²⁵⁹. La Fig. 4.14 muestra la clasificación de estos compuestos químicos y algunos ejemplos característicos.

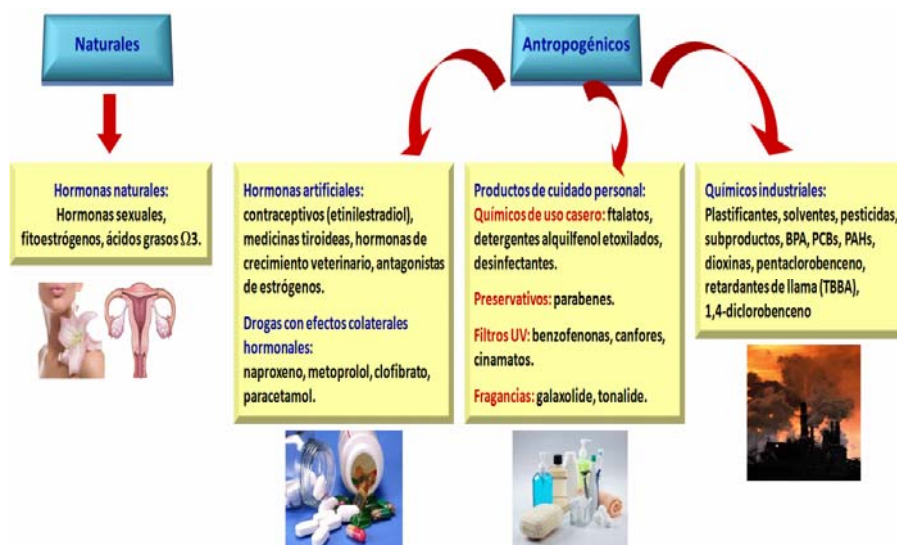


Figura 4.14. Clasificación de EDCs de acuerdo a su origen.

²⁵⁸ Anca Caliman F, Gavrilescu M. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review. *Clean*, 2009, 37: 277–303.

²⁵⁹ Vogel JM. Tunnel vision: The regulation of endocrine disruptors. *Policy Sciences*, 2004, 37:277–303.

4.2.4. Mecanismo de Acción de los Disruptores Endocrinos Químicos.

Las hormonas son un conjunto de moléculas que, junto con el sistema nervioso, coordinan diversas funciones en el organismo. Estos compuestos se producen en células u órganos endocrinos y ejercen su acción en otros órganos o células, tras ser transportados por el torrente sanguíneo. Del conjunto de sistemas hormonales que rigen el funcionamiento de un organismo se deben destacar tres por su vital importancia en el desarrollo sexual y reproductivo del individuo:

- Las hormonas tiroideas. Implicadas en el crecimiento y en la diferenciación sexual (el hipotiroidismo genera, entre otros efectos, una importante merma del desarrollo físico y mental);
- Las hormonas retinoideas, básicas para la diferenciación sexual embrionaria y cuyo mal funcionamiento acarrea deficiencias en el desarrollo sexual;
- Las hormonas esteroideas, que regulan el fenómeno reproductivo y el desarrollo de características sexuales secundarias.

Los EDCs son capaces de interactuar con los receptores hormonales perturbando la expresión génica. Al unirse al receptor, estos compuestos estimulan e inhiben la transcripción genética de forma similar a como lo hacen las hormonas naturales, o incluso pueden inactivar dicho proceso formando complejos receptor-ligando con conformaciones que anularían la transcripción. Así pues, el impacto de los EDCs en el metabolismo es de una gran importancia: genera interferencias en el transporte de proteínas, alteraciones en la síntesis y

biotransformación de las hormonas y efectos tóxicos en gónadas, hipotálamo, pituitaria y glándulas endocrinas.

Existen varias anomalías descritas en los seres humanos que se sugieren como efectos directos de la exposición a los EDCs, y que pueden resumirse en perturbaciones de la conducta²⁶⁰, defectos de nacimiento, comportamiento sexual alterado o reducido, hiperactividad y déficit de atención, función tiroidea o adrenal alterada, reducción de la calidad espermática e infertilidad²⁶¹ y un incremento notable de la incidencia de cánceres²⁶², más concretamente de aquellos que afectan a los sistemas reproductivos del hombre y la mujer.

Adicionalmente es necesario tener en cuenta que la acción de los EDCs es mucho más potente cuando más de un compuesto está presente de manera simultánea, aunque su acción individual pueda ser insignificante (efecto sinérgico).

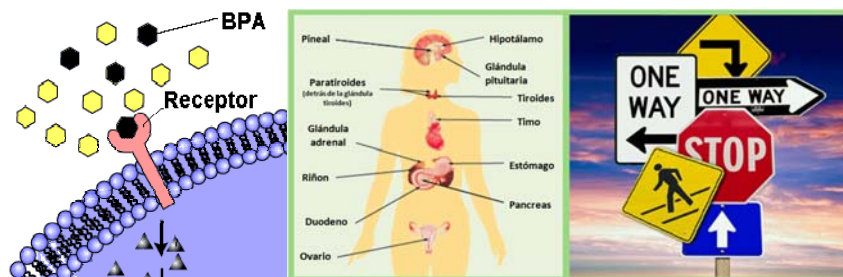


Figura 4.15. Los EDCs imitan a las hormonas naturales interactuando con los receptores hormonales en el sistema endocrino, alterando la expresión genética. Los EDCs envían un mensaje equivocado en el lugar equivocado en el momento equivocado.

²⁶⁰ Jacobson JL, Jacobson SW, Humphrey HE. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive function in young children. *Journal of Pediatrics*, 1990, 116:38-45.

²⁶¹ Sharpe NE. Are oestrogens involved in declining sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 1993, 341:1392-1395.

²⁶² Adami H, Bergström R, Möhner M, Teppo L. Testicular Cancer in nine Northern European countries. *International Journal of Cancer*, 1994, 59:33-38.

Un buen número de EDCs se caracterizan por enfocar su mecanismo de acción sobre las hormonas estrogénicas. Los EDCs estrogénicos pueden ser divididos en dos grupos generales: unos que imitan las hormonas esteroideas endógenas y otros que actúan como antagonistas. La estrogénicidad mediada por receptores clásicos o estrógenos endógenos ocurre cuando se unen directamente al receptor estrogénico alfa o beta, activándolo²⁶³. Un antagonista clásico, por ejemplo, fulvestrant, previene la activación por bloqueo del receptor al que se une el esteroide²⁶⁴. Sin embargo, existen otras maneras por las cuales los EDCs alteran los mecanismos de acción de las hormonas. Una selección de los mecanismos se describe brevemente a continuación (Fig. 4.16):

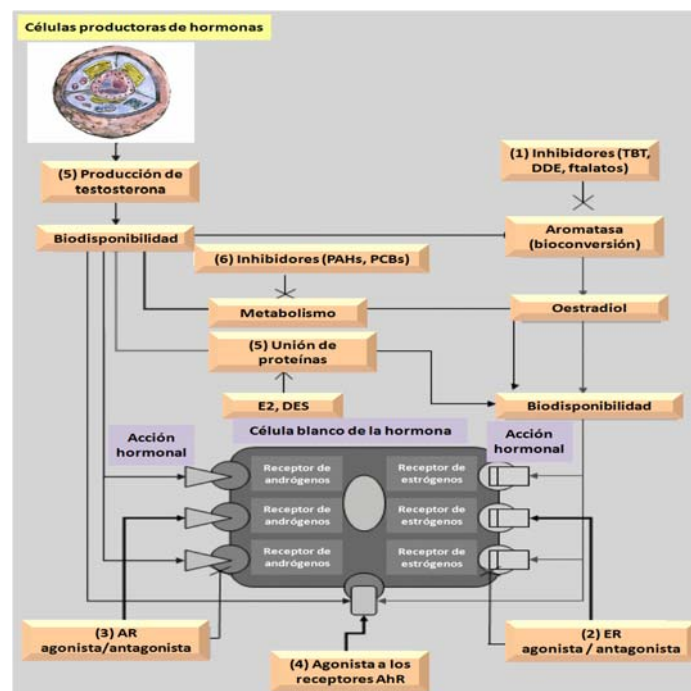


Figura 4.16. Mecanismos potenciales de los EDCs.

²⁶³ Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, Vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives*, 2003, 111(8):994-1006.

²⁶⁴ Howell A. Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 2006, 13(3):689-706.

1. Puede alterarse la biosíntesis de hormonas esteroideas endógenas. Un ejemplo clásico es el mitotano (o,p'-DDD), que afecta la biosíntesis de las hormonas esteroideas incluso en una etapa temprana. Reduce la producción de corticoesteroides por inhibición del esteroide mitocondrial 11 β -hidrolasa (CYP11B1) y la actividad en el lado de ruptura del colesterol (CYP11A1)²⁶⁵.
2. La biotransformación de hormonas puede afectarse por los EDCs. Algunos clorofenoles inhiben a las enzimas sulfotransferasas, responsables de inactivar los estrógenos, a través de la formación de sulfatos de estrógeno en sangre²⁶⁴, causando un desbalance en la sulfatación y desulfatación y un incremento de los niveles intercelulares de estrógenos.
3. Interferencia con el anabolismo de las hormonas. Por inhibición de la aromatasa (CYP19), responsable de convertir los andrógenos en estrógenos, el balance fisiológico de andrógenos y estrógenos sufre un desorden^{266,267}. Un ejemplo común son los fungicidas azoles, tal como el porchloraz²⁶⁶.
4. Un mecanismo no clásico de los EDCs se enfoca sobre los receptores esteroideos de membrana, localizados sobre la superficie celular. Un ejemplo es el receptor de membrana 20 β -S, el cual es responsable de la inducción de la maduración de los oocitos. La presencia de xenoestrógenos puede inhibir esta inducción²⁶⁸.

²⁶⁵ Sanderson JT. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*, 2006, 94(1):3–21.

²⁶⁶ Zarn JA, Bruschiweiler BJ, Schlatter JR. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 2003, 111(3):255–261.

²⁶⁷ Sanderson JT. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*, 2006, 94(1):3–21.

²⁶⁸ Thomas P. Rapid, nongenomic steroid actions initiated at the cell surface: lessons from studies with fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1–4):3–12.

5. Los EDCs también pueden alterar el receptor arilhidrocarburo (AhR) o su dupla, un heterodímero corto (SHP), ambos ejercen influencia sobre el receptor de los estrógenos^{269,270}.

4.2.5. Estructura Química y Uso del Bisfenol A y sus Derivados.

Los bisfenoles son compuestos aromáticos constituidos por dos anillos fenólicos que se unen a través de un grupo puente. El más común y el de uso más extendido es el bisfenol A, donde el grupo puente es un isopropilideno. Este compuesto muestra una gran tendencia a clorarse, como lo demuestra el hecho de que los cloroderivados del BFA están presentes en aguas cloradas, que es hoy en día el tratamiento más usual para aguas potables de abastecimiento público. La figura 4.17 muestra la estructura química de esta familia de compuestos.

²⁶⁹ Seol WG, Hanstein B, Brown M, Moore DD. Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (Short heterodimer partner). *Molecular Endocrinology*, 1998, 12(10):1551-1557.

²⁷⁰ Navas JM, Segner H. Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquatic Toxicology*, 2000, 51(1):79-92.

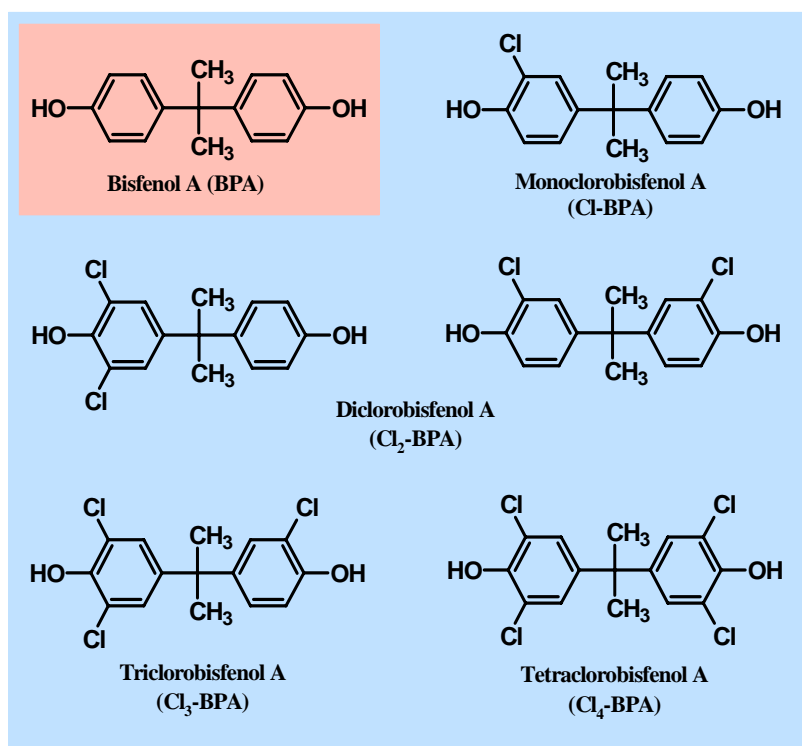


Figura 4.17. Estructura química del bisfenol A y sus derivados clorados.

El uso del BFA está muy extendido en la actualidad. Es el monómero base para la fabricación de resinas epoxi, que por entrecruzamiento dan polímeros de excelentes propiedades químicas, térmicas y mecánicas; y en la obtención de plásticos policarbonato, que poseen gran estabilidad mecánica y térmica, así como muy buena transparencia. Estos plásticos están presentes en infinidad de productos y de actividades como la industria del automóvil y aeronáutica, en instalaciones de alumbrado, en construcción, en sistemas eléctricos, conducciones de aguas potable, telecomunicaciones, equipos fotográficos, lentes ópticas y discos compactos, envasado de alimentos y aguas, en productos manufacturados como los biberones e incluso en materiales relacionados con la salud humana como prótesis y lentes intraoculares; también puede destacarse el uso de BFA en fungicidas,

retardantes de llama y colorantes. En las figuras 4.18 y 4.19 se muestran los usos más comunes del BFA.



Figura 4.18. Usos comunes del bisfenol A.



Figura 4.19. El bisfenol A es ubicuo en la vida del ser humano.

El bisfenol A es una de las sustancias químicas que más se producen a nivel mundial, con una producción anual de más de 4 millones de toneladas en la última década, cifra que continúa creciendo en la actualidad²⁷¹. Las figuras 4.20 y 4.21, muestran la distribución del BFA de acuerdo a sus usos en Europa, y la producción de resinas epoxi y de plásticos policarbonato y su distribución.

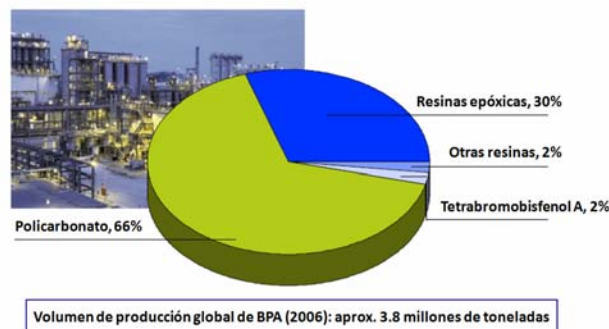


Figura 4.20. Producción de BFA en Europa en 2006 y distribución de acuerdo a sus usos.

²⁷¹ Yang M, Seon Park M, Sun Lee H. Endocrine Disrupting Chemicals: Human Exposure and Health Risks. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 2006, 24:183-224.

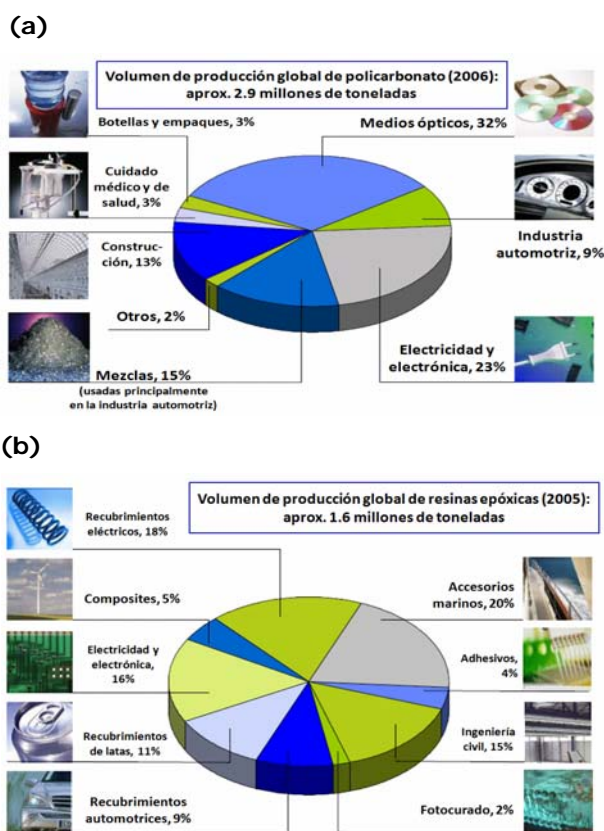


Figura 4.21. Producción de plásticos policarbonato (a) y resinas epoxi (b) en Europa entre los años 2005–2006. Distribución según usos.

Actualmente, el BFA es el EDC que más preocupación causa a la comunidad científico-médica debido a que los efectos que produce son aún más perniciosos que los de otros compuestos. Sin embargo, existe mucha controversia en torno a este compuesto ya que, aunque la industria de los plásticos establece que las concentraciones de BFA a las que está expuesta una persona no son tóxicas; por otro lado, existe la llamada hipótesis de la "dosis baja" aplicable a este compuesto, según la cual, dosis pequeñas pueden ser más dañinas que dosis altas²⁷². Existen

²⁷² Vandenberg L, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, 2009, 30:75–95.

estudios que han demostrado que el BFA puede causar efectos adversos por debajo de la dosis "de seguridad" de $50 \mu\text{g Kg}^{-1} \text{d}^{-1}$, por lo que estos niveles deberán ser reevaluados por la US EPA y FDA.

4.2.6. Comportamiento Bioquímico del Bisfenol A como Disruptor Endocrino.

A. Capacidad para Unirse a los Receptores Hormonales Estrogénicos y Competir con los Estrógenos Naturales.

Estudios in vitro han descrito la capacidad del BFA para competir eficazmente con el estradiol por unirse a los receptores estrogénicos de humanos y animales²⁷³⁻²⁷⁵, además demuestran que la afinidad del compuesto por estos receptores es superior a la de la mayoría de los xenobióticos conocidos. Un destacado estudio ha demostrado que el BFA presenta una gran afinidad por los receptores estrogénicos de tipo γ ²⁷⁶, los cuales están íntimamente relacionados con el desarrollo cerebral de los mamíferos. Esta afinidad por los receptores estrogénicos es tal que se están desarrollando dispositivos que permiten su eliminación de éste y otros disruptores de efluentes acuosos destinados al consumo humano, mediante la interacción xenobiótico-receptor²⁷⁷.

²⁷³ Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, Safe S, McDonell DP, Gaido KW. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor β in a distinct manner from estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1998, 142(1-2):203-214.

²⁷⁴ Aloisi AM, Della Seta D, Ceccarelli I, Farabollini F. Bisphenol-A differently affects estrogen receptors- β in estrous cycling and lactating female rats. *Neuroscience Letters*, 2001, 310(1):49-52.

²⁷⁵ Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, Yoshihara S, Fujimoto N, Watanabe H, Ohta S. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, 2005, 84(2):249-259.

²⁷⁶ Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor β (ERR β) with high constitutive activity. *Toxicological Letters*, 2006, 167(2):95-105.

²⁷⁷ Liu Z-h, Ito M, Kanjo Y, Yamamoto A. Profile and removal of endocrine disrupting chemicals by using an ER/AR competitive ligand binding assay and chemical analyses. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(7):900-906.

B. Interacción con Sistemas Enzimáticos Reguladores del Balance Hormonal.

En el año 2006 se demostró y publicó que el BFA puede sulfatarse y desulfatarse de forma muy similar a como lo hace el estradiol²⁷⁸, de modo que la acción de las sulfatasas permite transportar no sólo a los estrógenos naturales, sino también el bisfenol A. La consecuencia de este fenómeno es que el organismo no es capaz de ofrecer una resistencia tan eficaz como debiera a la acción de este contaminante. Mientras que otros disruptores al sulfatarse se transportan hasta llegar a la orina y se excretan, el BFA no se excreta de forma eficaz y sigue actuando en el organismo. Es decir, consigue obviar parcialmente la defensa metabólica del organismo ante la mayoría de los xenobióticos.

C. Efectos sobre la Proliferación de Células TumORAles.

Se ha demostrado que el BFA como sus derivados mono y di sulfatados provocan la proliferación de células MCF-7, y que este fenómeno está correlacionado con la concentración de disruptor a la que se somete el cultivo celular.

D. Actividad Antiandrogénica.

El BFA y sus cloroderivados poseen actividad antiandrogénica demostrada. Son capaces de inhibir la respuesta bioluminiscente de células N1H3T3, especialmente diseñadas para expresar la enzima luciferasa tras la unión de la dihidrotestosterona con sus receptores específicos²⁷⁵.

²⁷⁸ Stowell, C.L., et al., A role for sulfation-desulfation in the uptake of bisphenol A into breast tumor cells. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(8):891-897.

Se ha demostrado que los grupos más susceptibles a los efectos del BFA son los niños menores de 5 años, las madres gestantes y las que están dando de lactar, así como el feto, debido a que presentan una capacidad disminuida de metabolizar el BFA a nivel hepático, mientras que por otro lado, el BFA presenta una elevada afinidad para almacenarse en el tejido fetal, así como en la placenta²⁷².



Figura 4.22. Grupos más susceptibles a los efectos del BFA.

4.2.7. Efectos de los Derivados Clorados del Bisfenol A.

El BFA reacciona con el hipoclorito sódico, usado como agente blanqueante en las fábricas de papel y en la desinfección del agua potable, produciendo derivados clorados²⁷⁹ (Fig. 4.17), algunos de los cuales, como el tetracloro bisfenol A (TCBPA), son usados como retardantes de llama. Los cloroderivados, especialmente el tri- y tetraclorobisfenol A están comenzando a causar cierta preocupación, porque se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*, que pueden ser incluso más reactivos que el BFA en la competencia con el 17β -estradiol para unirse a los receptores estrogénicos humanos ($ER-\alpha$ y $ER-\beta$)²⁸⁰, incluso a concentraciones muy bajas de los compuestos^{279,281}. Además, a través de estudios con células humanas de carcinoma de mama

²⁷⁹ Fukazawa H, Watanabe W, Shiraishi F, Shiraishi H, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y. Formation of Chlorinated Derivatives of Bisphenol A in Waste Paper Recycling Plants and Their Estrogenic Activities. *Journal of Health Science*, 2002, 48:242-249.

²⁸⁰ Hu J, Aizawa T, Ookubo S. Products of Aqueous Chlorination of Bisphenol A and Their Estrogenic Activity. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36:1980-1987.

²⁸¹ Kuruto-Niwa R, Terao Y, Nosawara R. Identification of estrogenic activity of chlorinated bisphenol A using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2002, 12:27-35.

MCF-7, se ha demostrado que los cloroderivados del BFA tiene una potencia estimuladora mayor sobre su proliferación que el BFA²⁸².

El BFA y sus derivados clorados son además capaces de producir un incremento notable en la masa del tejido uterino y el endometrio, fases previas en el desarrollo de cánceres de útero y endometrio. Además, se ha demostrado que la exposición crónica a los derivados clorados a dosis muy pequeñas es mucho más potente y peligrosa que la del propio BFA²⁸². También se ha publicado que los cloroderivados poseen un mayor potencial de inhibición de la 3,3',5-triyodotironina (T3), la cual se une a la proteína tiroidea plasmática, transtirretina (TTR)²⁸³. Estos resultados indican que los cloroderivados también son competidores más potentes del TTR.

Por otro lado, los efectos de la cloración sobre la toxicidad aguda del BFA han generado preocupación que no ha sido aclarada. Se ha demostrado que los cloroderivados se pueden fotodegradar, produciendo especies reactivas más tóxicas. Además, también se ha comprobado que la citotoxicidad aguda de los cloroderivados se incrementa por radiación UVB y UVC²⁸⁴. Esto significa que cuando los cloroderivados ingresan al medio ambiente, estarán expuestos a la luz solar que contiene radiación UV, incrementando su citotoxicidad por generación de subproductos de fotodegradación.

²⁸² Takemura H, Ma J, Sayama K, Terao Y, Zhu BT, Shimoi K. In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology*, 2005, 207:215–221.

²⁸³ Murata T, Yamauchi K. 3,3',5-Triiodo-L-thyronine-like activity in effluents from domestic sewage treatment plants detected by *in vitro* and *in vivo* bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, 187:110–117.

²⁸⁴ Mutou Y, Ibuki Y, Terao Y, Kojima S, Goto R. Change of estrogenic activity and release of chloride ion in chlorinated bisphenol A after exposure to ultraviolet B. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29:2116–2119.

Más aún, se conoce que el BFA es metabolizado y transformado en glucorónidos a nivel hepático²⁸⁵, y sus metabolitos son rápidamente eliminados con las heces y la orina; sin embargo, en el caso de los cloroderivados, son degradados lentamente, acumulándose en el cuerpo humano y otros seres vivos.

4.2.8. Otros Efectos del Bisfenol A y Derivados Clorados.

Los daños demostrados del BFA son muy diversos y perniciosos. Además de los daños ya descritos sobre la capacidad y el desarrollo reproductivos de las especies^{286,287}, en los últimos años se ha demostrado que el BFA está relacionado con disfunciones como:

- Anomalías neuroendocrinas²⁸⁸.
- Alteraciones fisiológicas y estructurales del cerebro²⁸⁹.
- Alteraciones en la conducta: agresividad, estrés, conductas sexuales anómalas, mayor vulnerabilidad del individuo ante la ingesta de drogas como la morfina, peor capacidad cognitiva²⁸⁸.
- Inhibición de los fenotipos masculinos y de la espermatogénesis, es decir, feminización de la población de ensayo²⁹⁰.

²⁸⁵ Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter Jr. JM. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological Sciences*, 2000, 54:3-18.

²⁸⁶ Patisaul HB, Bateman HL. Neonatal exposure to endocrine active compounds or an ER α agonist increases adult anxiety and aggression in gonadally intact male rats. *Hormones and Behavior*, 2008, 53(4):580-588.

²⁸⁷ Ramakrishnan S, Wayne NL. Impact of bisphenol A on early embryonic development and reproductive maturation. *Reproductive Toxicology*, 2008, 25(2):177-183.

²⁸⁸ Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR, Vom Saal FS. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, 2007, 24(2):199-224.

²⁸⁹ Tando S, Itoh K, Yaoi T, Ikeda J, Fujiwara Y, Fushiki S. Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development. *Brain Development*, 2007, 29(6):352-356.

²⁹⁰ Furuya M, Adachi K, Kuwahara S, Ogawa K, Tsukamoto Y. Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by Bisphenol-A. *Life Sciences*, 2006, 78(15):1767-1776.

En la Tabla 4.3, se resumen alguno de los principales efectos que se sospecha produce el BFA y sus derivados sobre los organismos de los seres humanos.

Tabla 4.3. Efectos posibles de los EDCs en los seres humanos.

Mujeres	Niñas	Niños	Hombres
Cáncer de mama	Pubertad precoz	Criptorquidia o no descenso testicular	Cáncer de testículo
Endometriosis	Cáncer vaginal	Hipospadias	Cáncer de próstata
Muerte embrionaria y fetal	Mayor incidencia de cánceres	Reducción del recuento espermático	Reducción del recuento espermático
Malformaciones en la descendencia	Deformaciones en órganos reproductores	Disminución del nivel de testosterona	Reducción de la calidad del esperma
	Problemas en el desarrollo del SNC		Disminución del nivel de testosterona
	Bajo peso de nacimiento		Modificaciones de concentraciones de hormonas tiroideas
	Hiperactividad		
	Problemas de aprendizaje		
	Disminución del coeficiente intelectual y de la comprensión lectora		

4.2.9. Propiedades Físicoquímicas del Bisfenol A.

El BFA es un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 150–155 °C)²⁹¹. Es poco soluble en agua (120–300 mg L⁻¹ en función del pH del medio). Presenta propiedades como ácido debido a los grupos fenólicos que forman parte de su estructura, con valores de pK_a de 9.6 a 10.2. Debido a la presencia de los átomos de cloro, los derivados clorados presentan una acidez mayor.

²⁹¹ Staples CA, Dom PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A Review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 1998, 36:2149–2173.

El BFA presenta un coeficiente octanol-agua ($\log K_{ow}$) entre 2.2–3.82, valor que varía con el pH debido a sus propiedades ácido base. Este parámetro corrobora sus características hidrofóbicas, así como su elevada tendencia a adsorberse a matrices sólidas, como suelos, sedimentos y fangos.

Su baja presión de vapor ($8.7 \cdot 10^{-10}$ a $3.96 \cdot 10^{-7}$ mmHg), así como su baja constante de Henry ($1.0 \cdot 10^{-10}$ atm m³ mol⁻¹) establecen que el BFA no es un compuesto volátil.

El BFA presenta fluorescencia nativa en disolventes orgánicos, no así sus derivados clorados, con $\lambda_{excitación}$ entre 274 y 282 nm y $\lambda_{emisión}$ entre 297 y 309 nm para distintos disolventes orgánicos. Esta propiedad es empleada para su determinación analítica, como método de detección²⁹².

²⁹² Del Olmo M, Zafra A, Jurado AB, Vílchez JL. Determination of bisphenol A (BPA) in the presence of phenol by first-derivative fluorescence following micro liquid-liquid extraction (MLLE). *Talanta*, 2000, 50: 1141–1148.

5. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA EL ANÁLISIS DE LOS CONTAMINANTES SELECCIONADOS EN EL MEDIO AMBIENTE.

Los contaminantes seleccionados, se encuentran en el medio ambiente en concentraciones a nivel de trazas ($\mu\text{g L}^{-1}$ - ng L^{-1}). La determinación de este tipo de matrices es de gran importancia ya que son causa de preocupación por su impacto ecológico y por los efectos adversos sobre el ser humano ya referidos en esta memoria. Sin embargo, la determinación de concentraciones tan bajas en matrices tan complejas, dificulta de forma notable el proceso analítico.

Aunque en el caso de las aguas residuales existen en la bibliografía científica algunos métodos analíticos para el análisis de los compuestos seleccionados, es necesario mejorar estas metodologías y aumentar su sensibilidad y el número de sustancias analizadas de forma simultánea (métodos multiresiduo). De este modo se hará posible una mayor comprensión de la efectividad de los procesos de tratamiento de aguas residuales que buscan eliminar estos compuestos, para tener así una idea más real de la presencia de estas sustancias en el medio ambiente. Por otra parte, la determinación de los contaminantes de interés en los fangos de desecho, constituye un verdadero reto, ya que existen disponibles muy pocos métodos analíticos para este tipo de matriz que incluyan una gran variedad de analitos. Esto se debe posiblemente a la gran complejidad de la matriz, hecho que complica tanto la etapa de detección, como la extracción de los compuestos por las importantes interacciones analito-matriz.

En este apartado se proporciona una visión general de las herramientas analíticas empleadas para el desarrollo de los métodos analíticos propuestos en esta Tesis Doctoral.

5.1. Determinación de Microcontaminantes en Aguas.

5.1.1. Muestreo, Almacenamiento y Estabilidad.

Una de las etapas más importantes en cualquier procedimiento analítico, y que puede ser causa principal de error en el proceso completo, es la toma y preparación de la muestra. Suponiendo además esta etapa el 80% del tiempo total de análisis. Las principales dificultades durante el muestreo derivan de la necesidad de representatividad de la muestra.

La elección del método, el lugar, la frecuencia de muestreo y el número de muestras recolectadas son factores clave para minimizar estos errores²⁹³. Además, es de gran importancia la preservación de la muestra, una vez tomada, para evitar tanto alteraciones de la misma, como pérdidas por descomposición. En el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral, las muestras se han mantenido, hasta su análisis, siempre en oscuridad (desde su toma en botellas de vidrio ámbar) y en frío (a 4°C para el caso de aguas y a -20°C para muestras sólidas o fangos). Estas condiciones son de especial relevancia en el caso de las (fluoro)quinolonas, ya que estos compuestos son fotosensibles^{294,295}.

²⁹³ Seiftrová M, Nováková L, Lino C, Pena A, Solich P. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 649:158-179.

²⁹⁴ Ferdig N, Kaleta A, Buchberger W. Improve liquid chromatographic determination of nine currently used (fluoro)quinolones with fluorescence and mass spectrometric detection for environmental samples. *Journal of Separation Science*, 2005, 28:1448-1456.

²⁹⁵ Speltini A, Sturini M, Maraschi F, Profumo A. Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: sample preparation and determination. *Journal of Separation Science*, 2010, 33:1115-1131.

En el caso de estos compuestos, se han llevado a cabo estudios de estabilidad para seleccionar tanto la estrategia de muestreo, como las condiciones y el tiempo de almacenamiento de muestras y disoluciones patrón, teniendo además en cuenta la presencia de actividad bacteriana en las muestras²⁹⁶. Se ha demostrado que los dos factores que más influyen en la estabilidad son la temperatura y el tiempo de almacenamiento. En general, se recomienda la renovación de las disoluciones de patrones cada 3 meses como máximo aunque se mantengan a bajas temperaturas²⁹³. Por otro lado, estudios realizados en nuestro laboratorio, demostraron que la presencia de agua en las disoluciones estándar afecta notablemente la estabilidad de las quinolonas. Al ser compuestos altamente polares, se empleó la mínima cantidad de agua posible para facilitar su disolución en algunos casos.

En algunos casos fue necesario almacenar las muestras de agua parcialmente procesadas en los cartuchos SPE, pero en este caso, se intentó no conservar almacenadas las muestras durante mucho tiempo (dos semanas como máximo), ya que se ha demostrado que la estabilidad de las mismas en estas condiciones es aun menor²⁹³.

Por otro lado, con objeto de evitar el crecimiento bacteriano, y con ello la pérdida de analitos, se han aplicado medidas adicionales como la adición de algún conservante. Existen muchos agentes que pueden cumplir esta función, como azida sódica, cloruro mercúrico, cloroformo, formaldehído o tiosulfato sódico, sin embargo, algunos de éstos presentan una toxicidad elevada, y aunque se tengan en cuenta las medidas de seguridad pertinentes, no son recomendables para el trabajo analítico rutinario. Además, sustancias como el cloruro mercúrico, los sulfitos y los bisulfitos no son fiables para tiempos

²⁹⁶ Turiel E, Martín-Esteban A, Bordin G, Rodríguez AR. Stability of fluoroquinolone antibiotics in river water samples and in octadecyl silica solid-phase extraction cartridges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 380:123–128.

prolongados de almacenamiento²⁹⁷. En todos los análisis realizados durante esta Tesis Doctoral, se empleó una disolución de formaldehído al 1%, ya que numerosos trabajos científicos publicados avalan su efectividad, sin alterar la integridad de la muestra y los analitos²⁹⁸⁻³⁰⁰. Alternativamente las muestras pueden ser acidificadas para inhibir el crecimiento microbiano³⁰¹, siendo una buena opción, especialmente en el análisis de antibióticos³⁰², ya que además de ser efectivo como conservante, en el caso de compuestos como las quinolonas, el tratamiento de muestra requiere de la acidificación previa de la misma.

Otro factor importante y de especial importancia en el muestreo, es la naturaleza de los recipientes (Fig. 5.1). El material debe ser resistente a las condiciones de conservación y no interactuar con los analitos. Aunque hay varios tipos de materiales disponibles, en caso de los análisis desarrollados en este trabajo, se utilizaron recipientes de vidrio ámbar, ya que este material es muy recomendado en el análisis de fármacos en niveles traza³⁰³, con sólo algunas pocas excepciones³⁰¹, que no incluyen a los microcontaminantes seleccionados. Se evitaron los recipientes de plástico ya que el polietileno puede reaccionar con compuestos orgánicos, además hay que tener en consideración que

²⁹⁷ Vega Morales T, Torres Padrón ME, Sosa Ferrera Z, Santana Rodríguez JJ. Determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in liquid and solid samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(10):1186–1200.

²⁹⁸ Gabet V, Miège C, Bados P, Coquery M. Analysis of estrogens in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26:1113–1131.

²⁹⁹ Comerton AM, Andrews RC, Bagley DM. Practical overview of analytical methods for endocrine-disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in water and wastewater. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 2009, 367:3923–3939.

³⁰⁰ Vanderford BJ, Pearson RA, Rexing DJ, Snyder SA. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2003, 75:6265–6274.

³⁰¹ Madrid Y, Pedrero Zayas Z. Water sampling: Traditional methods and new approaches in water sampling strategy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26: 293–299.

³⁰² Abuin S, Codony R, Compañó R, Granados M, Prat MD. Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1114:73–81.

³⁰³ Kotwasik A, Debska J, Namiesnik J. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26:557–568.

algunos compuestos seleccionados se usan en la fabricación de plásticos (BFA) y podrían ser transferidos accidentalmente a las muestras. Por último, para el muestreo de grandes cantidades de agua o fangos, se utilizaron recipientes de teflón.



Figura 5.1. Recipientes de vidrio (a y b) y de teflón (c) fueron usados para el muestreo y almacenamiento de las muestras de agua y fango.

5.1.2. Pretratamiento de las Muestras.

La preparación de la muestra depende de las propiedades físicas y químicas de los analitos y de las matrices estudiadas. Los principales objetivos del proceso son concentrar los analitos, reducir/eliminar las interferencias debidas a la matriz y preparar un extracto adecuado que contenga a los analitos para el análisis cromatográfico. El tratamiento de la muestra incluye tres etapas: pretratamiento, limpieza de la muestra, y concentración de los analitos.

El primer paso consiste en la eliminación del material particulado mediante centrifugación y/o filtración de la muestra original (Fig. 5.2). Para esto último, se ha empleado papel de filtro de 0.45 y 0.20 μm . Esta etapa es necesaria para evitar futuros problemas de obstrucción de los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE). La elección del material del papel filtro es importante, ya que los analitos pueden adsorberse al filtro provocando pérdidas, este factor es especialmente importante en el caso

de las quinolonas³⁰⁴. Por eso, en la medida de lo posible, se han reemplazado los procedimientos de filtración por centrifugación.

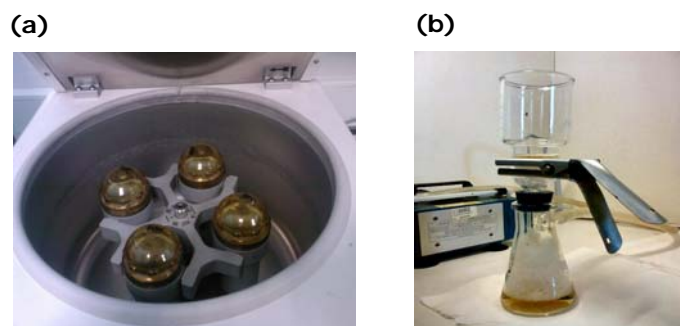


Figura 5.2. Pretratamiento de las muestras de agua por centrifugación (a) y/o filtración (b).

El ajuste del pH de la muestra es un paso de especial relevancia sobre todo para sustancias, como las seleccionadas en este trabajo, que presentan propiedades ácido-base. El valor del pH determina la forma química en la que se encuentran los analitos en las muestras, además condiciona su estabilidad, solubilidad e interacciones de éstos con el adsorbente y la matriz, en la etapa posterior de extracción en fase sólida.

La mayoría de los antibióticos, incluidas las quinolonas, poseen propiedades ácidas, de modo que al acidificar las muestras, predominan las formas neutras o ácidas. Estas formas, son retenidas de manera más eficiente por los adsorbentes de SPE más comunes³⁰⁵ de tipo polimérico hidrofílico-hidrofóbico. Además, a esos valores de pH la materia orgánica presenta una fuerte carga negativa, de modo que puede ser

³⁰⁴ Sturini M, Speltini A, Pretali L, Fasani E, Profumo A. Solid-phase extraction and HPLC determination of fluoroquinolones in surface waters. *Journal of Separation Science*, 2009, 32:3020–3028.

³⁰⁵ Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1161:132–145.

discriminada de manera eficiente por los cartuchos SPE que sean intercambiadores catiónicos, favoreciendo la limpieza de la muestra. En el caso de los cartuchos de naturaleza no polar, se produce la retención de una amplia variedad de compuestos, polares y no polares, siendo poco específicos en relación a las sustancias que retienen. La Fig. 5.3 muestra la naturaleza de los cartuchos SPE usados en los estudios que se llevaron a cabo en esta Tesis Doctoral.

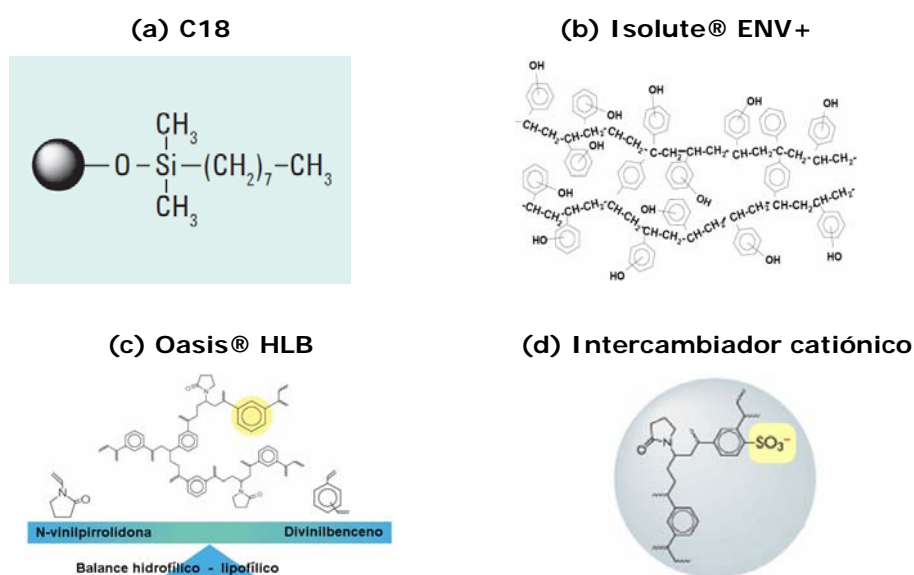


Figura 5.3. Adsorbentes usados en los cartuchos de SPE. **(a)** Adsorbente apolar a base de sílice, de fase inversa, aplicable a compuestos no polares y polares; **(b)** Adsorbente a base de resina no polar entrecruzado que contiene divinilbenceno poliestireno hidroxilado, de fase inversa en principio, aplicable a un rango amplio de compuestos; **(c)** Adsorbente constituido de dos monómeros, N-vinilpirrolidona y divinilbenceno, de fase inversa con interacciones polares, aplicable a compuestos ácidos, básicos y neutros. **(d)** Intercambiador catiónico fuerte a base de grupos sulfónicos, aplicable a compuestos básicos.

El pH de la muestra, muy ligado al de la extracción sobre todo en el caso de las quinolonas, es un parámetro que se debe optimizar mediante un estudio de recuperación de los analitos en un intervalo amplio de pH. Normalmente se emplean soluciones reguladoras para el

ajuste del pH. En el caso particular de los métodos desarrollados en el trabajo que constituye esta Tesis Doctoral, se seleccionó el buffer McIlvaine³⁰⁶, que permite cubrir un rango muy amplio de pH (entre 2 y 8), y es altamente estable.

En el caso del BFA, es un ácido débil con valores de pK_a superiores a 9, por lo que la forma predominante en casi todo el rango de pH de trabajo es la forma neutra, esto hace innecesario el ajuste del pH a las muestras. Por otro lado, aunque los derivados clorados son mucho más ácidos que el BFA, nuestros estudios han demostrado que la influencia del pH no es tan importante como en el caso de las quinolonas, y que es suficiente acidificar ligeramente el medio para asegurar que el pH de la muestra esté entre 6–7, y garantizar que todas las especies, incluido el derivado tetraclorado, el más ácido, estén bajo su forma neutra³⁰⁷. En consecuencia, y dado que la familia del BFA y sus derivados clorados se extrae cuantitativamente bajo la forma neutra, se seleccionaron cartuchos de SPE apolares (C18)³⁰⁸.

5.1.3. Extracción de las Muestras.

En la literatura científica se puede encontrar la aplicación de numerosas técnicas de extracción para fármacos y disruptores endocrinos a partir muestras acuosas. Éstas incluyen técnicas clásicas como la extracción líquido-líquido³⁰⁹ (LLE) y en fase sólida (SPE), junto a otras técnicas de reciente desarrollo como la microextracción en fase

³⁰⁶ McIlvaine TC. A Buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, 1921, 49:183–186.

³⁰⁷ Dorival-García N, Zafra-Gómez A, Navalón A, Vílchez JL. Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1253:1–10.

³⁰⁸ Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navalón A, Vílchez JL. Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography – mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 2008, 88:87–94.

³⁰⁹ Soliman MA, Pedersen JA, Suffet IH. Rapid gas chromatography–mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1029:223–237.

sólida (SPME)³¹⁰, la microextracción en fase líquida (LPME)³¹¹, técnicas de microextracción basadas en la tecnología de membrana³¹²; la extracción con membrana líquida soportada (SLM)³¹³, la extracción "stir bar sorptive" (SBSE)^{314,315} o la extracción en fase sólida "Molecularly Imprinted" (MISPE)^{316,317}.

En esta Tesis Doctoral se ha empleado la SPE. Técnica que sigue siendo uno de las más utilizadas, bien desarrollada, de eficiencia reconocida y con un alto grado de comercialización, ya que están disponibles en el mercado una amplia variedad de adsorbentes, que ofrecen múltiples opciones de análisis, especialmente en el desarrollo de métodos multiresiduo. La SPE permite tanto la limpieza de la muestra como la concentración de los analitos³¹⁸. El proceso completo consiste en 4 etapas (Fig. 5.4): (i) acondicionamiento del adsorbente, (ii) carga

³¹⁰ Radjenović J, Petrović M, Barceló, D. Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26:1132-1144.

³¹¹ Quintana JB, Rodil R, Reemtsma T. Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1061:19-26.

³¹² Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Developments in hollow fibrebased, liquid-phase microextraction *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2004, 23:1-10.

³¹³ Liu M, Qiu B, Jin X, Zhang L, Chen X, Chen G. Determination of estrogens in wastewater using three-phase hollow fiber-mediated liquid-phase microextraction followed by HPLC *Journal of Separation Science*, 2008, 31:622-628.

³¹⁴ Buchberger WW. Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218:603-618.

³¹⁵ Huang X, Qiu N, Yuan D, Lin Q. Preparation of a mixed stir bar for sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of quinolones from wastewater. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217:2667-2673.

³¹⁶ Chen L, Zhang X, Xu Y, Du X, Sun X, Sun L, Wang H, Zhao Q, Yu A, Zhang H, Ding L. Determination of fluoroquinolone antibiotics in environmental water samples based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 662:31-38.

³¹⁷ Rodríguez E, Navarro-Villoslada F, Benito-Peña E, Marazuela MD, Moreno-Bondi, MC. Multiresidue determination of ultratrace levels of fluoroquinolone antimicrobials in drinking and aquaculture water samples by automated online molecularly imprinted solid phase extraction and liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 2011, 83:2046-2055.

³¹⁸ Hennen MC. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography-Review. *Journal of Chromatography A*, 1999, 856:3-54.

de la muestra, (iii) lavado para eliminar los elementos interferentes, y (iv) elución y recuperación de los analitos³¹⁹.

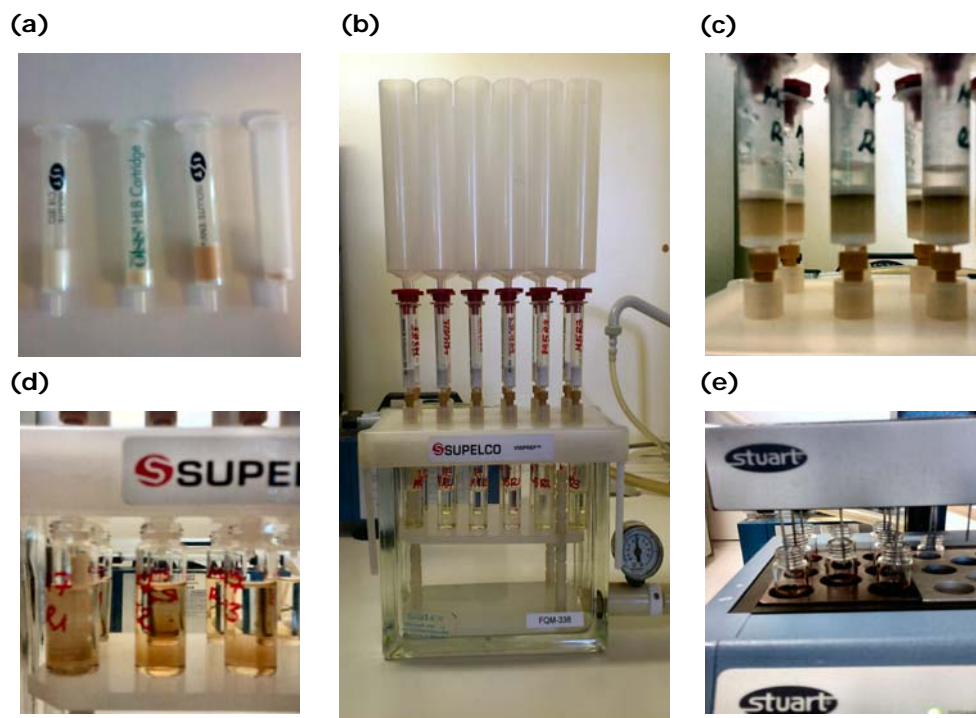


Figura 5.4. Proceso SPE para el análisis de quinolonas en aguas residuales. (a) cartuchos probados, de izquierda a derecha: Isolute[®] C18, Oasis[®] HLB, Isolute[®] ENV⁺, Empore MPC. (b) Montaje del sistema completo de SPE. (c) Detalle de los cartuchos durante la carga de la muestra de agua. (d) Detalle de la etapa de elución. (e) Detalle de la etapa de evaporación a sequedad de los extractos.

Las mejores recuperaciones se obtienen cuando los analitos son fuertemente retenidos por el adsorbente en presencia de agua cuando la muestra atraviesa el cartucho, y a continuación una retención pobre durante la etapa de elución³¹⁹. La SPE se puede usar *off-line*, cuando el proceso se lleva a cabo de manera separada al análisis cromatográfico,

³¹⁹ Pichon V. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, 2000, 885:195–215.

o puede ser *on-line*, cuando el proceso está integrado con el sistema analítico³²⁰.

Los adsorbentes convencionales están fabricados a base de sílice porosa a la que se le enlazan grupos apolares, siendo C₁₈ el más usado. Sin embargo, estos adsorbentes no ofrecen altas recuperaciones para compuestos de elevada polaridad, como los fármacos. Con la introducción de nuevos adsorbentes de tipo polimérico, donde existe un balance hidrofílico-lipofílico, se puede aplicar la SPE a este tipo de analitos^{321,322}. Por otro lado, el uso de resinas de intercambio iónico permite la extracción de compuestos cargados. A pesar de que el uso de estos intercambiadores iónicos es muy habitual hoy en día para la extracción de fármacos, el relleno de tipo polimérico Oasis[®] HLB, sigue siendo el adsorbente preferido^{323,324}. Además es el relleno seleccionado por la US EPA para los análisis multirresiduo de fármacos en agua³²⁵. Estos estudios han demostrado que se alcanzan recuperaciones superiores al 70% para compuestos ácidos, básicos y neutros en un rango amplio de pH^{321,326,327}.

³²⁰ Rossi DT, Zhang N. Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *Journal of Chromatography A*, 2000, 885:97–113.

³²¹ Gros M, 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. *Analytical Chemistry*, 2009, 81:898–912.

³²² Fatta D, Nikolaou A, Achilleos A, Meriç S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26:515–533.

³²³ Aga DS. *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*. CRC Press, Boca Raton, 2008, 408 pp.

³²⁴ Seifrtová M, Pena A, Lino CM, Solich P. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391:799–805.

³²⁵ U.S. Environmental Protection Agency. Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. Washintong, 2007, 77 pp.

³²⁶ Pavlović DM, Babić S, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26:1062–1075.

³²⁷ Gros M, Petrović M, Barceló D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, 2006, 70:678–690.

Tras la elección del adsorbente, se debe optimizar el proceso en función de varios parámetros, incluyendo el volumen de muestra, la velocidad de percolación, el volumen de adsorbente, el disolvente de elución y el volumen de este último³²⁸.

El tipo y volumen de disolvente de elución son factores muy importantes que afectan a la recuperación de los analitos. La elección de un disolvente que permita la desorción rápida de los analitos dependerá de las características físicoquímicas de los mismos y de la fuerza elutroica del disolvente. Los más usados son acetato de etilo, acetona, metanol y diclorometano, o mezclas de ellos^{310,329}.

El volumen de elución suele ser mucho menor que el volumen original de muestra pasada por el adsorbente, por lo que se produce una preconcentración de analitos significativa. En análisis medioambiental se suelen usar factores de concentración de entre 10^2 y 10^4 veces, dependiendo del tipo de matriz acuosa, ya que aunque a mayor concentración también se tiene una mayor sensibilidad del método, se debe tener en cuenta que los componentes de la matriz que son coextraídos también son concentrados, incrementando por tanto el efecto matriz. Para reducir este efecto, se suele incluir una etapa de lavado del cartucho previa a la elución. El disolvente de lavado también es un parámetro que debe ser optimizado^{330,331}.

³²⁸ Baugros JB, Giroud B, Dessalces G, Grenier-Loustalot MF, Cren-Olivé C. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 3 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 607:191–203.

³²⁹ Pietrogrande MC, Basaglia G. GC–MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26:1086–1094.

³³⁰ Chen L, Zhang X, Xu Y, Du X, Sun X, Sun L, Wang H, Zhao Q, Yu A, Zhang H, Ding L. Determination of fluoroquinolone antibiotics in environmental water samples based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 662:31–38.

³³¹ Demeestere K, Petrović M, Gros M, Dewulf J, Van Langenhove H, Barceló D. Trace analysis of antidepressants in environmental waters by molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396:825–837.

Para el caso específico de los antibióticos seleccionados, se observaron diferencias importantes en la eficiencia de extracción entre ambos tipos de quinolonas (anfotéricas y ácidas), lo cual ha sido corroborado por otros estudios previos²⁹³.

En condiciones de basicidad, tanto para las quinolonas ácidas como anfotéricas predomina la forma aniónica, menos retenida por el adsorbente que las formas catiónica, zwitteriónica o neutra. En estas condiciones se debería utilizar un intercambiador aniónico, pero en estos casos también serían retenidos muchos componentes de la matriz interferentes que también estarían cargados negativamente (ácidos húmicos y fúlvicos)^{305,327,332}. En consecuencia, los valores ideales de pH para la extracción se encuentran entre 2 y 7. Como paso adicional de limpieza, se podría usar un adsorbente aniónico, ya que bajo estas condiciones de pH, sólo los referidos interferentes ácidos componentes de la matriz serían retenidos, no así los analitos. Sin embargo, la adición de un paso de SPE adicional implicaría un mayor costo de análisis.

Cuando la extracción se lleva a cabo en condiciones ácidas, las quinolonas anfotéricas se encuentran en su forma catiónica, mientras que las ácidas están predominantemente en la neutra. Ambas formas no son retenidas por igual, por ejemplo un adsorbente polimérico como Isolute[®] ENV⁺ presenta mayor afinidad por las quinolonas ácidas. Éstas, debido a su ausencia de carga, también son retenidas por adsorbentes de tipo C18. Otra posibilidad es el uso de intercambiadores catiónicos^{333,334} que permitan retener a las quinolonas anfotéricas a

³³² Renew JE, Huang C-H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1042:113–121.

³³³ Lee H-Biu, Peart TE, Svoboda ML. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1139:45–52.

valores de pH no muy ácidos. Como regla general, el pH de la muestra debe estar en torno a 2 unidades por debajo del pK_a ³³⁴.

En los estudios realizados a lo largo de esta Tesis Doctoral, se hizo uso de cartuchos MPC, los cuales aunque ofrecen buenos resultados para las quinolonas anfotéricas, tienen el inconveniente de presentar menor masa de adsorbente en comparación a otros, hecho que limita notablemente el volumen de muestra. Además, las quinolonas ácidas son menos retenidas, al ser también menor la cantidad de adsorbente de fase-inversa presente en el cartucho³³⁵.

Para el caso del bisfenol A y sus derivados clorados, la situación es notablemente diferente, ya que el pH no juega un rol destacado en la extracción al no producirse especiación en un rango amplio de pH. Al tratarse de compuestos altamente lipofílicos, los rellenos de elección suelen ser de tipo apolar (C18 típicamente), y los analitos son extraídos principalmente bajo su forma neutra. En este caso, la elección de los disolventes se convierte en una etapa de mayor importancia, ya que se trata de un adsorbente muy poco específico. No obstante, la experiencia nos ha dictado que el efecto matriz que ejercen estos componentes coextraídos es mucho mayor para el caso del análisis de quinolonas que para el del bisfenol A y derivados.

5.1.4. Concentración de las Muestras.

Tras la etapa de elución, las muestras deben ser evaporadas a sequedad (Fig 5.4e), ya que en ninguno de los dos casos (análisis de quinolonas y bisfenoles), la composición del disolvente de elución se

³³⁴ Nakata H, Kannan K, Jones PD, Giesy JP. Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography – mass spectrometry and fluorescence detection. *Chemosphere*, 2005, 58:759–766.

³³⁵ Golet EM, Alder AC, Hartmann A, Ternes TA, Giger W. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Chemistry*, 2001, 73:3632–3638.

corresponde con el empleado para el análisis cromatográfico posterior. Los extractos secos deben ser reconstituidos en un disolvente compatible con el análisis que se vaya a llevar a cabo³¹⁹. El volumen de reconstitución también debe ser evaluado, ya que aunque se deseen elevados grados de concentración de los analitos, es necesario considerar también la presencia del efecto matriz, fenómeno que fue especialmente importante en el caso de la determinación de quinolonas. Lo más común es emplear como disolvente de reconstitución, la fase móvil al inicio del gradiente cromatográfico³³⁶⁻³³⁸.

5.2. Determinación de los Microcontaminantes Seleccionados en los Fangos de Desecho.

La determinación de fármacos y disruptores endocrinos ha demostrado ser notablemente más sencilla en matrices acuosas que en matrices sólidas, siendo tradicionalmente estas últimas menos estudiadas^{339,340}. Para el caso específico de los microntaminantes seleccionados, las matrices sólidas más estudiadas han sido de tipo biológico y alimentario. Y esto se debe a que por un lado, se ha tenido especial consideración de los efectos de los contaminantes sobre la fisiología de los seres vivos y su bioacumulación en los tejidos. Por otro, los riesgos de ser incorporados a través de la dieta, ya sea a través de

³³⁶ Benijts T, Dams R, Lambert W, De Leenheer A. Countering matrix effects in environmental liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1029:153–159.

³³⁷ Farré M, Petrovic M, Gros M, Kosjek T, Martínez E, Heath E, Osvald P, Loos R, Le Menach K, Budzinski H, De Alencastro F, Müller J, Knepper T, Fink G, Ternes TA, Zuccato E, Kormali P, Gans O, Rodil R, Quintana JB, Pastori F, Gentili A, Barceló D. First interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drugs analysis in environmental samples. *Talanta*, 2008 76:580–590.

³³⁸ Jahnke A, Gandrass J, Ruck W. Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1035: 115–122.

³³⁹ Picó Y, Andreu V. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387:1287–1299.

³⁴⁰ Mohapatra DP, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY. Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater sludge-fate of bisphenol A. *Chemosphere*, 2010, 78:923–941.

los envases que contienen a los alimentos (BFA), o por el consumo de productos de origen animal, que pueden contener residuos de antibióticos. Matrices como suelos, sedimentos o fangos de desecho han sido muy poco estudiadas.

En los últimos años y debido a la preocupación creciente por la presencia de contaminantes emergentes en este tipo de matrices ambientales, la investigación analítica ha cobrado un especial interés. Para la realización del trabajo experimental de esta Tesis Doctoral, se han seleccionado los fangos de desecho de depuradora como matriz de trabajo. Se trata de una matriz compleja, por lo que la determinación de microcontaminantes representa un reto analítico. Estos fangos contienen gran cantidad y variedad de microorganismos y una importante actividad enzimática que puede afectar tanto cualitativa como cuantitativamente a los contaminantes. Además, la materia orgánica y los iones metálicos son componentes ubicuos, que pueden establecer interacciones importantes con los analitos, como la formación de complejos, hecho que exige el desarrollo de métodos de extracción muy eficientes.

Aunque existen algunos estudios realizados para la determinación tanto de quinolonas como de EDCs en fangos de desecho, en el caso de las quinolonas, por ejemplo, los métodos desarrollados han incluido un número muy reducido de estos antibióticos, especialmente de uso humano, sin incluir a quinolonas de nuevas generaciones como la moxifloxacina que están siendo ampliamente utilizadas en la actualidad por sus mejores efectos terapéuticos y porque contribuyen a contrarrestar la resistencia bacteriana³⁴¹⁻³⁴³. Es por tanto necesario

³⁴¹ Kowalski RP, Dhaliwal DK, Karenchak LM, Romanowski EG, Mah FS, Ritterband DC, Gordon YJ. Gatifloxacin and moxifloxacin: an in vitro susceptibility comparison to levofloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin using bacterial keratitis isolates. *American Journal of Ophthalmology*, 2003, 136:500-505.

³⁴² Faich GA, Morganroth J, Whitehouse AB, Brar JS, Arcuri P, Kowalsky SF, Haverstock DC, Celesk RA, Church DA. Clinical experience with moxifloxacin in patients with respiratory tract infections. *The Annals of Pharmacotherapy*, 2004, 38:749-754.

disponer de metodología analítica de buenas características que permita la determinación de un amplio rango de quinolonas para poder así entender los riesgos ambientales.

Para el caso del BFA, aunque ya existen métodos analíticos para la determinación individual de este compuesto en fangos de desecho, no hay ningún método para la determinación de sus derivados clorados. En esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un método conjunto para el análisis del BFA y sus derivados clorados en este tipo de matriz.

5.2.1. Situación Actual de las Técnicas de Extracción en Matrices Sólidas.

En los años 80s y 90s, las técnicas de extracción de contaminantes orgánicos en matrices sólidas estaban basadas principalmente en la extracción mediante Soxhlet y la destilación por arrastre con vapor. Sin embargo, ambas técnicas requerían de tiempos muy largos de extracción (hasta por encima de 24 h), y cantidades elevadas de disolventes orgánicos, dañinos para la salud humana y el medio ambiente³⁴⁴. Con la perspectiva de superar las deficiencias de estas metodologías clásicas, se han desarrollado nuevas técnicas de extracción que han sido exitosamente aplicadas para el caso de contaminantes orgánicos. Entre estas técnicas tenemos las siguientes:

- Extracción por ultrasonidos (USE).
- Extracción por microondas (MAE).
- Extracción por líquidos presurizados (PLE).
- Extracción por fluidos supercríticos (SFE).

³⁴³ Hu JY, Wang WF, Zhu Z, Chang H, Pan F, Lin BL. Quantitative structure - activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41:4806-4812.

³⁴⁴ Petrovic M, Barceló D. Review of advanced sample preparation methods for the determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in solid environmental matrices. *Chromatographia*, 2002, 56:535-544.

En la Fig. 5.5 se resumen los distintos pasos a seguir para la determinación de fármacos y productos de cuidado personal en fangos de desecho utilizando las técnicas más comunes, desde el tratamiento preliminar de la muestra hasta el análisis cromatográfico. En el desarrollo de esta memoria, se han empleado las tres primeras técnicas citadas. La extracción SFE se usa actualmente en poca extensión, ya que aunque se reduce el uso de disolventes orgánicos, tiene como principal limitante la necesidad de contar con equipos sofisticados que controlen y operen en las condiciones que requiere el fluido supercrítico (habitualmente CO₂)³⁴⁵.

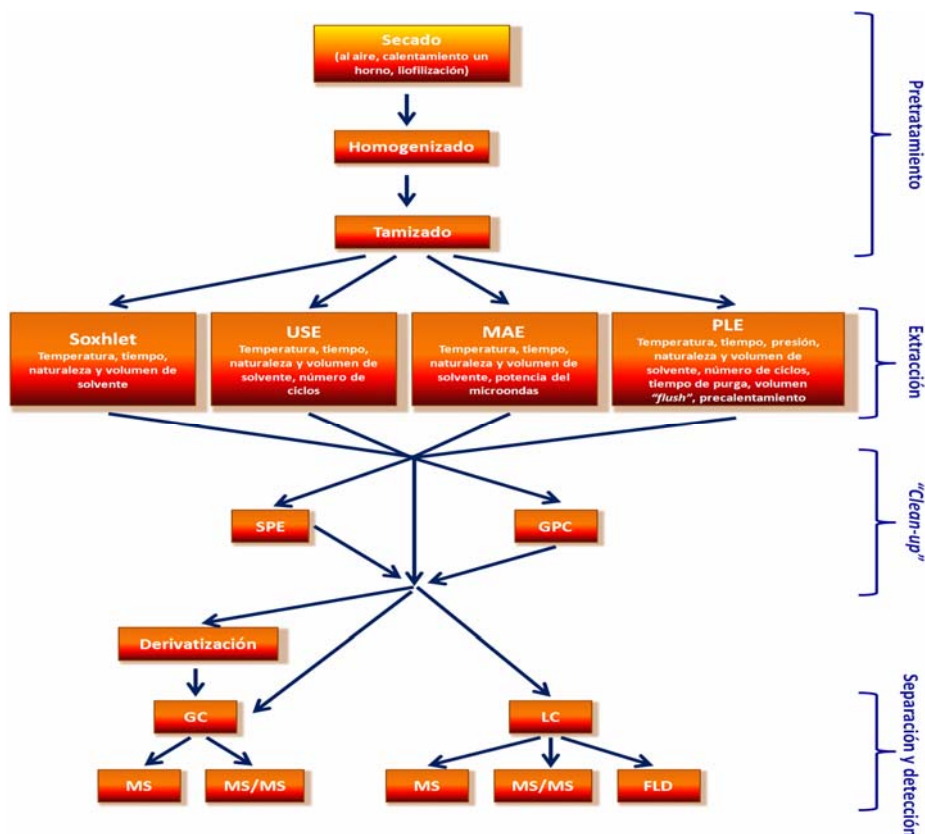


Figura 5.5. Esquema del procedimiento analítico para la determinación de fármacos y productos de cuidado personal en fangos de desecho.

³⁴⁵ Lee HB, Peart TE, Chan J, Gris G. Occurrence of Endocrine-Disrupting Chemicals in Sewage and Sludge Samples in Toronto, Canada. *Water Quality Research Journal of Canada*, 2004, 39:57-63.

Recientemente se han desarrollado otras técnicas como resultado de modificaciones en las anteriormente citadas. Entre las más importantes destacan:

- La *extracción selectiva por líquidos presurizados* (SPLE). Es una combinación de la extracción mediante líquidos presurizados con un procedimiento "*clean-up*" *in situ* (en la celda de extracción). La muestra es dispersada en un material adsorbente como sílice modificada, florisil o alúmina, y la mezcla es empaquetada en la celda. La mayor parte de las aplicaciones se han desarrollado en alimentos y suelos, y muy pocas en fangos de desecho³⁴⁶⁻³⁴⁸.
- La *extracción sólido-líquido con ondas de ultrasonido focalizado* (FUSLE)³⁴⁹. Esta técnica se ha empleado para la determinación de POPs en muestras biológicas y sedimentos, así como para la determinación de disruptores endocrinos en fangos³⁴⁸.
- La *extracción por microondas focalizada* (FMASE). Es una técnica basada en la extracción Soxhlet pero asistida por microondas focalizadas. Conserva las ventajas de la extracción Soxhlet pero supera sus limitaciones, debido a la facilidad que tienen las ondas de microondas focalizadas (200 W de potencia máxima) para romper las interacciones analito-matriz. Es automatizable y no requiere del uso de volúmenes excesivos de disolvente. Se ha

³⁴⁶ Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernández-Méndez J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1089:1-17.

³⁴⁷ Zhang Z, Rhind SM, Kerr C, Osprey M, Kyle CE. Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 685:29-35.

³⁴⁸ Martínez-Moral MP, Tena MT. Focused ultrasound solid-liquid extraction and selective pressurised liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2011, 34:2513-2522.

³⁴⁹ Santos HM, Lodeiro C, Capelo-Martínez JL. *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*, Wiley, Weinheim, 2009, 157 pp.

empleado para la determinación de BFA, dioxinas, triclosan y otros productos de cuidado personal³⁵⁰.

- La *extracción micelar asistida por microondas* (MAME). Su principal ventaja es la sustitución de los disolventes orgánicos por medios micelares³⁵¹. Genera un extracto que puede ser inyectado en un sistema cromatográfico, ya que los medios micelares o surfactantes son compatibles con las fases móviles que se usan habitualmente en cromatografía de líquidos. Estas fases móviles son menos tóxicas, biodegradables y menos costosas que los disolventes orgánicos. Además, los surfactantes aumentan la señal fluorescente de ciertos compuestos, como las quinolonas^{352,353}.

5.2.2. Toma de Muestra.

Se deben tener en cuenta todas las consideraciones previamente desarrolladas para el análisis de aguas. Además, debido a que se trata de muestras sólidas, se debe incluir un paso de centrifugación y/o filtración y una etapa de secado, seguido de un procedimiento de trituración y tamizado. Es importante tener en cuenta que, dado que la filtración/centrifugación no conduce necesariamente a la completa separación de las fases sólida y líquida, una cantidad importante de fase acuosa puede encontrarse todavía mezclada con la muestra sólida que

³⁵⁰ Morales-Muñoz S, Luque-García JL, Ramos MJ, Martínez-Bueno MJ, Luque de Castro MD. Sequential automated focused microwave-assisted soxhlet extraction of compounds with different polarity from marine sediments prior to gas chromatography mass spectrometry detection. *Chromatographia*, 2005, 62:69–74.

³⁵¹ Cueva Mestanza R, Torres Padrón ME, Sosa Ferrera Z, Santana Rodríguez JJ. Microwave-assisted micellar extraction coupled with solid-phase extraction for preconcentration of pharmaceuticals in molluscs prior to determination by HPLC. *Biomedical Chromatography*, 2008, 22:1115–1122.

³⁵² Montesdeoca-Esponda S, Torres Padrón ME, Sosa Ferrera Z, Santana Rodríguez JJ. Solid-phase microextraction with micellar desorption and HPLC-fluorescence detection for the analysis of fluoroquinolones residues in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 394:927–935.

³⁵³ Montesdeoca-Esponda S, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ. Combination of microwave-assisted micellar extraction with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of fluoroquinolone antibiotics in coastal marine sediments and sewage sludges samples. *Biomedical Chromatography*, 2012, 26:33–40.

es posteriormente secada. En consecuencia, se puede cometer el error de determinar no sólo la concentración de analito presente en el sólido, sino también el que estaba presente en la fase acuosa remanente. Las alternativas para evitar introducir este error sistemático dependerán de las características específicas de los analitos. En los casos contemplados en esta memoria, dada la intensa interacción que establecen las quinolonas con la matriz y las características altamente hidrofóbicas del bisfenol A y sus derivados clorados, un lavado con agua Milli-Q posterior a la centrifugación/filtración es suficiente para eliminar el agua residual remanente.

5.2.3. Extracción Asistida por Ultrasonidos (USE)

La radiación de ultrasonido es una herramienta muy poderosa para acelerar el proceso analítico. El ultrasonido es de gran ayuda en el tratamiento de muestras sólidas, y no sólo en la extracción de compuestos químicos, sino también en la dispersión de suspensiones acuosas, homogeneización, nebulización, lavado y derivatización³⁵⁴.

Las ondas de sonido son vibraciones mecánicas en un sólido, líquido o gas. El ultrasonido tiene una frecuencia mucho mayor que el rango audible a los humanos (10–16 kHz) (Fig. 5.6). Las ondas de sonido deben viajar a través de la materia, produciendo ciclos de expansión y compresión mientras viajan a través del medio. La expansión hace que las moléculas se separen, mientras que la compresión las acerca.

³⁵⁴ Luque-García JL, Luque de Castro MD. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003, 22:41–47.

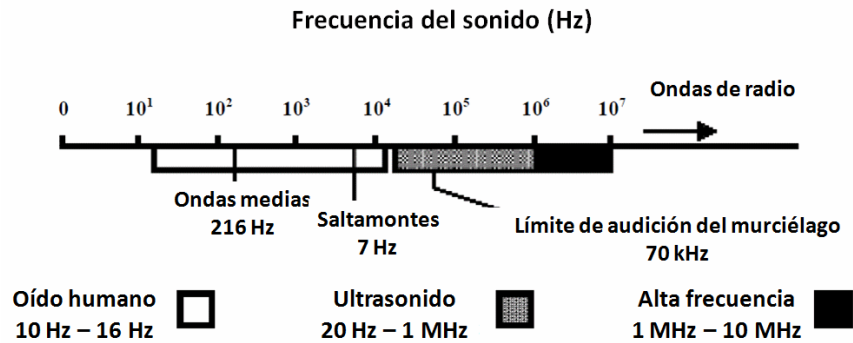


Figura 5.6. Región de frecuencia del sonido.

En un líquido, el ciclo de expansión produce presión negativa. Si el ultrasonido es lo suficientemente fuerte, este ciclo puede crear burbujas o cavidades en el líquido. La presión negativa excede la fuerza de tensión local en el líquido, la cual varía dependiendo de su naturaleza y pureza (Fig. 5.7). El proceso por el cual se forman las burbujas de vapor, crecen y sufren el colapso implosivo recibe el nombre de "cavitación", el cual tiene lugar en alrededor de 400 ms.

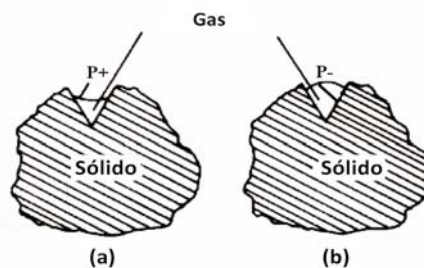


Figura 5.7. Efecto del gas aprisionado en el poro de una partícula: (a) presión positiva, (b) presión negativa.

La cavitación tiene su importancia en el sentido de cómo se produce el colapso de las burbujas que se forman en el líquido. En algún momento, una burbuja ya no puede absorber más la energía del ultrasonido, de modo que implosiona (Fig. 5.8). La compresión

adiabática rápida de los gases y vapores dentro de las burbujas o cavidades produce temperaturas y presiones extremadamente altas. Se ha determinado que las temperaturas en el interior de estos puntos pueden llegar a los 5000°C (similar a la de la superficie del sol), mientras que la presión puede alcanzar las 1000 atm (equivalente a la de las Fosas Marianas). El tamaño de las burbujas es muy pequeño en relación al volumen total de líquido, de modo que el calor que se produce es disipado rápidamente, haciendo que los cambios en las condiciones ambientales no sean apreciables. El enfriamiento que sigue al colapso de la burbuja cavitacional ha sido estimada que está alrededor de 10 billones °C/s.

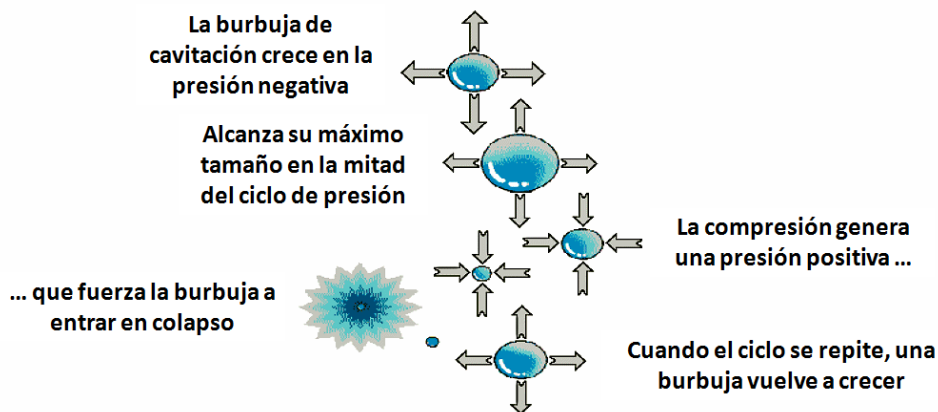


Figura 5.8. Esquema de la implosión de una burbuja.

La cavitación acústica proporciona una interacción única entre la materia y la energía. Cuando ésta ocurre, la dinámica del colapso de la cavidad cambia drásticamente. La energía potencial de la burbuja expandida se transforma en energía cinética que se propaga a una velocidad considerable, alcanzando el recorrido de las partículas de la matriz. Estas colisiones provocan la ruptura de la matriz, generando partículas más pequeñas, exponiendo una mayor superficie al

disolvente³⁵⁵. Este hecho, junto a las altas temperaturas, que provocan el aumento de la solubilidad y difusividad, y las altas presiones, que favorecen la penetración y el transporte, justifican el alto poder extractivo de esta técnica siendo considerada una técnica robusta para la extracción de contaminantes orgánicos de matrices sólidas³⁵⁶.

Hay dos dispositivos comúnmente utilizados para la aplicación de ultrasonido, que son los baños y las sondas. Los baños de ultrasonido son los más usados, sin embargo, presentan algunas desventajas, como la falta de uniformidad en la distribución de la energía de ultrasonido y la disminución de la potencia con el tiempo. Además, su aplicación a menudo está acompañada por una reducción significativa de la repetibilidad y reproducibilidad experimental. Los sistemas que emplean sondas de ultrasonido tienen la ventaja de enfocar su energía en una región localizada, por lo que proporciona una cavitación más eficiente en el líquido. En el desarrollo de los métodos por ultrasonidos descritos en esta memoria, se ha utilizado el sistema de la sonda de ultrasonido, mediante un diseño que se ilustra en la Fig. 5.9b.

³⁵⁵ Capelo JL, Mota AM. Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*, 2005, 1: 193–201.

³⁵⁶ Bossio JP, Harry J, Kinney CA. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. *Chemosphere*, 2008, 70: 858–864.

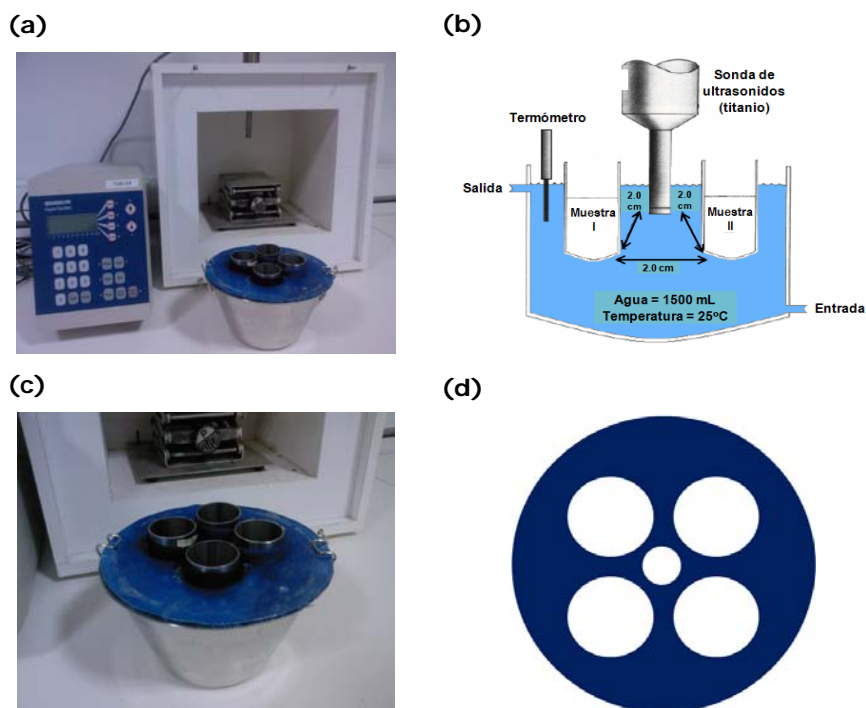


Figura 5.9. (a) Equipo de ultrasonidos empleado. (b) Esquema del diseño y las partes del equipo. (c) Detalle del portaceldas y las celdas de acero inoxidable. (d) Detalle de la tapa del portaceldas. Los cuatro agujeros grandes dan cabida a las celdas, mientras que el agujero central es para la sonda de ultrasonidos.

El modo de operación seleccionado consiste en introducir la sonda en un baño con agua donde se encuentran las celdas que contienen a la muestra. Aunque el uso directo de la sonda de ultrasonido, es decir, el que entre en contacto directo con la muestra, favorecería el proceso de cavitación, incrementando la eficiencia de la extracción³⁵⁴, se ha comprobado que en nuestro caso no es necesario, disminuyendo el riesgo de daño de la punta de la sonda. Además el método resulta más práctico en el procesamiento de un mayor número de muestras. Esta modalidad de baño presenta ventajas respecto al baño de ultrasonido convencional, como son la uniformidad en la dispersión de las ondas y la mayor potencia, lo cual se traduce en resultados más reproducibles.

Las variables experimentales inherentes a esta modalidad, que afectan al proceso³⁵⁷, son numerosas. Es por tanto necesario el estudio de las mismas a fin de conocer las que más interfieren y así lograr una extracción más reproducible. Las condiciones más significativas son: líquido utilizado para la propagación de las ondas de ultrasonido, la cantidad del líquido empleado en el baño, temperatura del líquido, forma geométrica del baño, forma geométrica de la cápsula de extracción, composición material de la cápsula, número de cápsulas, distancia entre la sonda y la cápsula de extracción. Por lo tanto, los análisis deben realizarse siempre bajo las mismas condiciones, las que se indican en la Fig. 5.9b.

Con estas condiciones preestablecidas se procedió a la optimización de las variables que afectan al proceso de extracción. Los parámetros evaluados para la optimización del proceso fueron los siguientes:

- Disolvente de extracción.
- pH de extracción.
- Volumen del disolvente de extracción.
- Tiempo de extracción.
- Número de ciclos de extracción.
- Amplitud del ultrasonido.

Para no reducir el tiempo de vida de la sonda, se emplearon valores de amplitud menores del 75%, y para evitar problemas de sobrecalentamiento, el tiempo de extracción máximo predeterminado fue de 20 min. De acuerdo a cada situación particular, estos parámetros fueron optimizados empleando métodos univariantes o multivariantes

³⁵⁷ Nascentes CC, Mauro Korn M, Sousa CS, Arruda MAZ. Use of ultrasonic baths for analytical applications: A new approach for optimisation conditions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2001, 12: 57-63.

por diseño de experimentos, especialmente por las importantes interacciones que existen entre parámetros como el tiempo de extracción y la amplitud del ultrasonido.

5.2.4. Extracción Asistida por Microondas (MAE)

En esta técnica, el disolvente de extracción absorbe la energía de microondas para que, al estar en contacto con la muestra, facilite la partición de los analitos desde la matriz hacia el disolvente. La energía de microondas es una radiación no ionizante (frecuencia de 300–300,000 MHz) que causa el movimiento molecular por migración de los iones y la rotación de los dipolos. Las microondas son ondas electromagnéticas que son empleadas como portadores de energía, es decir, los materiales que son capaces de absorberlas, la transformarán en calor³⁵⁸. El principio de MAE está basado en el efecto directo de las microondas sobre las moléculas del sistema de extracción causado por dos mecanismos, conducción iónica y rotación dipolar³⁵⁹. La conducción iónica genera calor debido a la resistencia del medio al flujo iónico. La migración de los iones disueltos causa colisiones entre las moléculas porque la dirección de los iones cambia tantas veces como cambia el signo del campo eléctrico. La rotación dipolar está relacionada con el movimiento alternativo de las moléculas polares, las cuales tratan de alinearse con el campo eléctrico. Las colisiones múltiples a causa de la agitación de las moléculas provoca la liberación de energía y por lo tanto el incremento de la temperatura.

Es importante resaltar que a diferencia de las formas convencionales de calentamiento (convección y conducción), las microondas calientan el sistema directamente, permitiendo tiempos de

³⁵⁸ Letellier M, Budzinski H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analysis*, 1999, 27:259–270.

³⁵⁹ Madej K. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28:436–446.

extracción muy cortos. La generación de calor en la muestra dentro del campo de microondas requiere de la presencia de un compuesto dieléctrico. Cuanto mayor sea la constante dieléctrica (ϵ'), mayor será la energía térmica liberada y más rápido será el calentamiento a una frecuencia dada. El efecto de la energía de microondas no sólo dependerá del disolvente, sino también de la muestra, ya que ésta debe ser capaz de disipar la energía generada (pérdida dieléctrica, ϵ''). Comúnmente, el disolvente de extracción debe tener una constante dieléctrica elevada, para que pueda ser capaz de absorber eficientemente la energía de microondas. Sin embargo, en algunos casos, sólo la matriz es calentada, de modo que los analitos son transferidos a un disolvente frío, hecho particularmente útil para compuestos termolábiles³⁶⁰. Los compuestos que tienen altas constantes dieléctricas son principalmente compuestos polares y por lo tanto, una característica del calentamiento por microondas es la selectividad.

La aplicación técnica para la extracción de las muestras se puede hacer usando sistemas cerrados (bajo temperatura y presión controladas), o en sistemas abiertos (a presión atmosférica), que reciben el nombre de MAE presurizado (PMAE) y MAE enfocado (FMAE), respectivamente. En el desarrollo de los métodos contemplados en esta memoria, se ha empleado el primer sistema (Fig. 5.10a).

³⁶⁰ Camel V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2000, 19: 229–248.

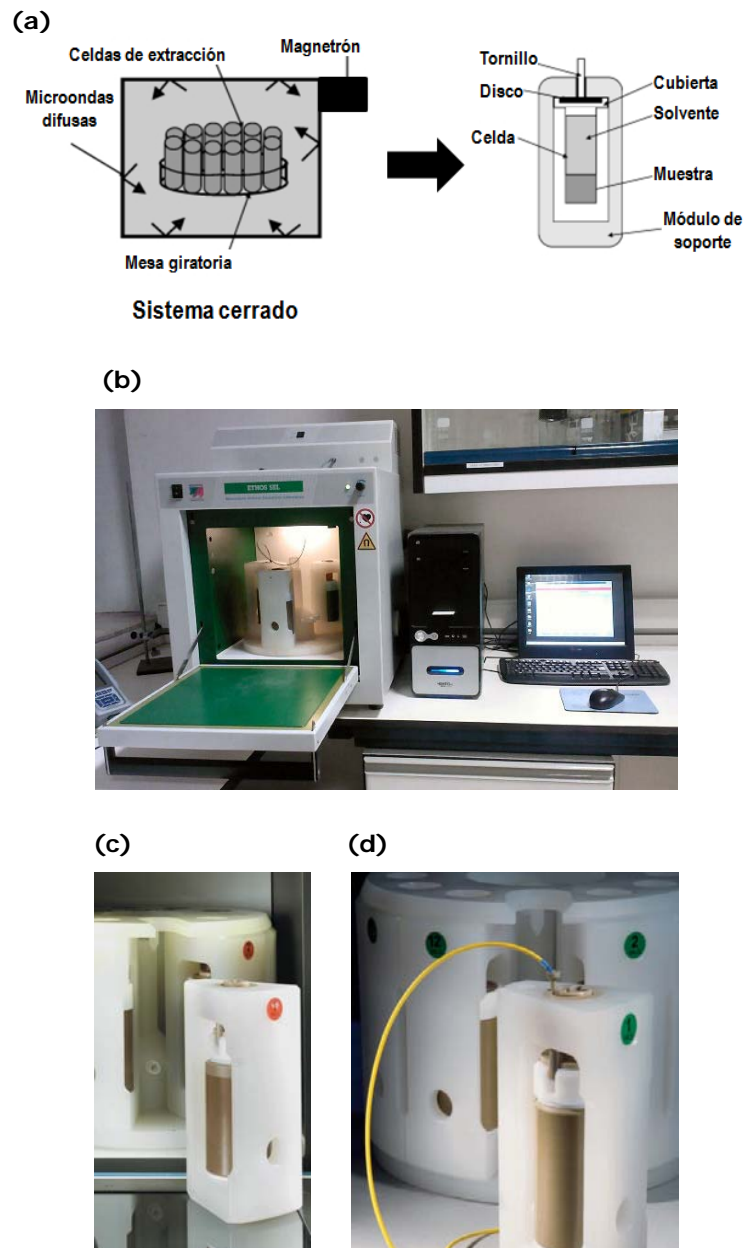


Figura 5.10. (a) Esquema del equipo indicando sus partes. (b) Horno de microondas empleado, ETHOS SEL® de Milestone. (c) Detalle de una celda de extracción ensamblada y preparada para la extracción. (d) Detalle de la celda que porta la sonda de temperatura, hecha de fibra óptica.

Los principales parámetros que afectan a la extracción y que se deben optimizar son la naturaleza del disolvente de extracción, el volumen de disolvente, la potencia de irradiación, el tiempo de exposición y la temperatura³⁶¹.

En cuanto a la selección de los disolventes para la extracción de los contaminantes seleccionados se deben tener en cuenta que:

- A nivel práctico es preferible un disolvente polar, aunque no tenga una constante dieléctrica muy elevada. El disolvente seleccionado es consecuencia de una solución de compromiso, ya que mientras un disolvente con baja constante dieléctrica requiere mayor tiempo y potencia para calentarse hasta una temperatura determinada, por otro lado, puede tener mejores características para disolver y extraer los analitos de interés. Esto es lo que ocurre en la extracción del BFA y sus derivados, el acetato de etilo es el mejor disolvente de extracción, aunque su constante dieléctrica no es tan elevada (ϵ' , 6.02) como la de otros disolventes evaluados como el metanol (ϵ' , 23.9), el acetonitrilo (ϵ' , 37.5) o la acetona (ϵ' , 21.1). Además el acetato de etilo presenta pérdidas dieléctricas menores (ϵ'' , 3.2), en comparación con metanol (ϵ'' , 15.3) o acetona (ϵ'' , 11.5)³⁶².
- Esta técnica de extracción es mucho más drástica que USE y genera extractos con elevado efecto matriz. Es por tanto necesario elegir un disolvente que presente una afinidad elevada por los analitos de interés y no por la matriz. La coextracción de interferentes también se puede controlar mediante la adecuada selección de la temperatura y el tiempo de extracción, siempre que

³⁶¹ Camel V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *The Analyst*, 2001, 126:1182–1193.

³⁶² Eskilsson CS, Bjorklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 2000, 902:227–250.

haya una buena estabilidad térmica de los analitos, como es el caso del bisfenol A y sus derivados. En el caso de las quinolonas, se ha demostrado en la bibliografía científica que una pequeña fracción puede experimentar degradación a temperaturas superiores a 100°C³⁶³.

En cuanto a la elección del volumen de extracción, aunque generalmente en las extracciones convencionales, el uso de un volumen mayor de disolvente incrementa la recuperación de los analitos; en MAE podría ocurrir el efecto contrario, debido a una mezcla inadecuada del disolvente y la matriz a causa de las microondas. Por otro lado, el uso de un volumen pequeño puede causar problemas de saturación del disolvente. Se debe alcanzar una solución de compromiso en función del tipo y tamaño de la muestra, asegurando siempre un volumen mínimo suficiente para que la muestra entre totalmente en contacto con él.

Por otro lado, el contenido de agua es un factor clave, debido a su elevada constante dieléctrica (ϵ' , 78.3)³⁶², lo cual conduce a una mayor eficiencia en el calentamiento de la muestra. Habitualmente se adiciona un volumen de agua a la matriz antes del disolvente de extracción, teniendo siempre en cuenta que un mayor calentamiento provocará una mayor extracción de analitos, pero también de la matriz, y que la adición de agua debe ser controlada para obtener resultados reproducibles.

La potencia de las microondas, también condiciona de forma notable la eficiencia de extracción. Sin embargo, este parámetro no fue optimizado en ningún caso en el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral. El motivo es que el equipo empleado tiene la limitación de no poder utilizar potencias mayores a 1000 W, lo cual puede resultar

³⁶³ Roca M, Castillo M, Martí P, Althaus RL, Molina MP. Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58:5427-5431.

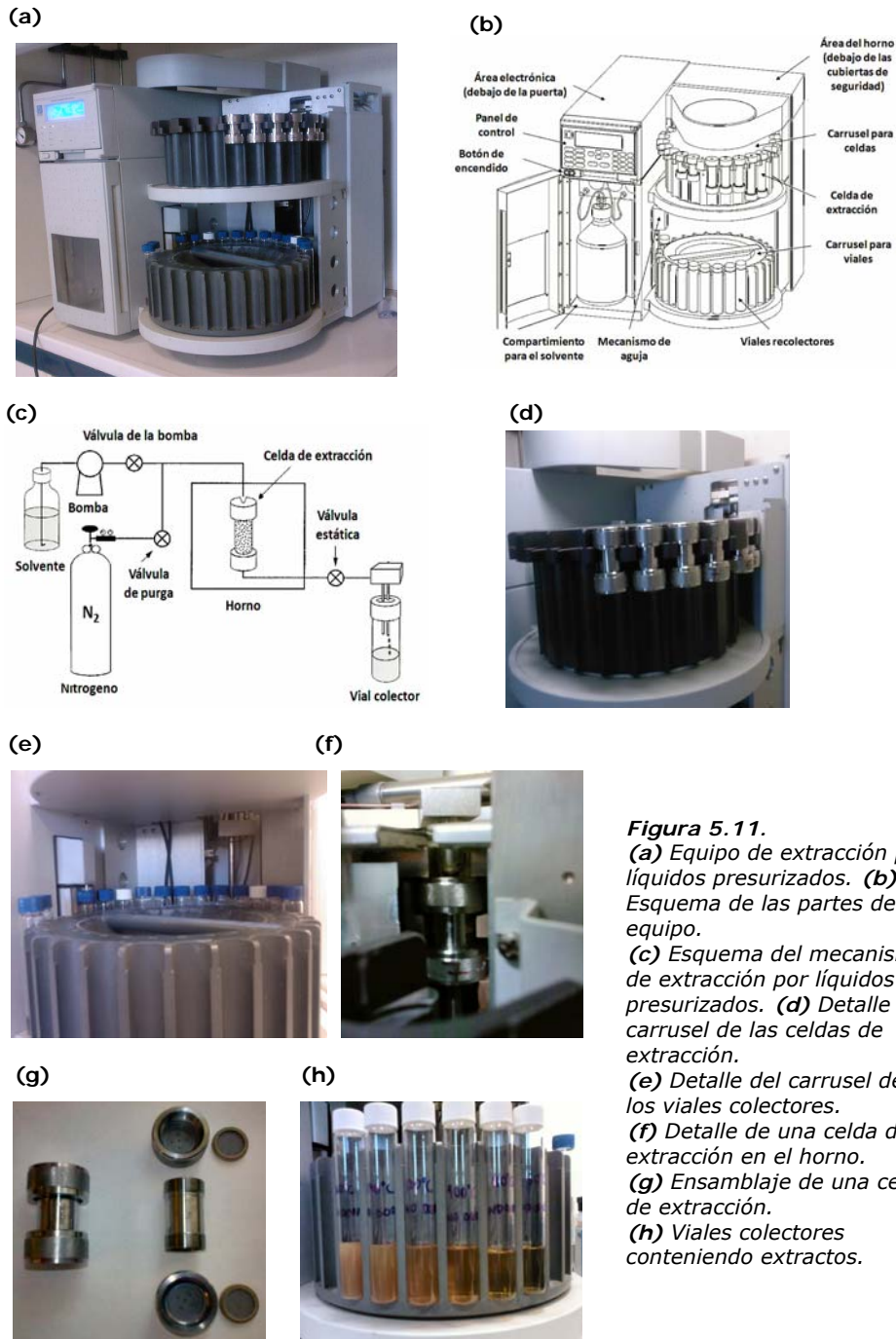
insuficiente para los casos en los que el disolvente utilizado presente baja constante dieléctrica, como el acetato de etilo para el análisis de BFA y derivados. Además, en el caso del análisis de quinolonas, se observó que el uso de potencias menores reducía notablemente la eficiencia de extracción, por las intensas interacciones quinolona-matriz.

Las principales ventajas de esta técnica residen en que es una técnica muy "amigable" con el medio ambiente. Se produce una reducción significativa del volumen de disolvente, de los tiempos de extracción (aumentando además el número de muestras procesadas de forma simultánea) y de la cantidad de muestra necesaria. Disminuyendo además la energía consumida y por tanto los costos de operación.

Dadas las importantes interacciones que existen entre los parámetros, especialmente entre la temperatura y el tiempo de extracción, durante la optimización de los métodos analíticos que emplean esta técnica, se empleó diseño experimental multivariante.

5.2.5. Extracción con Líquidos Presurizados (PLE)

La extracción con líquidos presurizados también es llamada ASE™ ("*Accelerated Solvent Extraction*"), que es la marca registrada de Dionex, empresa que fabrica y comercializa los equipos necesarios. El proceso de extracción se caracteriza porque transcurre a temperaturas (entre 100 y 200°C) y presiones (por encima de 100 a 150 bar) elevadas. A tales temperaturas y presiones, se puede considerar que el disolvente se encuentra en un estado subcrítico, con buenas propiedades de transferencia de masa³⁶¹, lo cual permite realizar extracciones rápidas y eficientes. En la figura 5.11 a y b se muestra la imagen y el esquema del equipo ASE. El sistema tiene la ventaja adicional de que la extracción está completamente automatizada y puede procesar un número múltiple de muestras al mismo tiempo.



Hay dos razones principales por las que el uso de disolventes líquidos a presiones y temperaturas elevadas aumenta la eficiencia de la

extracción: (i) efectos de solubilidad y transferencia de masa, y (ii) trastornos en el equilibrio superficial.

- **Efectos de solubilidad y transferencia de masa**³⁶⁴. (A) El uso de temperaturas elevadas, incrementa exponencialmente la capacidad de los disolventes para solubilizar analitos. Por otro lado, la solubilidad del agua en disolventes orgánicos también aumenta. Esto es especialmente importante si se considera que los disolventes a temperaturas y presiones bajas son excluidos de los poros que contienen agua y también analitos. La solubilidad incrementada del agua en disolventes orgánicos a las condiciones de PLE, permitirá que el disolvente alcance estos poros y extraiga a los analitos contenidos allí. (B) Se producen velocidades de difusión más rápidas como resultado del incremento de la temperatura de la extracción. Aunque es difícil de obtener una relación exacta para el efecto de la temperatura con las velocidades de difusión, se puede esperar un incremento de éstas de entre 2 y 10 veces para un aumento de temperatura de 25 a 150°C. (C) Si se aplican varios ciclos de extracción, con disolvente limpio, se mejora la transferencia de masa y, por tanto, se incrementa la eficiencia de extracción.

- **Alteración del equilibrio superficial.** Dado que ambos, la temperatura y la presión juegan un rol importante, se tratarán por separado.
 - **Efecto de la temperatura.** (A) El aumento de la temperatura produce una alteración de las interacciones fuertes soluto-matriz. La energía térmica puede vencer tanto las interacciones cohesivas (soluto-soluto) como las adhesivas (soluto-matriz),

³⁶⁴ Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porte NL. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 1996, 68: 1033–1039.

reduciendo la energía de activación necesaria para el proceso de desorción. Además, los puentes de hidrógeno son debilitados con el incremento de la temperatura. (B) Con la temperatura también disminuye la viscosidad de los disolventes líquidos, permitiendo una mejor penetración hacia las partículas de la matriz. Además, también se produce la disminución de la tensión superficial, que permite que el disolvente "moje" mejor la matriz, facilitando la formación de cavidades de disolvente para permitir que los analitos se disuelvan más rápidamente³⁶⁵. Ambos cambios permiten un mejor contacto analito-disolvente e incrementan la eficiencia de la extracción.

○ *Efecto de la presión.* (A) Si durante las extracciones se ejerce una presión suficiente sobre el disolvente, se pueden emplear temperaturas por encima del punto de ebullición, con el consiguiente beneficio. (B) El uso de presión facilita las extracciones de las muestras en las cuales los analitos han quedado atrapados en los poros de la matriz. La presión fuerza al disolvente a entrar en áreas de la matriz que normalmente no alcanzaría bajo condiciones de presión atmosférica. El uso de presiones elevadas (junto a las temperaturas elevadas) forzarán al disolvente a entrar en contacto con los analitos en los poros.

La realización de un proceso de extracción (Fig. 5.11c) requiere de varios pasos sucesivos. En primer lugar, se coloca la celda con la muestra en el horno (Fig. 5.11f) y se *precalienta* durante unos minutos (0–5 min) antes de adicionar el disolvente. A continuación, comienza el *calentamiento*, que es el tiempo requerido para que la muestra alcance

³⁶⁵ Möckel HJ, Welter G, Melzer H. Correlation between reversed-phase retention and solute molecular surface type and area: I. Theoretical outlines and retention of various hydrocarbon classes. *Journal of Chromatography A*, 1987, 388: 255–266.

el equilibrio térmico. Su duración depende de la temperatura y la presión fijada en el método (5–9 min). Después se inicia la extracción propiamente dicha, que recibe el nombre de *extracción estática* (5–10 min suelen ser suficientes). Luego se deja atravesar por la celda una cantidad de disolvente limpio para arrastrar y liberar el extracto en los viales recolectores (Fig 5.11h). Esta cantidad de disolvente que pasa por la celda recibe el nombre de *flush*, y corresponde a un porcentaje del volumen de la celda. Una extracción se puede llevar a cabo en varios *ciclos de tiempos estáticos*, que corresponderá al *tiempo de extracción total*, en este caso el *flush* es dividido entre el número de ciclos.

Al finalizar la extracción, para asegurar que no queden residuos en la celda, ésta es purgada por el paso de un gas inerte (normalmente N₂) por un tiempo determinado (*tiempo de purga*) (entre 30 y 120 s). A su término, la celda es retirada del horno y colocada en el carrusel de celdas (Fig 5.11d). Para limpiar el sistema de cualquier residuo que se haya podido quedar retenido, se puede *enjuagar* el sistema antes de iniciar la extracción de la siguiente muestra. El volumen de extracto recogido depende del tamaño de la celda. Se pueden obtener entre 10 y 100 mL, que posteriormente se someterán a un paso de "*clean-up*" y/o evaporación para concentrar el extracto final.

Los parámetros que afectan significativamente a la recuperación de los analitos por esta técnica, y que son optimizados en el proceso de extracción, son el disolvente de extracción, la temperatura, la presión, el tiempo de extracción estático y el número de ciclos. Otros parámetros, como el tiempo de precalentamiento, el tiempo de purga y flush, no influyen excesivamente en las recuperaciones finales, de modo que no se suelen optimizar. En cualquier caso, como es el de los métodos desarrollados en la presente Tesis Doctoral, se puede considerar la aplicación previa de un diseño factorial de "*screening*" a todos los parámetros de extracción (*e.g.* diseño Plackett-Burman), para

determinar cuáles son los que realmente afectan a la extracción, para a continuación fijar los que no son significativos y optimizar los demás³⁶⁶.

Un parámetro adicional que puede afectar a la eficiencia de PLE es la preparación de la muestra antes de la extracción. Para permitir una mayor exposición superficial e incluso mayor difusión del disolvente de extracción en los intersticios de la matriz, se suele mezclar la muestra con matrices sólidas inertes. También se pueden agregar agentes para humedecer la matriz ("*prewetting agents*")³⁶⁷ o electrolitos³⁶⁸, para aumentar la eficiencia de la extracción. En el caso particular de los analitos estudiados en esta Tesis Doctoral, se hicieron pruebas mezclando la muestra previamente con distintas proporciones de arena de playa, suelo agrícola y tierra de diatomeas; así mismo se probaron soluciones acuosas a distintas concentraciones de NaCl como agente humedecedor de la matriz ("*prewetting swelling agent*"). En ninguno de los casos se obtuvo un incremento en la recuperación de los analitos, de modo que este paso no fue necesario.

En la Tabla 5.1 se muestra un resumen comparativo de las tres técnicas de extracción empleadas en el desarrollo de los métodos contemplados en esta memoria.

³⁶⁶ Nieto A, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29: 752–764.

³⁶⁷ Fahmy TM, Paulaitis ME, Johnson DM, McNally ME. Modifier effects in the supercritical fluid extraction of solutes from clay, soil, and plant materials. *Analytical Chemistry*, 1993, 65: 1462–1469.

³⁶⁸ Suter MJF, Alder AC, Berg M, McArdell CS, Riediker S, Giger W. Determination of hydrophilic and amphiphilic organic pollutants in the aquatic environment. *Chimia*, 1997, 51: 871–877.

Tabla 5.1. Comparación de las técnicas de extracción modernas en relación a la extracción clásica con Soxhlet.

	Técnicas de extracción			
	Soxhlet	USE	MAE	PLE
Breve descripción	La muestra es envuelta en fibra de vidrio y colocada en un extractor Soxhlet. La muestra es percolada repetidamente con los vapores condensados del disolvente.	La muestra es colocada en el disolvente dentro de una celda, que es extraída en un baño de ultrasonido.	La muestra es colocada en un disolvente que absorbe las microondas dentro de una celda cerrada, y es irradiada con microondas	La muestra y el disolvente son calentados y presurizados en una celda de extracción. Cuando la extracción finaliza, el extracto y colocado automáticamente en un vial
Tiempo de extracción	3-48 h	10-60 min	3-30 min	5-30 min
Tamaño de la muestra	1-30 g	1-30 g	1-10 g	1-30 g
Volumen de disolvente	100-500 mL	30-200 mL	10-40 mL	10-100 mL
Inversión	Baja	Baja	Moderada	Alta
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere filtración 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracciones múltiples 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracciones rápidas y múltiples • Bajo consumo de disolvente • Temperatura elevada 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracciones rápidas • Bajo consumo de disolvente • Temperatura elevada • No requiere filtración • Sistema automatizado
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Grandes volúmenes de disolvente • Tiempos de extracción largos • "Clean-up" necesario 	<ul style="list-style-type: none"> • Grandes volúmenes de disolvente • Varios ciclos de extracción pueden ser necesarios • "Clean-up" necesario 	<ul style="list-style-type: none"> • Disolvente de extracción debe ser capaz de absorber la radiación de microondas • Tiempo de espera para que las celdas se enfríen después de la extracción 	<ul style="list-style-type: none"> • "Clean-up" necesario

5.2.6. La Masa de Muestra.

La elección de esta variable es básica para el establecimiento de un método analítico de buenas características. Sin embargo, muchas veces se pasa por alto su importancia y no se elige adecuadamente. La elección de la cantidad de muestra dependerá tanto de los requerimientos experimentales como de aspectos netamente analíticos, ya que una masa grande de muestra no siempre se traduce en un método altamente sensible, pues el efecto matriz también debe ser tomado en cuenta, asimismo que no todos los analitos son afectados en la misma extensión por este efecto.

Para el caso específico de los analitos estudiados, la eficiencia de la extracción fue evaluada con masas de muestra seca de fango entre 0.5 a 2.0 g, observándose en el caso de la determinación de BFA y derivados que la masa de muestra no es un parámetro importante. Sin embargo, para el caso del análisis de quinolonas, es un parámetro crítico. Se observó que en cualquiera de las tres técnicas de extracción empleadas, el aumento en la masa de muestra produce un efecto negativo en la recuperación de los compuestos, especialmente en las de tipo anfotérico. Este efecto ya ha sido previamente observado³⁶⁹.

5.2.7. Tratamientos Post-extracción.

Con el objetivo final de reducir los interferentes coextraídos con los analitos, el extracto generado con cualquiera de las técnicas de extracción empleadas, suele requerir de un paso de *limpieza* antes de ser inyectado en el cromatógrafo. En esta etapa se suele hacer uso de la SPE, los extractos orgánicos son diluidos con agua y luego tratados de manera similar al caso de las aguas residuales.

³⁶⁹ Golet E, Strehler A, Alder AC, Giger W. Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction. *Analytical Chemistry*, 2002, 74: 5455-5462.

Sin embargo, en el caso de los métodos desarrollados durante esta Tesis Doctoral, se demostró que la contribución de esta etapa de limpieza no es muy importante en comparación a la inyección directa del extracto³⁰⁷. De modo que se descartó este procedimiento, en base a criterios de tiempo de análisis y costos. Todos los extractos fueron evaporados a sequedad después de la extracción, siendo luego reconstituidos con el disolvente compatible con la técnica analítica seleccionada.

5.3. Análisis Mediante Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem.

De la bibliografía consultada se desprende que, tanto la cromatografía de líquidos (LC) como la de gases (GC) con diferentes modalidades de detección, son las técnicas más empleadas para separar y detectar fármacos y productos de cuidado personal en matrices de interés medioambiental a nivel traza.

Los fármacos generalmente son compuestos no volátiles y polares, que contienen grupos funcionales ionizables (*e.g.* carboxílico, fenol, amino), con coeficientes de partición octanol/agua de bajos a moderados. En consecuencia, la técnica seleccionada suele ser la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, UHPLC ó UPLC). Por su lado, para el caso de los EDCs y de los fármacos de naturaleza ácida, la cromatografía de gases suele ser también una técnica de elección. La electroforesis capilar ha sido escasamente aplicada a la investigación ambiental, ya que es una técnica menos robusta y fiable que la cromatografía de líquidos para los análisis de rutina en matrices de interés medioambiental^{294,370,371}.

³⁷⁰ Herrera-Herrera AV, Hernández-Borges J, Borges-Miquel TM, Rodríguez-Delgado MA. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with nonaqueous capillary

En la actualidad, la evolución de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, la ha convertido en la técnica de elección habitual, evitando así las desventajas inherentes al tratamiento de muestra en cromatografía de gases y los procesos de derivatización previos a la inyección cromatográfica^{372,373}. También se ha usado históricamente la cromatografía de líquidos con detectores de fluorescencia^{324,335,374-376}, ultravioleta visible^{377,378} o electroquímico, sin embargo, en los últimos años se ha impuesto de una forma clara la detección con espectrometría de masas (MS) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Son numerosas ventajas que ofrece esta última:

- Se pueden estudiar una amplia variedad de analitos, de alto y bajo peso molecular.

electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in waters. *Electrophoresis*, 2010, 31:3457–3465.

³⁷¹ Faria AF, Souza MVN, Almeida MV, Oliveria MAL. Simultaneous separation of five fluoroquinolone antibiotics by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 579:185–192.

³⁷² Ballesteros O, Zafra A, Navalón A, Vílchez JL. Sensitive gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1121:154–162.

³⁷³ Hernando M, Mezcuca M, Gomez M, Malato O, Aguera A, Fernandez Alba A. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1047:129–135.

³⁷⁴ Shi L, Zhou XF, Zhang YL, Gu GW. Simultaneous determination of 8 fluoroquinolone antibiotics in sewage treatment plants by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Water Science and Technology*, 2009, 59:805–813.

³⁷⁵ Gil García MD, Belmonte Gallegos A, Valverde RS, Martínez Galera M. Determination of (fluoro)quinolones in environmental water using online preconcentration with column switching linked to large sample volumes and fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 2012, 35:823–831.

³⁷⁶ Montesdeoca Esponda S, Torres Padrón ME, Sosa Ferrera Z, Santana Rodríguez JJ. Solid-phase microextraction with micellar desorption and HPLC–fluorescence detection for the analysis of fluoroquinolones residues in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 394:927–935.

³⁷⁷ Babić S, Asperger D, Mutavdžić D, Horvat Alka JM, Kastelan-Macan M. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta*, 2006, 70:732–738.

³⁷⁸ Mutavdžić Pavlović D, Babić S, Dolar D, Asperger D, Kosutić K, Horvat AJM, Kastelan-Macan M. Development and optimization of the SPE procedure for determination of pharmaceuticals in water samples by HPLC–diode array detection. *Journal of Separation Science*, 2010, 33:258–267.

- Esta técnica proporciona datos tanto cuantitativos como cualitativos para la identificación inequívoca de cualquier analito. Genera información del ion molecular, y de los iones producidos por su fragmentación, ofreciendo información estructural básica para discriminar la identidad de cualquier sustancia.
- Al tratarse de una técnica muy selectiva, permite identificar y cuantificar compuestos aunque no hayan sido previamente resueltos completamente durante el análisis cromatográfico. Esta característica convierte a este detector en idóneo para el caso del análisis de matrices complejas, como las aguas residuales y fangos de desecho. Esto permite también el uso de compuestos marcados isotópicamente como patrones internos, lo cual junto con la elevada sensibilidad de esta técnica, permite determinaciones cuantitativas muy exactas y precisas.

Como técnica para la separación de PPCPs, se ha empleado tradicionalmente la cromatografía de líquidos de fase reversa (RPLC), aunque para el caso de determinación de quinolonas también se han hecho estudios empleando columnas monolíticas^{324,379,380}. Actualmente se utilizan columnas estándar C8 ó C18, de < 3 μm de tamaño de partícula (adsorbente de sílice), con 2.1 mm de diámetro interno (i.d.) y 100 mm de largo, las cuales toleran flujos menores ($200\text{--}250 \mu\text{L min}^{-1}$), hasta un máximo de $500 \mu\text{L min}^{-1}$, especialmente si se usan interfases de tipo ESI o APCI en el espectrómetro de masas. En la tabla 5.2 se muestran las fases estacionarias empleadas durante el desarrollo de los métodos contemplados en esta memoria.

³⁷⁹ Huang X, Qiu N, Yuan D, Lin Q. Preparation of a mixed stir bar for sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of quinolones from wastewater. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217:2667–2673.

³⁸⁰ Pena A, Chmielova D, Lino CM, Solich P. Preparation of a mixed stir bar for sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of quinolones from wastewater. *Journal of Separation Science*, 2007, 30:2924–2928.

Tabla 5.2. Características de las columnas y cromatógrafos de líquidos usados en esta Tesis Doctoral.

Análisis	Cromatógrafo	Características de la columna
Quinolonas en aguas residuales	Waters Acquity UPLC™ H-Class-Xevo TQS™	Acquity UPLC BEH™ C ₁₈ column (50 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 μm de tamaño de partícula)
Quinolonas en fangos de desecho	UHPLC Agilent 1200™- API 2000™	Kinetex C ₁₈ column (100 mm x 2.1 mm i.d., 2.6 μm de tamaño de partícula)
BPA y derivados clorados en aguas residuales y fangos de desecho	UHPLC Agilent 1200™- API 2000™	Gemini C ₁₈ column (100 mm x 2.0 mm i.d., 3 μm de tamaño de partícula)

En lo que respecta a la fase móvil, agua, metanol y acetonitrilo son los disolventes de uso común en la separación los contaminantes de interés. Para la detección por espectrometría de masas, se utilizan como aditivos para incrementar la eficiencia en la ionización, electrolitos que no dejan residuo como acetato de amonio, amoníaco, ácido acético, ácido fórmico o trialkilaminas, especialmente en la interfase ESI.

En los métodos analíticos desarrollados en esta memoria, tanto para la determinación de quinolonas como de BFA y derivados en ambas matrices (aguas residuales y fangos de desecho), se emplearon los dos equipos de cromatografía de líquidos acoplados a espectrometría de masas que se muestran en la Fig. 5.12.

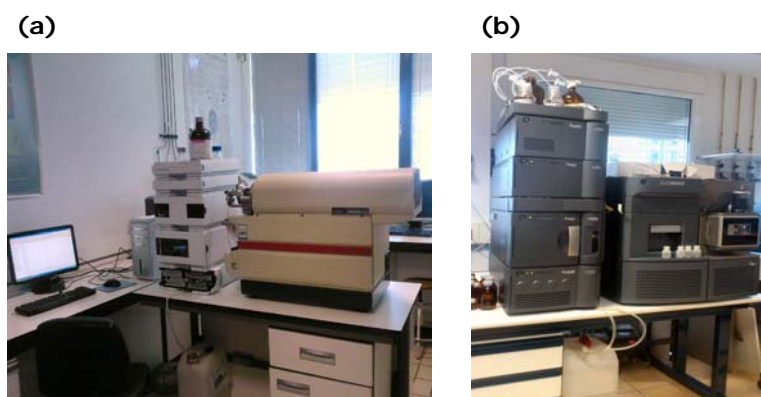


Figura 5.12. Equipos de cromatografía de líquidos empleados.
(a) Cromatógrafo UHPLC Agilent 1200™-API 2000™,
(b) Cromatógrafo Waters Acquity UPLC™ H-Class-Xevo TQS™

Existen ciertas incompatibilidades entre la espectrometría de masas y la cromatografía líquida, ya que ésta última utiliza una fase móvil líquida, que a menudo contiene cantidades significativas de agua, mientras que el espectrómetro de masas debe ser mantenido bajo condiciones de alto vacío. Este problema se soluciona colocando entre ambos dispositivos, una "interfase", que tiene como finalidad eliminar la fase móvil tanto como sea posible, pero también permitir el paso de la máxima cantidad de analito desde el cromatógrafo hacia el espectrómetro de masas, para no comprometer la sensibilidad del método. En la interfase también se produce la ionización de las moléculas, de tal forma que el espectrómetro de masas sea capaz de generar a partir de estas condiciones toda la información analítica, y eso sólo lo puede lograr si las moléculas han sido convertidas en iones en fase gaseosa. Además, los iones son separados, detectados y medidos de acuerdo a su relación masa-sobre-carga (m/z).

Los métodos de ionización habituales en LC-MS incluyen ionización por impacto electrónico (EI), por ionización química (CI), bombardeo

rápido de átomos (FAB), ionización por "termospray" (TSP), ionización por "electrospray" (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI). De especial interés analítico son ESI (Fig. 5.13 y 5.14) y APCI (Fig. 5.15), caracterizados por ser métodos de ionización que ocurren a presión atmosférica, por lo que presentan una gran facilidad para acoplarse al sistema de cromatografía de líquidos; además la eficiencia de la ionización es de 10^3 a 10^4 veces mayor que para la ionización química a presión reducida³⁸¹, lo que los hace métodos de ionización muy sensibles y robustos.

³⁸¹ De Hoffmann E, Stroobant V. Mass Spectrometry. Principles and Applications. 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd, England, 2007, 502 pp.

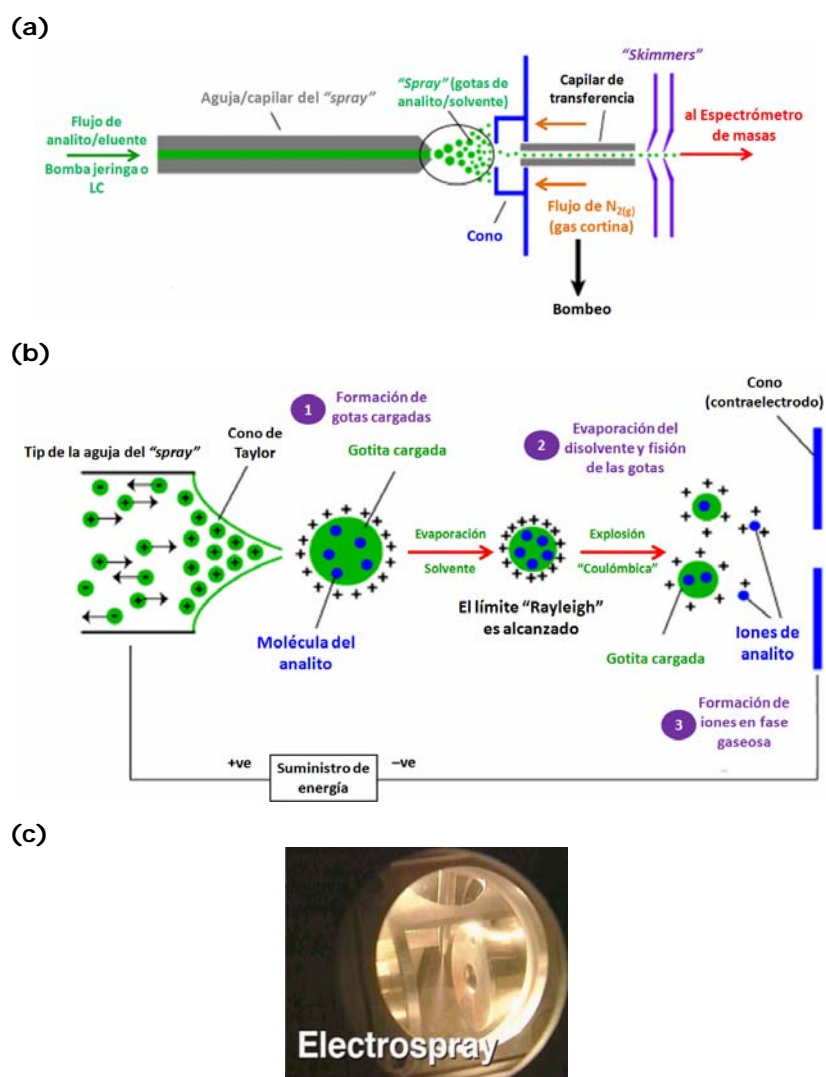


Figura 5.13. Método de ionización "electrospray" (ESI). (a) Estructura de la interfase ESI. (b) Mecanismo de ionización por ESI. (c) Imagen de la formación del "spray".

El método de ionización ESI es muy suave con muy poca energía residual retenida por el analito después de la ionización. Habitualmente no se produce fragmentación dentro de la fuente. Los compuestos de bajo peso molecular forman generalmente iones monocargados por pérdida o ganancia de un protón y las biomoléculas de alto peso

molecular y polímeros forman iones multicargados. Se pueden formar aductos o multímeros con el disolvente. Los aductos de NH_4^+ ($M+18$), Na^+ ($M+23$), y K^+ ($M+39$) son muy comunes.

El espectrómetro de masas Xevo TQS™ que está acoplado al cromatógrafo UPLC™ H-Class de Waters, se caracteriza por tener una interfase *ESI ortogonal Z-Spray™*, que le da importantes ventajas en relación a la interfase ESI tradicional del otro equipo usado (API 2000). El "spray" es generado de la forma tradicional, pero con la diferencia de que no todo este "spray" es arrastrado a través del orificio del cono de muestra, ya que debido a diferencia de presión y voltaje, sólo la porción cargada (que contiene al analito) ingresa al analizador de masas, que se encuentra en posición perpendicular a la trayectoria del "spray". El resto, que debe contener a componentes de la matriz no cargados, va al desecho (escape de gases). Este sistema permite disminuir/eliminar en gran extensión la cantidad de componentes de la matriz que han sido coextraídos, y que son responsables del efecto matriz.

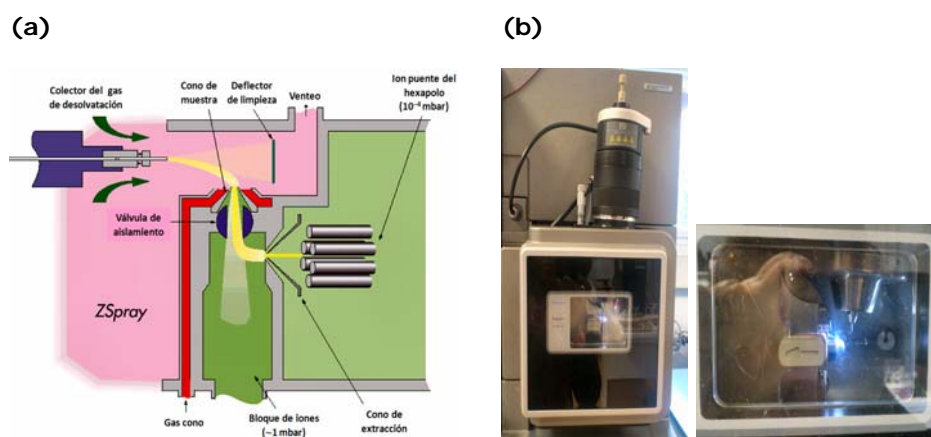


Figura 5.14. (a) Esquema; (b) imágenes, de la interfase ESI ortogonal Z-spray™.

En general, la interfase ESI presenta una gran sensibilidad y selectividad para el análisis de PPCPs en muestras complejas. Los fármacos de naturaleza ácida se suelen analizar usando el modo de ionización negativo, mientras que los neutros y básicos (*e.g.* las quinolonas) en el modo positivo, empleando aditivos apropiados en las fases móviles para mejorar la eficiencia de la ionización.

APCI es similar a la ionización química con la diferencia de que ocurre a presión atmosférica. La estructura de la interfase es muy parecida a la de ESI (Fig. 5.15a), pero la principal diferencia es la manera en cómo ocurre la ionización. En ESI, la ionización se lleva a cabo a través de la diferencia de potencial entre la aguja del "spray" y el cono a lo largo del trayecto de desolvatación, que ocurre de manera suave pero rápida. En APCI, la solución de analito es introducida en un nebulizador neumático y desolvatado en un tubo caliente de cuarzo antes de interactuar con la descarga corona que genera los iones. En otras palabras, en ESI la ionización ocurre en solución, mientras que en APCI ocurre en fase gaseosa. En APCI, los iones primarios colisionan con moléculas de disolvente vaporizado para formar iones reactantes secundarios *e.g.* H_3O^+ y $(\text{H}_2\text{O})_n^{\text{H}^+}$ (Fig. 5.15b), quienes sufren repetidas colisiones para formar más iones de analito. La elevada frecuencia de las colisiones da lugar a una elevada eficiencia en la ionización, por lo que se considera una técnica más potente que ESI en el sentido que se emplea en analitos de más difícil ionización. APCI origina principalmente iones monocargados, con posibilidad también de formación de aductos.

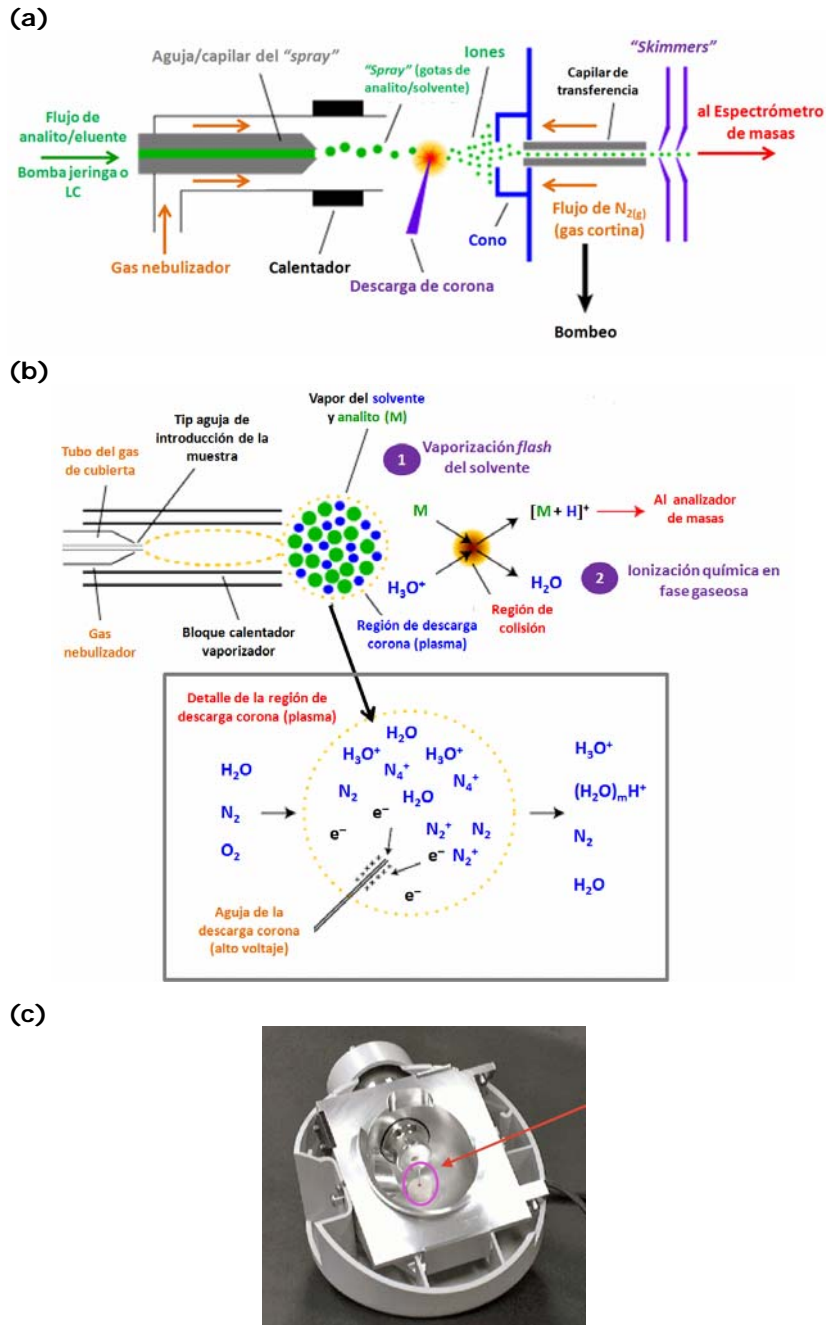


Figura 5.15. Método de ionización química a presión atmosférica (APCI).
 (a) Estructura de la interfase APCI. (b) Mecanismo de ionización por APCI.
 (c) Imagen de la interfase APCI donde se señala la aguja donde ocurre la descarga corona.

La elección del método de ionización es una etapa muy importante. No deben ser condiciones de ionización demasiado "drásticas" ya que tienen que proporcionar información de la masa molecular así como características estructurales, por eso, los métodos de ionización química son muy utilizados. En general, los métodos de ionización por ESI y APCI son "suaves" en el sentido que comúnmente se observa la formación de iones monocargados por transferencia de protones ($[M + H]^+$ ó $[M-H]^-$) y por ello son los más aplicados.

5.3.1. Analizadores de Masas.

El analizador de masas recomendado, por su sensibilidad, para el análisis cuantitativo a nivel de trazas, es el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo en los modos de trabajo "single ion monitoring" (SIM) o "multiple reaction monitoring" (MRM). En la Fig. 5.16 se muestran los procesos que tienen lugar en el interior del triple cuadrupolo.

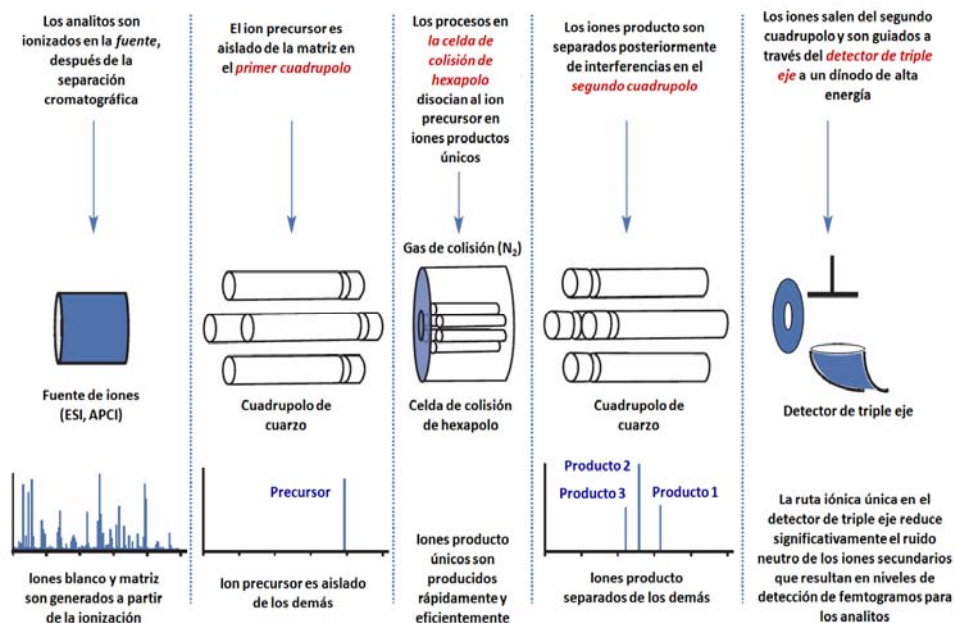


Figura 5.16. Esquema de los procesos que ocurren al interior del espectrómetro de masas, desde la interfase, el paso por el triple cuadrupolo y el detector.

El primer paso en la detección mediante espectrometría de masas en tándem es la selección del ion precursor (llamado también "ion padre"). En el análisis de matrices ambientales, es preferible que el espectro de ionización sea de un solo ion molecular o cuasi-molecular. Los iones moleculares protonados ($[M + H]^+$) o deprotonados ($[M-H]^-$) son considerados como los mejores iones precursores, aunque en ocasiones, para mejorar la detección en términos de sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, se puede seleccionar un aducto como precursor, asegurando previamente que este aducto presente buenas características de fragmentación en la celda de colisión. Para el caso específico de los contaminantes analizados en este trabajo, para las quinolonas (modo ESI+) se seleccionó como ion precursor el $[M + H]^+$ y en el caso del BFA y sus derivados clorados (APCI-), el $[M-H]^-$, siempre trabajando en modo MRM (Fig 5.17)³⁸². En esta modalidad de trabajo, en lugar de registrar el espectro completo, se registra sólo la corriente iónica debido a pares específicos ion precursor-ion hijo. El ion precursor sufre una disociación inducida por la colisión ("*collision-induced dissociation*", CID), que genera varios iones hijo. Los iones seleccionados deben ser preferiblemente los más abundantes y sobre todo, característicos para el analito de interés. Además, si se dispone de patrón interno marcado isotópicamente del mismo compuesto, éste debe producir fragmentos que aún conserven la marca isotópica.

³⁸² Hao C, Clement R, Yang P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of bioactive pharmaceutical compounds in the aquatic environment—a decade's activities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387:1247-1257.

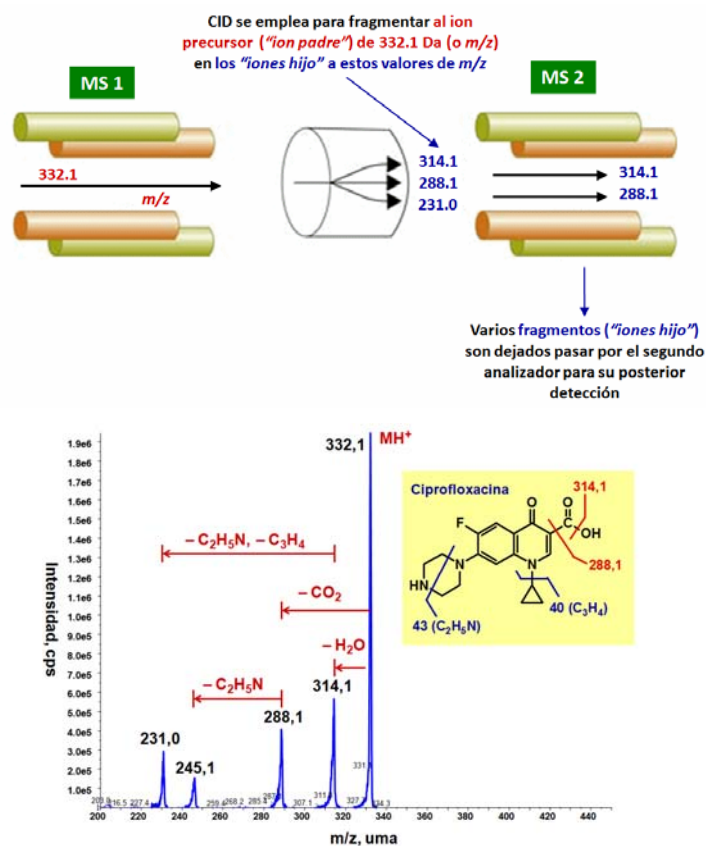


Figura 5.17. Fundamento del modo "multiple reaction monitoring" (MRM). Determinación de ciprofloxacina.

A pesar de la elevada especificidad de LC-MS/MS, los compuestos de interés pueden ser identificados de manera errónea, debido a la interferencia de los componentes de la matriz y los metabolitos. Para mejorar la calidad de los datos y evitar cualquier falso positivo, la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/ECD requiere que se utilicen dos o más transiciones para la identificación de un analito en el método MRM. En la práctica se emplean tanto la transición más abundante para cuantificación como una segunda para confirmación. En aquellos casos en los que el compuesto experimenta fragmentaciones poco específicas, como las quinolonas, se pueden seleccionar otros fragmentos para

asegurar su identificación inequívoca, o escoger fragmentaciones más específicas. Otro requisito que se debe cumplir es que la relación de abundancias entre las diferentes transiciones debe ser calculada y comparada con las del estándar. Para confirmar la identificación positiva, las desviaciones de las relaciones entre los iones y de los tiempos de retención deben estar de acuerdo con la Decisión anteriormente citada³⁸³.

En los últimos años, las mejores técnicas están permitiendo el uso de otros tipos de detectores, además del triple cuadrupolo. Así, la trampa de iones ("*Ion trap*", IT) y el detector de tiempo de vuelo ("*Time-of-flight*", TOF), que se pueden emplear solos o combinados en instrumentos híbridos, como el de Q-TOF, IT-TOF, y Q-LIT, o trampa iónica lineal ("*Linear ion trap*", LIT), ya se están utilizando con buenos resultados en el análisis de microcontaminantes en el medio ambiente.

5.3.2. Efecto Matriz.

La principal limitación del uso de LC-MS/MS para el análisis cuantitativo es la presencia del "*efecto matriz*", el cual resulta a menudo en una disminución de la señal (*supresión iónica*), o en menor extensión, un incremento de la señal³⁸⁴. En cualquiera de los dos casos, la exactitud y precisión del análisis se verá comprometida. Este efecto es la principal desventaja de la técnica de ionización por "*electrospray*" (ESI).

³⁸³ Pozo OJ, Guerrero C, Sancho JV, Ibáñez M, Pitarch E, Hogendoorn E, Hernández F. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1103:83-93.

³⁸⁴ Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2008, 74 (5):1299-1312.

La disminución en la sensibilidad del método puede ser causada por varios factores:

- Los analitos pueden adsorber materia orgánica, uno de los principales componentes de las matrices estudiadas.
- Los componentes de la matriz pueden interferir con los picos de los analitos elevando la línea base del cromatograma.
- La presencia de compuestos, tanto de los aditivos de la fase móvil como de los compuestos coextraídos de la matriz (contraiones conjugados, sales, aminas, ácidos grasos, triglicéridos, etc.)³⁸⁵, pueden reducir la eficiencia de la ionización de los analitos, compitiendo con ellos por ser ionizados, alterando la eficiencia en la formación de las gotitas^{305,384,386,387}. Este efecto afecta la cantidad de iones cargados en la fase gaseosa³⁸⁸. También puede producirse una disminución en la evaporación de la disolución o un incremento en la tensión superficial debido a una elevada concentración de los componentes de la matriz³⁸⁹.

Existen estudios publicados en la bibliografía que afirman que los antibióticos dentro de la misma clase generalmente exhiben el mismo

³⁸⁵ Mei H, Hsieh Y, Nardo C, Xu X, Wang S, Ng K, Korfmacher WA. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, 17:97-103.

³⁸⁶ Mallet CR, Lu Z, Mazzeo JR. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, 18:49-54.

³⁸⁷ Vanderford BJ, Pearson RS, Rexing DJ, Snyder SA. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2002, 75:6265-6274.

³⁸⁸ Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 2003, 49:1041-1044.

³⁸⁹ King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, 2000, 11:942-950.

grado de efecto matriz, siendo las quinolonas una de las familias que presentan una mayor supresión iónica³⁸⁷.

Se han desarrollado una serie de estrategias para compensar o minimizar el efecto matriz, como por ejemplo, la reducción del flujo de entrada al espectrómetro de masas; la reducción del volumen de inyección; el uso de concentraciones pequeñas de aditivos en la fase móvil; la mejora del tratamiento de muestra que permita una limpieza efectiva de los extractos; la dilución de los extractos; y el uso de patrones internos marcados isotópicamente³⁹⁰, aunque en este último caso, estas sustancias suelen ser sumamente costosas, y no siempre están disponibles.

Una alternativa de uso extendido, es el uso de métodos apropiados para la construcción de las curvas de calibrado, como el método de adición de patrón y la calibración interna en muestra "*matrix-matched calibration*"³²⁷. Éste último método fue el elegido para los métodos desarrollados en esta memoria, ya que además de ser sumamente efectivo, es mucho más práctico ya que no demanda mucho tiempo a diferencia del método de adición de patrón. También se realizaron ensayos de dilución de extractos, pero esta alternativa no mostró ninguna mejora en la reducción del efecto matriz. En el caso de la determinación de BFA y sus derivados clorados, se usó la metodología de dilución isotópica, ya que los correspondientes patrones marcados para el caso de las quinolonas son sumamente costosos, y sólo algunos están disponibles. En este caso se utilizaron dos patrones internos del tipo "*surrogate*", uno para cada tipo de quinolona, que son fármacos de uso veterinario y por lo tanto de presencia improbable en las muestras.

³⁹⁰ Kloefer A, Quintana JB, Reemtsma T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067:153–160.

En el caso particular de las matrices seleccionadas a lo largo del trabajo experimental desarrollado en esta Tesis Doctoral, los componentes de la muestra que causan el efecto matriz son sustancias polares que se caracterizan por eluir con tiempos de retención muy bajos en un sistema de cromatografía de fase reversa, de modo que retardar la aparición de los primeros analitos también es una buena estrategia para reducir/eliminar el efecto matriz³⁸⁵. Se sabe que los ácidos húmicos y fúlvicos en particular son responsables de la supresión iónica en el análisis de pesticidas y fármacos polares en aguas superficiales y residuales cuando se analizan con ESI³³².

En la mayoría de los casos, ESI es más sensible al efecto matriz que APCI^{305,384-386,391-394}. Se ha publicado que APCI puede reducir el efecto matriz por un factor de 3 a 10 veces³⁹⁵. El efecto más fuerte para ESI se puede explicar parcialmente con una mayor tendencia a la formación de aductos³⁹⁶ o por la saturación en la ionización, ya que se observa un límite superior de número total de iones (típicamente

³⁹¹ Ye Z, Weinberg HS, Meyer MT. Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2007, 79:1135–1144.

³⁹² Lindberg R, Jarnheimer PA, Olsen B, Johansson M, Tysklind M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, 2004, 57:1479–1488.

³⁹³ Gómez MJ, Petrović M, Fernández-Alba AR, Barceló D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1114:224–233.

³⁹⁴ Vieno NM, Tuhkanen T, Kronberg, L. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1134:101–111.

³⁹⁵ Schlüsener MP, Bester K. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. *Rapid Communications of Mass Spectrometry*, 2005, 19:3269–3278.

³⁹⁶ Borts DJ, Bowers LD. Direct measurement of urinary testosterone and epitestosterone conjugates using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2000, 35:50–61.

10^{-5} M)³⁹⁷. En consecuencia, el fenómeno de supresión iónica en la determinación de fármacos se observa frecuentemente con el uso de la interfase ESI. Y aunque la existencia de efecto matriz también ha sido demostrada para el análisis de fármacos usando la interfase APCI en fluidos biológicos³⁹⁸⁻⁴⁰², existen muy pocos de estos estudios para el caso de aguas residuales y fangos de desecho⁴⁰³. Durante el desarrollo del método de determinación de BFA y derivados clorados en fangos de desecho, contemplado en esta memoria, se utilizó la interfase APCI observándose una importante supresión iónica, posiblemente debido a procesos de neutralización en fase gaseosa y coprecipitación de los analitos con materiales no volátiles⁴⁰³.

³⁹⁷ Bruins AP. Mechanistic aspects of electrospray ionisation. *Journal of Chromatography A*, 1998, 794:345–357.

³⁹⁸ Van Hout MWJ, Niederländer HAG, De Zeeuw RA, De Jong GJ. Ion suppression in the determination of clenbuterol in urine by solid-phase extraction atmospheric pressure chemical ionisation ion-trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, 17:245–250.

³⁹⁹ Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2003, 14:1290–1294.

⁴⁰⁰ Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Analytical Chemistry*, 1998, 70:882–889.

⁴⁰¹ Hsieh Y, Chintala M, Mei H, Agans J, Brisson J, Ng K, Korfmacher WA. Quantitative screening and matrix effect studies of drug discovery compounds in monkey plasma using fast-gradient liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001, 15:2481–2487.

⁴⁰² Tiller PR, Romanyshyn LA. Implications of matrix effects in ultra-fast gradient or fast isocratic liquid chromatography with mass spectrometry in drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, 16:92–98.

⁴⁰³ Zhao X, Metcalfe CD. Characterizing and compensating for matrix effects using atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analysis of neutral pharmaceuticals in municipal wastewater. *Analytical Chemistry*, 2008, 80:2010–2017.

6. MICROBIOLOGÍA DE LOS TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS DE AGUAS RESIDUALES.

6.1. Fangos activados. Estructura y Composición

El fango activado (Fig 6.1) está compuesto por flóculos biológicos ("flocs") que contienen numerosos constituyentes, tales como sustancias poliméricas extracelulares ("extracellular polymeric substances", EPS), partículas orgánicas e inorgánicas y microorganismos⁴⁰⁴.

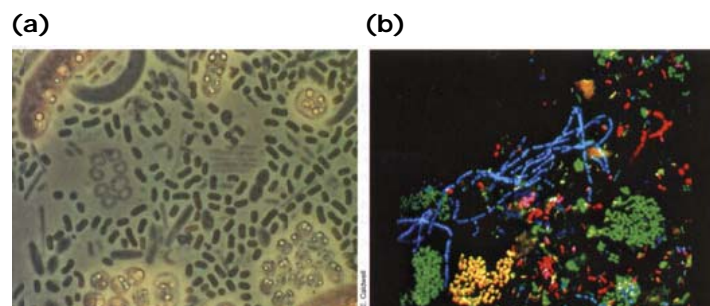


Figura 6.1. Imágenes de fango activado: (a) microscopio óptico, (b) con "Tridimensional Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) time-lapse imaging".

Los grupos taxonómicos que se pueden encontrar en los fangos activados son fundamentalmente procariotes (bacterias y archae) (Fig. 6.2), que incluyen además a hongos, protozoarios y organismos superiores como rotíferos, larvas de insectos y gusanos, siendo las bacterias, la comunidad microbiana más abundante (Fig. 6.3).

⁴⁰⁴ Nielsen PH, Thomsen TR, Nielsen JL. Bacterial composition of activated sludge-importance for floc and sludge properties. *Water Science and Technology*, 2004, 49:51-58.

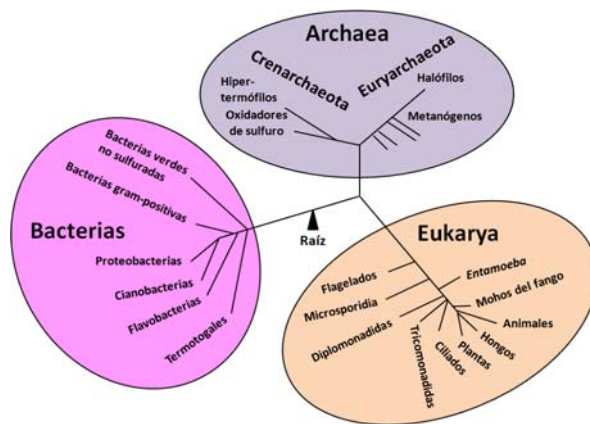


Figura 6.2. Árbol filogenético de la vida.

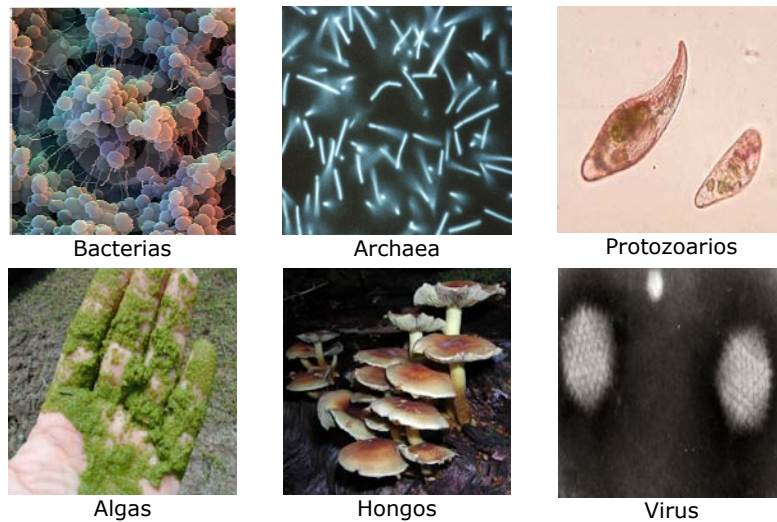


Figura 6.3. Algunos microorganismos encontrados en aguas residuales y fangos activados.

La Fig. 6.4 ilustra la cadena alimenticia en un sistema de tratamiento biológico de aguas residuales. Formas superiores como protozoarios, rotíferos, nematodos y larvas de insectos juegan roles básicos en el consumo de la materia orgánica suspendida, así como en el control de la concentración

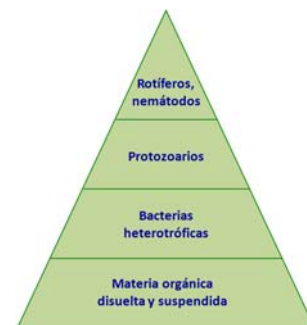


Figura 6.4. Ecología de sistemas de fangos activados.

del fango. Por otro lado, existe evidencia de que estos organismos superiores se encuentran en concentraciones menores en MBRs que en los sistemas convencionales de fangos activados^{181,405}. Sin embargo, si se opera a valores prolongados de HRT (20–74 h), se desarrollan mayores concentraciones protozoarios, especialmente flagelados y ciliados libres, en comparación con el tratamiento convencional⁴⁰⁶. Estos organismos predatorios tienen un efecto negativo sobre la nitrificación⁴⁰⁷, y se ha demostrado que un sobrecrecimiento puede inhibirla por completo⁴⁰⁸. Además, el desarrollo de organismos superiores debe ser estrictamente controlado, ya que por ejemplo, el género *Nocardia*, que presentan tendencia a desarrollar en sistemas MBRs, es responsable de problemas de generación de espuma.

Como los sistemas MBR pueden operar a concentraciones elevadas de fango, el desarrollo del fango activado está limitado por la energía proporcionada, la competencia por el alimento y el decaimiento celular⁴⁰⁹. Las condiciones que se crean en el biorreactor permiten que el fango se acumule hasta alcanzar una máxima concentración de biomasa activa, donde toda la energía se destina al mantenimiento celular. La elevada concentración de microorganismos en comparación a la cantidad de "alimento" disponible crea un ambiente donde las bacterias experimentan condiciones críticas de inanición, no estando en condiciones fisiológicas para el crecimiento celular. Por otro lado, hay

⁴⁰⁵ Witzig R, Manz W, Rosenburger S, Krüger U, Kraume M, Szewzyk U. Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Research*, 2002, 36:394–402.

⁴⁰⁶ Ghysels W, Verstraete W. Reduced sludge production in a two-stage membrane-assisted bioreactor. *Water Research*, 2000, 34:205–215.

⁴⁰⁷ Lee N, Welander T. Influence of predators on Nitrification in aerobic biofilm processes. *Water Science and Technology*, 1994, 29(7):355–363.

⁴⁰⁸ Bouchez T, Patreau D, Dabert P, Juretschko S, Wagner M, Godon J, Delgenès J, Moletta R. Bioaugmentation of a nitrifying sequencing batch reactor with the aerobic denitrifying bacteria *Microvirgula aerodenitrificans*: effects on nitrogen removal and consequences in terms of microbial community, Proceedings of the European Conference on New Advances in Biological Nitrogen and Phosphorus Removal for Municipal or Industrial Wastewaters, Narbonne, 1998.

⁴⁰⁹ Low E, Chase H. The effect of maintenance energy requirements on biomass production during wastewater treatment. *Water Research*, 1999, 33(3):847–854.

que tener en cuenta que incluso si las células bacterianas no están creciendo, están llegando bacterias nuevas al sistema a través del agua residual de entrada, de modo que como las bacterias no pueden "comer", habrá muerte celular para mantener la concentración de biomasa constante en el biorreactor. Por tanto, aparte de condiciones apropiadas de pH, temperatura, concentración de sólidos disueltos y niveles de oxígeno, la concentración de MLSS es determinante en el crecimiento microbiano. La mayoría de microorganismos viven en condiciones aeróbicas, pH neutro, temperatura de ambiente y en soluciones diluidas.

El número de bacterias en los fangos activados está en el rango de $1-10 \times 10^{12} \text{ g VSS}^{-1}$, de los cuales el 80% están activas o vivas⁴¹⁰. Las células bacterianas constituyen solamente una porción minoritaria de los flóculos, aproximadamente entre 5-20%^{411,412}. Esto significa que el resto, entre 80-95% es materia orgánica que puede ser considerada como material "muerto".

Muchos grupos funcionales de bacterias están presentes en los fangos activados. Los principales se muestran en la Tabla 6.1. La mayoría son bacterias heterótrofas aeróbicas y desnitrificadoras, aunque se pueden observar algunos microorganismos considerados como menos importantes en los procesos normales de fangos activados como las hierro reductoras, sulfato reductoras y metanógenos. Bajo determinadas condiciones (e.g. problemas de aglomeración), están también presentes bacterias oxidadoras de sulfuros.

⁴¹⁰ Nielsen PH, Roslev P, Dueholm T, Nielsen JL. *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic - aerobic activated sludge plants. *Water Science and Technology*, 2002, 46(1-2):73-80.

⁴¹¹ Lavallée B, Lessard P, Besser C. Decay rate variability of active heterotrophic biomass. *Water Science and Technology*, 2002, 46(1-2):423-430.

⁴¹² Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH. Extraction of exopolymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, 1996, 30:1749-1758.

Tabla 6.1. Grupos funcionales de bacterias en fangos activados.

Grupo funcional	Porcentaje del total de bacterias
Bacterias detectables con FISH	80
Bacterias aeróbicas heterotróficas	74
Bacterias nitrato reductoras	71
Organismos acumuladores de fósforo (PAOs)	4
Organismos acumuladores de glicógeno (GAOs)	?
Bacterias reductoras de Fe (III)	4
Bacterias sulfato reductoras	3-4
Bacterias productoras de metano	0-1
Bacterias oxidadoras de amonio	2-3
Bacterias oxidadoras de nitrito	2-3
Bacterias oxidadoras de Fe (II)	0-1

La identidad taxonómica directa de las especies presentes es casi desconocida, excepto por algunos grupos funcionales. Se han identificado muchas bacterias filamentosas⁴¹³, oxidadores de amonio⁴¹⁴ y oxidadores de nitrito⁴¹⁵, algunos PAOs⁴¹⁶ y sulfato reductoras⁴¹⁷. La mayoría de éstas y otras especies de bacterias se caracterizan porque

⁴¹³ Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13:218-227.

⁴¹⁴ Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Koops H-P, Wagner M. Phylogeny of all recognized species of ammonia-oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66:5368-5382.

⁴¹⁵ Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, Schleifer K-H, Wagner M. *In situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(11):5273-5284.

⁴¹⁶ Crocetti GR, Hugenholtz P, Bond PL, Schuler A, Keller J, Jenkins D, Blackall LL. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantification. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(3):1175-1182.

⁴¹⁷ Manz W, Eisenbrecher M, Neu TR, Szewzyk U. Abundance and spatial organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by *in situ* probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 25:43-61.

no se pueden cultivar utilizando los medios de cultivo convencionales⁴¹⁸, detectándose solamente mediante métodos en biología molecular^{413,419}, como la construcción de librerías moleculares para el gen 16S-rRNA, que es una aproximación cualitativa o semicuantitativa; y la técnica FISH ("*Fluorescence In Situ Hybridization*") que permite determinar la forma de crecimiento, el número y ubicación de las bacterias dominantes⁴²⁰.

A parte de las células bacterianas, la materia orgánica en los flóculos se presenta de varias formas. La fracción EPS es la fracción más importante y consiste de polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, sustancias húmicas y varios heteropolímeros, siendo las proteínas y los polisacáridos las fracciones más abundantes^{412,421,422}. Los EPSs provienen de la lisis bacteriana y de la materia adsorbida procedente de las aguas residuales.

A parte de los constituyentes orgánicos, el fango también contiene iones, especialmente cationes, por tanto las partículas orgánicas e inorgánicas también se pueden unir a los flóculos. Todos estos constituyentes son responsables de las propiedades físicoquímicas y coloidales de los flóculos, y particularmente en lo referente a la formación de geles, teniendo una gran importancia, ya que determinan las características de adsorción para una amplia variedad de compuestos orgánicos, que pueden ser retenidos en el fango durante el tratamiento

⁴¹⁸ Wagner M, Amann R, Lemmer H, Schleifer K-H. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59:1520-1525.

⁴¹⁹ Wagner M, Amann R, Lemmer H, Schleifer K-H. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59:1520-1525.

⁴²⁰ Nielsen PH, Thomsen TR, Nielsen JL. Bacterial composition of activated sludge—importance for floc and sludge properties. *Water Science and Technology*, 2004, 49:51-58.

⁴²¹ Higgins MJ, Novak JT. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *Journal of Environmental Engineering*, 1997, 123:479-485.

⁴²² Liu Y, Tay J-H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 2002, 36:1653-1665.

del agua residual. En el caso de las EDARs que operan con el tratamiento convencional de fangos activados, estas propiedades también son importantes por la sedimentabilidad del fango⁴²³.

6.1.1. Las Bacterias Filamentosas.

Aunque la presencia de cierto número de bacterias filamentosas es importante para el desarrollo apropiado de los flóculos, la existencia de grandes concentraciones de este tipo de bacterias es perjudicial para el tratamiento de aguas residuales, ya que causa la formación de espumas que generan problemas de sedimentación y dificultan los procesos en los clarificadores secundarios durante el tratamiento convencional. Los procesos mediados por MBRs también son claramente afectados.

En el proceso convencional, para que el agua sea separada de manera efectiva del fango activado, es necesario que los microorganismos se agreguen en flóculos compactos. En este proceso, los microorganismos filamentosos funcionan como una red a la que quedan fijados los microorganismos floculantes, formando flóculos mayores que decantan más fácilmente. Sin embargo, si la presencia de microorganismos filamentosos es excesiva, se forma una malla que impide la correcta separación de las fases sólida y líquida, es el "bulking" filamentosos.

Una de las principales causas de la aparición de este fenómeno es la baja relación entre las concentraciones de microorganismo y sustrato, F/M resultante del aumento de volumen, y por lo tanto del SRT, asociado a la eliminación de nutrientes. Otras posibles causas son un bajo nivel de oxígeno, agua procedente de fosas sépticas, presencia de sulfuros, deficiencia de nutrientes y bajo pH. Hoy en día es uno de los

⁴²³ Keiding K, Wybrandt L, Nielsen PH. Remember the water—a comment on EPS-colligative properties. *Water Science and Technology*, 2001, 43(6):17–23.

mayores problemas a los que tienen que hacer frente las plantas de tratamiento biológico de aguas residuales, encontrándose presentes en casi todos los procesos, con SRT tanto cortos como prolongados.

Por otro lado, la presencia de exceso de bacterias filamentosas también afecta a los procesos de transferencia de oxígeno al sistema, reduciendo su rendimiento para la eliminación de materia orgánica y nitrógeno, así como la eficiencia de la membrana, ya que ésta presenta una mayor tendencia a sufrir procesos de ensuciamiento o "*biofouling*", que pueden a la larga afectar su integridad y tiempo de operación efectivo⁴²⁴.

Estos problemas también pueden repercutir seriamente en el tratamiento de muestra para las determinaciones analíticas de los contaminantes seleccionados, ya que por ejemplo, la generación excesiva de espuma durante la filtración (Fig. 6.5) y la presencia de sólidos en suspensión muy finos se traducen en problemas de taponamiento de las membranas durante la filtración de la muestras, obligando a un continuo recambio de las mismas, incrementándose grandemente el tiempo de procesamiento de la muestra y el costo del análisis.

El problema se puede controlar y reducir mediante el uso de agentes floculantes químicos, o sustancias que provoquen la muerte de las bacterias filamentosas, como cloro, peróxido de hidrógeno y ozono, así como preparados enzimáticos y microbiológicos, como algunas especies de ciliados, que son predadores de las bacterias filamentosas. El problema de proliferación de filamentosas, así como eutrofización y proliferación de algas por los elevados niveles de amonio en las aguas residuales fueron problemas recurrentes en el MBR durante su período

⁴²⁴ Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13:218-227.

de funcionamiento, por lo que fueron aplicados periódicamente tratamientos químicos para remediar estos problemas.

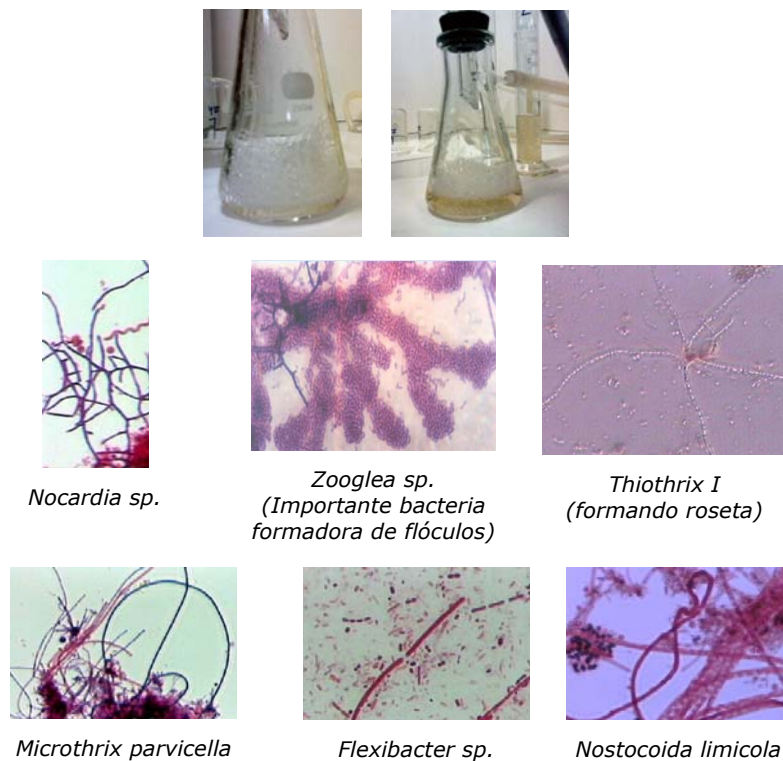


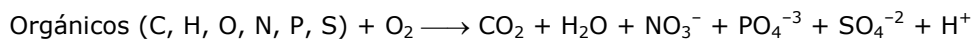
Figura 6.5. Sobreproducción de espuma durante la filtración del fango activado debido a la presencia excesiva de microorganismos filamentosos. Bacterias filamentosas típicas en los fangos activos en tinción de Gram (1000x).

6.2. Principios de Oxidación Biológica.

Los procesos en los fangos activados pueden ser definidos como un sistema en el cual, los flóculos biológicos circulan continuamente para entrar en contacto y oxidar compuestos orgánicos que se encuentran en las aguas residuales en presencia de oxígeno. El hecho que una masa "activa" de organismos sea mantenida en el sistema para un proceso de oxidación biológica continua y exitosa, explica por qué el

proceso es denominado tratamiento de "fangos activados". Existen dos objetivos fundamentales en el tratamiento de fangos activados: obtener la máxima eliminación de sustancias orgánicas en el tiempo más corto posible, y hacer que los flóculos biológicos tengan buenas características de sedimentación. Ambos son esenciales en el control de la calidad del efluente secundario. Sin embargo, ambos objetivos no son compatibles porque los flóculos que son muy eficientes en la eliminación de sustancias orgánicas normalmente tienen características de baja sedimentación, y viceversa. En la tecnología de los MBRs, el segundo objetivo no es necesario, ya que el agua tratada es separada del fango por una membrana, por lo que se pueden optimizar las condiciones que favorezcan el desarrollo de una biomasa con una elevada capacidad de degradación de sustancias orgánicas, independientemente de su capacidad de sedimentación.

La situación ideal sería una oxidación o mineralización completa de los compuestos orgánicos:



Pero, para que esto ocurra, se necesitaría de un tiempo infinito de aireación del fango activado, así como una concentración muy elevada de biomasa activa presente, lo cual no es económicamente factible. Tampoco es posible mantener una población estable y estacionaria para que organismos menos competitivos (*e.g.* bacterias nitrificantes) desarrollen en el biorreactor bajo las condiciones de operación establecidas. El resultado más notable es la ausencia de procesos de nitrificación significativos, de modo que los efluentes contienen concentraciones importantes de ion amonio, que se caracteriza por ser tóxico. Además, un tratamiento eficiente de aguas residuales debe conducir también a una importante reducción de la materia orgánica, la cual se mide a través del COD y BOD₅, así como del material particulado

en suspensión, para poder ajustarse a los requerimientos impuestos por la legislación en relación a la calidad de los efluentes.

Durante la oxidación biológica de las aguas residuales tienen lugar procesos de síntesis y de oxidación. En el proceso global participan muchas poblaciones de microorganismos. Se ha determinado que hay una eliminación rápida inicial de material orgánico cuando el agua entra en contacto con el fango activado, lo cual ocurre en sólo minutos. Este mecanismo de eliminación es interpretado como un fenómeno de adsorción, que elimina principalmente partículas discretas y coloidales. La materia orgánica adsorbida puede eventualmente ser oxidada, dependiendo de sus características, o ser empleada en la síntesis de componentes celulares. Sin embargo, existen muchos compuestos orgánicos (contaminantes) que ya no están disponibles para ser biodegradados cuando están adsorbidos, por lo que el proceso de adsorción los convierte en recalcitrantes, y aunque son retirados de las aguas residuales, persistirán en los fangos de desecho, lo cual no es sinónimo de un tratamiento eficiente, pues pueden reingresar al medio ambiente, especialmente cuando dichos fangos son reutilizados como fertilizantes de suelos agrícolas.

Después de la adsorción, tienen lugar los procesos de degradación por los microorganismos del fango. La mayoría de los compuestos de alto peso molecular (macromoléculas como proteínas y polisacáridos) no pueden entrar en el interior de las células para ser metabolizadas. Entonces, son secretadas por las células exoenzimas específicas que digieren las macromoléculas que estén adsorbidas a la superficie de los flóculos o estén en el agua residual. Las enzimas digestivas son hidrolasas que catalizan la descomposición hidrolítica de los sustratos.

Sin enzimas digestivas, sólo las sustancias de bajo peso molecular entran en el interior de las células. Se sabe que solamente las moléculas

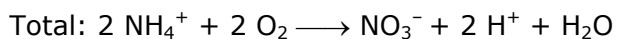
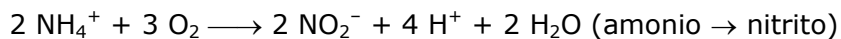
que contienen grupos hidrofílicos (grupos OH, COOH, NH₂, o sulfonatos, hasta con un máximo de 12 átomos de carbono) pueden pasar a través de la membrana celular, mientras que los grupos hidrofóbicos con más de 8 átomos de carbono no lo hacen. Los compuestos hidrofóbicos no hidrolizados penetran de una manera diferente. Ellos son atraídos por la porción lipídica de la membrana citoplasmática donde son solubles. Una vez que han penetrado hacia la fracción lipídica, el resto de la molécula también es transportada hacia el interior de la célula. Aunque todas las células presentan en general las mismas características, distintos organismos pueden diferir en su habilidad para aceptar ciertos nutrientes orgánicos específicos para emplearlos en su metabolismo, ya que hay sitios específicos en la membrana que realizan un transporte selectivo de compuestos particulares y iones al interior de las células. Una vez dentro de las células, los compuestos sufren procesos bioquímicos de oxidación mediado por enzimas intracelulares que los transforman en compuestos más sencillos o eventualmente, los mineralizan por completo.

6.2.1. Procesos Biológicos Convencionales para la Eliminación de Nitrógeno y Fósforo.

La eliminación de nitrógeno y fósforo es de particular interés en el tratamiento de las aguas residuales. La eliminación de amonio representa un punto crítico porque puede ser tóxico para las especies acuáticas. La eliminación biológica de nitrógeno ocurre lentamente porque los microorganismos responsables de su eliminación crecen lentamente. Además el control de procesos para establecer las condiciones aeróbicas y anaeróbicas, necesarias para la nitrificación y desnitrificación, respectivamente, es bastante complicado. Para superar estos problemas, se han estudiado varias clases de biorreactores para incrementar la eficiencia de la eliminación de nitrógeno, como por

ejemplo procesos combinados de nitrificación y denitrificación⁴²⁵ o inmovilización de bacterias sobre perlas de gel polimérico en un biorreactor de biopelícula de lecho movable⁴²⁶.

La eliminación convencional de nitrógeno por microorganismos se basa en la *nitrificación autotrófica* y la *denitrificación heterotrófica*. El proceso incluye la *nitrificación aeróbica*, que utiliza oxígeno molecular como aceptor final de electrones. Este proceso consiste en la generación de nitrato (NO_3^-) a partir de nitrógeno amoniacal (NH_4^+) y tiene lugar en dos pasos⁴²⁷:



Cada proceso es catalizado por una clase de bacterias quimiolitotautotróficas diferente, las *bacterias oxidadoras de amonio* ("ammonia-oxidizing bacteria", AOB) y las *bacterias oxidadoras de nitrito* ("nitrite-oxidizing bacteria", NOB), respectivamente. Estas bacterias se denominan colectivamente como *bacterias nitrificantes*, como los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira* (AOB), y *Nitrobacter* y *Nitrospira* (NOB) (Fig. 6.6). Son microorganismos aeróbicos estrictos de crecimiento extremadamente lento, por tanto, a valores prolongados de SRT se favorece su desarrollo en fangos activados, por lo que tienen mayores posibilidades de desarrollo en sistemas MBR en comparación con el tratamiento convencional. Además, estas bacterias también son muy susceptibles a agentes químicos y físicos presentes en su medio de crecimiento.

⁴²⁵ Kuenen JG, Robertson LA. Combined nitrification–denitrification processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 15:109–118.

⁴²⁶ Hem LJ, Rusten B, Ødegarrrd H. Nitrification in a moving bed biofilm reactor. *Water Research*, 1994,28:1425–1433.

⁴²⁷ Khin T, Annachatre AP. Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*, 2004, 22:519–532.

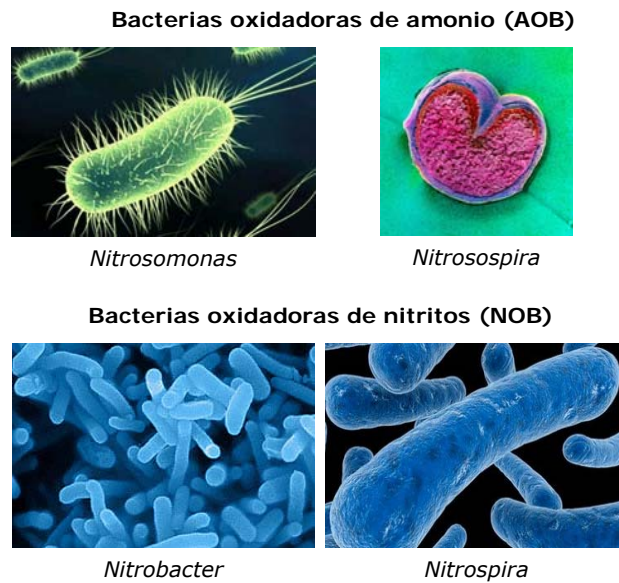
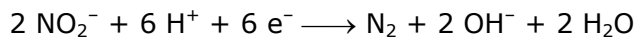
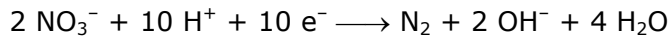


Figura 6.6. Géneros de bacterias nitrificantes más importantes.

Las bacterias nitrificantes son gram-negativas, mesófilas y su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30°C. El rango óptimo de pH para el crecimiento de *Nitrosomonas* está entre 7.8 y 8.0, y para las nitrobacterias, entre 7.3 y 7.5, mientras que la nitrificación se inhibe por completo a valores de pH por debajo de 6.0. *Nitrosomonas* es totalmente dependiente de la existencia de amoníaco en el medio, pudiendo entrar en estado de latencia cuando carece de su fuente de energía. Las nitrobacterias, por el contrario, pueden usar además de nitritos, otras fuentes de energía, como hidrocarburos y desechos orgánicos. Esto explica por qué no entran en período de latencia, ya que continuamente encuentran fuentes de energía. La conversión a nitritos por *Nitrosomonas* es altamente eficiente, no así la oxidación a nitratos por las nitrobacterias.

La *denitrificación anóxica* consiste en la conversión de nitrato y nitrito a nitrógeno molecular por bacterias aeróbicas facultativas, y se lleva a cabo utilizando una variedad de donadores de electrones, que

incluyen a metanol, acetato, etanol, lactato y glucosa^{428,429}. El proceso se lleva a cabo mediante las siguientes reacciones:



Como la nitrificación y denitrificación se llevan a cabo bajo diferentes condiciones y por diferentes microorganismos, la experiencia muestra que estos procesos tienen que estar separados en tiempo y espacio para que se lleven a cabo de manera efectiva. La nitrificación consume una gran cantidad de oxígeno, requiriendo 4.2 g de oxígeno por cada gramo de nitrógeno amoniacal nitrificado⁴²⁷. Durante la denitrificación, el requerimiento de carbono orgánico es significativo. Por ejemplo, se requieren 2.47 g de metanol por gramo de nitrógeno de nitrato para una denitrificación completa⁴²⁷. El requerimiento de la adición de donadores de electrones tales como el metanol hace que el proceso de denitrificación a gran escala sea bastante costoso. Por este motivo, la mayor parte de EDARs no han sido diseñadas para la eliminación de nitrógeno como nitrógeno molecular, en el caso de los MBR, los procesos de operación se pueden optimizar para hacer que el nitrato generado de la nitrificación sea incorporado como material celular y de esta manera el nitrógeno es retirado de las aguas.

En cuanto al fósforo, su eliminación biológica es difícil de conseguir, porque para que los microorganismos asimilen el fósforo, se requiere de una combinación especial de condiciones aeróbicas y anaeróbicas en el biorreactor, por lo que éste se suele eliminar en forma de precipitados insolubles usando agentes químicos como coagulantes o

⁴²⁸ Tam NFY, Wong YS, Leung G. Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrients by the nitrification denitrification process. *Water Research*, 1992, 26:1229-1236.

⁴²⁹ Akunna JC, Bizeau C, Moletta R. Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Water Research*, 1993, 27:1303-1312.

caliza, o mediante precipitación mediada por microorganismos. Para estos procesos existen los llamados organismos acumuladores de polifosfato (PAOs), que tienen la habilidad de acumular fósforo muy por encima de los requerimientos normales de la célula, el cual es alrededor del 1–3% de la masa celular seca. A este grupo pertenecen las bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Tetrasphaera*.

6.3. Actividad Enzimática en los Fangos Activados.

El porcentaje de materia orgánica en el agua residual puede variar entre el 40 y el 60%⁴³⁰. Considerando dicho porcentaje, el proceso de hidrólisis enzimática durante el tratamiento biológico de estas aguas es básico para la completa mineralización de la materia orgánica, ya que sólo las moléculas pequeñas y sencillas pueden ser transportadas al interior de las células de los microorganismos para ser metabolizadas. La mayor parte de materia orgánica, carbohidratos, proteínas y lípidos, debe experimentar un paso previo de depolimerización e hidrólisis⁴³¹. Este proceso ocurre gracias a enzimas hidrolíticas, básicamente de tipo exocelular⁴³², como la α -amilasa (que hidroliza polímeros de glucosa, como almidones), celulasa (para la celulosa), exoenzimas proteolíticas (hidrolizan enlaces peptídicos en las moléculas de proteína) y lipasas (hidrolizan grasas y otros ésteres).

Se considera que esta hidrólisis es el paso determinante en la velocidad de mineralización de la materia orgánica en un proceso de tratamiento basado en fangos activados. Las exoenzimas se pueden generar por autólisis celular o por procesos de secreción. Éstas aparecen

⁴³⁰ Henze M. Characterization of wastewater for modeling of activated sludge processes. *Water Science and Technology*, 1992, 25(6):1–15.

⁴³¹ Li Y, Chróst RJ. Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39:568–572.

⁴³² Henze M, Mladenovski C. Hydrolysis of particulate substrate by activated sludge under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*, 1991, 25(1):61–64.

asociadas a las células que las producen, en forma libre, disueltas en agua o adsorbidas a otro tipo de superficies formando complejos de manera reversible, y quedando inmovilizadas⁴³³.

Las actividades enzimáticas se pueden aplicar como medida de la biomasa activa, como indicadores de poblaciones específicas o de procesos específicos en el fango activado (eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo). En los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral, se estudió la actividad de las enzimas fosfatasa⁴³⁴, glucosidasa⁴³⁵, proteasa⁴³⁶, esterasa⁴³⁷ y deshidrogenasa⁴³⁸. Los métodos tradicionales de determinación de las actividades enzimáticas son colorimétricos (Fig. 6.7).

Las *fosfatasas* son enzimas que hidrolizan los ésteres fosfato (presentes en muchos lípidos), liberando grupos fosfato. Existen dos tipos: la ácida y la alcalina, que difieren en el pH óptimo de máxima actividad y en el tipo de sustratos que hidrolizan. La *α-glucosidasa* rompe los enlaces α -1,4-glucosídicos en el disacárido maltosa (producto de la hidrólisis de polisacáridos), para producir glucosa. La *proteasa* rompe los enlaces peptídicos en los péptidos y proteínas. Las *esterasas* juegan un rol importante en la biodegradación de muchas sustancias naturales en las aguas residuales, como lípidos, proteínas y compuestos sintéticos.

⁴³³ Frølund B, Griebe T, Nielsen PH. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 43:755-761.

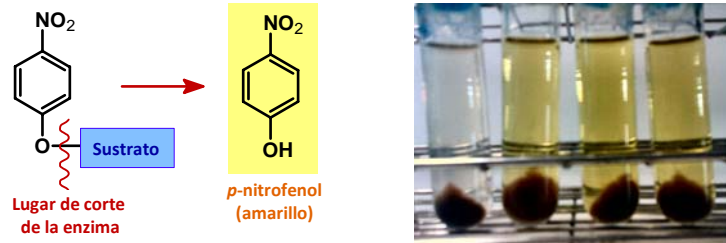
⁴³⁴ Richards SR, Hastwell C, Davis M. The comparative examination of 14 activated-sludge plants using enzymatic techniques. *Water Pollution Control*, 1984, 83:300-313.

⁴³⁵ Awong J, Bitton G, Koopman B. ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams. *Water Research*, 1985, 7:917-921.

⁴³⁶ Cadoret A, Conrad A, Block J-C. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31:179-186.

⁴³⁷ Boczar BA, Forney LJ, Begley WM, Larson RJ, Federle TW. Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Water Research*, 2001, 35(17):4208-4216.

⁴³⁸ Liwarska-Bizukojc E, Ledakowicz S. Estimation of viable biomass in aerobic biodegradation processes of organic fraction of municipal solid waste (MSW). *Journal of Biotechnology*, 2003, 101:165-172.

Actividad enzimática: Glucosidasas, fosfatasa ácida y alcalina**Fundamento:**

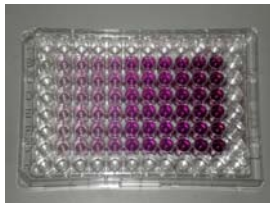
Los sustratos para las enzimas glicosidasas y fosfatasa son hidrolizados por las enzimas correspondientes para liberar p -nitrofenol (amarillo) que se determina por métodos colorimétricos.

Actividad enzimática: Proteasas

Solución de azocaseína

Fundamento:

La reacción se basa en la hidrólisis enzimática de la azocaseína para producir productos coloreados (azocompuestos), que se determinan por métodos colorimétricos.

Actividad enzimática: Deshidrogenasas**Fundamento:**

La reacción se basa en la reducción del INT (cloruro de 2-(p -yodofenil)-3-(p -nitrofenil)-5-feniltetrazolio) para dar lugar a formazán que son cristales rojos insolubles en agua y que toman coloración rojiza en acetona.

Figura 6.7. Fundamento de las reacciones enzimáticas utilizadas.

La composición del agua residual que entra en el reactor biológico es muy compleja, por lo que se hace necesario que exista una gran variedad de enzimas extracelulares para conseguir un proceso de hidrólisis eficiente que posteriormente facilite la mineralización completa de la materia orgánica. Dado que se ha descrito que las proteínas y los carbohidratos constituyen la fracción orgánica mayoritaria en las aguas, las actividades enzimáticas de la α -glucosidasa y la proteasa son básicas en el proceso total. La enzima *deshidrogenasa* no es una enzima extracelular pero su actividad es vital en la eliminación de sustratos por

oxidación. Se ha encontrado que la actividad de esta enzima está relacionada con la velocidad de consumo de oxígeno⁴³⁹. En la tabla 6.2 se presenta una breve descripción de los métodos para determinación de las actividades enzimáticas descritas.

Tabla 6.2. Metodologías para la determinación de actividades enzimáticas.

Actividad enzimática	Sustrato	Condiciones de incubación	Terminación de la reacción
Fosfatasa alcalina (pH 9.6)	Sal disódica de <i>p</i> -nitrofenilfosfato al 0.1%	Tiempo de incubación: 30 min. Temperatura: 37°C. Centrifugar y medir la absorbancia a 410 nm.	NaOH 0.2 M
Fosfatasa ácida (pH 4.8)	Sal disódica de <i>p</i> -nitrofenilfosfato al 0.1%	Tiempo de incubación: 30 min. Temperatura: 37°C. Centrifugar y medir la absorbancia a 410 nm.	NaOH 0.2 M
α -glucosidasa (pH 7,6)	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosido al 0.1%	Tiempo de incubación: 60 min. Temperatura: 37°C. Centrifugar y medir la absorbancia a 410 nm.	Calentar en agua hirviendo por 5 min
Proteasa	Azocaseína al 0.5%	Se hacen mediciones de absorbancia cada 10 min hasta completar una hora a 340 nm.	TCA al 10%
Deshidrogenasa	INT al 0.2%	Tiempo de incubación: 30 min. Temperatura: 60°C. Centrifugar, resuspender en tetracloroetileno: acetona, dejar 30 min en oscuridad, centrifugar y medir absorbancia a 490 nm.	Formaldehído al 37%
Esterasa (pH 7.2)	ésteres de acetato, butirato, caproato, caprilato, laurato, y palmitato	Tiempo de incubación: 2 h. Temperatura: 25°C. Centrifugar y medir la absorbancia a 400 nm.	Acetona

⁴³⁹ Nybroe O, Jørgensen PE, Henze M. Enzyme activities in waste water and activated sludge. *Water Research*, 1992, 26(5):579-584.

6.4. Efecto de Microcontaminantes Orgánicos Sobre el Crecimiento Bacteriano en los Fangos Activados.

La actividad biológica de los fangos activados juega un papel importante en el tratamiento de las aguas. Sin embargo, las aguas residuales pueden contener compuestos potencialmente inhibitorios o tóxicos por la comunidad biológica de los fangos activados. Un estudio realizado en 109 EDARs Europeas demostró que entre el 45 y el 60% contenían sustancias inhibitorias⁴⁴⁰.

La naturaleza y la concentración de las sustancias presentes en las aguas residuales son parámetros variables, por lo que se hace necesario implantar programas de supervisión, considerando la importancia que ello tiene sobre la eficiencia de la depuración. Los efectos adversos sobre la actividad biológica en una EDAR pueden evitarse o minimizarse si las aguas residuales son analizadas y en base a los resultados, se toman acciones apropiadas, especialmente para neutralizar sus efectos a través de algún tratamiento físico o químico preliminar.

La necesidad de determinación de la toxicidad tanto de los influentes como de los fangos activados en las EDARs es algo que está cobrando cada vez más importancia. La "Water Environment Research Foundation" (WERF) ha realizado estudios para evaluar los métodos disponibles para ello^{441,442}.

Uno de los principales objetivos de los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral, tanto en la planta piloto MBR como en los biorreactores a escala de laboratorio, fue determinar la eficiencia en la

⁴⁴⁰ Jönsson K, Grunditz C, Dalhammar G, Jansen JC. Occurrence of nitrification inhibition in Swedish municipal wastewater. *Water Research*, 2000, 34:2455–2462.

⁴⁴¹ Ren S. Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments. *Environment International*, 2004, 30:1151–1164.

⁴⁴² Love NG, Bott CB. A review and needs survey of upset early warning devices. Water Environment Research Foundation, Virginia, 2000.

eliminación de microcontaminantes por biodegradación. Para establecer las concentraciones a usar en los experimentos, se realizaron estudios preliminares de toxicidad o inhibición de crecimiento bacteriano, para así interpretar de manera adecuada los resultados del comportamiento de los microcontaminantes⁴⁴³, y evitar, por ejemplo, que una sustancia tóxica pero biodegradable sea erróneamente identificada como no biodegradable, debido a sus efectos tóxicos en el sistema biológico.

La evaluación de los efectos que puede tener una sustancia sobre las poblaciones microbianas de los fangos activados es complicada, considerando la variedad de tipos de microorganismos que viven en el fango, las interacciones que existen entre ellos, el hecho de que el contaminante no afecta a todas las comunidades de la misma manera y que no todas están involucradas en los procesos de degradación de los compuestos orgánicos. Por estas razones, los métodos convencionales que se utilizan en microbiología para la medición de la toxicidad pueden no ofrecer la información más conveniente.

En el caso en particular de las quinolonas, la evaluación de la toxicidad adquiere especial relevancia ya que son antibióticos y además al ser compuestos persistentes, el hecho de que las bacterias estén expuestas a estas sustancias durante largos períodos de tiempo puede provocar numerosas respuestas, a parte de los efectos esperados de toxicidad aguda, como fenómenos de adaptación, ecotoxicidad y desarrollo de efectos genotóxicos.

Existen varios métodos para determinar la toxicidad de sustancias en los fangos activados⁴⁴¹:

⁴⁴³ Organization for Economic Co-operation and Development. OECD 303. Simulation Test-Aerobic sewage treatment. OECD Guideline for the testing of chemicals, 2001.

- Métodos de inhibición de crecimiento⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁶: turbidimetría^{447,448}, ISO 15522⁴⁴⁹, ISO 10712 para *Pseudomonas putida*⁴⁵⁰.
- Métodos basados en bioluminiscencia: ensayo Microtox®⁴⁵¹, ISO 11348⁴⁵².
- Métodos respirométricos: "OECD sludge respiration inhibition test" (OECD 209), ensayo de inhibición de BOD y de inhibición de la botella cerrada ("Closed Bottle Inhibition Test"), ensayo de la inhibición del consumo de oxígeno (ISO 8192⁴⁴⁶). Ensayos respirométricos para evaluar nitrificación/denitrificación (ISO 9509⁴⁵³).
- Métodos basados en biología molecular⁴⁴¹.

⁴⁴⁴ Reynolds U, Blok J, De Morsier A, Gerike P, Wellens H, Bontinck WJ. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere*, 1987, 16:2259-2277.

⁴⁴⁵ Strotmann UJ, Eglsaer H, Pagga U. Development and evaluation of a growth inhibition test with sewage bacteria for assessing bacterial toxicity of chemical compounds. *Chemosphere*, 1994, 28:755-766

⁴⁴⁶ Strotmann UJ, Pagga U. A growth inhibition test with sewage bacteria. Results of an international ring test 1995. *Chemosphere*, 1996, 32:921-933.

⁴⁴⁷ Anon. Determination of the toxicity of substances to aerobic bacteria by measurement of growth inhibition Standard Committee of Analysts. Discussion paper BTP 204, UK Department of Environment, 1985.

⁴⁴⁸ Alsop GM, Waggy GT, Conway RA. Bacterial growth inhibition test. 2. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 1980, 52(10):2452-2456.

⁴⁴⁹ International Organization for Standardization. Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge micro-organisms. ISO 15522, Switzerland, 1999.

⁴⁵⁰ International Organization for Standardization. Water quality - *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test). ISO 10712, Switzerland, 1995.

⁴⁵¹ De Zwart D, Slooff W. The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. *Aquatic toxicology*, 1984, 4:129-138.

⁴⁵² International Organization for Standardization. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria. ISO 11348, Switzerland, 2007.

⁴⁵³ International Organization for Standardization. Water quality - Toxicity test for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge microorganisms. ISO 9509, Switzerland, 2006.

- Métodos basados en sensores y biosensores^{441,454}.

Sin embargo, no existen criterios preestablecidos para determinar cuál o cuáles son los métodos más apropiados.

Estos métodos determinan los valores "umbral" de toxicidad e inhibición, EC_{50} e IC_{50} . Estos valores son definidos como el valor medio de la concentración que afecta al crecimiento bacteriano o la respiración, y son usados para controlar a los microcontaminantes, tal como ocurre con el sistema THP ("*Toxicity, Health effects and Persistency*") que es usado en los países de la OECD. Este sistema determina los efectos tóxicos en el ambiente acuático (concentración más baja a la cual los contaminantes presentan efectos adversos sobre la ecología acuática, *T*), riesgos sobre la salud humana (LD_{50} , *H*), y persistencia bioquímica (tiempo de vida media de un contaminante en el medio acuático, *P*).

El método inicialmente seleccionado en la determinación de la toxicidad de los microcontaminantes en este trabajo fue una modificación del de Strotmann y Pagga⁴⁴⁶, que es un ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano, basado en el método de Alsop⁴⁴⁸. En este método, el crecimiento de las bacterias de los fangos activados se determina a partir de medidas de turbidez (o densidad óptica) de los cultivos con un espectrómetro UV-visible a 530 nm (OD_{530}). El período total de crecimiento fue 16 h a temperatura de ambiente. En este tiempo, los cultivos alcanzan el estado estacionario de la curva de crecimiento. La disminución esperada en el crecimiento al final del período de incubación en el medio de cultivo y con la sustancia que está siendo evaluada, se compara con un cultivo similar, pero sin la sustancia bajo estudio. Con los valores obtenidos, se construye una curva de inhibición y a partir de ella se determina la EC_{50} correspondiente. Como sustancia de referencia para los ensayos de toxicidad se usó 3,5-

⁴⁵⁴ Carucci A, Cappai G, Piredda M. Biodegradability and Toxicity of Pharmaceuticals in Biological Wastewater Treatment Plants. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2006, 41:1831-1842.

diclorofenol⁴⁵⁵. La Fig. 6.8 muestra varias etapas del método empleado para medir la toxicidad.

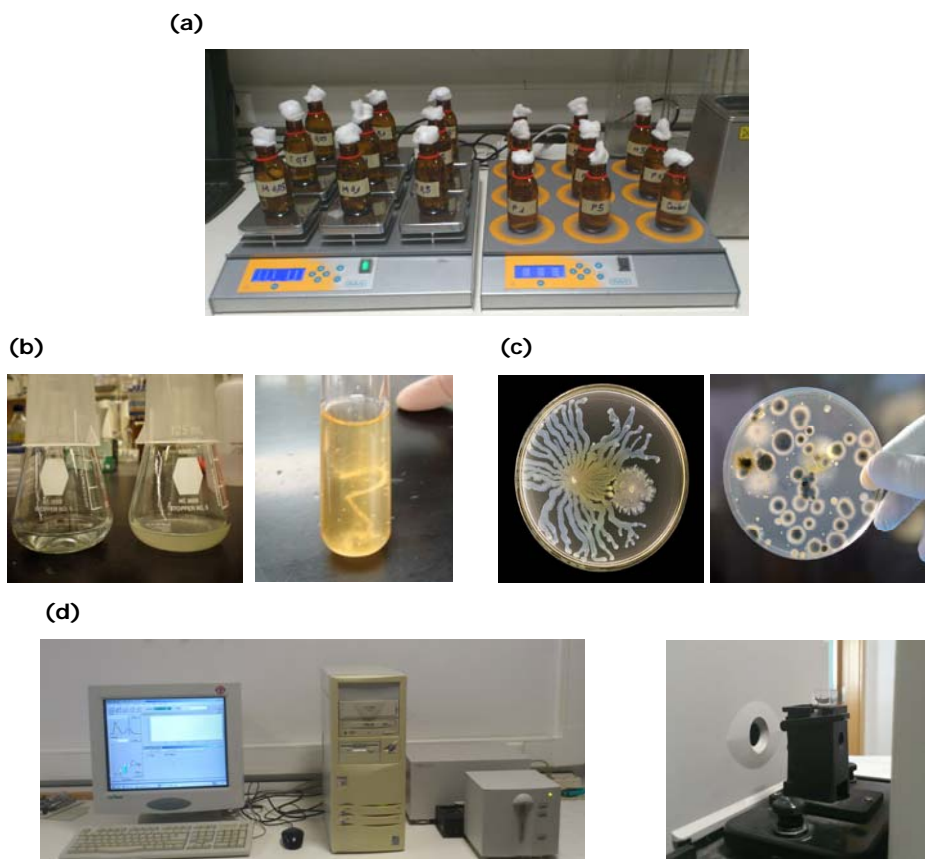


Figura 6.8. Algunas etapas del ensayo de toxicidad aplicado. **(a)** Detalle de la incubación de los cultivos a temperatura de ambiente. **(b)** Cultivos resultantes al final del período de incubación. **(c)** Cultivos sólidos en agar nutritivo de los microorganismos del fango activado con una concentración de 10 mg L^{-1} de ciprofloxacina. **(d)** Espectrómetro UV-visible donde se hicieron las mediciones.

El ensayo dio muy buenos resultados en la determinación de la toxicidad del BFA (Fig. 6.9), observándose que el BFA es solamente

⁴⁵⁵ Halling-Sørensen B, Holten Lützhøft H, Andersen HR, Ingerslev F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, 46: 53–58.

ligeramente tóxico para bacterias en los fangos activados. Esta conclusión, coincide con estudios previos publicados⁴⁵⁶ (Tabla 6.3).

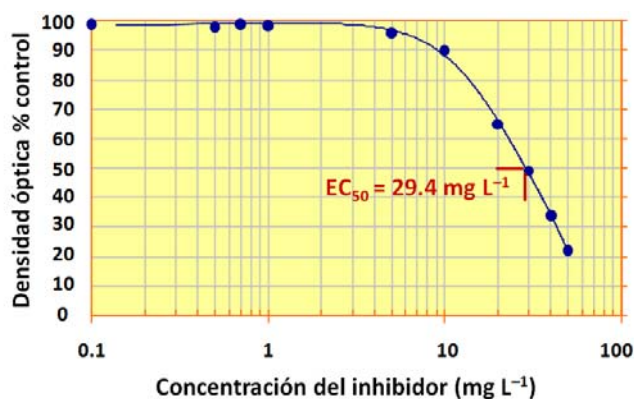


Figura 6.9. Determinación del EC_{50} para el bisfenol A en fangos activados de un MBR.

Tabla 6.3. Concentración de toxicidad aguda (EC ó IC) para el bisfenol A en bacterias en ambientes acuáticos.

Tipo de efecto	Tiempo del ensayo	Concentración (mg L ⁻¹)	Organismo	Método
EC_{10} disminución de la respiración	—	35.0	<i>Pseudomonas</i>	Ensayo modificado (48°C y bajas concentraciones de nutrientes)
IC_{50} inhibición del crecimiento	—	54.5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	OECD
EC_{10} disminución de la respiración	—	90.0	<i>Pseudomonas</i>	Condiciones estándar (25°C, glutamato sódico como fuente de carbono)
LOEC inhibición del crecimiento	18 h	320	<i>Pseudomonas putida</i>	25°C
NOEC inhibición del crecimiento	18 h	≥ 320		

⁴⁵⁶ Groshart CP, Okkerman PC. Chemical study of bisphenol A. Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat, Ministerie van Verkeer en Waterstaat Directoraat-Generaal, Delft, 2001.

En el caso de las quinolonas, el método descrito no ofreció buenos resultados a pesar de estudiarse la toxicidad en un amplio rango de concentraciones (hasta 50 mg L⁻¹). En algunos casos, como el ácido pipemídico, la ciprofloxacina y la moxifloxacina, la presencia del antibiótico no causó un efecto negativo sobre el crecimiento, observándose en su lugar, un incremento en la turbidez al aumentar la concentración del antibiótico. Se realizaron algunos experimentos preliminares para demostrar la presencia de biomasa activa en presencia de antibióticos, observándose el crecimiento de colonias (Fig. 6.8c). Estos resultados difieren de los escasos datos encontrados en bibliografía (Tabla 6.4), donde los valores de toxicidad aguda para bacterias del fango activado en presencia de quinolonas son notablemente más bajos^{455,457-459}.

Tabla 6.4. Concentración de toxicidad aguda (EC ó IC) para las quinolonas seleccionadas en bacterias de fangos activados.

Tipo de microorganismo	Quinolona	Tipo de efecto	Tiempo del ensayo	Concentración (mg L ⁻¹)	
Bacterias	Ciprofloxacina	EC ₅₀	—	0.31–1.22 (media 0.61)	
	Ácido oxolínico	EC ₅₀	—	0.70–0.77 (media 0.73)	
	Flumequina	EC ₅₀	—	0.88–1.0 (media 0.95)	
	Ácido oxolínico	ISO 15522 EC ₅₀			0.07–0.13 (media 0.1)
		Método "Pour Plate" EC ₅₀			0.037–0.108 (media 0.064)
		Inhibición de la nitrificación en <i>Nitrosomonas europaea</i> EC ₅₀			0.8–0.15 (media 0.1)
		Método "Pour Plate" en <i>Nitrosomonas europaea</i> EC ₅₀			0.38–0.58 (media 0.46)
	Ofloxacina	IC ₅₀	20 h	1 – 10	
<i>Vibrio fischeri</i>	Norfloxacina	EC ₅₀	—	0.0223	
	Ofloxacina	EC ₅₀	—	0.0135	

⁴⁵⁷ Kümmerer K, Alexy R, Huttig J, Scholl A. Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria. *Water Research*, 2004, 38:2111–2116.

⁴⁵⁸ Backhaus T, Grimme LH. The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 1999, 38:3291–3301.

⁴⁵⁹ Halling-Sørensen B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, 40:451–460.

La observación de crecimiento bacteriano a concentraciones tan altas de antibiótico puede ser debido a *fenómenos de adaptación*. Se demostró que existe una relación positiva entre los antibióticos que aparentemente resultaron "*menos tóxicos*" y aquellos que son frecuentemente detectados en las aguas residuales, lo que constituiría una importante evidencia de la existencia de adaptación bacteriana a antibióticos que "normalmente" deberían resultar tóxicos a concentraciones que raramente superan los 1 mg L^{-1} (Tabla 6.4).

Debido a estas observaciones, en los experimentos tanto en la planta piloto MBR como en los biorreactores a escala de laboratorio, para determinar si la concentración elegida de antibiótico causa efectos negativos en la microbiota, se utilizó cafeína como sustancia de referencia para indicar la actividad biológica de los fangos, ya que esta sustancia es rápidamente biodegradable y no presenta tendencia a adsorberse a los fangos⁴⁶⁰.

En los estudios de eliminación de antibióticos bajo condiciones nitrificantes en los reactores a escala de laboratorio, para evaluar si las bacterias nitrificantes se afectan negativamente por las concentraciones seleccionadas de los antibióticos, se midió la capacidad del fango activado nitrificante ("*Nitrifying Activated Sludge*", NAS) para convertir el amonio en nitrato, y se le comparó con el mismo NAS en ausencia de antibióticos. La evaluación de la actividad nitrificante fue esencial en este caso, porque este tipo de bacterias suelen ser más sensibles a la presencia de xenobióticos, especialmente antibióticos⁴⁶¹.

⁴⁶⁰ Li B, Zhang T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44:3468–3473.

⁴⁶¹ Schmidt S, Winter J, Gallert C. Long-term effects of antibiotics on the elimination of chemical oxygen demand, nitrification, and viable bacteria in laboratory-scale wastewater treatment plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012, 63:364–374.

En suma, para el caso de los estudios con antibióticos, no se utilizaron los métodos convencionales para determinar la toxicidad, debido a que la gran variabilidad en la composición de las poblaciones microbianas, así como los factores externos a los que están sometidas, que determinan propiedades únicas y difícilmente comparables, por lo que se evaluaron los efectos específicos de las concentraciones seleccionadas de antibióticos bajo las condiciones establecidas en los estudios, de esa manera se tuvo una idea más real de la situación de la microbiota en los fangos en relación a niveles de toxicidad.

7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS ANALÍTICOS.

7.1. Diseño Experimental y Optimización de los Métodos de Extracción de Microcontaminantes de Matrices Ambientales.

El diseño estadístico de experimentos es el proceso de planificar un experimento para obtener datos apropiados que puedan ser analizados mediante métodos estadísticos con el objeto de obtener conclusiones válidas y objetivas⁴⁶². El diseño experimental ayuda a seleccionar la estrategia óptima para obtener la información buscada con el mínimo coste y evaluar los datos experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtengan.

El gran reto en la utilización de técnicas de extracción de microcontaminantes en matrices de naturaleza diversa (ambientales, biológicas, etc.) es lograr una optimización adecuada de las mismas. Del entendimiento de la naturaleza y las características del proceso de extracción resultará el establecimiento de las variables relevantes más influyentes que serán estudiadas en la optimización del método.

Si los factores involucrados en el análisis son independientes (lo cual es una situación rara), la práctica más común es el *diseño de experimentos un factor a la vez (diseño univariante)*. Sin embargo, este método clásico de optimización es largo, tedioso y presenta numerosos inconvenientes.

⁴⁶² D.C. Montgomery. Diseño y Análisis de Experimentos, 2^{da} ed. Limusa Wiley, México, 2002, 686 pp.

Las interacciones entre variables suelen ser muy frecuentes y a veces son los efectos más importantes sobre la respuesta de un sistema, por lo que conocerlas es imprescindible para comprender su comportamiento. La solución, por lo tanto, puede consistir en variar más de un factor simultáneamente al realizar un nuevo experimento (*diseño multivariante*), que de forma general se aplica a sistemas como el mostrado esquemáticamente en la Fig. 7.1. En todos ellos se observa una o más variables experimentales dependientes (respuestas (y)) cuyo valor depende de una o más variables independientes controlables (factores (x)). Las respuestas también pueden estar influidas por otras variables que no son controladas por el experimentador (z).

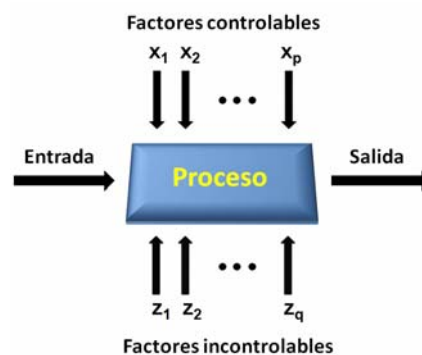


Figura 7.1. Esquema general de un proceso o sistema

El diseño experimental multivariante conduce a una planificación con menos experimentos proporcionando un conocimiento mayor del sistema o proceso en estudio⁴⁶³. Las herramientas quimiométricas que se aplican al diseño de experimentos multivariantes permiten el desarrollo de modelos matemáticos para describir el comportamiento del sistema, determinar la relevancia estadística de los efectos independientes que están siendo investigados, así como establecer las interacciones. Si existen interacciones significativas entre las variables examinadas, las condiciones óptimas indicadas por estudios univariantes serán muy diferentes de los resultados correctos de la optimización

⁴⁶³ Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, Da Silva EGP, Portugal LA, Dos Reis PS, Souza AS, Dos Santos WNL. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597:179–186.

multivariante. A mayores interacciones, mayor será la diferencia entre ambas estrategias de optimización.

En la optimización multivariante se siguen una serie de etapas ordenadas: (i) definición del problema y selección de las variables apropiadas y respuesta(s) a través de estudios de diagnóstico; (ii) elección del diseño de experimentos; (iii) selección de los niveles de variables y codificación; (iv) ajuste matemático del modelo; (v) revisión de la idoneidad del modelo; (vi) análisis del modelo y estimación del efecto; (vii) determinación de los óptimos; (viii) revisión de la robustez.

7.1.1. Definición del Problema y Selección de las Variables Apropriadas y Respuesta(s) a Través de Estudios de Diagnóstico.

En general, las variables pueden ser de dos tipos:

- *Variables continuas.* Representan mediciones en una escala continua, como la presión, temperatura y tiempo de extracción.
- *Variables categóricas o cualitativas.* Representan información sobre características discretas, como el número de ciclos de extracción.

La distinción entre ambos tipos de variable es importante cuando se quieren añadir puntos centrales al diseño, y también para aplicar posteriormente, pruebas para la presencia de curvatura, como también para establecer la validez de un modelo simple de efectos lineales. En relación a la elección del parámetro de respuesta(s), habitualmente se consideran la recuperación, la eficiencia de la extracción o el factor de enriquecimiento. Para la optimización de un método analítico, pueden

seleccionarse una o más respuestas si se observa que la variación de la respuesta en función de las variables es muy pequeña. Si se debe considerar más de una respuesta, se pueden determinar prioridades entre ellas. En el caso de los análisis realizados en esta Tesis Doctoral, se observó que la evaluación del porcentaje de recuperación del analito fue suficiente para cumplir los objetivos fijados.

Cuando el proceso de extracción involucra un gran número de variables, es necesario identificar primero aquellas que presentan los efectos más importantes que puedan afectar significativamente la respuesta. Con este objeto se utilizan los *diseños de diagnóstico*, también llamados de cribado o "*screening*". Estos diseños suelen aplicarse en las primeras fases de un proceso de optimización, cuando es probable que muchos de los factores inicialmente considerados tengan poco o ningún efecto sobre la respuesta. Los factores que se identifican como importantes en esta primera etapa son investigados entonces con mayor detalle en diseños posteriores. Entre los diseños de diagnóstico destacan los diseños factoriales fraccionados⁴⁶⁴, dentro de los cuales, el más utilizado es el *diseño Plackett-Burman* (diseño fraccionado de dos niveles).

7.1.2. Diseño Factorial Fraccionado.

En el *diseño factorial* (2^k), se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de las variables (k) estudiadas en cada ensayo. Los diseños factoriales son los más eficientes para estudiar los efectos producidos por dos o más variables las cuales tienen dos o más niveles (la notación más habitual, por lo general, es el valor -1 para el nivel inferior y el valor +1 para el nivel superior). El efecto de una variable se define como el cambio en la respuesta producido por un

⁴⁶⁴ Box GEP, Hunter JS. The 2^{k-p} fractional factorial designs. *Technometrics*, 1961, 3:311-351.

cambio en el nivel de la variable. A medida que el número de variables en un diseño factorial 2^k aumenta, el número de ensayos necesarios para obtener un diseño completo sobrepasa rápidamente los recursos de la mayoría de los experimentadores. Por ejemplo, un diseño 2^6 requiere de 64 ensayos, donde la mayor parte corresponden a interacciones superiores de más de 2 factores. Si el experimentador puede razonablemente suponer que algunas interacciones de orden superior son despreciables, la información sobre los efectos principales y las interacciones de menor orden puede obtenerse realizando sólo una fracción del diseño factorial completo. Estos *diseños factoriales fraccionados* (2^{k-p}) se encuentran entre los más ampliamente utilizados en el diseño de experimentos para optimización de métodos analíticos.

El empleo de los diseños factoriales fraccionados se basa en tres ideas fundamentales: principio de dispersión de efectos, propiedad de proyección y experimentación secuencial.

Diseño de Plackett-Burman (PB)⁴⁶⁵. Es un diseño de dos niveles (± 1) y es utilizado para estudiar k variables con N ensayos, siendo N múltiplo de 4. Este tipo de diseño es útil cuando $N = 12, 20, 24, 28$ y 36 . Mientras que los diseños fraccionados restringen el número de ensayos por la potencia de 2, en el diseño PB, N es un múltiplo de 4, por lo que hace que sea posible realizar un análisis de muchos factores en un número mucho menor de ensayos. Los niveles de las variables se determinan en base a la experiencia o estudios previos, debiéndose considerar también las limitaciones del sistema experimental.

El diseño Plackett-Burman es un *diseño saturado* que asume que las interacciones pueden ser completamente ignoradas, y por eso sólo se calculan los efectos principales con un número muy reducido de

⁴⁶⁵ Plackett RL, Burman J. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 1946, 33:305-325.

experimentos. Se emplea cuando se quieren conocer las variables más significativas en un proceso y cuáles afectan en menor grado y, por lo tanto, pueden ser fijadas cuando ya se conoce cómo se comportan.

La tabla 7.1 muestra la matriz Plackett-Burman para 12 ensayos (N), que se aplicó para la optimización de 7 factores (k) en la extracción de BFA y derivados clorados en fangos de desecho mediante extracción con líquidos presurizados (PLE).

Tabla 7.1. Diseño Plackett-Burman para $N = 12$ y $k = 7$.

Ensayo	Factores						
	A	B	C	D	E	F	G
1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1
4	1	-1	-1	-1	1	1	1
5	-1	-1	1	1	1	-1	1
6	-1	1	1	1	-1	1	1
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
8	-1	1	-1	-1	-1	1	1
9	1	-1	1	1	-1	1	-1
10	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	-1	-1	1	1	1	-1
12	1	1	-1	1	1	-1	1

La tabla muestra los niveles examinados para cada variable así como el diseño de la matriz. Los 12 ensayos se llevan a cabo de manera aleatoria para anular el efecto de factores externos que no se pueden controlar. Finalmente se aplica un análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar los datos y establecer los efectos estadísticamente significativos mediante un test *t-student* (95% de nivel de confianza).

7.1.3. Elección del Diseño Experimental Usando Metodología de Superficie de Respuesta. Diseño Experimental Doehlert.

La metodología de superficies de respuesta (RSM) reúne a un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas en la optimización de una respuesta que es función de varias variables significativas. El modelado de estas superficies se realiza empleando un modelo empírico basado en modelos polinomiales completos. Estos modelos tienen como mayor ventaja su versatilidad a la hora de describir la gran variedad de superficies de respuesta que se pueden ajustar dentro del dominio impuesto por los factores, ya que no sólo explican el efecto de cada factor sobre la respuesta del sistema, sino que además revelan la existencia de interacciones entre factores cuando éstas están presentes en un sistema. En la mayoría de los casos se desconoce inicialmente la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes. Por ello, el primer paso consiste en establecer una aproximación apropiada a la relación funcional real entre la respuesta y el conjunto de variables independientes. En general, se emplea un polinomio de orden bajo en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta se describe adecuadamente por una función lineal de las variables, se podrá emplear como función de aproximación un modelo de primer orden, mientras que si existe curvatura en el modelo, deberá emplearse un modelo de segundo orden.

Una vez ajustada la superficie de respuesta al modelo, y tras comprobarse que no existe falta de ajuste, se procede a la localización del punto estacionario (que generalmente será un máximo, un mínimo o un punto de silla), mediante análisis canónico. Los modelos más empleados son los de segundo orden, con al menos tres niveles por factor y, si es posible, deben cumplir con las premisas de ortogonalidad y rotabilidad.

Esta técnica se aplica cada vez más en química analítica, sobre todo en procedimientos de optimización. Se suele aplicar después de hacer un análisis previo, generalmente mediante *diseños de diagnóstico*, para seleccionar sólo aquellas variables que influyen en la respuesta, y realizar aproximaciones previas que permitan dar una idea de la dirección hacia dónde se debe apuntar para determinar la región óptima.

Algunos autores han propuesto al *diseño Doehlert*⁴⁶⁶ como idóneo para estimar una superficie de respuesta adecuada para la optimización de métodos espectrométricos, electroanalíticos y cromatográficos^{467,468}. Este diseño proporciona una buena estimación de la función de respuesta ya que cuenta con suficientes grados de libertad; permite extender el dominio por adición de otra variable o desplazar el diseño hacia un nuevo dominio experimental que cada vez se acerque más a la región del óptimo; y permite evaluar el fallo de ajuste haciendo réplicas del punto central y/o con métodos gráficos.

Se trata de un modelo de segundo orden que permite evaluar los factores principales, las interacciones y los efectos cuadráticos. Ofrece numerosas ventajas, por ejemplo, requiere de menos ensayos, siendo un diseño muy eficiente. Este diseño permite la descripción de una región alrededor de una respuesta óptima y contiene $k^2 + k + 1$ puntos para k variables. Por ejemplo, para dos variables, el diseño Doehlert consiste en siete experimentos, que son un punto central y seis puntos que forman un hexágono regular (Fig. 7.2).

⁴⁶⁶ Doehlert DH. Uniform shell designs. *Applied Statistics*, 1970, 19:231–239.

⁴⁶⁷ Nechar M, Molina MFM, Rodríguez LC, Sendra JMB. The application of Doehlert designs in the optimization of experimental variables in solid phase spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 316:185–193.

⁴⁶⁸ Bosque-Sendra JM, Cuadros-Rodríguez L, Molina Molina MF. Optimization of analytical methods by using Doehlert's designs. *Analytical Proceedings*, 1995, 32:375–377.

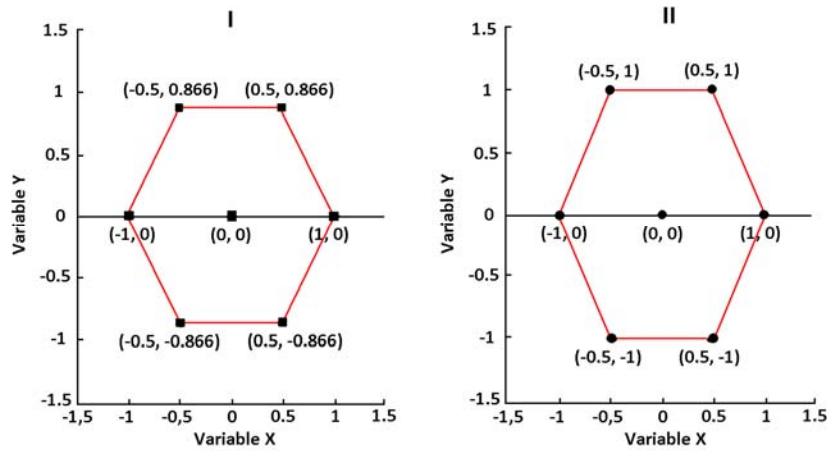


Figura 7.2. Diseños Doehlert centrados para 2 variables ($k = 2$).
(I) Diseño regular; (II) Diseño deformado.

Para tres variables, se requieren 13 experimentos. Una de las propiedades del diseño Doehlert es que describe un dominio experimental esférico, ofreciendo una distribución uniforme de los experimentos en un espacio tridimensional (Fig. 7.3), así 12 experimentos son equidistantes de un experimento central, a cada uno de los cuales se les ha adjudicado un código, y están distribuidos en una esfera con un radio de 1. Lo mismo ocurre para el modelo con dos variables, pero en este caso se trata de una región bidimensional. Aunque la matriz Doehlert no es ni ortogonal ni rotatoria, no diverge significativamente de la calidad requerida para su uso efectivo⁴⁶⁸.

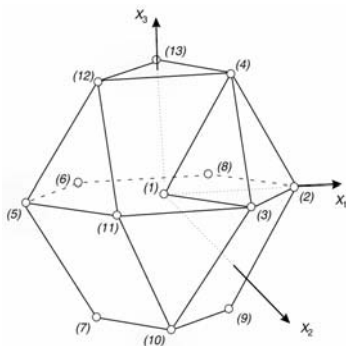


Figura 7.3. Diseño Doehlert (3 variables, $k=3$).

Cuboctaedro exhibiendo la localización de los 13 puntos experimentales para tres diferentes variables codificadas (e.g. X_1 , X_2 , y X_3). A lo largo del eje X_3 , seis experimentos están localizados en los vértices (2, 3, 5, 6, 8 y 11) y uno en el centro (1) de un hexágono; y sobre ambos lados, se encuentran tres experimentos (4, 12, y 13) en la mitad superior, y otros tres experimentos (7, 9 y 10) en la mitad inferior.

El número de niveles no es el mismo para todas las variables, así, para dos variables, por ejemplo, una es estudiada a cinco niveles, mientras que la otra es estudiada a tres niveles. Se pueden usar diferentes criterios para asignar los niveles. Con objeto de obtener mayor información del sistema, como regla general, se dará a la variable con el efecto más influyente el mayor número de niveles.

La comparación entre los diseños de segundo orden más usados ha demostrado que las matrices Doehlert y los diseños Box-Behnken son más eficientes que el diseño compuesto central. La Tabla 7.2 presenta una comparación de la eficiencia estos diseños. Se observa que el diseño Doehlert es el más eficiente de los tres, para todos los valores de k . Los diseños Doehlert también son más eficientes en mapear el espacio, los hexágonos colindantes pueden llenar el espacio más de forma más completa y eficiente (los hexágonos llenan el espacio sin superponerse).

Tabla 7.2. Comparación de la eficiencia de los diseños compuesto central (CCD), Box-Behnken (BBD) y Doehlert (DM).

Variables (k)	Número de coeficientes (p)	Número de experimentos (f)			Eficiencia (p/f)		
		CCD	DM	BBD	CCD	DM	BBD
2	6	9	7	—	0.67	0.86	—
3	10	15	13	13	0.67	0.77	0.77
4	15	25	21	25	0.60	0.71	0.60
5	21	43	31	41	0.49	0.68	0.61
6	28	77	43	61	0.36	0.65	0.46
7	36	143	57	85	0.25	0.63	0.42
8	45	273	73	113	0.16	0.62	0.40

En los diseños Doehlert aplicados en el trabajo realizado a lo largo de esta Tesis Doctoral para la optimización de los diferentes métodos de extracción, se han empleado matrices de dos y tres variables. La Tabla 7.3 presenta las matrices correspondientes con sus valores codificados.

Tabla 7.3. Matrices Doehlert para dos y tres variables.

Experimento	Variables experimentales	
	A	B
1	0	0
2	1	0
3	0.5	0.866
4	-1	0
5	-0.5	-0.866
6	0.5	-0.866
7	-0.5	0.866

Experimento	Variables experimentales		
	A	B	C
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0.5	0.866	0
4	0.5	0.289	0.817
5	-1	0	0
6	-0.5	-0.866	0
7	-0.5	-0.289	-0.817
8	0.5	-0.866	0
9	0.5	-0.289	-0.817
10	-0.5	0.866	0
11	0	0.577	-0.817
12	-0.5	0.289	0.817
13	0	-0.577	0.817

Cada diseño debe luego ajustarse a un modelo matemático. Por ejemplo, el diseño Doehlert para dos y tres variables puede describirse por los siguientes modelos:

Para dos variables:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{12} X_1 X_2$$

Para tres variables:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3$$

donde $b_0, b_1, b_2 \dots b_{23}$ son los coeficientes y X_1, X_2 y X_3 son las variables codificadas.

A continuación se debe examinar el modelo ajustado para asegurar que se adecua al comportamiento del sistema real. El modelo queda validado si muestra una buena capacidad de predicción. El método más

potente para la validación del modelo es la aplicación del *análisis de varianza (ANOVA)*. ANOVA comprueba la adecuación del modelo de regresión en términos de la prueba de falta de ajuste ("*lack-of-fit test*") y si los coeficientes estimados son influyentes. ANOVA puede comparar la variación debido al tratamiento (cambio en la combinación de los niveles de las variables) con la variación debido a errores aleatorios inherentes a las mediciones de las respuestas. A partir de esta comparación, es posible evaluar la significancia de la regresión empleada para prever las respuestas considerando las fuentes de varianza experimental⁴⁶⁹. Esta comparación es realizada a través del valor F, el cual es la proporción entre el cuadrado medio del modelo y el error residual. Si el modelo es un buen predictor de los resultados experimentales, el valor F debe ser mayor que el valor tabulado en un cierto número de grados de libertad y viceversa. En el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se empleó un 95% de nivel de confianza.

También se debe evaluar el coeficiente de determinación (R^2), que mide cuantitativamente la correlación entre los datos experimentales y las respuestas predichas. Un valor de R^2 igual a 1.0 indica que la regresión se ajusta perfectamente a los datos.

Finalmente, también se puede validar el modelo de forma gráfica. El método gráfico más conocido es el *diagrama de Pareto* (Fig. 7.4), el cual es muy útil para estudiar un gran número de factores. En este diagrama, las variables y las interacciones posibles aparecen en el eje y, mientras el valor del efecto estimado estandarizado es graficado en el eje x. Estos efectos estimados para cada variable aparecen como una barra horizontal, cuya longitud es proporcional al valor absoluto del efecto estimado, mientras que también se incluye una línea vertical de referencia que corresponde al intervalo de confianza especificado (95%

⁴⁶⁹ Stalikas C, Fiamegos Y, Sakkas V, Albanis T. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216:175-189.

habitualmente). El efecto se considera significativo cuando su valor sobrepasa esta línea de referencia mientras que los signos positivo y negativo revelan los casos cuando la respuesta es incrementada o disminuida, respectivamente, cuando se pasa del nivel más bajo al más alto de una variable específica. En el caso del diseño PB, el diagrama de Pareto ilustra solamente la significancia estadística de los efectos principales, pero para un diseño Doehlert, también se incluye la relevancia de las interacciones entre las variables.

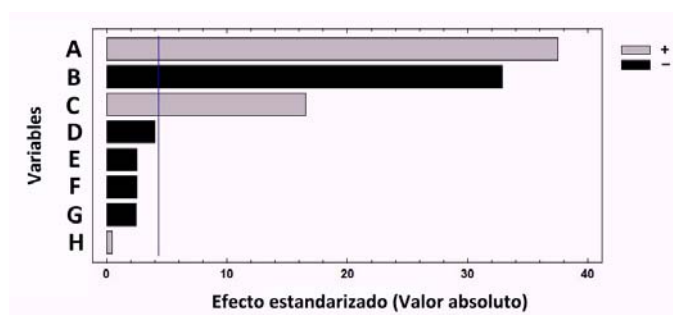


Figura 7.4. Diagrama de Pareto para el diseño de diagnóstico PB. Se observan los efectos principales. La línea vertical en el diagrama define el 95% del nivel de confianza, y permite determinar que en este caso, solamente las variables A, B, C ejercen una influencia estadísticamente significativa en la respuesta.

7.2. Cálculo de Parámetros de Calidad del Método Analítico.

Los métodos analíticos deben ser validados a través de pruebas de laboratorio: "La validación de un proceso analítico es el procedimiento por el cual éste es establecido a través de estudios de laboratorio, de modo que la información que de él se derive sea útil para cumplir los requerimientos necesarios de los problemas analíticos en los que será aplicado"⁴⁷⁰.

⁴⁷⁰ USP 32. General Chapter 1225. Validation of compendial methods. United States Pharmacopeia XXXII. Rockville: United Pharmacopoeial Convention, Inc., 2009.

Hay muchas razones para justificar la necesidad de validar un procedimiento analítico. Entre ellas, se encuentran requerimientos regulatorios, buenas prácticas de laboratorio y control de calidad. El *Código de Regulaciones Federales* (CFR) 311.165c establece explícitamente que *"la exactitud, sensibilidad, especificidad, y reproducibilidad de los métodos analíticos empleados deberán ser establecidos y documentados"*.

La validación implica en primer lugar la verificación de la exactitud de los resultados que genera un método analítico. La exactitud se define por la Norma ISO 5725 como *"el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y un valor de referencia aceptado"*⁴⁷¹. La exactitud combina dos propiedades complementarias: la veracidad y la precisión de los resultados. La veracidad se logra al eliminar los errores sistemáticos, mientras que la precisión se obtiene al minimizar los errores aleatorios. Para completar la validación de un método de análisis es necesario establecer otros parámetros de calidad del mismo, dentro de los cuales podemos incluir: rango lineal, linealidad, sensibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación.

7.2.1. Evaluación de la Exactitud.

La exactitud de cualquier método analítico debe ser evaluada en términos tanto de veracidad como de precisión.

Veracidad. Se define como *"el grado de concordancia entre la media aritmética de un conjunto de resultados y el valor aceptado o de referencia"*⁴⁷¹. Su evaluación consiste en estimar la concentración media del analito en una muestra y compararla con el valor verdadero empleando el protocolo estadístico apropiado. Ya que es imposible

⁴⁷¹ Norma ISO 5725. Partes 1 y 2. Exactitud (Veracidad y Precisión). International Organization for Standardization, Ginebra, 1994.

conocer el valor verdadero de una especie química en una muestra, es necesario obtener un valor verdadero convencional o aceptado para emplearlo como valor de referencia. Este último puede ser obtenido mediante dos estrategias: empleando un estudio interlaboratorio o un estudio intralaboratorio. Dentro de un laboratorio están disponibles dos alternativas para demostrar la veracidad de un método analítico: el uso de materiales certificados de referencia y la comparación con métodos de referencia. Antes de realizar las experiencias necesarias para demostrar la veracidad del método de análisis desarrollado, es necesario evaluar si los constituyentes de las muestras sobre las que se aplicará el método generan errores sistemáticos constantes o proporcionales sobre la respuesta analítica.

El "efecto matriz" puede causar un error sistemático proporcional, manifestándose con un cambio en las pendientes de las rectas de calibrado con patrones y en presencia de matriz. El efecto matriz puede detectarse comparando las pendientes de ambas rectas de calibrado⁴⁷² mediante un test de *t-student*. Las soluciones posibles para reducir/compensar el "efecto matriz" consisten en el uso de patrones internos y la preparación de rectas de calibrado de acuerdo al método de adición de patrón o la calibración en matriz "*matrix-matched calibration*", los cuales se aplican para matrices complejas que no pueden ser imitadas artificialmente. Ninguna de estas soluciones ofrece garantías totales de que el error sistemático por efecto matriz se haya eliminado por completo, lo que obliga a validar siempre la veracidad de los métodos analíticos.

Para la estimación de la veracidad en el trabajo desarrollado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, se han empleado los *ensayos de recuperación* sobre muestras libres de los analitos, dopadas con los

⁴⁷² Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1997, 887 pp.

mismos a un mínimo de tres niveles de concentración. La incertidumbre asociada al valor asignado está limitada exclusivamente al error que pueda cometerse en la adición de la cantidad de analito al material. El porcentaje de recuperación (%R), se calcula dividiendo la cantidad neta de analito encontrada entre la añadida al blanco de muestra. Esta forma de validación de la veracidad es la aceptada en la Decisión 2002/657/EC⁴⁷³, cuando no existen materiales de referencia certificados disponibles.

Precisión. Mide el grado de concordancia entre resultados independientes de un ensayo obtenidos bajo condiciones estipuladas⁴⁷¹. Matemáticamente la precisión se expresa por la desviación estándar relativa (o coeficiente de variación). La desviación estándar relativa de la concentración, RSD, se puede calcular a partir de la expresión:

$$\text{RSD} = 100 \cdot s_c / c$$

donde s_c es la desviación estándar obtenida a partir de replicados⁴⁷⁴, y c es el valor de la concentración media.

La precisión se puede calcular en condiciones de *repetibilidad*, esto es, medidas realizadas en las mismas condiciones experimentales, en el mismo laboratorio, con el mismo operador, usando el mismo equipo y en un corto intervalo de tiempo, o de *reproducibilidad* donde las medidas se realizan con el mismo método pero en diferentes laboratorios, con diferentes operadores, equipos, y distintos intervalos de tiempo. Puede estimarse también la *precisión intermedia*, a partir de las variaciones dentro de un mismo laboratorio, por ejemplo, con medidas realizadas en diferentes días.

⁴⁷³ Commission Decision 2002/657/EEC. Official Journal of the European Communities, L 221, 2002.

⁴⁷⁴ Cuadros Rodríguez L, García Campaña AM, Jiménez Linares C, Román Ceba M. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 1993, 26:1243–1258.

7.2.2. Otros Parámetros de Calidad.

Los parámetros a evaluar son⁴⁷⁵:

- Linealidad.
- Límite de Detección y de Cuantificación
- Selectividad.

En esta Tesis Doctoral estos parámetros se han estimado a partir de los datos obtenidos de la recta de calibrado. Para ello, es necesario obtener la recta de calibrado a partir de una serie de réplicas de cada "punto del calibrado", recomendándose tres réplicas para al menos seis valores de concentración igualmente espaciados sobre el intervalo de aplicación del método. Siempre que el método analítico lo permita, estos patrones deben de incluir al "blanco" como otro valor más (concentración de analito "cero"), ya que su señal instrumental está sujeta al mismo tipo de errores que las demás medidas.

Linealidad. La linealidad mide el grado de ajuste de los valores de señal medidos sobre la recta de calibrado. Habitualmente la linealidad se suele deducir a partir de la desviación estándar de los residuales ($s_{R,c}$), del test de fallo de ajuste o de los coeficientes de correlación (r) y de determinación (R^2).

Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ). La capacidad de detección, límite de detección o concentración mínima detectable se define por la Norma ISO 11843⁴⁷⁶ para una probabilidad de falso positivo, α , como "la verdadera concentración neta de analito en el

⁴⁷⁵ Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 2003, 987:57-66.

⁴⁷⁶ Norma ISO 11843. Capability of detection, Ginebra, Part 1, 1997 y Part 2, 2000.

material a analizar, la cual permite, con una probabilidad $1-\beta$ la correcta conclusión de que la concentración en el material analizado es diferente de la del blanco". Se asocia con la menor concentración de analito en una muestra que puede ser separado del ruido de fondo, siendo posible su detección. En esta memoria el límite de detección se calculará utilizando la recomendación IUPAC⁴⁷⁷, que corresponde a tres veces la desviación estándar del blanco (s_{c0}). El límite de cuantificación o determinación (LOQ) es una medida de la capacidad de cuantificación inherente de un proceso de medida químico, es decir, el mínimo (verdadero) valor cuantificable. Se considera que el LOQ corresponde a 10 veces la desviación estándar del blanco. En cuanto al cálculo de s_{c0} (desviación estándar del valor de concentración cero o blanco), se encuentran disponibles varios métodos en bibliografía⁴⁷⁸.

Selectividad (especificidad). La ICH define a la "especificidad" como "la habilidad de distinguir inequívocamente la presencia del analito en medio de otros componentes que pueden encontrarse presentes. Típicamente se pueden incluir a impurezas, componentes de la matriz, etc". La USP <1225> e ISO/IEC también refieren la misma definición, pero otras autoridades acreditadas como IUPAC y AOAC, usan el término "selectividad" para expresar "especificidad". Ellos reservan el uso de "específico" para aquellos procedimientos que producen una respuesta para un solo analito⁴⁷⁹.

La selectividad y/o especificidad es uno de los parámetros básicos que caracterizan la calidad de un método analítico. Sin embargo, mientras que todos los demás parámetros son fácilmente definibles en términos cuantitativos, la selectividad (o especificidad) presenta

⁴⁷⁷ Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemical, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 2002.

⁴⁷⁸ García Campaña AM, Baeyens WR, Van der Weken G, Cuadros Rodríguez L, Alés Barrero F. A first and straightforward approach to detection limits for narrow-bore HPLC and CE. *Biomedical Chromatography*, 1998, 12:177-178.

⁴⁷⁹ Huber L. Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies, 2010: <http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>.

definiciones cuantitativas imprecisas. En la práctica analítica se suele representar la selectividad a través de la cuantificación de la interferencia producida por una especie química concreta en la determinación de un analito en un procedimiento dado, de modo que se establece un nivel máximo de interferente que no produce interferencia.

En la literatura existen algunas estrategias a seguir para decidir si una sustancia produce interferencia en la determinación de un analito, lo que se hace a través de la medición de la señal analítica correspondiente a la concentración de analito en estudio en presencia de una determinada concentración del posible interferente. Si el valor obtenido de señal no está incluido en el intervalo de confianza para la señal, establecido mediante la desviación estándar de la respuesta analítica, deducida a partir del calibrado, se entiende que ha producido un error sistemático superior al error aleatorio del método analítico asociado a ese nivel de concentración, y, por tanto, se concluye que es un interferente; en cambio, si la señal se incluye en el intervalo de confianza calculado, se concluye que no hay interferencia⁴⁸⁰.

7.3 Comparación de los Métodos Analíticos.

A lo largo del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se emplearon tres técnicas de extracción reconocidas (por ultrasonidos, microondas y líquidos presurizados). Debido a que cada método de extracción genera extractos de diferente composición, se fijó como objetivo determinar si los tres métodos eran igualmente válidos para la determinación de los compuestos seleccionados en las matrices de interés.

⁴⁸⁰ García Campaña AM, Cuadros Rodríguez L, Jiménez Linares C, Alés Barrero F, Román Ceba M. Estimation of the tolerance level of interfering substances in instrumental analytical methods. *Analytical Letters*, 1995, 28:369–380.

Cuando dos métodos se comparan, ninguno proporciona una medida inequívocamente correcta, de modo que es necesario determinar el grado de concordancia entre ambos, para concluir si se pueden usar o no de forma alternativa. La comparación debe descubrir los posibles errores sistemáticos. Habitualmente la comparación se realiza entre el método nuevo y uno de referencia. Sin embargo, en este caso al no existir métodos de referencia, el objetivo fue determinar si cada uno de los métodos desarrollados podía constituir o no una alternativa fiable para la determinación de los analitos en las muestras analizadas.

7.3.1. Procedimientos para la Comparación de Métodos.

Una vez determinada la concentración de los analitos en distintas muestras usando los métodos que se van a comparar, se procede a tratar los datos de acuerdo a los procedimientos que se indican a continuación^{481,482}:

El “plot de dispersión” (“Scatter-plot”). Consiste en representar los valores de concentración obtenidos con un método frente a los obtenidos con el segundo método. Se suele colocar al método más preciso en el eje x. La relación matemática es estimada por una línea de regresión. El acuerdo entre métodos se mide por la desviación de la situación ideal ($b = 1$; $a = 0$; $r^2 = 1$). Un ejemplo es ilustrado en la Fig. 7.5a. Las desviaciones de la idealidad se deben, entre otros factores, a los errores sistemáticos.

⁴⁸¹ Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986, 1:307-310.

⁴⁸² Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th Ed., Pearson Education Limited, Essex, 2005, 285 pp.

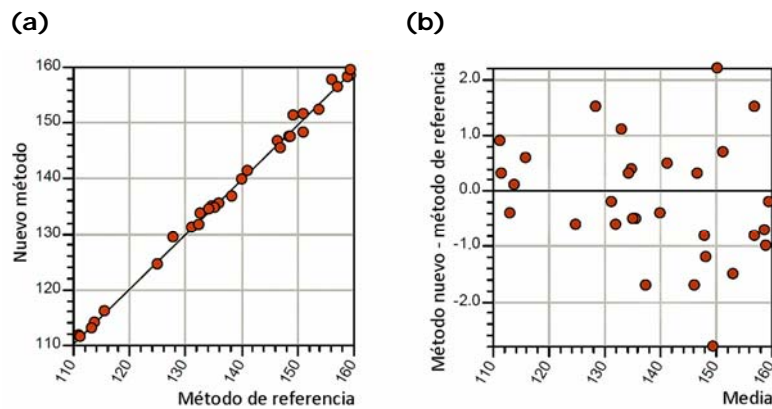


Figura 7.5. Ejemplo de comparación de métodos. (a) "Plot de dispersión" ("Scatter-plot"), (b) "Plot de diferencia" ("Difference-plot").

Si las desviaciones de la idealidad se aceptan para determinar el acuerdo entre dos métodos, es necesario calcular un *intervalo de tolerancia*, el cual debe ser establecido de acuerdo al uso que se le dará al método. Los resultados deben ser interpretados con cautela, ya que por ejemplo, un r^2 muy cercano a 1 no significa necesariamente que haya un alto nivel de acuerdo entre los métodos, lo mismo se extiende para valores de pendiente e intercepto cercanos a los valores ideales, ya que incluso en estas condiciones, al comparar la precisión entre los valores proporcionados por los métodos, puede no ser aceptable. Esto significa que a pesar de que este método de comparación es muy usado, porque es capaz de proporcionar información valiosa sobre la naturaleza de las diferencias entre los métodos, puede estar sujeto a objeciones teóricas, que se deben tener en cuenta⁴⁸².

El "plot de diferencia" ("Difference-plot"). Este método se utiliza para complementar y confirmar la información obtenida del "plot de dispersión", el cual en algunos casos no permite determinar el desacuerdo entre los métodos, por lo que un "plot de diferencia" puede ser más informativo. Consiste en representar las diferencias entre las

concentraciones medidas de cada muestra frente a la media de cada par. El desacuerdo entre los métodos se mide por la desviación de los puntos de la línea horizontal de desviación cero ("*horizontal nil-bias line*"). Un ejemplo de "plot de diferencia" se muestra en la Fig. 7.5b.

Esta aproximación sirve para obtener la magnitud en la que difieren ambos métodos, y para establecer si estas diferencias pueden o no ser aceptadas de acuerdo al uso que se le den a los métodos y a las interpretaciones de sus resultados. El "*plot de diferencia*" sirve para investigar cualquier relación posible entre el error medido y el valor verdadero. Cuando se analizan muestras, no es posible saber cuál es el valor verdadero, de modo que la media entre dos mediciones es el mejor estimado que se tiene.

A partir de esta aproximación, se pueden calcular los "*límites de acuerdo*", que son las diferencias en las concentraciones medidas por ambos métodos. Lo esperable es que estos límites sean lo suficientemente pequeños para considerar que las mediciones que se obtienen de cualquier método son confiables y se pueden usar indistintamente. Si se selecciona otra muestra, los "*límites de acuerdo*" también cambiarán, por eso se suelen calcular los intervalos de confianza para estos límites, con el objeto de ver su precisión, y si las diferencias siguen una distribución aproximadamente normal. Si los intervalos de confianza son amplios, reflejan una gran variación en las diferencias entre las medidas, pudiendo establecerse que el grado de acuerdo entre los métodos no es aceptable.

La interpretación del "*plot de diferencia*" es sencilla, cualquier punto dentro del área poligonal de tolerancia satisface las condiciones que se aceptan para la variabilidad entre los resultados. Cualquier punto fuera indica que los dos métodos analíticos no son intercambiables para

esa muestra. El veredicto final está basado en el porcentaje de puntos fuera y dentro del área de tolerancia que se encuentren (Fig. 7.6).

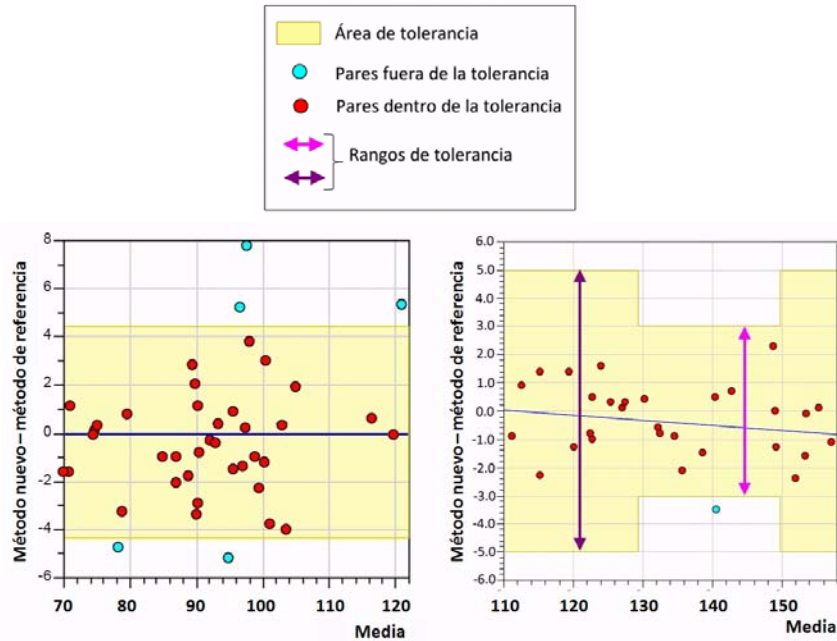


Figura 7.6. Ejemplos de "plots de diferencia" mostrando los "límites de acuerdo", que definen un área poligonal de tolerancia (en color amarillo), que incluyen la línea de desviación cero ("nil-bias line", en azul). Si los límites superior e inferior son paralelos (izquierda), se habla de tolerancia absoluta, por el contrario, si difieren (derecha), se trata de tolerancia relativa, ya que ésta dependerá del rango de concentraciones en el que se encuentre la muestra.

CAPÍTULO I

Microcontaminantes en Aguas Residuales

1. OBJETIVOS.

Los principales objetivos de los trabajos realizados y presentados en este capítulo son:

- Proponer un método efectivo y robusto para el análisis de 13 residuos de quinolona mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS).
- Estudiar la influencia de los parámetros principales que afecta al tratamiento de muestra, la extracción en fase sólida y el análisis cromatográfico.
- Presentar un protocolo detallado y eficaz para la validación del método de análisis, en términos de exactitud, linealidad, selectividad y sensibilidad.
- Aplicar la metodología desarrollada en el control y evaluación del contenido de esta familia de antibióticos en aguas residuales con el objetivo final de aplicar el método en estudios de presencia medioambiental y destino final de estos compuestos en el medioambiente.

2. PUBLICACIÓN I:

Microchemical Journal, In press
DOI: 10.1016/j.microc.2012.09.002

Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

N. Dorival–García, A. Zafra–Gómez, S. Cantarero, A. Navalón and J.L. Vilchez

Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

ABSTRACT: A simple, rapid, sensitive, accurate and reliable multiresidue method based on ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) is developed and validated for the simultaneous determination of 13 quinolone derivatives in urban wastewaters. The main parameters influencing the preliminary sample treatment and selective solid–phase extraction procedure have been analyzed in order to optimize a suitable procedure for extraction of amphoteric and acidic quinolones in one single step. Matrix components of wastewater samples were significantly reduced and even eliminated. The mass spectrometric conditions in positive electrospray ionization (ESI) mode were individually optimized for each analyte to obtain maximum sensitivity in the Selected Reaction Monitoring (SRM) mode. Selection of two specific fragmentation reactions for each compound allowed simultaneous quantification and identification in one run, ensuring a high

specificity of the method. The analytes were separated in less than 10 min. Marbofloxacin and cincophen were used as surrogates for amphoteric and acid quinolones, respectively. The limits of detection ranged from 0.02 to 0.04 ng mL⁻¹ and limits of quantification from 0.07 to 0.15 ng mL⁻¹, while inter- and intra-day variability was < 4%. Due to the absence of certified materials, the method was validated using matrix-matched calibration and a recovery assay with spiked samples. Recovery rates ranged from 98.5% to 103.9%. The method was satisfactorily applied for the determination of these antibiotics in wastewater samples collected from different wastewater treatments plants from the province of Granada (Spain). In addition, the method will be applied in further studies of the occurrence and fate of these commonly used antibiotics in sewage treatment plants and in aquatic environments.

Keywords: Antibiotics; Quinolones; UPLC-MS/MS; Wastewaters; Solid-phase extraction; Matrix effect

* Corresponding author: Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafr@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

1. Introduction

In recent years, research in the field of the environmental pollution has expanded beyond classical contaminants—pesticides, biocides, PHA, PCBs or dioxins—to personal care products and pharmaceuticals [1]. Since pharmaceuticals are used to be biologically active and stimulate a physiological response even at low concentrations, there is a growing concern regarding the use of these substances, which are starting to be considered as “emerging contaminants” when they are released to the environment [2]. More than 5000 drugs are used and antibiotics and their degradation metabolites are among the most commonly used compounds. Resistance to antibiotics and other anti-infective agents constitutes a major threat to public health and ought to be recognized as such more widely than it is at present. Some studies have detected many antibiotic-resistant bacteria in drinking water supplies. Moreover, wildlife could be severely affected by the presence of antibiotics in the environment, even at trace concentrations. Therefore, the EU recommends the prudent use of antimicrobial agents in medicine [3, 4]. One of the most important groups of antibiotics is quinolones and fluoroquinolones. They are widely used worldwide in both human and veterinary medicine at therapeutic levels, and at sub-therapeutic levels to promote animal growth. They are used in the treatment of a wide variety of bacterial infections and they are being increasingly used as antibiotics with broad-spectrum activity, including activity against gram-negative organisms as well as some gram-positive bacteria [5]. Ciprofloxacin is perhaps the most popular, and *one* of the most frequently *prescribed medications in the world* [6]. This antibiotic is especially interesting because it is used therapeutically in many critical applications such as the treatment of anthrax infections, and it is a primary

degradation product of enrofloxacin, which is used in aquaculture and agriculture [7].

After their therapeutic administration, these compounds are only partially metabolized and are excreted unchanged in the urine and faeces [8, 9]. They are then released into influents to municipal wastewater treatment plants (WWTPs) as parent compounds or bioactive metabolites [10, 11]. Wastewaters become one of the main routes for the introduction of compounds into the environment [12]. Unfortunately, currently operating WWTPs are not designed for effective removal of pharmaceuticals; as a result, an important portion could survive treatment processes and disseminate to the environment via effluents or may remain sorbed to sewage sludge [8], being transferred to agricultural soils when sewage sludge is used as fertilizer. Due to their sorption properties they tend to accumulate in sewage sludge and soils from where they can diffuse to water [13]. The ubiquitous occurrence of quinolones justifies a proper environmental risk assessment of these compounds [14, 15] and further research is required in this respect on the extent of their environmental occurrence, transport, fate and effects [16]. Analysis of the existing amounts in different environmental compartments is thus essential, as well as the development of highly sensitive analytical methodologies, given the very low concentrations at which these compounds pose a serious threat for the environment. To date, maximum residue levels (MRLs) for antibiotics in environmental waters have not been established.

Several studies have been published for the determination of quinolones and fluoroquinolones in environmental waters, including urban wastewaters, WWTP effluents, ground, natural and surface waters. The development and validation of analytical methods to determine ultra-trace amounts of quinolones in complex matrices is a challenging task. Although

detection methods are becoming more specific and sensitive, the use of an appropriate clean-up technique is required, since the matrix components in wastewaters that are retained and concentrated together with the target compounds during sample treatment seriously affect detection and sensitivity of quinolones [17, 18]. In addition to SPE procedure, other sample preparation methods have been examined, including several solid-phase microextraction techniques (SPME), molecularly imprinted polymer SPE (MIP-SPE), and ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. However, the current trend for analysis of quinolone antibiotics in environmental samples continues to be the application of solid-phase extraction (SPE). The sample treatment is usually followed by liquid chromatography with mass spectrometry detection and less commonly (<20%) by other detection techniques, such as capillary electrophoresis or electrochemical detection [9, 19, 20–33].

In the last decade, about fifty studies focusing in this subject have been published, and more than 50% focus on the determination of quinolones in aqueous matrices that are relatively “clean” or containing low amounts of organic matter, which is considered as the main interference in the determination of quinolones in environmental matrices. In about 70% of these methods, no more than five compounds are monitored, which is definitively not representative of the wide variety of quinolones that are currently prescribed mainly in human medicine. Less than 10% of the studies involve the determination of more than 10 quinolones of common use in only one multiresidue method, and among these, only Xiao et al. [31] developed and validated a method for the determination of more than 13 compounds in wastewater. However, this method uses an additional SPE step in order to improve the clean-up process that increases significantly analysis costs, especially when used as routine analysis method. On the

other hand, very few studies have analyzed amphoteric and acidic quinolones using a single analytical method, due to the differences in the physicochemical properties between them. Although it is true that acidic quinolones usually belong to the first generation class, and many countries have replaced their use by newer ones, it is also true that they are still widely used because of the serious side effects and genotoxic potentials associated with the new generations of quinolones [34]. The present study includes the most used acidic quinolones in Europe [18], and 3 of the 5 selected ones were detected in the analyzed wastewaters.

The present work proposes a sensitive, reliable and accurate method for the simultaneous analysis of 13 quinolone derivatives—amphoteric and acidic—in wastewaters using SPE and UPLC–MS/MS analysis. The extraction procedure was accurately optimized in order to effectively reduce/eliminate matrix effects in extracts, which represents an important improvement over previous methods. The method was successfully applied for the determination of 13 quinolone derivatives in wastewater samples from WWTPs of the province of Granada (Spain). In addition, this sensitive method will facilitate further research on the occurrence, contamination pathways, fate and risk assessment of this important class of antibiotics in the environment.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Water (18.2 M Ω cm) was purified using a Milli–Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). Analytical grade standards of quinolones [pipemidic acid (PIP), enoxacin (ENO), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin

(CIP), ofloxacin (OFL), enrofloxacin (ENR), lomefloxacin (LOM), moxifloxacin (MOX), cinoxacin, (CIN), nalidixic acid (NAL), oxolinic acid (OXO), flumequine, (FLU), piromidic acid (PIR)], and the surrogates [marbofloxacin (MAR) and 2-phenyl-4-quinoline carboxylic acid (cincophen, CIC)] were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Individual standard solutions of compounds ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in a water/methanol mixture (1:4, v/v) and stored at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. These solutions were prepared fresh monthly. The use of acids or bases was avoided to facilitate dissolution, because it has been documented that quinolones may undergo unwanted chemical changes in presence of these substances [35]. Working standard mixtures were prepared by diluting the individual stock solution in methanol or in the initial mobile phase immediately before use. They were stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and prepared fresh weekly. All solutions were stored in dark glass bottles to prevent photodegradation. PIP, ENR, OFL, OXO, and FLU exhibited significant degradation in stock standard solutions after 5 months. LC-MS grade water and methanol, acetonitrile, sodium hydroxide, ammonia ($> 25\%$) and formic acid (98%)—used for the preparation of standards, mobile phases and pH adjustments—were purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). SPE cartridges were Oasis[®] HLB (500 mg, 6mL) from Waters Corporation (Milford, MA, USA). Mixed-phase cation-exchange disk cartridges (MPC, octyl-phase and benzenesulfonate mixture, high-density 12- μm particle size) (7 mm, 3 mL) from Varian International AG (Basel, Switzerland), Isolute C18 (500 mg, 3 mL) and ENV+ (200 mg, 3 mL) from Biotage (Sweden) were also evaluated. Water samples were filtered through a 0.45 μm nitrocellulose membrane disk filters (Millipore) prior to analysis.

2.2. Instrumentation and software

UPLC–MS/MS analysis was performed using a Waters Acquity UPLC™ H–Class (Waters, Manchester, UK), consisting of an ACQUITY UPLC™ binary solvent manager and an ACQUITY UPLC™ sample manager. Separation of compounds was obtained with ACQUITY UPLC BEH™ C18 column (1.7 μm; 2.1 mm×50 mm) (Waters, UK). A Xevo TQS tandem quadrupole mass spectrometer (Waters) equipped with an orthogonal Z–spray™ electrospray ionization (ESI) source was used for antibiotic detection.

For pH measurements, a Crison 2000 digital pH–meter with a combined glass–Ag/AgCl (KCl 3 M) electrode (Crison Instruments S.A, Barcelona, Spain) was used. A vortex–mixer (Yellow line, Wilmington, NC, USA) and a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttlingen, Germany) were also used. SPE procedure was carried out on a Supelco vacuum manifold (Bellefonte, PA, USA) with capacity for 12 columns connected to a Supelco vacuum tank and to a vacuum pump. Statgraphics software package was used for statistical treatment of data.

2.3. Sample collection and storage

Samples of wastewater were collected from two WWTPs located in the province of Granada (Spain). The samples were kept in dark glass bottles and decreased biological activity was achieved by adding 1% (v/v) formaldehyde. Once in the laboratory, samples were centrifuged at $3634 \times g$ for 20 min and the aqueous phase was decanted and vacuum filtered through a 0.45 μm pore size nitrocellulose membrane. The sample was kept in the dark at 4 °C and extracted by SPE within 24 h in order to avoid degradation.

2.4. Preparation of fortified samples

Due to the absence of certified materials, blank wastewater samples for recovery studies were spiked with 100 μL of methanolic standard solutions containing the different analytes under study at appropriated concentrations. For method validation, the recoveries of antibiotics were measured by extracting analytes from 100 mL of wastewater spiked with the quinolones at three concentration levels (0.25, 1.0 and 3.0 ng mL^{-1}).

2.5. Solid-phase extraction

Wastewater filtrates (100 mL) were spiked with the surrogates and then acidified with 98% (v/v) formic acid to pH 3.0. The Oasis[®] HLB cartridge was preconditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of water at pH 3 at a rate of 3 mL min^{-1} . Then, the sample was loaded with a flow rate of approximately 3 mL min^{-1} and the cartridge was rinsed with 5 mL Milli-Q water with 5% (v/v) of methanol. Next, the cartridge was dried for 20 min under vacuum and the analytes eluted using 8 mL methanol. Final extracts were evaporated to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen and 1 mL of the initial mobile phase was added to dissolve the residues prior to the chromatographic injection.

2.6. Ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Chromatographic separation was performed using a binary gradient mobile phase consisting of 0.2% (v/v) aqueous formic acid solution (solvent A) and methanol (solvent B). The flow rate was 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, the column

was maintained at 40 °C and the injection volume was 5 µL. Gradient conditions were as follows: initial mobile phase, 80% (A), which was linearly decreased to 30% (A) within 5.0 min and to 0% within 0.1 min and held for 1.4 min to clean the column using 100% organic mobile phase. Finally, back to 80% in 0.1 min and kept for 3.4 min to equilibrate the column. Total run time was 10 min.

The mass spectrometer (MS) was operated with electrospray ionization (ESI) in positive ion mode. For increased sensitivity and selectivity, mass spectrometric analyses were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode and the MS/MS parameters were optimized individually for each antibiotic by continuous infusion of 0.5 µg mL⁻¹ standard solution in the initial mobile phase into the mass spectrometer under combined mode, using [M+H]⁺ as precursor ion. Instrument parameters were as follows: capillary voltage, 0.60 kV; source temperature, 150 °C; desolvation temperature, 500 °C; cone gas flow, 150 L h⁻¹; desolvation gas flow, 500 L h⁻¹; collision gas flow, 0.15 mL min⁻¹, and nebuliser gas flow, 7.0 bar. Nitrogen (≥ 99.995%) was used as cone and desolvation gas, and argon (99.999%) was used as a collision gas. After selecting the precursor ions, product ions were obtained with a combination of collision energies and cone voltages. These parameters were previously optimized in order to obtain the maximum sensitivity with the highest amount of product ions available. The two most sensitive MRM transitions (one used for quantification and the other for confirmation) were selected. For quantification, the most abundant transition was chosen to obtain the maximum sensitivity. Dwell time for each transition was 25 ms, and interscan delay was set at 3 ms. Finally, data acquisition was performed under time-segmented conditions based on the chromatographic separation of the target compounds to maximize the sensitivity of detection. MassLynx

software 4.1 was used for instrument control and peak detection and integration. The optimum collision energies and cone voltages selected for each transition, as well as segment periods and retention times are shown in Table 1.

Table 1
Optimized MRM conditions and retention times for the studied antibiotics by UPLC/MS/MS.

	MRM1 ^a	CV/CE ^b	MRM2 ^a	CV/CE ^b	Segment (min)	t _R (min)
PIP	304.2→217.1 (MH ⁺ – CO ₂ – Pip ^c)	10/22	304.2→286.2 (MH ⁺ – H ₂ O)	10/18	1.00 – 2.25	1.59
MAR	363.2→71.9	10/20	363.2→320.1 (MH ⁺ – C ₂ H ₅ N)	10/14	1.25 – 2.25	1.80
OFL	362.2→318.2 (MH ⁺ – CO ₂)	4/18	362.2→261.1 (MH ⁺ – CO ₂ – Pip ^c)	4/26	1.50 – 2.75	2.23
ENO	321.2→303.2 (MH ⁺ – H ₂ O)	6/18	321.2→232.0	6/34	1.70 – 2.75	2.27
NOR	320.2→302.2 (MH ⁺ – H ₂ O)	38/18	320.2→276.2 (MH ⁺ – CO ₂)	38/16	1.70 – 3.00	2.41
CIP	332.2→314.2 (MH ⁺ – H ₂ O)	14/18	332.2→231.1 (MH ⁺ – CO ₂ – Pip ^c)	14/34	1.80 – 3.00	2.56
ENR	360.2→316.2 (MH ⁺ – CO ₂)	8/18	360.2→245.1 (MH ⁺ – CO ₂ – Pip ^c)	8/26	2.25 – 3.00	2.66
LOM	352.2→265.1 (MH ⁺ – CO ₂ – Pip ^c)	6/22	352.2→308.2 (MH ⁺ – CO ₂)	6/16	2.20 – 3.25	2.80
MOX	402.2→384.2 (MH ⁺ – H ₂ O)	30/22	402.2→358.2 (MH ⁺ – CO ₂)	30/18	3.20 – 4.25	3.81
NAL	233.1→215.0 (MH ⁺ – H ₂ O)	2/14	233.1→187.0 (MH ⁺ – H ₂ O – N-1 ^d)	2/24	4.25 – 5.00	4.65
O XO	262.2→244.0 (MH ⁺ – H ₂ O)	4/18	262.2→215.9 (MH ⁺ – H ₂ O – N-1 ^d)	4/26	4.50 – 5.25	4.90
FLU	262.2→244.0 (MH ⁺ – H ₂ O)	6/18	262.2→202.0 (MH ⁺ – H ₂ O – C ₃ H ₆)	6/32	4.50 – 5.25	4.90
CIC	250.2→127.9	4/34	250.2→222.0	4/26	5.00 – 5.80	5.35
CIN	263.2→245.1 (MH ⁺ – H ₂ O)	4/14	263.2→189.0	4/26	5.00 – 5.80	5.42
PIR	289.2→271.1 (MH ⁺ – H ₂ O)	8/18	289.2→243.1 (MH ⁺ – H ₂ O – N-1 ^d)	8/28	5.30 – 6.00	5.67

^a MRM1 = transition used for quantification; MRM2 = transition used for confirmation.

^b CV = cone voltage (V); CE = collision energy (eV).

^c Loss of CO₂ followed by rupture of piperazine ring (Pip).

^d Loss of water followed by loss of an alkyl group attached to N-1.

3. Results and discussion

3.1. Liquid chromatographic separation

To obtain the higher sensitivity and selectivity for the chromatographic separation in a shorter run time, the main variables affecting chromatographic separation and signal intensity were studied. A standard mixture of 0.5 ng mL^{-1} of each antibiotic was used.

The effect of the mobile phase on chromatographic separation was studied. Methanol, acetonitrile and mixtures of the two solvents were evaluated as organic mobile phases (solvent B). Methanol was selected because it improved sensitivity, peak shapes and separation. As solvent A, deionised water with different acid additives was studied. The addition of organic acids improves the chromatographic separation of quinolones and the ionization in positive ESI mode, especially for amphoteric quinolones ($\text{pK}_{\text{a}1}$ 5.5–6.0), since at acid pH values, the cationic forms are the predominant [36–38]. However, the sensitivity for acidic quinolones is not significantly enhanced by acidification since—due to the absence of the piperazine ring at C-7—the non dissociated forms are the predominant (pK_{a} 2.3–5.0) [39]. Formic acid was used as additive. Acid concentrations from 0.0% to 0.3% (v/v) were assayed. The optimal results were obtained using 0.2% (v/v). A significant loss in sensitivity was observed with concentrations $> 0.2\%$, since formic acid may also suppress ionization efficiency [40].

The effect of column temperature and flow rate was also studied. Flow rates from 0.1 to 0.4 mL min^{-1} were tested and 0.3 mL min^{-1} significantly improved the resolution, peak shape, intensity of the response, and retention times. Flow rates < 0.2 and $> 0.3 \text{ mL min}^{-1}$ showed poor resolution.

Temperatures from 30 °C to 50 °C were assayed, and 45 °C was selected as working temperature. Figure 1 (A) shows UPLC–MS/MS chromatograms for a SPE extracted water sample spiked with 0.5 ng mL⁻¹ of the studied quinolones.

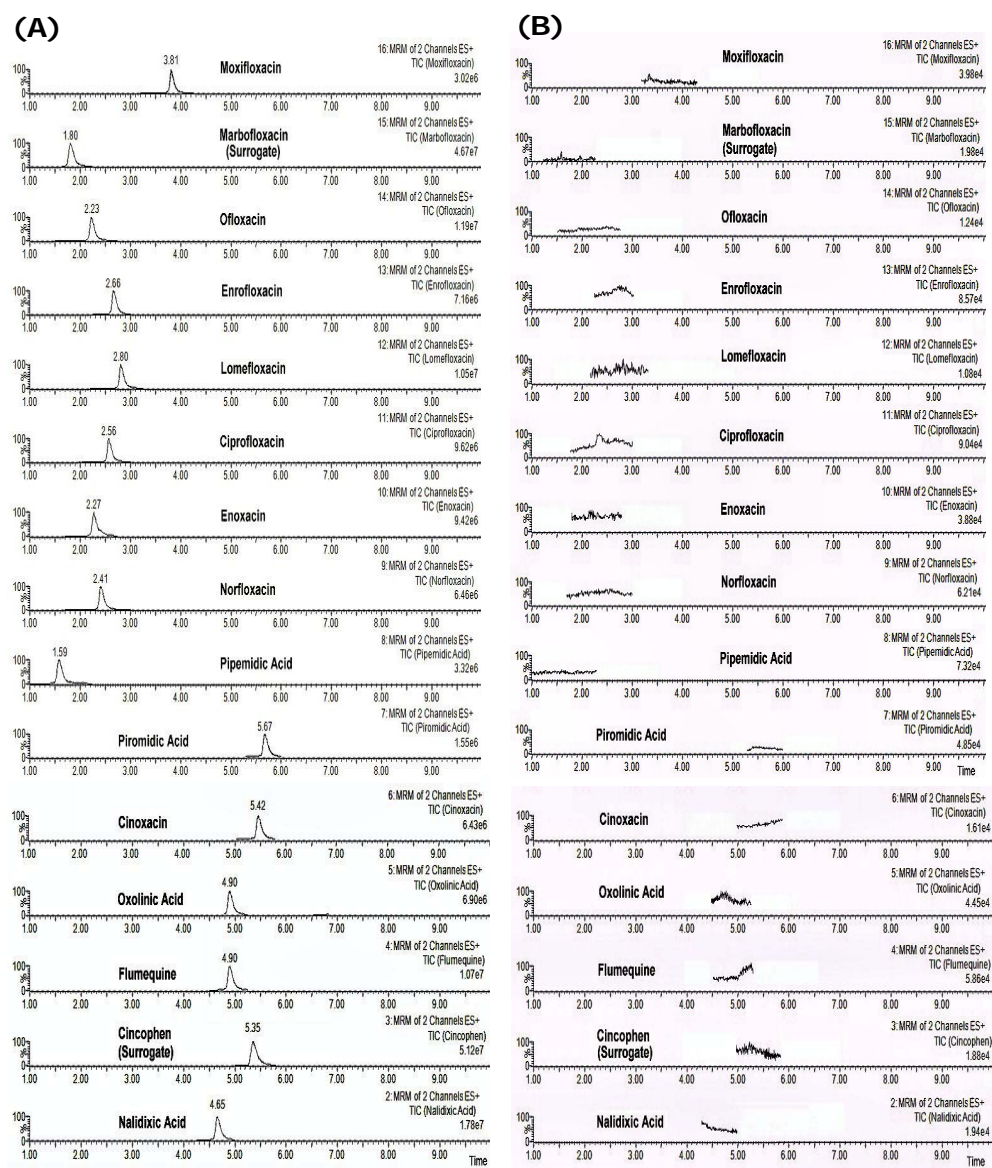


Fig. 1. (A) UPLC–MS/MS chromatogram of a SPE extracted Milli–Q water sample fortified with target compounds at a concentration of 500 ng L⁻¹. (B) UPLC–MS/MS chromatogram of a blank.

3.2. *Electrospray mass spectral behaviour and MS/MS of quinolones*

For most amphoteric quinolones, the largest fragments corresponded to the loss of both H₂O and CO₂ from the carboxylic group; for the acid quinolones corresponds to the loss of H₂O. In addition, acid quinolones produced fewer product ions due to the lack of the reactive C-7 substituents (piperazine ring) [38]. It is important to note that the loss of H₂O from the carboxyl group at C-3, followed by the loss of R₁ (as C₂H₄) from the ethyl groups at N-1 was characteristic as second ion product in most of the acidic quinolones. In the case of amphoteric quinolones, it was also observed that primary product ions (e.g. CO₂) fragmented further by partial loss of the piperazine substituent to different extents, followed by a loss of the alkyl groups. Neutral losses of 87, 101 and 115 amu that corresponds to rupture of the piperazine ring were observed in most of these quinolones. Flumequine exhibited a neutral loss of 42 amu from [MH - H₂O]⁺ to produce the ion at m/z 202, probably corresponding to loss of CH₃-CH=CH₂ from the ring structure between N-1 and C-8. Losses of H₂O and CO₂ are common but they are not specific for quinolones, whereas losses on the piperazine substituent or other characteristic fragmentations for acidic quinolones, in combination with the respective retention times ensure a high specificity for quinolones and are, therefore, ideal for identification purposes. For these reasons, selection of these specific ruptures in the studied compounds was also important. Table 1 also shows the product ions.

3.3. *Effect of sample filtration*

An important step in wastewater analysis is sample filtration. When the presence of drugs in aqueous samples is investigated, the possibility that

part of the drugs is sorbed by the filter is often disregarded. In this study nitrocellulose 0.45 μm (Millipore) and nylon 0.45 μm (Millipore) disk membrane filters were used to test recovery on wastewater samples spiked with the studied quinolones at a final concentration of 5 ng mL^{-1} . The samples were treated according to the procedures previously described and the relative areas for each compound before and after filtration were compared. Samples spiked after filtration were considered to have 0% analyte retention. A significant percentage of the quinolones was retained by the nylon filter and the optimal results were obtained with nitrocellulose, where no significant loss of antibiotics (<3.5%) was observed. A figure comparing the retention of quinolones in the sample filtration step is shown in the supplementary material.

3.4. Solid-phase extraction optimization

The following parameters were optimized: sorbent phases (SPE cartridges), pH value of the sample, preconditioning, and washing conditions. A volume of 100 mL of spiked blank sample (2 ng mL^{-1}) was used. All experiments were performed in triplicate.

The selection of the sorbent in SPE strongly depends on the interactions sorbent–functional groups of the analytes and on the matrix sample and its interactions with both the sorbent and the analytes. The analytes selected in this study can be divided into acidic (FLU, OXO, NAL, CIN, PIR) and amphoteric quinolones (CIP, ENR, NOR, PIP, OFL, LOM, MOX, ENO). In acidic conditions, amphoteric quinolones would be in the cationic form, whereas acidic quinolones would be neutral due to the absence of piperazine ring at C-7, where the basic (protonated) groups are found.

In order to find the most suitable sorbent for the preconcentration of acidic and amphoteric quinolones in a single SPE procedure, four different sorbents were evaluated, a nonpolar sorbent (Isolute C18), polymeric sorbents (Isolute ENV+ and Oasis HLB), and a mixed-phase cation-exchange (MPC) cartridge. Isolute C18 is an octadecyl (non end-capped) functionalized silica sorbent. The polymeric sorbent, Isolute ENV+, is a resin-based non-polar sorbent composed of hydroxylated polystyrene divinylbenzene. Both sorbents are used with compounds with a wide range of polarity. Oasis HLB is formed by the combination of two monomers, hydrophilic N-vinylpyrrolidone and lipophilic divinylbenzene, and it is used with acidic, neutral and basic compounds [41]. The MPC sorbent is a mixed-mode silica-based sorbent consisting of a special nonpolar octyl-phase and a strong cation exchanger (benzenesulfonate). This combination of hydrophobic and cation-exchange properties results in a more specific interaction with quinolones via the aromatic moiety of the quinolone core and the charged amino groups of the quinolone substituents for amphoteric quinolones [42]. Furthermore, the small particle size of the MPC disk cartridge material (12 μm) favors the diffusion step involved in the cation-exchange enrichment, and therefore, faster kinetics and better analyte retention can be achieved.

Sorbent and pH optimization were performed simultaneously. Three values of pH were studied, so that samples were adjusted to pH 3 and 10, using 98% (v/v) formic acid and 0.2 M NaOH solution, respectively. Non adjusted samples were also evaluated, whose pH values were between 7 and 8. Efficiency of MPC cartridges was not studied at pH 10, since the analytes will not interact at this pH with the cation exchanger present in the mixed cartridges. The initial conditions used for SPE have been described elsewhere in the literature [40, 42]. Cartridges were preconditioned with 5

mL of methanol and 5 mL of water at the evaluated pH. Samples were then percolated through the cartridge. After extraction, the cartridges were washed with 5 mL of Milli-Q water and vacuum-dried for 20 min. Compounds were then eluted using 8 mL of methanol, evaporated to dryness, reconstituted with mobile phase and analyzed in UPLC system.

For MPC cartridges the procedure was slightly different because of the special characteristics of the sorbent. Cartridges were preconditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of water at pH 3. After extraction of the sample, the cartridges were vacuum-dried for 5 min. Compounds were then eluted using 2.5 mL of 5% ammonia solution in 15% MeOH, neutralized using 0.3 mL of 98% HCOOH, evaporated to dryness, reconstituted with mobile phase and analyzed in LC system. A flow rate of 1 mL min⁻¹ was established since ion exchange mechanisms are characterized by slow kinetics. Moreover, due to MPC cartridges contained less sorbent mass in comparison with the others, experiments to determine the breakthrough of the analytes were performed. It was obtained that the quinolones were quantitatively extracted from 100 mL of wastewater. The results are shown in Figure 2 (A).

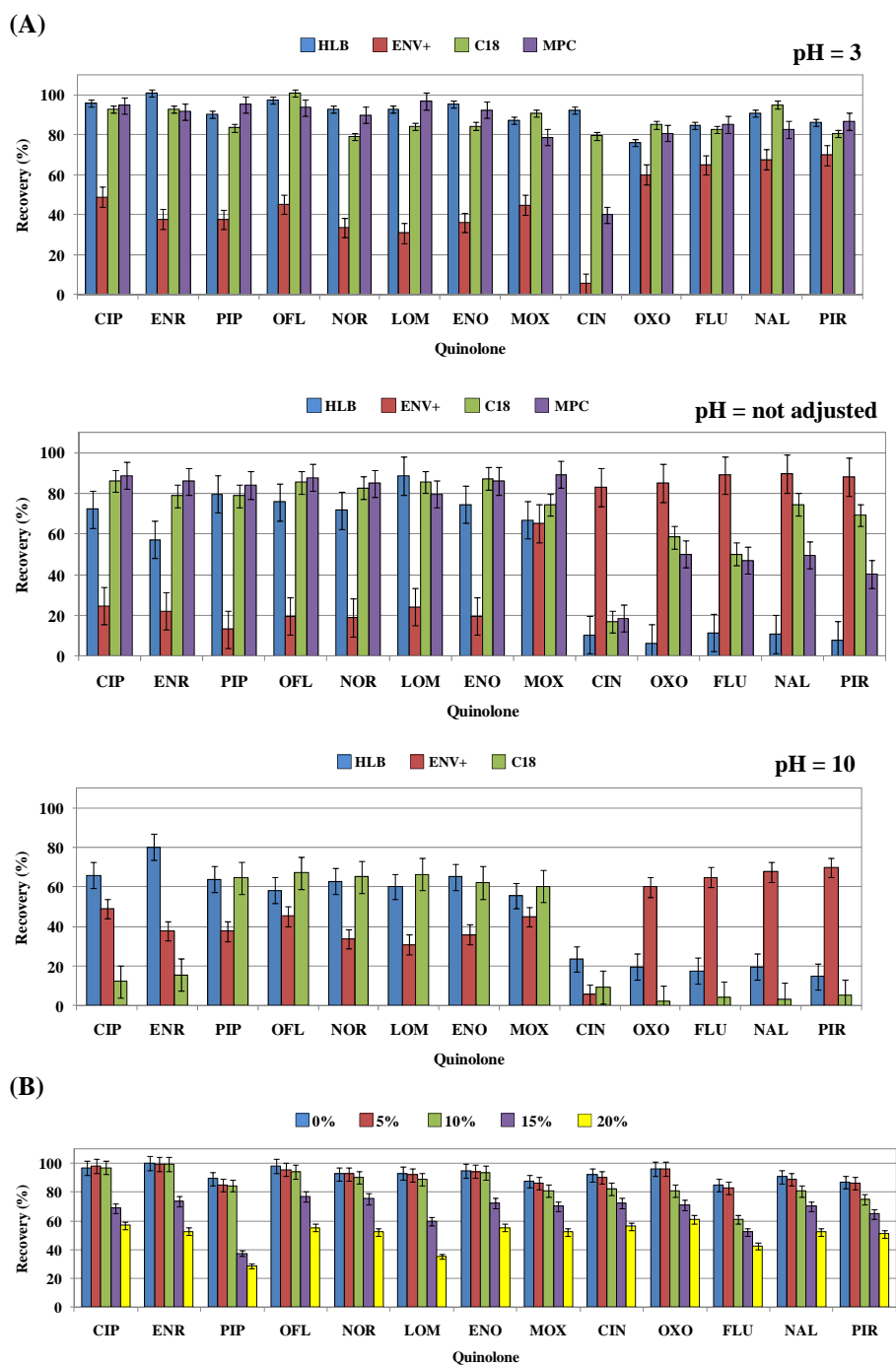


Fig. 2. (A) Influence of SPE sorbent and pH in the recoveries of the studied quinolones ($n = 3$). (B) Influence of the presence of methanol in washing solvent. Concentration of spiked quinolones: 2 ng mL^{-1} .

Due to the different acid–base properties, a significant difference in the extraction efficiency between amphoteric and acidic quinolones was observed. The lowest recoveries were obtained at basic pH values in all cases. Recoveries at $\text{pH} < 7$ were higher for all cartridges, except for ENV+, which exhibited lower recoveries, especially for amphoteric quinolones at these values of pH. Oasis HLB and $\text{pH} = 3$ was selected considering the best recoveries observed. Similar recoveries were observed with Isolute C18 and MPC, but Oasis HLB provided cleaner extracts, and MPC cartridges required longer extraction times.

Once the sorbent and pH were optimized in order to reduce matrix effects, different percentages of methanol were added to water in washing solvent. Figure 2 (B) shows the results obtained. The presence of methanol helps to remove some of the matrix components from the cartridge, as well as quinolones to some extent.

There were differences between acidic and amphoteric quinolones with respect to the effect of methanol in washing solution. The maximum concentration of methanol without significant losses of antibiotics was 10% and 5% for amphoteric and acid quinolones, respectively. Therefore, a concentration of 5% (v/v) methanol was selected since this allows removal of higher amounts of matrix components without significant losses of analytes.

Breakthrough on HLB cartridges was studied by extracting 100 mL of sample in two stacked cartridges spiked at a high concentration (4.0 ng mL^{-1}), which is not likely to occur in municipal wastewaters. No antibiotics were detected in the second cartridge eluant for water samples at the spiked concentration. Therefore, all the analytes were well enriched by the first HLB cartridge at the established SPE conditions and no breakthrough was observed.

3.5. Study of the matrix effects

A major limitation in quantitative analysis with ESI–MS is the matrix effect [43]. Previous studies found in the literature have demonstrated that the matrix components of wastewater may drastically reduce the ionization efficiency of the quinolones [44, 45]. Humic substances in particular have been proved to cause significant signal suppression (from 19 to 50%) [17, 23, 31]. Most of the studies published in the literature overlook the study of matrix effects, and do not pay any attention to the fact that quinolones are more susceptible to signal suppression than other antibiotics, especially when organic matter (i.e. humic acids) is the main component of the matrix.

The matrix effect was evaluated comparing the calibration curves prepared in pure solvent (mobile phase) with those prepared in matrix extracts. The *t*–Student test was applied in order to compare the calibration curves. First, we had to compare the variances estimated as $s^2_{y/x}$ by means of the *F*–Snedecor test. No statistical differences between the variances compared were found for all quinolones. The *t*–Student test did not showed statistical differences among slope values for the calibration curves of OFL ($t_{calculated} = 0.41$), CIP ($t_{calculated} = 1.87$), NOR ($t_{calculated} = 1.77$), and PIP ($t_{calculated} = 0.99$), allowing us to confirm the absence of significant matrix effects for these antibiotics ($t_{tabulated}$ for 60 degrees of freedom = 2.00 at 97.5% confidence level). For the remaining quinolones, signal suppressions ranging from 15 to 30% were calculated. Therefore, the quantification was done using the matrix–matched calibration.

Other important alternative to overcome the problem of matrix effect is the dilution of the final extracts prior to chromatographic injection. Dilution of samples proved to be an effective approach in cases when the preconcentration of matrix components during sample preparation

magnified matrix effect. In some cases, it has been noted that dilution is sufficient to minimize signal suppression, increasing the signal intensity of the analytes and making it possible to correct the results of quantitative analysis. In this work, a process of sequential dilutions (1:1 and 1:4) of extracts were injected and the signal intensity was compared with the obtained for non-diluted extract (see supplementary material). Dilution led in all cases to a decrease in sensitivity, being therefore not a suitable alternative to improve method sensitivity.

3.6. Analytical performance. Method validation

In the majority of previous analytical methods proposed in the literature, surface and well waters were usually used for performing calibration and recovery assays. Matrix-matched calibration with wastewater “free” of the analytes (<LOD) was used in the present work. We are aware that the use of matrix-matched calibration implies the availability of a “real” and representative blank sample with similar matrix content to that of the environmental samples. In fact, such condition is rather difficult to find in the analysis of environmental samples because of the unknown concentration of the analyte in the sample and the high variability of sample matrix. By means of some studies using urban wastewaters from different WWTPs, we have proved that such variability among matrices is not a critical factor.

The method performance was evaluated in terms of linearity, sensitivity, accuracy (trueness, repeatability, reproducibility) and matrix effect in wastewater matrices. This provides a more accurate estimation of the losses of sensitivity, difficulties during sample treatment and interferences, which is a way to evaluate the real potentialities of an

analytical method. This method provides similar and even better LODs and LOQs than most published works that were also validated in wastewater matrices, with the additional advantage of analyzing a much greater number of quinolones (amphoteric and acid).

A six-point calibration curve—based on the ratio of peak areas of the analytes and surrogate—was obtained for each analyte in the range from the limit of quantification to 4 ng mL⁻¹. Each calibration level was made in triplicate and analyzed twice. Table 2 shows the main calibration parameters. Marbofloxacin and cincophen were the surrogates for amphoteric and acidic quinolones, respectively. Marbofloxacin is for veterinary use that is not likely to be found in urban wastewaters. Cincophen is not a quinolone but it shows a similar structural core, especially because of the absence of the piperazine ring at C-7 characteristic of acidic quinolones. Additionally, the chromatographic retention times of each group of quinolones are close to the corresponding surrogate and neither marbofloxacin nor cincophen were detected in samples.

Table 2
Analytical and statistical parameters.

Parameter ^a	Quinolone						
	MOX	OFL	ENR	LOM	CIP	ENO	NOR
n	36	36	36	36	36	36	36
b (mL ng ⁻¹)	0.134	0.277	0.284	0.303	0.224	0.350	0.208
s _b (mL ng ⁻¹)	7.5·10 ⁻⁴	1.0·10 ⁻³	1.6·10 ⁻³	2.3·10 ⁻³	1.0·10 ⁻³	1.4·10 ⁻³	7.7·10 ⁻⁴
s _{y/x}	6.0·10 ⁻³	8.0·10 ⁻³	1.4·10 ⁻²	1.9·10 ⁻²	8.0·10 ⁻³	1.1·10 ⁻²	6.0·10 ⁻³
R ² (%)	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.9	99.9
P _{lof} (%)	21.3	42.5	26.6	19.2	51.5	18.4	9.8
LOD (ng mL ⁻¹)	0.03	0.02	0.03	0.04	0.03	0.02	0.02
LOQ (ng mL ⁻¹)	0.11	0.07	0.11	0.14	0.09	0.07	0.07
LDR (ng mL ⁻¹)	LOQ – 4.00						
Parameter ^a	Quinolone						
	NOR	PIP	PIR	CIN	OXO	FLU	NAL
n	36	36	36	36	36	36	36
b (mL ng ⁻¹)	0.208	0.064	0.068	0.329	0.439	0.440	0.644
s _b (mL ng ⁻¹)	7.7·10 ⁻⁴	3.9·10 ⁻⁴	3.9·10 ⁻⁴	2.4·10 ⁻³	3.2·10 ⁻³	3.4·10 ⁻³	4.1·10 ⁻³
s _{y/x}	6.0·10 ⁻³	3.0·10 ⁻³	5.0·10 ⁻³	2.0·10 ⁻²	2.7·10 ⁻²	2.8·10 ⁻²	3.4·10 ⁻²
R ² (%)	99.9	99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	99.9
P _{lof} (%)	9.8	11.4	6.3	37.9	37.4	59.4	52.3
LOD (ng mL ⁻¹)	0.02	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
LOQ (ng mL ⁻¹)	0.07	0.12	0.11	0.14	0.14	0.15	0.12
LDR (ng mL ⁻¹)	LOQ – 4.00						

^a n = points of calibration; b = slope; s_b = slope standard deviation; s_{y/x} = regression standard deviation; R² = determination coefficient; % P_{lof} = P value of lack-of-fit test; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification; LDR = linear dynamic range.

Linearity. The linear correlation coefficient (R²) and the *lack-of-fit* test (P_{lof}) were used to evaluate linearity. Good linearity was observed within the concentration range with R² ranging from 99.7% to 99.9% and P_{lof} values > 5% in all cases.

Selectivity. The specificity of the method could be demonstrated by UPLC–MS/MS analysis of blank samples. Figure 1 (A) shows a UPLC–MS/MS chromatogram of a water sample spiked with 0.5 ng mL⁻¹ of the studied quinolones and a blank sample (B). Retention times showed no interferences after analysis of the blank samples and spiked matrices with all studied quinolones. High precision in retention times was also observed, with relative standard deviation (RSD, %) values lower than 1%. These data confirm the high selectivity of the LC–MS/MS method.

Sensitivity. Two fundamental aspects need to be examined in the validation of any analytical method to determine whether an analyte is present in the sample: the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ). These parameters were determined as the minimum detectable amount of analyte with a signal-to-noise ratio of 3 and 10 for the LOD and LOQ, respectively. Table 2 shows the values obtained.

Accuracy: precision and trueness. To assure precise quantifications, the precision of the method in terms of intra- and inter-day variability was evaluated at three concentration levels (0.25, 1.0 and 3.0 ng mL⁻¹). Precision was determined from triplicate spiked wastewater samples at different levels during the same day (repeatability) and in 7 successive days (reproducibility). Precision was expressed as RSD. The values obtained are summarized in Table 3. RSD values fell between 0.2% and 2.4%. Precision data indicated that the method is highly reproducible and robust.

Table 3
Accuracy of the method. Precision and trueness.

Compound	Spiked level (ng mL ⁻¹)	Trueness	Precision	
		(n = 42) Recovery (%)	Intra-day (%) ^a (n = 6)	Inter-day (%) ^a (n = 42)
MOX	0.25	100.1	1.4	3.2
	1.00	101.2	1.5	2.3
	3.00	99.4	0.3	0.4
OFL	0.25	99.4	0.7	1.6
	1.00	102.4	0.9	1.1
	3.00	99.3	0.4	0.6
ENR	0.25	98.5	1.3	2.2
	1.00	102.2	1.4	1.7
	3.00	99.9	1.2	1.3
LOM	0.25	101.2	1.0	2.6
	1.00	100.9	2.1	2.3
	3.00	99.6	0.5	1.7
CIP	0.25	99.8	2.2	2.8
	1.00	100.2	1.9	2.2
	3.00	99.5	0.7	1.5
ENO	0.25	99.2	1.3	3.4
	1.00	100.7	0.7	0.6
	3.00	100.4	1.3	1.4
NOR	0.25	99.1	1.8	2.3
	1.00	102.6	1.6	1.7
	3.00	100.3	1.0	1.2
PIP	0.25	100.8	2.0	2.9
	1.00	102.7	1.1	1.2
	3.00	99.4	1.1	1.0
PIR	0.25	99.4	2.5	3.4
	1.00	99.1	1.6	3.0
	3.00	99.6	1.2	1.1
CIN	0.25	99.5	3.2	3.2
	1.00	99.7	1.5	1.9
	3.00	99.9	1.3	1.5
OXO	0.25	98.7	2.1	2.4
	1.00	103.9	1.6	1.8
	3.00	102.6	0.9	0.9
FLU	0.25	100.1	2.4	2.5
	1.00	99.6	0.8	0.8
	3.00	100.6	1.4	1.3
NAL	0.25	99.6	1.4	2.0
	1.00	100.3	1.9	2.7
	3.00	102.0	0.8	0.9

^a Relative standard deviation (RSD, %)

Due to the absence of certified materials, a recovery assay to validate the method in terms of trueness was carried out. Blank spiked samples previously analyzed to ensure they did not contain the compounds of interest or that these were below the LOD of the method were used. Trueness was evaluated by determining the recovery of known amounts of tested compounds in wastewater samples. As shown in Table 3, the recoveries are close to 100% (98.5% to 103.9%) in all cases.

3.7. Application of the method

The method was applied for the determination of quinolone derivative residues in wastewaters from two WWTPs located in the province of Granada (Spain). The samples were collected randomly from the primary settling tank during a one-year period. Concentration values for samples are shown in Table 4. Figure 3 shows an example of chromatograms for an analyzed sample.

Table 4
Application of the method to wastewater samples from WWTPs.

	^a Concentration (ng mL ⁻¹)												
	MOX	OFL	ENR	LOM	CIP	ENO	NOR	PIP	PIR	CIN	OXO	FLU	NAL
G01	nd	nd	nd	nd	1.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
G02	1.4	1.4	nd	nd	1.2	1.2	1.0	0.5	nd	nd	nd	nd	nd
G03	1.2	1.1	nd	nd	1.1	0.2	1.4	1.3	0.3	nd	nd	nd	nd
G04	1.4	1.7	nd	nd	1.4	0.5	1.2	1.5	nd	nd	nd	nd	nd
G05	0.4	1.1	nd	nd	1.0	0.5	0.4	0.4	nd	nd	nd	nd	nd
G06	0.8	1.4	nd	nd	0.6	0.2	0.2	1.1	nd	nd	nd	nd	nd
G07	1.1	1.0	nd	nd	0.8	nd	1.0	0.5	0.3	nd	nd	nd	nd
G08	1.7	0.4	nd	nd	1.4	1.0	0.5	0.8	0.4	nd	nd	nd	nd
G09	1.1	0.8	nd	nd	0.7	0.5	0.7	0.9	0.6	nd	nd	nd	nd
G10	1.7	0.5	nd	nd	0.2	0.7	0.6	0.6	nd	nd	nd	nd	nd
G11	1.4	0.3	nd	nd	1.3	0.6	0.8	0.8	nd	nd	nd	nd	nd
G12	0.5	0.4	nd	nd	1.1	nd	0.8	0.9	0.3	nd	nd	nd	nd
G13	0.9	0.2	nd	nd	1.2	nd	0.6	1.4	0.4	nd	nd	nd	nd
G14	2.4	1.0	nd	nd	0.8	nd	1.6	0.9	0.3	nd	nd	nd	nd
G15	1.9	0.8	nd	nd	2.0	0.6	0.3	1.2	nd	nd	nd	nd	nd
G16	1.5	1.7	nd	nd	1.7	0.3	0.6	0.2	nd	nd	nd	nd	nd
G17	1.9	1.1	nd	nd	1.4	nd	1.2	0.6	0.6	nd	nd	nd	nd
G18	1.5	1.6	nd	nd	2.0	nd	0.6	1.2	0.6	nd	nd	nd	nd
G19	2.5	0.3	nd	nd	1.1	nd	0.3	0.7	1.1	nd	nd	nd	nd
G20	1.5	0.3	nd	nd	0.8	0.8	1.4	1.3	nd	nd	nd	nd	nd
G21	1.6	2.0	nd	nd	0.9	1.3	0.6	1.1	nd	nd	nd	nd	nd
M01	0.5	0.3	nd	nd	1.5	nd	nd	0.7	0.2	nd	0.5	nd	0.2
M02	0.7	0.8	nd	nd	0.3	nd	nd	1.2	nd	nd	0.5	nd	0.3
M03	1.1	1.1	nd	nd	1.4	0.3	nd	0.6	0.2	nd	0.6	nd	0.2
M04	0.2	0.6	nd	nd	0.6	0.1	nd	0.6	nd	nd	0.3	nd	0.4
M05	0.4	1.2	nd	nd	0.7	nd	nd	0.8	nd	nd	0.4	nd	0.5
M06	1.0	1.1	nd	nd	0.9	nd	nd	0.9	0.5	nd	0.6	nd	0.3
M07	0.2	0.8	nd	nd	1.3	nd	nd	0.3	0.3	nd	0.6	nd	0.4

^a Mean of three determinations. nd = not detected (<LOD).

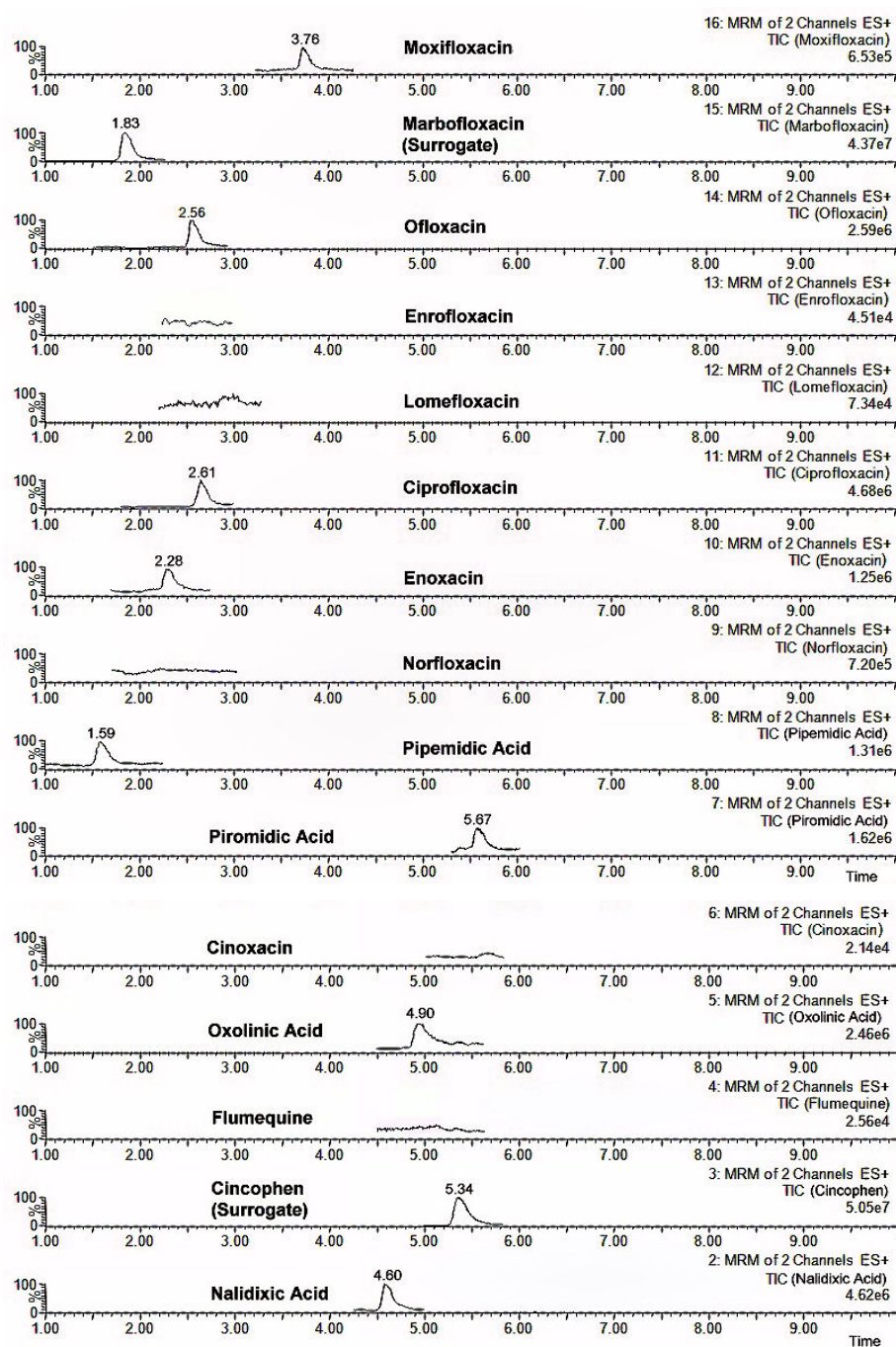


Fig. 3. UPLC-MS/MS chromatogram of a natural wastewater sample (containing the surrogates: marbofloxacin and cincophen).

It is known that the pharmaceuticals found in wastewaters and sewage sludge reflect prescription trends and patients consumption. CIP (100%), MOX (96%), OFL (96%) and PIP (96%) were found in almost all samples and at the highest concentrations (in the range from 0.2 to 2.5 ng mL⁻¹), followed by NOR, which was found slightly less frequently (71%) but still at high concentrations (0.2 to 1.6 ng mL⁻¹). PIR and ENO were detected in 50% and 54% of samples, respectively, but at lower concentrations (0.1 to 1.3 ng mL⁻¹). OXO and NAL were found in 25% of samples, in the lowest concentrations (0.2 to 0.6 ng mL⁻¹). OXO, NAL and NOR were detected in only one of the WWTPs. ENR, LOM, CIN and FLU were not detected in any of the analyzed samples. These results confirmed the urban nature of the analyzed wastewaters, given the absence of quinolones that are mainly used in veterinary medicine, like ENR and FLU. Although OXO is also use in animals, it could be prescribed to humans in some cases, explaining its presence in some samples. As expected, it was established a relation between the concentration of quinolones detected correlated with the data provided by the European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) [6]. Our study corroborates that the most used quinolones belong to the second generation (CIP, NOR and OFL), followed by quinolones of the first generation (PIP and PIR). It was however surprising the fact that MOX—a third generation quinolone—was also among the most used quinolones.

4. Conclusions

The present work proposes an analytical methodology for the determination of 13 quinolone derivatives use in wastewaters based on a SPE procedure prior to an UPLC–MS/MS analysis. The influence of the

most important parameters affecting the sample treatment, SPE procedure and UPLC–MS/MS analysis has been optimized. Likewise, SPE has allowed reducing significantly typical matrix components of wastewaters that usually are responsible for the strong signal suppression that leads to a reduction of sensitivity and accuracy of the method. With the aim of improving specificity of the method, specific fragmentation reactions for quinolones were selected during the optimization of MS method. The analytical performance of the method was validated in wastewaters, achieving very low LOD (between 0.02 and 0.04 ng mL⁻¹), high recoveries and precision. The method is suitable for the determination of trace levels of this group of antibiotics in wastewaters. This is an important achievement because this method may be applied in screening studies on environmental presence and final fate of these compounds because these highly polar pharmaceuticals are not effectively eliminated in WWTPs.

Treated waters containing trace levels of antibiotics, even at subtherapeutic doses, can pose a biomedical hazard because they can lead to bacterial resistance that can be passed to bacteria living in other environments such as ground or drinking water, posing a serious environmental threat.

Acknowledgements

This study was supported by the regional Government of Andalusia (Research Contract No. 3017–00) and by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (Project No. CTQ2011–24210). The authors are grateful to the Spanish Ministry of Foreign Affairs (Agency for International Cooperation) for the fellowship granted to N. Dorival–García and to the company Air Liquide España for its valuable contribution to this study.

References

- [1] T.A. Ternes, A. Joss, H. Siegrist, Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 392A–399A.
- [2] C.G. Daughton, T.A. Ternes, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) Suppl, 907–938.
- [3] S. Kim, D.S. Aga, Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants, *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 10 (2007) 559–573.
- [4] K. Kümmerer, Significance of antibiotics in the environment, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 5–7.
- [5] V.T. Andriole, The quinolones: past, present, and future, *Clin. Infect. Dis.* 41 (2005) 113–119.
- [6] M. Ferech, S. Coenen, S. Malhotra-Kumar, K. Dvorakova, E. Hendrickx, C. Suetens, H. Goossens, European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient use in Europe, *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (2006) 423–427.
- [7] L.A. Cardoza, C.W. Knapp, C.K. Larive, J.B. Belden, M. Lydy, D.W. Graham, Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems, *Water Air Soil Pollut.* 161 (2004) 383–398.
- [8] T. Junker, R. Alexy, T. Knacker, K. Kummerer, Biodegradability of 14 C-labeled antibiotics in a modified laboratory scale sewage treatment plant at environmentally relevant concentrations, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 318–324.
- [9] K. Mitani, H. Kataoka, Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography – tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 16–22.
- [10] M. Leclercq, O. Mathieu, E. Gomez, C. Casellas, H. Fenet, D. Hillaire-Buys, Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56 (2009) 408–415.

- [11] B.G. Plósz, H. Leknes, H. Liltved, K.V. Thomas, Diurnal variations in the occurrence and the fate of hormones and antibiotics in activated sludge wastewater treatment in Oslo, Norway, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 1915–1924.
- [12] B.E. Ericson, Analyzing the ignored environmental contaminants, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 140A–145A.
- [13] E.M. Golet, A.C. Alder, A. Hartmann, T.A. Ternes, W. Giger, Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid–phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3632–3638.
- [14] T. Christian, R.J. Schneider, H.A. Färber, D. Skutlarek, M.T. Meyer, H.E. Goldbach, Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31 (2003) 36–44.
- [15] W.H. Xu, G. Zhang, S.C. Zou, X.D. Li, Y.C. Liu, Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high–performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Environ. Pollut.* 145 (2007) 672–679.
- [16] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122–159.
- [17] M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, Development of a multi–residue analytical methodology based on liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters, *Talanta* 70 (2006) 678–690.
- [18] J.E. Renew, C.H. Huang, Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography – electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 113–121.
- [19] S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Asperger, M. Perisa, M. Zrncić, A.J.M. Horvat, M. Marija Kastelan–Macan, Determination of multi–class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1185–1194.

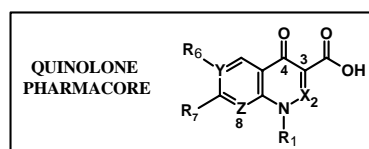
- [20] M. Ferdig, A. Kaleta, W. Buchberger, Improved liquid chromatographic determination of nine currently used (fluoro)quinolones with fluorescence and mass spectrometric detection for environmental samples, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1448–1456.
- [21] M. Ibáñez, C. Guerrero, J.V. Sancho, F. Hernández, Screening of antibiotics in surface and wastewater samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2529–2539.
- [22] R.H. Lindberg, P. Wennberg, M.I. Johansson, M. Tysklind, B.A.V. Andersson, Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3421–3429.
- [23] R. López-Serna, S. Pérez, A. Ginebreda, M. Petrović, D. Barceló, Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry, *Talanta* 83 (2010) 410–424.
- [24] X.S. Miao, F. Bishay, M. Chen, C.D. Metcalfe, Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3533–3541.
- [25] H. Nakata, K. Kannan, P.D. Jones, J.P. Giesy, Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography – mass spectrometry and fluorescence detection, *Chemosphere* 58 (2005) 759–766.
- [26] A. Pena, J. Pina, L.J.G. Silva, L. Meisel, C.M. Lino, Fluoroquinolone antibiotics determination in piggeries environmental waters, *J. Environ. Monitor.* 12 (2010) 642–646.
- [27] L. Shi, X.F. Zhou, Y.L. Zhang, G.W. Gu, Simultaneous determination of 8 fluoroquinolone antibiotics in sewage treatment plants by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, *Water Sci. Technol.* 59 (2009) 805–813.
- [28] L. Tong, P. Li, Y. Wang, K. Zhu, Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE–LC/MS/MS, *Chemosphere* 74 (2009) 1090–1097.

- [29] E. Turiel, G. Bordin, A.R. Rodríguez, Trace enrichment of (fluoro)quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography – ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A* 1008 (2003) 145–155.
- [30] N.M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 101–111.
- [31] Y. Xiao, H. Chang, A. Jia, J. Hu, Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 100–108.
- [32] Q.T. Dinh, F. Alliot, E. Moreau-Guigon, J. Eurin, M. Chevreuil, P. Labadie, Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS, *Talanta* 85 (2011) 1238–1245.
- [33] M. Prat, J. Benito, R. Compañó, J. Hernández-Arteseros, M. Granados, Determination of quinolones in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 27–33.
- [34] A. Jia, Y. Wan, Y. Xiao, J. Hu, Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant, *Water Res.* 46 (2012) 387–94.
- [35] B. De Witte, J. Dewulf, K. Demeestere, M. De Ruyck, H. Van Langenhove, Critical points in the analysis of ciprofloxacin by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 126–130.
- [36] F. Tamtam, F. Mercier, J. Eurin, M. Chevreuil, B. Le Bot, Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry performance evaluation for analysis of antibiotics in natural waters, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1709–1718.
- [37] J.C. Yorke, P. Froc, Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 63–77.

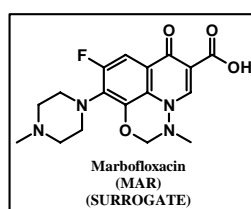
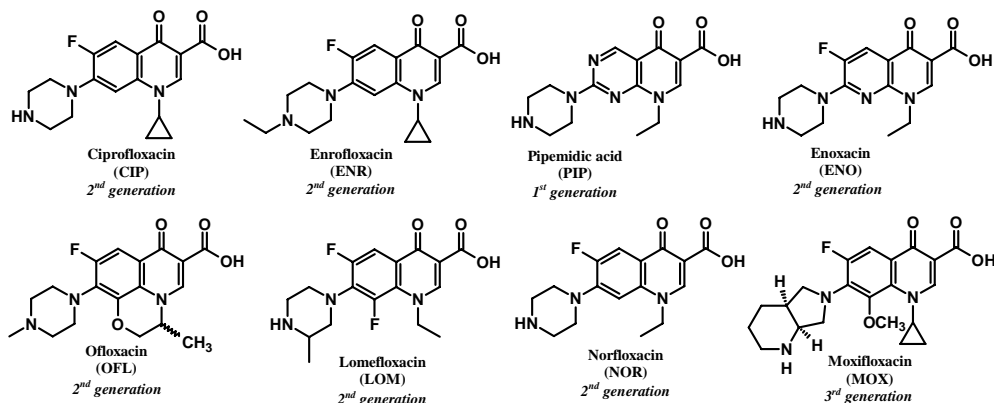
- [38] D.A. Volmer, B. Mansoori, S.J. Locke, Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4143–4155.
- [39] J. Hu, W. Wang, Z. Zhu, H. Chang, F. Pan, B. Lin, Quantitative structure–activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 4806–4812.
- [40] B. Li, T. Zhang, Z. Xu, H.H. Ping Fang, Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 645 (2009) 64–72.
- [41] B. Kasprzyk–Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid–phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 132–145.
- [42] E.M. Golet, A.C. Alder, W. Giger, Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3645–3651.
- [43] A. Cappiello, G. Famigliani, P. Palma, E. Pierini, V. Termopoli, H. Truffelli, Overcoming matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9343–9348.
- [44] A.P. Bruins, Mechanistic aspects of electrospray ionization, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345–357.
- [45] H.C. Holten Lutzhoft, W.H.J. Vaes, A.P. Freidig, B. Halling–Sorensen, J.L.M. Hermens, Influence of pH and other modifying factors on the distribution behavior of 4-quinolones to solid phases and humic acids studied by "Negligible–Depletion" SPME–HPLC, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 4989–4994.

Supplementary Material

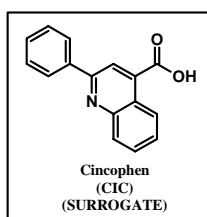
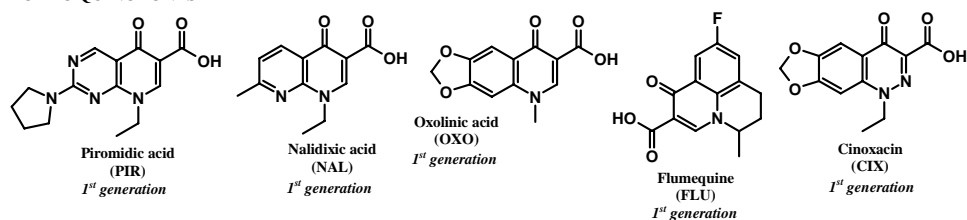
Chemical structure of quinolone and fluoroquinolones



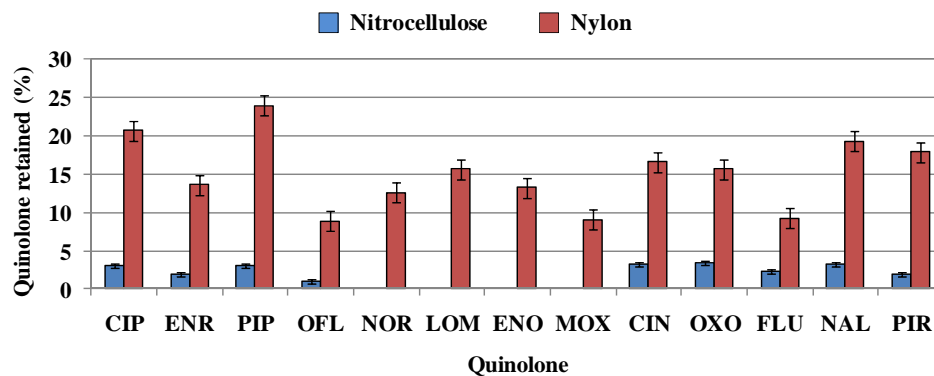
AMPHOTERIC QUINOLONES



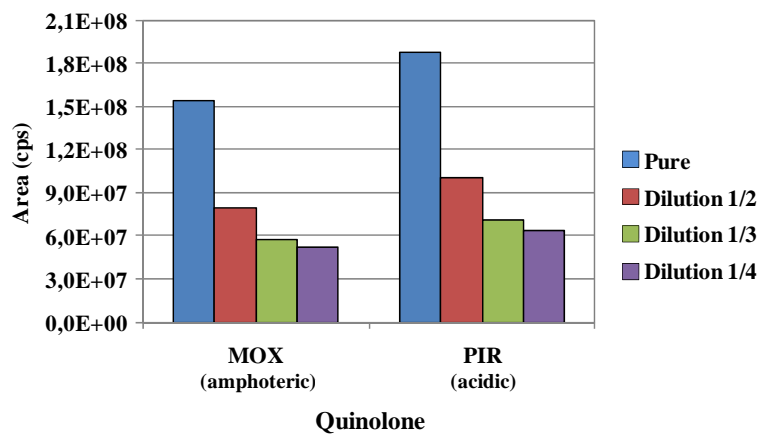
ACIDIC QUINOLONES



Effect of the sample filtration step



Influence of the dilution of the final extracts in matrix effect.



CAPÍTULO II

Microcontaminantes en Fangos de
Depuradora

1. OBJETIVOS

Los principales objetivos de los trabajos realizados y presentados en este capítulo son:

- Establecer metodología analítica de buenas características para la determinación de bisfenol A, sus derivados clorados y derivados de las quinolonas en fangos de depuradora.
- Optimizar el proceso de extracción de los compuestos a partir de las muestras naturales mediante el uso de distintas técnicas de extracción (MAE, USE y PLE).
- Validar los métodos analíticos propuestos en términos de exactitud, linealidad, selectividad y sensibilidad de acuerdo a los requerimientos de las guías de validación aplicables.
- Aplicar los métodos propuestos a la determinación de bisfenol A y sus derivados clorados y para la determinación de derivados de las quinolonas en fangos de depuradora de diferente procedencia.
- Comparar estadísticamente las metodologías propuestas y seleccionar la más adecuada para el análisis rutinario de los contaminantes de interés.

2. PUBLICACIÓN II

Journal of Chromatography A, 1253 (2012) 1 – 10
DOI: 10.1016/j.chroma.2012.06.079

Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques

N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez, A. Navalón, J.L. Vilchez

Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

ABSTRACT

This paper presents a comparison of three extraction techniques—ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction and pressurized liquid extraction—in order to evaluate their efficiency in the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Extraction parameters for each technique were accurately optimized to achieve the highest recoveries. The selected compounds were detected and quantified using liquid-chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), operating in negative atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The analytes were separated in less than 6 min. BPA-d₁₆ was used as internal standard. Three selective, sensitive, robust and accurate analytical methods were developed. The limits of detection (LODs) of the methods

ranged from 2 to 9 ng g⁻¹ and the limits of quantification (LOQs) from 8 to 26 ng g⁻¹, while inter- and intra-day variability was under 6% in all cases. Given the absence of certified reference materials (CRMs), the methods were validated separately by using matrix-matched calibration and recovery assays with spiked samples. Recovery rates ranged from 97.7% to 103.1%. The sewage sludge samples used for experiments were collected from two different wastewater treatments plants (WWTPs) located in the province of Granada (South-East Spain). The statistical comparison of the methods demonstrated no statistically significant differences between the extraction techniques for the determination of BPA and chlorinated derivatives in sludge samples.

Keywords: Bisphenol A; LC-MS/MS; Sewage sludge; Ultrasound-assisted extraction; Microwave-assisted extraction; Pressurized liquid extraction

* Corresponding author: Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

1. Introduction

Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) are a group of natural and synthetic chemicals that may interfere with the normal function of the endocrine system in animals and humans [1]. EDCs can either mimic or inhibit the action of natural hormones, leading to adverse reproductive and developmental effects. In men, exposure to EDCs is associated with problems in reproductive capacity and testicular or prostate cancer [2]. In women, abnormal endocrine function may be associated with increased risk for endometriosis, reproductive and endocrine-related cancers, or impaired oocyte competence, ovarian function or menstrual cycling [3]. Effects of early life exposure to EDCs remain unclear, but it has been suggested that fetal or childhood exposure may lead to abnormal sex differentiation, abnormal neurological and reproductive development, and to risk of reproductive problems or cancer later in life [4].

A wide variety of chemicals have been shown to have estrogenic activity [5]; however, most EDCs are synthetic compounds, some of which are designed to act as estrogens (*e.g.*, oral contraceptives). Many are designed for other purposes and accidentally have estrogenic activity (plasticizers and surfactants), or are components of pharmaceuticals and personal care products (parabens or UV-filters) [6].

BPA is probably the most widely used synthetic chemical in the world. It is a monomer used in the manufacturing of polycarbonate plastic and polystyrene resins as well as in dental sealants. BPA is also used as an additive in other types of plastic (PVC and PET), used in mineral water bottles [7]. It is one of the most highly produced chemicals in the world, with an annual production of more than 3 million tonnes [8]. Depolymerization of these products results in BPA and its derivatives, which may leach into canned foods, infant formula from plastic baby bottles, and can be found in the saliva of patients treated with dental sealants

and in fresh food at microgram to milligram per kilogram level. Evidence exists suggesting that *food intake* is the *primary* source of human *exposure* to *BPA* [9]. Concentrations of BPA in the range of 0.1–10 ng mL⁻¹ have been detected in human fluids, fat, placenta and fetal tissues [10]. Studies conducted over the past 20 years show that BPA is not only a ubiquitous pollutant in the human body but also a powerful developmental toxin at very low doses. Many studies have documented the adverse effects of BPA on human health including structural and neurochemical changes in the brain, associated with behavioural changes, fertility problems, recurrent miscarriage, and polycystic ovary syndrome in women [11-14].

Wastewater treatment plants (WWTPs) are the major point sources of BPA and other EDCs to the environment [15]. EDCs are released into the environment mainly through WWTPs before reaching surface and ground waters and agricultural land. Human exposure to these compounds has become an increasingly concern because of their unknown long-term effects, even at extremely low concentrations [16]. In addition, it is known that BPA easily reacts with sodium hypochlorite—used as a bleaching agent in paper factories and for water disinfection—producing chlorinated derivatives (mono-, di, tri- and tetrachlorobisphenol A) that can be also released into the environment. Chlorinated derivatives have been proven to show more estrogenic and cytotoxic activity than BPA itself [17].

The fate of BPA is determined by the sorption to solids and suspended matter during treatment. Sewage sludge, or the sludge that is reused for the production of compost, can be applied directly to agricultural lands as a means of soil amendment representing a way for the release of BPA into the environment, from where it may eventually enter the human food chain [18]. BPA concentrations found in sludge samples fall into a wide range, from ng kg⁻¹ to mg kg⁻¹. This is particularly worrying because the known threshold concentration leading to potential estrogenic responses is in the part per trillion levels [16]. The need for detection of trace level of BPA

presents an important challenge, making it necessary the development of efficient pre-treatment procedures and highly sensitive and selective analytical methods.

Different techniques have been used to extract contaminants from solid samples. Traditionally, the most common is ultrasound assisted extraction (USE) [19–23], but new extraction techniques such as microwave-assisted extraction (MAE) [24] or pressurized liquid extraction (PLE) [25] have been successfully applied for the analysis of a wide range of chemicals from solid matrices. These techniques provide shorter extraction times, low solvent consumption and better recoveries than classical extraction techniques. Moreover, the development of more advanced instruments allows for simultaneous extraction of multiple organic pollutants with a high degree of automation [26]. To our knowledge, very few studies deal with the determination of BPA in sewage sludge and there are no articles on the determination of all the chlorinated derivatives [19-21, 24, 25, 27-29].

The purpose of the present study is to compare the efficiency of USE, PLE and MAE in the extraction of BPA and its chlorinated derivatives from sewage sludge samples. An LC–MS/MS method was developed for the detection and quantification of analytes.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Analytical grade standards of BPA, tetrachlorobisphenol A (Cl₄-BPA) and deuterated bisphenol A (BPA-d₁₆)—used as internal standard—were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Mono-, di- and trichloro- bisphenol A (Cl-BPA, Cl₂-BPA, Cl₃-BPA) were synthesized and

separated in our laboratory (purity > 99.5%) [30]. Individual standard solutions of compounds ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in methanol and stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. These solutions were prepared fresh monthly. Working standard mixtures were prepared by diluting the individual stock solution in methanol or in the initial mobile phase immediately before use. They were stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and prepared fresh weekly. All solutions were stored in dark glass bottles. LC-MS grade water and methanol—used for the preparation of standards and mobile phases—were purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). Disodium hydrogen phosphate and citric acid, as well as sodium hydroxide for the preparation of McIlvaine buffer solution [31] were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Ammonia (>25%), acetonitrile, dichloromethane, hexane, acetone and ethyl acetate, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Instrumentation and software

Three instruments were used for the extraction of samples. The first was a Branson digital Sonifier[®] unit model S-450D (Danbury, CT, USA), operated with a standard 12.7 mm titanium disruptor horn, a flat and replaceable 12.7 mm titanium tip and a temperature probe. For the microwave-assisted solvent extraction, we used a Milestone's ETHOS SEL extraction Labstation (Sheldon, CT, USA), operated at 2455 MHz with a maximum delivered power of 1000W. Time, temperature and microwave power control were adjusted and controlled throughout the process using the easyWAVE 3 software, version 3.2.1.0. An optical fibre temperature sensor was used to monitor the temperature. This unit contains 10 closed sealed teflon vessels that can reach a maximum temperature of $300 \text{ }^\circ\text{C}$. For

pressurized liquid extraction, we used a Dionex Accelerated Solvent Extractor, ASE® 200 (Sunnyvale, CA, USA) equipped with a solvent controller.

Detection and quantification of the analytes were performed using an Agilent 1200 series (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) LC system equipped with a binary pump, a vacuum membrane degasser, a thermostated column compartment, an automatic autosampler and an automatic injector. The LC system is coupled “on line” to an API 2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) triple quadrupole mass spectrometer system that can use either atmospheric pressurized chemical ionization (APCI) or electrospray ionization (ESI) interfaces. Analyst software version 1.5.2 was used for instrument control, data acquisition and analysis.

A Crison 2000 digital pH-meter with a combined glass-Ag/AgCl (KCl 3 M) electrode (Crison Instruments S.A, Barcelona, Spain) was used for pH measurements. A vortex-mixer (Yellow line, Wilmington, NC, USA), a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttlingen, Germany), and a Memmert oven (Schwabach, Germany) were also used. Statgraphics Plus version 5.0 software package (Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA. 2000) was used for statistical treatment of data.

2.3. *Sample collection and storage*

Samples of sewage sludge were collected from two WWTPs located in the province of Granada (Spain). The samples were kept in amber glass bottles and decreased biological activity was achieved by adding 1% (v/v) formaldehyde. Once in the laboratory, samples were centrifuged at $3634 \times g$ for 15 min and the solid components recovered, dried in a heater at 60 °C to

constant weight and finely ground (≤ 1.41 mm). The samples were stored in the dark at 4 °C until analysis.

2.4. Preparation of fortified samples

Due to the absence of certified reference materials (CRMs), blank samples for recovery studies were spiked at different concentrations by adding 1 mL of a methanolic standard solution containing the different analytes under study to 1.0 g of dry sewage sludge sample. This volume allows the analytes to come in contact with the whole sample. In order to attain sorption equilibrium and to allow complete evaporation of methanol from samples, the mixtures were shaken on a vortex mixer for 10 min and were then left to stand for 24 h at room-temperature in the dark before analysis.

2.5. Basic procedures

2.5.1 Ultrasound-assisted extraction

Dried samples of 1.0 g sewage sludge were weighted into stainless steel capsules and 10 mL of the ethyl acetate were added. The capsules were vortexed for 2 min and sonicated for 20 min at 70% amplitude. Four samples could be simultaneously extracted. Only one extraction cycle was required. The extract was centrifuged for 30 min at $3634 \times g$. The supernatant was then decanted into an amber glass vial and evaporated to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen. 500 μ L of the initial mobile phase containing the internal standard were added to dissolve the residues.

The obtained extract was centrifuged again at $3634 \times g$ for 30 min and supernatant was directly injected into the LC system.

2.5.2 *Microwave-assisted extraction*

A sample of 1.0 g of sewage sludge was placed in a microwave vessel, 10 mL of ethyl acetate were added as well as 400 μL of Milli-Q water were added to the sample to facilitate the heating process. Ten vessels were processed simultaneously; extracted for 10 min (10 min for holding) at 90°C and 1000 W of power. In the Ethos unit, the pressure is controlled automatically, and overpressure complications are thus avoided. Only one extraction cycle was required. After microwave irradiation, an air flow cooled the vessels inside the microwave unit ($< 45^\circ\text{C}$). The extracts were centrifuged for 30 min at $3634 \times g$ and the supernatants decanted into a glass vial. After evaporation to dryness under a stream of nitrogen at 50°C , the residues were re-dissolved in 500 μL of the initial mobile phase, containing the internal standard, centrifuged again at $3634 \times g$ for 30 min and directly injected into the LC system.

2.5.3 *Pressurized liquid extraction*

A sample of 1.0 g of sewage sludge was transferred into an 11 mL stainless steel extraction cell of the Dionex extractor. The operating conditions were as follows: extraction temperature, 100°C ; extraction pressure, 1000 psi; preheating period, 2 min; static extraction period, 8 min; number of extraction cycles, 3; solvent flush, 30% of the cell volume and nitrogen purge, 75 s. Ethyl acetate was used as extraction solvent. Final extraction volume was approximately 15 mL. The extracts were evaporated

to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen and 500 µL of the initial mobile phase containing the internal standard were added to dissolve the residues. The extracts were centrifuged for 30 min at $3634 \times g$, and the supernatants were directly injected into the LC system.

2.5.4 Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis

The chromatographic analysis was performed using a Gemini C₁₈ column (100 mm × 2.0 mm i.d., 3 µm particle size) and a C₁₈ guard column, both supplied by Phenomenex (Torrance, CA, USA). The flow rate was 350 µL min⁻¹, the column was maintained at 40 °C and the injection volume was 40 µL. A gradient mobile phase consisting of 0.025% (v/v) ammoniacal aqueous solution (solvent A) and 0.025% (v/v) ammonia in methanol (solvent B) was used. Gradient conditions were: 0.0–3.5 min, 60% B; 3.5–4.0 min, 60–100% B; 4.0–5.0 min, 100% B and back to 60% in 1.0 min. The total run time was 6 min, and the post-delay time for reconditioning the column with 60% B was 4 min.

The mass spectrometer operated in negative APCI and in MRM mode, and Q1 and Q3 quadrupoles were set at unit mass resolution. Mass spectrometric conditions were optimized for each compound by continuously infusing the standard solutions (50 µg mL⁻¹). The ion source temperature was maintained at 350 °C. The IonSpray voltage was set at -3 kV. Nitrogen was used as curtain gas at 30 psi and as ion source gas 1 and 2 at 50 and 30 psi, respectively; collision gas was air at 10 psi. The horizontal and vertical positions of the interface were 3 mm. Additional parameters that were optimized (MRM transitions, potentials and dwell times of the target compounds and BPA-d₁₆) are shown in Table 1.

Table 1

Selected MRM transitions and optimised potentials of the target compounds.

Compound	Transitions	Dwell time (ms)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CX P (V)	Retention time (t _R , min)
BPA	227.2→212.2 ^a	685.7	-41	-255	-10	-30	-30	6.01
	227.2→132.9 ^b							
Cl-BPA	261,1→182,1 ^a	600.0	-45	-170	-10	-40	-18	5.01
	261,1→210,0 ^b							
Cl ₂ -BPA	295,1→244,1 ^a	428.6	-42	-240	-9	-30	-25	4.17
	295,1→215,2 ^b							
Cl ₃ -BPA	329,1→250,1 ^a	471.4	-46	-150	-10	-47	-31	1.94
	329,1→278,0 ^b							
Cl ₄ -BPA	365,0→314,2 ^a	214.3	-50	-260	-10	-41	-31	1.34
	365,0→286,1 ^b							
BPA-d ₁₆	241.2→142.0 ^a	428.6	-43	-160	-11	-32	-20	5.78

^a MRM transition used for quantification; ^b MRM transition used for confirmation.

DP, declustering potential; FP, focusing potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential.

For quantification, the most abundant transition was selected to obtain the maximum sensitivity. The interscan delay was set at 5 ms. In terms of sensitivity, the most influential parameters were declustering potential (DP) and collision energy (CE). Only one transition was selected for the internal standard because the selected substance is an isotopically labelled compound that is unlikely to be found in environmental samples.

3. Results and discussion

3.1. Liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis

The optimization of the chromatographic separation and the signal intensity was carried out using a 100 ng g⁻¹ standard mixture of compounds. A Gemini C18 LC column (100 mm × 2 mm i.d., 3 μm particle size) from

Phenomenex (Torrance, CA, USA) and an Acquity UPLC column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size) from Waters (Mildford, MA, USA) were evaluated. Although both columns offered similar resolution for all compounds, the Gemini C18 column was chosen because the Acquity column generated pressures close to the maximum allowed by the system.

A mixture of pure methanol and water, as mobile phase, was used as the initial conditions. In order to improve ionization processes, several additives in the mobile phase were tested. First, an aqueous solution of 1% (v/v) acetic acid as solvent A was evaluated because acid mobile phases help to suppress the ionic mobility of the analytes, thus ensuring appropriate retention on the stationary phase [32, 33]. The sensitivity for the detection of BPA did not improve with these conditions. Alkaline additives were also studied because the ionization of compounds with phenolic groups (acid groups) is better achieved under basic conditions. A 20 mM solution of ammonium formate, a mixture of 5 mM of acetic acid and 5 mM triethylamine and a 0.025% (v/v) solution of ammonia were assayed. The best results were obtained with ammonia, which was also added to methanol (solvent B) at the same concentration. ESI and APCI interfaces in positive and negative modes were compared with the different additives. APCI interface in negative mode provided the optimal ionization for all analytes.

The effect of flow rate, column temperature and injection volume on BPA detection was also studied. Flow rates from 0.1 to 0.35 mL min⁻¹ were tested and this parameter significantly improved the resolution, peak shape, intensity of the response, and retention times. 0.35 mL min⁻¹ was selected as optimal flow rate. Temperatures from 30 °C to 50 °C were assayed, but the influence of this parameter was not significant; 40 °C was selected as working temperature. Finally, injection volumes from 5 to 40 µL were

evaluated, 40 μL providing a clear increase in sensitivity with only a slight peak broadening and without loss of resolution.

3.2. Optimization of pressurized liquid extraction

Given the hydrophobicity and physicochemical characteristics of sludge, the physical sorption of BPA to sludge plays a dominant role in the fate of this pollutant in WWTPs [34, 35]. Parameters such as pH, solvent, as well as the most influential variables affecting the PLE procedure were evaluated. Samples spiked with 200 ng g^{-1} were used for optimization. The initial PLE conditions were as follows: temperature, $75 \text{ }^\circ\text{C}$; pressure, 1500 psi; static extraction time, 5 min, two cycles; purge time, 120 s and 30% of flush volume [36]. Figures of the extraction optimization are shown in the supplementary material.

3.2.1 Optimization of extraction pH and solvent

Mixtures of aqueous buffer solutions at different pH and methanol (1:4) were evaluated. McIlvaine buffer solution [31] and NaOH solution were used. The assay showed that the recoveries were pH-dependent but they were very low (65%) in all cases. There was a pH interval (2-6) where the recovery of all analytes was optimum. Different slightly acidified extraction solvents (acetone, ethyl acetate, methanol, dichloromethane and a mixture of acetone-hexane (50:50, v/v)) were evaluated and ethyl acetate was selected as the compromise solvent, offering recoveries $> 80\%$ for all compounds. Dichloromethane and acetonitrile offered recoveries $< 70\%$.

3.2.2 Selection of significant PLE variables by Plackett–Burman design

Plackett–Burman design (PB) was used in the preliminary optimization process to determine the most influential factors in PLE, given the multiple parameters involved in this extraction technique [37]. The experimental PB design resulted in 12 experiments plus three replicates for the central point. Variables were examined at two levels, low and high, as well as the intermediate level for the central point. A total of seven variables were analyzed: pressure (600 and 1700 psi), temperature (60 and 160 °C), static time (4 and 12 min), number of extraction cycles (1 and 5), preheating time (0 and 5 min), N₂ purge time (30 and 120 s) and flush (30 and 150%). Figure 1 shows the statistically significant effect of each variable.

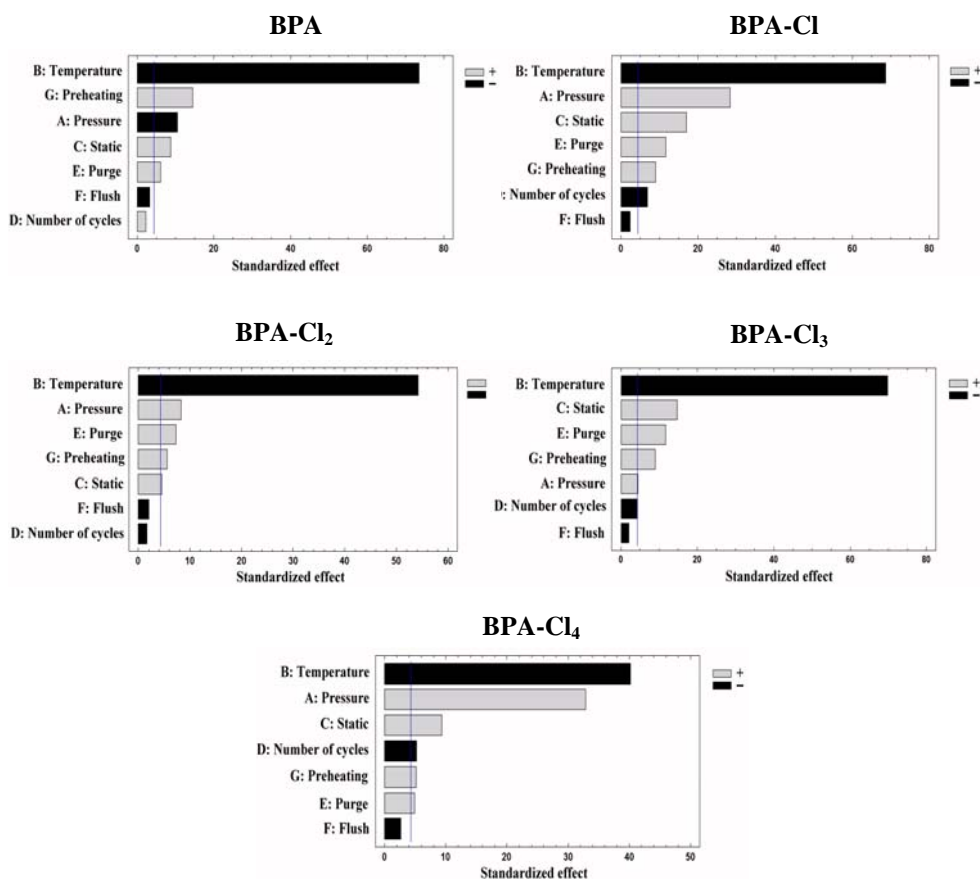


Figure 1. Standardized main effect Pareto charts for the Plackett–Burman design.

A 95% confidence interval was used for the statistical evaluation of the results. A minimum t -value —indicated by the vertical line in Figure 1— was obtained. Variables with higher t -values were considered as statistically significant factors. The temperature of the system was the most statistically significant parameter in all cases. Flush (%) was not an influential factor, and it was therefore set at the minimum value (30%), enough to remove the extracted analytes, clean the system and avoid extreme dilutions of the extracts preventing handling of large volumes. The remaining significant parameters, such as pressure, static, preheating and purge times were positive for all compounds, except for BPA, where

pressure had a negative effect. The number of extraction cycles was the least influential variable.

3.2.3 Optimization of the PLE variables

The first variables that were optimized were temperature and pressure. An increase in temperature has a negative effect on the recoveries of analytes, especially in cases of highly chlorinated BPAs. A temperature of 100 °C was selected. Probably, the higher amounts of matrix components that are extracted at higher temperatures affect the extraction of the analytes. This could be a first evidence of significant matrix effects. Pressure did not seem to have a pronounced effect on recoveries, except for very high pressures. A value of 1000 psi was selected because values > 1000 psi had a negative effect on BPA.

Since extraction time and number of cycles are closely related and there is a chance of interaction between them, the optimization was done according to a Doehlert experimental design [38]. The Doehlert matrix consisted of 9 experiments, including three central points. Five levels for number of extraction cycles (from 1 to 5) and three levels for static time (from 4 to 12 min) were considered. After analyzing the results, both parameters, particularly their quadratic terms, resulted statistically significant for all compounds. In general, static time showed a positive influence, whereas the cycles had a negative effect. Significant interactions between the variables were also observed. A static time of 8 min and 3 cycles were the chosen compromise values. The response surfaces are included in the supplementary material.

Finally, three different preheating times were evaluated and 2 min was set as optimal. Purge was also found to be an influential variable; however,

according to the PB design and as reported by previous studies [39], its influence is not crucial. The value for this parameter was established at 75 s.

3.3. Optimization of ultrasound-assisted extraction

The most influential variables in USE, in addition to extraction solvent, are extraction time and amplitude. To investigate the effects of these parameters on extraction efficiency, a new multivariate Doehlert experimental design was applied. The design involved 9 experiments that included the 3 central point replicates. Slightly acidified ethyl acetate was used as extraction solvent. The extraction time was studied at five levels (from 5 to 20 min). Extraction times > 20 min were not evaluated because they resulted in system overheating. Three levels for the amplitude (from 25% to 75%) were evaluated. The maximum amplitude was 75% so as not to reduce the lifespan of the ultrasound probe. The extraction volume was 20 mL, considering the high volume rates used in previous studies [20].

The application of analysis of variance (ANOVA) showed that the influence of time and amplitude is statistically significant. In general, the recovery rates for all analytes increased with extraction time and amplitude, the latter having a more significant influence on the recovery. Optimal amplitudes were between 60% and 70%, whereas extraction time varied between 16 and 20 min. The final conditions selected were 20 min and 70% amplitude, providing high extraction efficiency (between 76 and 87%) for all analytes. The response surfaces are included in the supplementary material.

The effect of the extraction volume and the extraction cycles was also studied. Volumes of 5, 10, 15 and 20 mL of solvent were assayed and a

volume of 10 mL proved enough for extraction of the analytes providing the highest possible recoveries for each compound.

As for the number of extraction cycles, 1, 2 and 3 cycles were carried out. Recoveries did not show statistically significant differences with increase in the number of extraction cycles. One single cycle was therefore carried out.

3.4. Optimization of microwave-assisted extraction

The nature of the solvent, temperature, and irradiation time were investigated. Different solvents were assayed. In order to improve the heating of the solvent during the extraction, 400 μ L of Milli-Q water were added to 1.0 g of sludge before the addition of 10 mL of extraction solvent. The microwave power was set at 1000 W (maximum power allowed for the unit) so all the solvents could reach the selected temperatures for this test. The use of ethyl acetate—used in PLE and USE—was investigated because it has a low dielectric constant and it might not be suitable for MAE. The most efficient solvents in all cases were acetone and ethyl acetate, with recoveries close to 100%. Methanol and acetonitrile showed very low recoveries. Ethyl acetate was also selected as extraction solvent for MAE.

The effect of temperature and irradiation time was also evaluated according to a Doehlert design. Five levels of irradiation time (from 5 to 30 min) and three levels for extraction temperature (from 80 to 100 °C) were evaluated. Since the objective was to obtain the highest recoveries avoiding solvent saturation, 10 mL of solvent, as well as only one extraction cycle was employed, considering the high recoveries that were obtained at these conditions in previous assays. The response surfaces are included as supplementary material.

According to the ANOVA test results, in general, irradiation time had a more significant influence than temperature on recoveries, and the quadratic terms for both parameters also played a decisive role in the determination of optimal values. Additionally, significant interactions were observed between both factors. The optimal temperatures fell within a very narrow interval (88 to 90 °C), and 90 °C was selected as compromise temperature. The selection of the optimal irradiation time was more complicated because of the wide variation interval (10 to 18 min) and because of the significant influence of its quadratic term. Ten minutes was selected as the compromise extraction time. The selected conditions provided recoveries > 93.7%. Longer extraction times and higher temperatures were associated with a significant reduction of recoveries. However, given the characteristic thermal stability of BPA and its chloroderivatives [40], this reduction of recoveries probably is not due to their degradation during the extraction process. The reason for this may be that the higher amounts of matrix components that are extracted at high temperatures and the long extraction times interfere with the determination of the analytes.

3.5. Comparison of extraction techniques

3.5.1 Extraction efficiency

The results of the comparison the extraction efficiency of the three techniques showed statistically significant differences (Figure 2a).

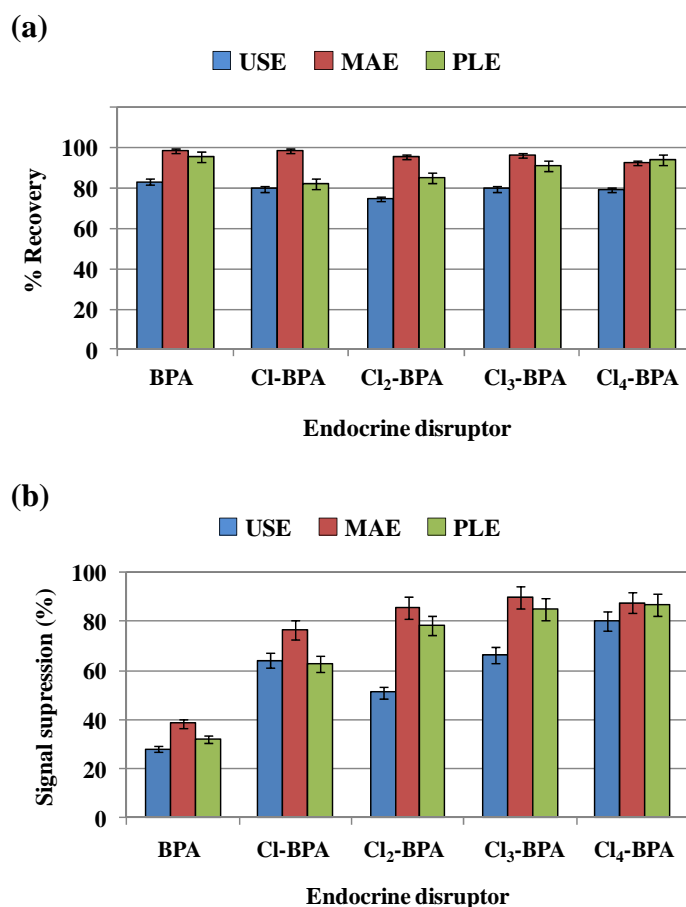


Figure 2. (a) BPA and its chlorinated derivatives extraction efficiencies by the three evaluated techniques. BPA (LSD = 4.62); Cl-BPA (LSD = 2.31); Cl₂-BPA (LSD = 3.68); Cl₃-BPA (LSD = 4.83); Cl₄-BPA (LSD = 3.49). (b) Percentages of MS ion suppression in sewage sludge extracts obtained from the evaluated extraction techniques. BPA (LSD = 4.12; Cl-BPA (LSD = 1.35); Cl₂-BPA (LSD = 2.91); Cl₃-BPA (LSD = 1.16); Cl₄-BPA (LSD = 1.51). Significance level of 95% was selected for all cases.

MAE and PLE provided the highest recoveries, demonstrating that temperature and pressure are crucial parameters in the extraction efficiency of the studied EDCs. Moreover, since the five analytes evaluated showed a similar behaviour, it can be concluded that the extraction efficiency of the analytes depends on the extraction technique rather than on the particular

characteristics of the compounds, the extraction solvent or the amount of sample.

3.5.2 Matrix effects

Matrix effects were evaluated by calculating the percentage of signal suppression in the extracts obtained with the three extraction techniques. The peak areas from the analysis of spiked sludge extracts were compared with the ones corresponding to the spiked solvent (mobile phase) at the same concentration levels [41]. The results of signal suppression in extracts spiked with 200 ng g^{-1} of the studied analytes are shown in Figure 2b. In general, matrix effects were significantly different between the three techniques. The highest signal suppression was observed in MAE extracts. This is probably due to the more drastic experimental conditions that MAE uses, which facilitate the extraction of matrix components responsible for signal suppression. It was also noted that PLE extracts resulted in more matrix effects than USE extracts. Moreover, higher chlorination levels of BPA were associated with higher signal suppression. This behaviour was observed with all the extraction techniques, therefore, it can be concluded that chlorination makes BPA more susceptible to matrix components.

3.6. Method validation

A seven-point matrix-matched calibration curve was obtained for each method in the range from the limit of quantification to $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. BPA-d₁₆ was used as internal standard in all cases. Each calibration level was made in triplicate and analyzed twice. The curves for each extraction technique were compared (*t*-Student test) with the ones generated in solvent (mobile

phase). Statistically significant differences were observed between the slopes for the matrix-matched calibration curves and their corresponding in the solvent for the three methods and for the five analytes. This confirms that the correct quantification of the analytes in sludge samples requires the use of matrix-based calibration curves. The analytical methods were validated in terms of linearity, selectivity, sensitivity and accuracy (trueness and reproducibility). Table 2 shows the main calibration and validation parameters.

Table 2
Analytical and statistical parameters.

Parameter ^a	USE				
	BPA	Cl BPA	Cl ₂ BPA	Cl ₃ BPA	Cl ₄ BPA
R ²	99.94	99.93	99.94	99.98	99.96
n	42	42	42	42	42
b (g ng ⁻¹)	2.1·10 ⁻²	1.7·10 ⁻²	8.9·10 ⁻³	7.2·10 ⁻³	4.1·10 ⁻³
s _b (g ng ⁻¹)	1.1·10 ⁻⁴	1.1·10 ⁻⁴	5.1·10 ⁻⁵	2.4·10 ⁻⁵	2.1·10 ⁻⁵
s _{y/x}	0.174	0.165	0.080	0.038	0.031
LOD (ng g ⁻¹)	4	4	4	2	3
LOQ (ng g ⁻¹)	13	14	14	8	11
LDR (ng g ⁻¹)			LOQ - 1000		
Parameter ^a	MAE				
	BPA	Cl BPA	Cl ₂ BPA	Cl ₃ BPA	Cl ₄ BPA
R ²	99.86	99.70	99.80	99.86	99.89
n	42	42	42	42	42
b (g ng ⁻¹)	1.3·10 ⁻²	1.2·10 ⁻²	5.5·10 ⁻³	3.3·10 ⁻³	1.7·10 ⁻³
s _b (g ng ⁻¹)	1.1·10 ⁻⁴	1.4·10 ⁻⁴	5.7·10 ⁻⁵	2.8·10 ⁻⁵	1.4·10 ⁻⁵
s _{y/x}	0.178	0.225	0.089	0.043	0.026
LOD (ng g ⁻¹)	6	9	7	6	7
LOQ (ng g ⁻¹)	21	30	24	20	23
LDR (ng g ⁻¹)			LOQ - 1000		
Parameter ^a	PLE				
	BPA	Cl BPA	Cl ₂ BPA	Cl ₃ BPA	Cl ₄ BPA
R ²	99.89	99.94	99.82	99.77	99.80
n	42	42	42	42	42
b (g ng ⁻¹)	7.3·10 ⁻³	1.3·10 ⁻²	5.8·10 ⁻³	3.8·10 ⁻³	1.5·10 ⁻³
s _b (g ng ⁻¹)	7.7·10 ⁻⁵	5.5·10 ⁻⁵	4.3·10 ⁻⁵	1.7·10 ⁻⁵	
s _{y/x}	0.085	0.120	0.086	0.066	0.025
LOD (ng g ⁻¹)	5	4	7	8	8
LOQ (ng g ⁻¹)	18	14	23	26	25
LDR (ng g ⁻¹)			LOQ - 1000		

^a R² = determination coefficient; n = points of calibration; b = slope; s_b = slope standard deviation; s_{y/x} = regression standard deviation; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification; LDR = linear dynamic range.

Linearity. The linear correlation coefficient (R^2) and the *lack-of-fit* test (P_{lof}) were used to evaluate linearity. Good linearity was observed within the concentration range from the limit of quantification to $1 \mu\text{g g}^{-1}$.

Selectivity. The specificity of the method could be demonstrated by LC-MS/MS analysis of blank samples. The chromatograms of a blank sample and a spiked blank sample were compared with the chromatograms of the five evaluated compounds that were extracted with the three extraction methods. Figure 3 shows a characteristic MRM chromatogram of extracts obtained by USE, MAE and PLE for a spiked sample (a-c), natural samples (d-f) and a blank (g). These observations prove the high selectivity of the methods.

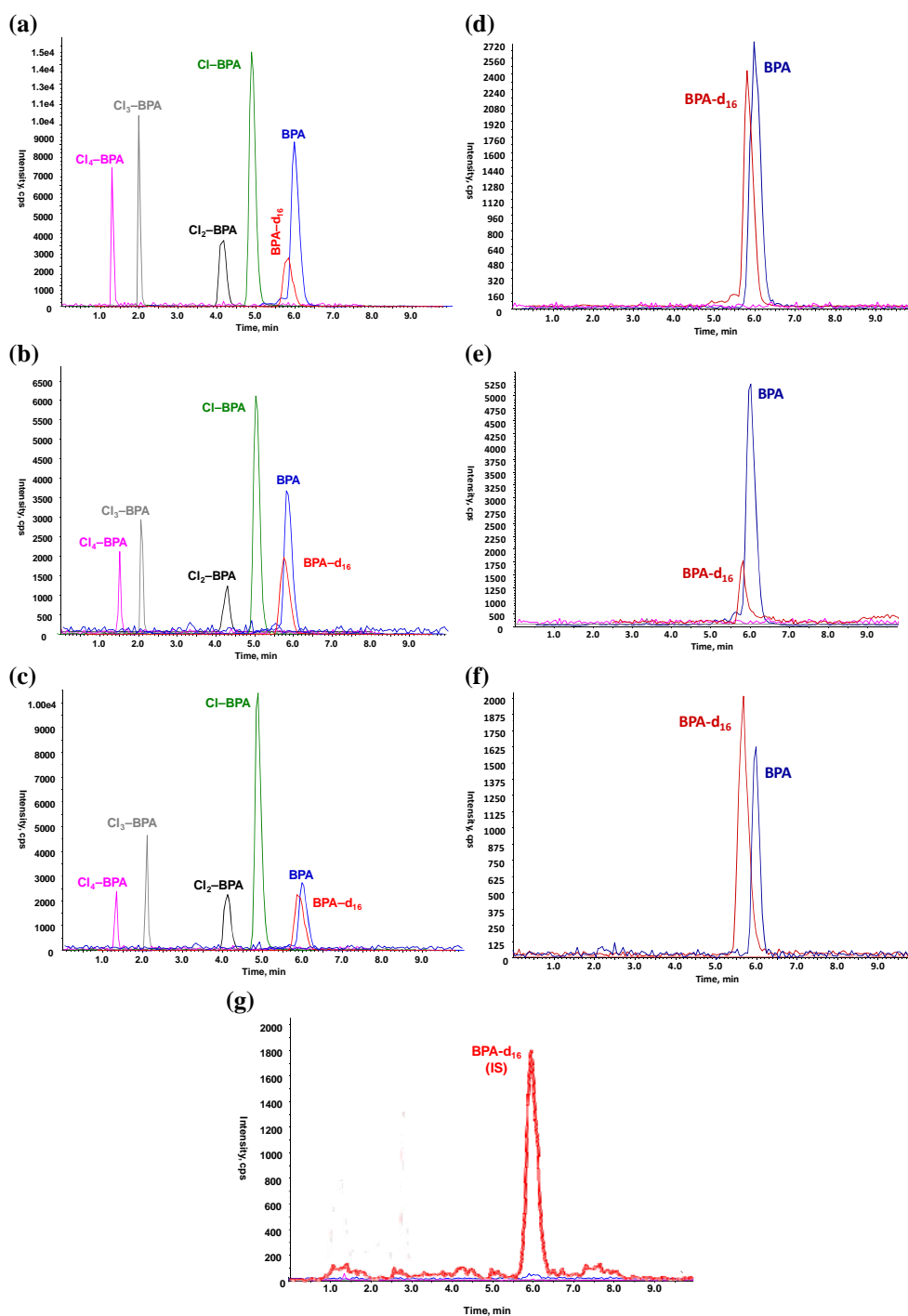


Figure 3. MRM mode chromatograms of the extracts of the same spiked sewage sludge sample obtained by (a) USE, (b) MAE and (c) PLE; and natural sewage sludge samples by (d) USE, (e) MAE and (f) PLE. (g) Chromatogram of a not contaminated (blank) sewage sludge sample.

Sensitivity. Two fundamental aspects need to be examined in the validation of any analytical method to determine whether an analyte is present in the sample: the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ). These parameters were determined as the minimum detectable amount of analyte with a signal-to-noise ratio of 3 and 10 for the LOD and LOQ, respectively. Table 2 shows the values obtained.

Accuracy (precision and trueness). The precision of the method in terms of intra- and inter-day variability was evaluated at three concentration levels (50, 250 and 500 ng g⁻¹). Precision (expressed as relative standard deviation, RSD, %) was determined from triplicate spiked sludge samples during the same day (repeatability) and in nine different days (reproducibility). The values obtained are summarized in Table 3.

Table 3
Accuracy of the methods. Precision and trueness of target compounds in samples.

Extraction technique	Spiked level (ng g ⁻¹)	BPA			Cl-BPA		
		Trueness Recovery (%) ^a	Precision		Trueness Recovery (%) ^a	Precision	
			Intra-day ^b (%)	Inter-day ^c (%)		Intra-day ^b (%)	Inter-day ^c (%)
USE	50	99.8	1.2	1.9	100.2	0.9	2.0
	250	99.4	1.2	1.6	101.7	1.4	2.5
	500	97.9	1.0	2.1	98.9	0.8	1.3
MAE	50	99.8	1.6	2.7	98.9	3.5	5.3
	250	100.6	3.1	3.5	97.0	1.1	1.5
	500	98.7	1.0	3.7	97.2	1.7	2.1
PLE	50	99.4	1.0	1.6	99.0	1.6	2.4
	250	99.5	1.0	1.3	100.6	1.0	2.0
	500	99.4	0.7	0.9	99.3	1.3	1.7
Extraction technique	Spiked level (ng g ⁻¹)	Cl ₂ -BPA			Cl ₃ -BPA		
		Trueness Recovery (%) ^a	Precision		Trueness Recovery (%) ^a	Precision	
			Intra-day ^b (%)	Inter-day ^c (%)		Intra-day ^b (%)	Inter-day ^c (%)
USE	50	98.4	0.7	1.8	100.6	0.4	3.4
	250	101.3	2.1	3.1	100.2	0.5	1.8
	500	99.6	1.2	1.5	99.8	1.4	2.0
MAE	50	99.0	0.4	3.1	101.3	3.5	4.4
	250	101.0	1.9	2.8	101.4	0.8	2.2
	500	99.3	0.9	3.0	99.8	1.8	3.6
PLE	50	99.0	2.8	3.2	99.7	3.8	4.9
	250	98.9	3.0	4.0	97.7	2.3	4.6
	500	99.4	1.8	2.4	99.7	1.3	2.5
Extraction technique	Spiked level (ng g ⁻¹)	Cl ₄ -BPA					
		Trueness Recovery (%) ^a	Precision				
			Intra-day ^b (%)	Inter-day ^c (%)			
USE	50	99.0	1.3	2.8			
	250	103.1	2.0	3.4			
	500	99.2	1.4	2.0			
MAE	50	97.2	1.0	3.2			
	250	99.3	2.5	4.0			
	500	98.7	0.6	3.9			
PLE	50	98.7	4.6	5.7			
	250	97.7	3.1	4.9			
	500	99.3	2.1	5.0			

^aMean value of 54 determinations; ^bRSD (%), relative standard deviation. (n=6); ^cRSD (%), relative standard deviation. (n=54)

RSD values fell between 0.4% and 5.7%. The data indicated that the methods are highly reproducible and robust. Additionally, due to the absence of certified reference materials (CRMs), a recovery assay was carried out to validate the methods in terms of trueness. Blank spiked samples previously analyzed to ensure they did not contain the compounds of interest or that these were below the LODs of the method were used. Trueness was evaluated by determining the recovery of known amounts of tested compounds in sludge samples. As is shown in Table 3, the recoveries are close to 100% (97.0% to 103.1%) in all cases.

3.7. Comparison of methods

BPA concentration was determined in different sewage samples using UAE, MAE and PLE with the aim of comparing statistically the efficiency of these extraction techniques. Regression curves were used for comparing the analytical methods [42]. The assays were performed by using samples from two different WWTPs of the province of Granada (Spain) and at two different concentration ranges. The results are presented in Table 4.

Table 4
Method comparison results by linear regression.

Analyte (Concentration range)	Compared methods (<i>x</i> vs <i>y</i>)	Slope	Intercept	n	r
BPA (24 – 206 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	0.998	-0.207	42	0.999
	PLE vs USE	1.006	-0.111	42	0.999
	PLE vs MAE	1.004	-0.340	42	0.999
BPA (116 – 700 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	0.999	0.426	14	0.998
	PLE vs USE	1.001	-0.211	14	0.999
	PLE vs MAE	0.999	0.198	14	0.998

A bias < 1%, excellent correlation coefficients, and insignificant intercepts were obtained at both concentration ranges. This demonstrates

that the three extraction techniques evaluated are completely reliable. Difference-plots between the analyzed sludge samples were also calculated (Figure 4) helping to determine the agreement or disagreement between methods. The differences between concentrations in every split sample were plotted against the means of each pair. This plot allows us to investigate any possible relationship between the measurement error and the true value. We do not know the true value, so that the mean of the two measurements is the best estimate. The lack of agreement between methods is measured by the deviation of the points from the horizontal nil-bias line. In general, there was a narrow scatter around the zero line of no difference, with a homogeneous distribution above and below the zero line, graphically suggesting the absence of significant proportional systematic errors between the evaluated methods.

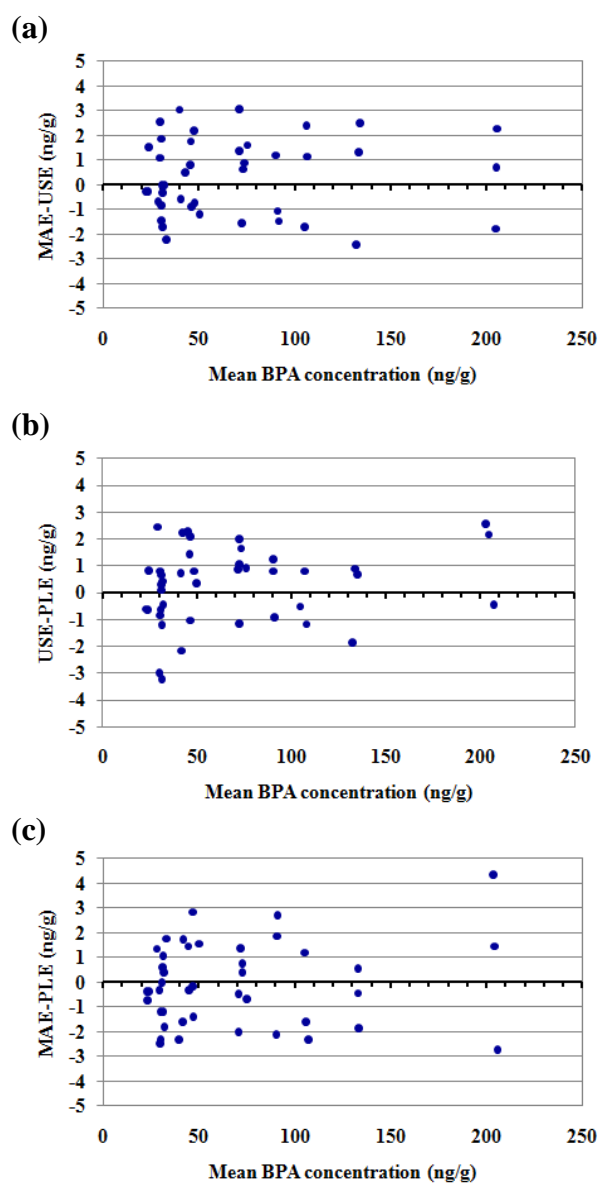


Figure 4. Overview of difference-plots for the comparison of the extraction techniques for the determination of BPA in sludge samples in the concentration range of 24–206 ng g⁻¹.

This proves that the variation in measurements was mainly due to random measurement errors, therefore confirming the reliability of the extraction techniques evaluated. The use of one technique or another is

determined by other factors such as throughput of samples and cost-related issues. The initial investment to purchase MAE or PLE units is very high, but the use of these techniques will “repay” the costs because serial samples can be extracted in a fraction of the time, with a higher degree of automation compared to USE. Nonetheless, the proposed USE procedure has the advantage of using simpler equipment and similar amounts of solvent than MAE and PLE. Although USE provided lower recoveries, it showed the least amount of signal suppression; therefore it was not observed a reduction in the sensitivity of the method in relation to the LODs and LOQs. Consequently, USE must also be considered as an appropriate and robust technique for the extraction of these contaminants from sewage sludge samples.

4. Conclusions

In this paper, we present the analytical procedures applied to USE, MAE and PLE and LC–MS/MS for the determination of BPA and its chlorinated derivatives in complex sewage sludge matrices. Although the obtained extracts showed significant matrix effects, the optimization of the extraction techniques, together with the sensitive detection and quantification by LC–MS/MS, allowed the validation of the analytical performance of the methods, achieving low LODs (between 2 and 9 ng g⁻¹), high recoveries and precision. MAE and PLE showed the highest extraction yields, with short extraction times, easy operation and shorter analysis times, due to the high degree automation of these procedures. USE offers a simpler extraction procedure, requiring similar amounts of solvent than MAE and PLE, but it requires longer analysis times. Despite the differences in the extraction procedures, the three methods exhibited similar analytical

parameters in relation to sensitivity, selectivity, accuracy and precision. The results showed no statistically significant differences between the three extraction techniques for the determination of BPA. Therefore, the use of one technique versus another is not determined by analytical factors but rather by price-related factors. One of the most important contributions of this work is the demonstration that the three evaluated extraction techniques are valid, offering accurate and precise determination of compounds.

Acknowledgements

This study was supported by the regional Government of Andalusia (Research Contract N° 3017-00 and Project N° P09-CTS-4470) and by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (Project N° CTQ2011-24210). The authors are grateful to the Spanish Ministry of Foreign Affairs (Agency for International Cooperation) for the fellowship granted to N. Dorival-García.

References

- [1] US EPA, Office of Research and Development, EPA/630/R-36/012 (1997).
- [2] S. Pflieger-Bruss, H.C. Schuppe, W.B. Schill, *Andrologia* 36 (2004) 337.
- [3] P. Nicolopoulou-Stamati, M.A. Pitsos, *Hum. Reprod. Update* 7 (2001) 323.
- [4] I.N. Damgaard, K.M. Main, J. Toppari, N.E. Skakkebaek, *Best Pract. Res. Cl. En.* 16 (2002) 289.

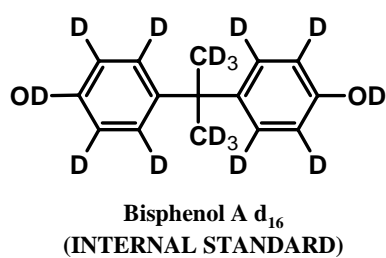
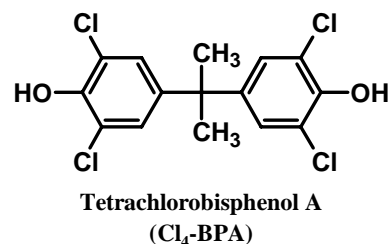
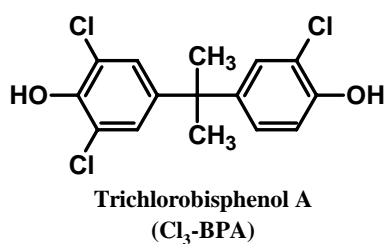
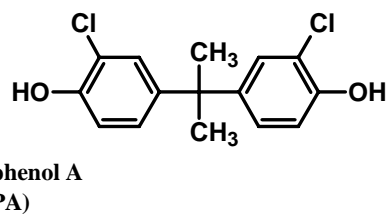
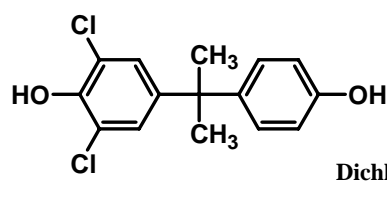
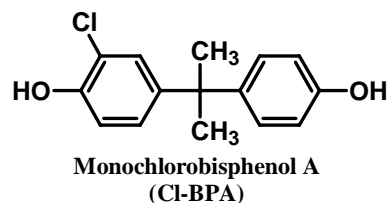
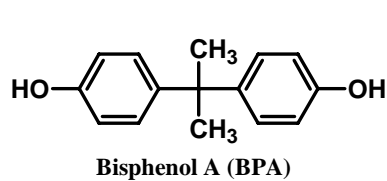
- [5] F. Ingerslev, E. Vaclavik, B. Halling-Sorensen, *Pure Appl. Chem.* 75 (2003) 1881.
- [6] F. Anca Caliman, M. Gavrilescu, *Clean* 37 (2009) 277.
- [7] W.V. Welshons, S.C. Nagel, F.S. Vom Saal, *Endocrinology* 147 (2006) S56.
- [8] Y. Sui, N. Ai, S.H. Park, J. Rios-Pilier, J.T. Perkins, W.J. Welsh, C. Zhou, *Environ. Health Persp.* 120 (2012) 399.
- [9] L.N. Vandenberg, R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, W.V. Welshons, *Reprod. Toxicol.* 24 (2007) 139.
- [10] E.C. Bonefeld-Jørgensen, M. Long, M.V. Hofmeister, A.M. Vinggaard, *Environ. Health Persp.* 115 (2007) 69.
- [11] M. Furuya, K. Adachi, S. Kuwahara, K. Ogawa, Y. Tsukamoto, *Life Sci.* 78 (2006) 1767.
- [12] C. Erler, J. Novak, *J. Pediatr. Nurs.* 25 (2010) 400.
- [13] C.L. Stowell, K.K. Barvian, P.C.M. Young, R.M. Bigsby, D.E. Verdugo, C.R. Bertozzi, T.S. Widlanski, *Chem. Biol.* 13 (2006) 891.
- [14] J.D. Meeker, S. Sathyanarayana, S.H. Swan, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364 (2009) 2097.
- [15] S.K. Khanal, B. Xie, M.L. Thompson, S.S. Sung, S.K. Ong, J. Van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 6537.
- [16] L.N. Vandenberg, M.V. Maffini, C. Sonnenschein, B.S. Rubin, A.M. Soto, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 75.
- [17] H. Fukazawa, M. Watanabe, F. Shiraishi, H. Shiraishi, T. Shiozawa, H. Matsushita, Y. Terao, *J. Health Sci.* 48 (2002) 242.
- [18] S.R. Smith, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 367 (2009) 4005.
- [19] V.G. Samaras, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2549.

- [20] T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 701.
- [21] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 32.
- [22] Y. Niea, Z. Qianga, H. Zhanga, C. Adams, *J. Chromatogr. A* 1216 (2008) 7071.
- [23] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, B. Albero, A.I. García-Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2415.
- [24] T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *Talanta* 85 (2011) 1825.
- [25] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2513.
- [26] M. Barriada-Pereira, M.J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández, *Talanta* 71 (2007) 1345.
- [27] M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4560.
- [28] Y. Yu, Q. Huang, J. Cui, K. Zhang, C. Tang, X. Peng, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 891.
- [29] S. Chu, G.D. Haffner, R.J. Letcher, *J. Chromatogr., A* 1097 (2005) 25.
- [30] J.L. Vilchez, M. del Olmo, A. González-Casado, A. Navalón, Spanish Patent No. 2190852 (2005).
- [31] T.C. McIlvaine, *J. Biol. Chem.* 49 (1921) 183.
- [32] A. Zafra-Gómez, O. Ballesteros, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Microchem. J.* 88 (2008) 87.
- [33] T.C.R. Santos, J.C. Rocha, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 3.
- [34] J. Zhao, Y. Li, C. Zhang, Q. Zeng, Q. Zhou, *J. Hazard. Mater.* 155 (2008) 305.

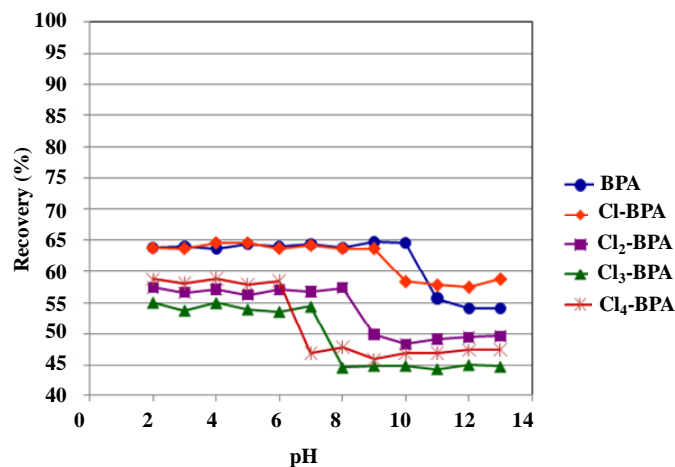
- [35] M. Clara, B. Strenn, E. Saracevic, N. Kreuzinger, *Chemosphere* 56 (2004) 843.
- [36] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 224.
- [37] R.L. Plackett, J.P. Burman, *Biometrika* 33 (1946) 305.
- [38] S.L.C. Ferreira, W.N.L. dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta* 63 (2004) 1061.
- [39] J.L. Luque-García, M.D. Luque De Castro, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 41.
- [40] A. Zafra, M. Del Olmo, B. Suárez, E. Hontoria, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Water Res.* 37 (2003) 735.
- [41] A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta* 80 (2009) 363.
- [42] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Limited, Essex, 5th ed., 2005.

Supplementary Material

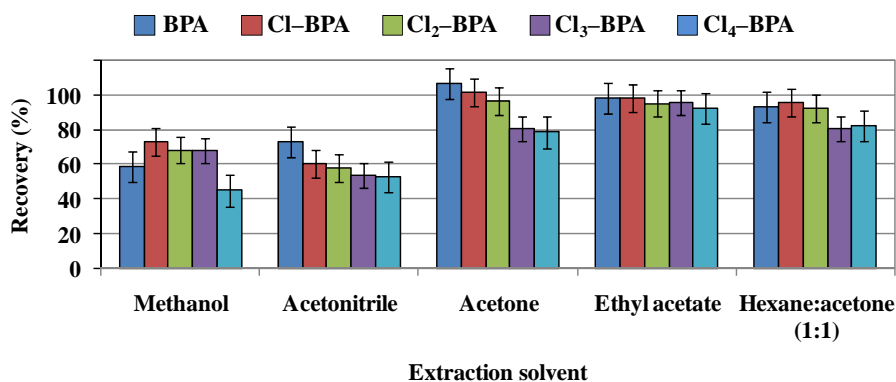
Structural formula and acronyms of the studied EDCs. BPA-d₁₆ was used as internal standard.



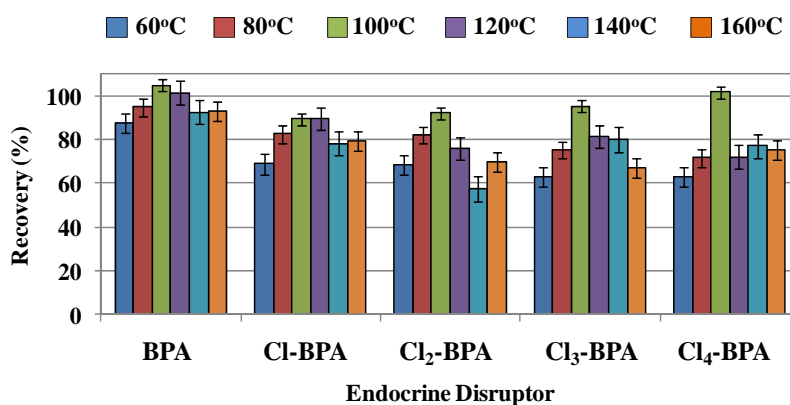
Influence of pH in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives by PLE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) followed by PLE with a mixture of McIlvaine buffer solution and methanol (1:4) and LC-MS/MS analysis. The buffer solution was adjusted at different pH values.



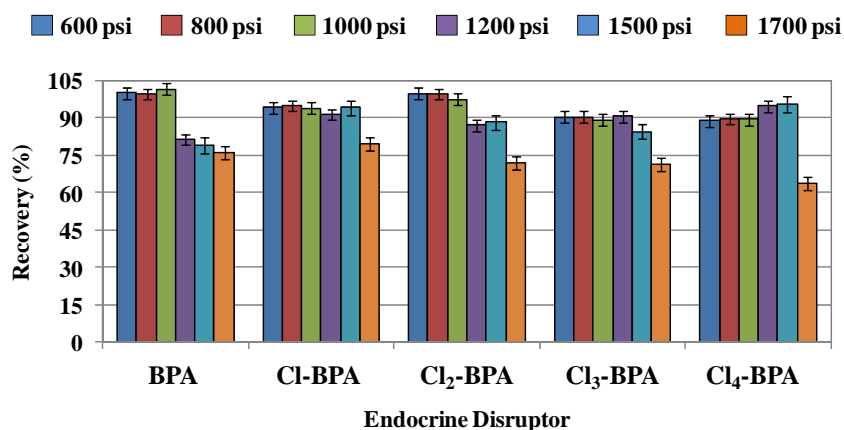
Recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) followed by PLE with different solvents and LC-MS/MS analysis.



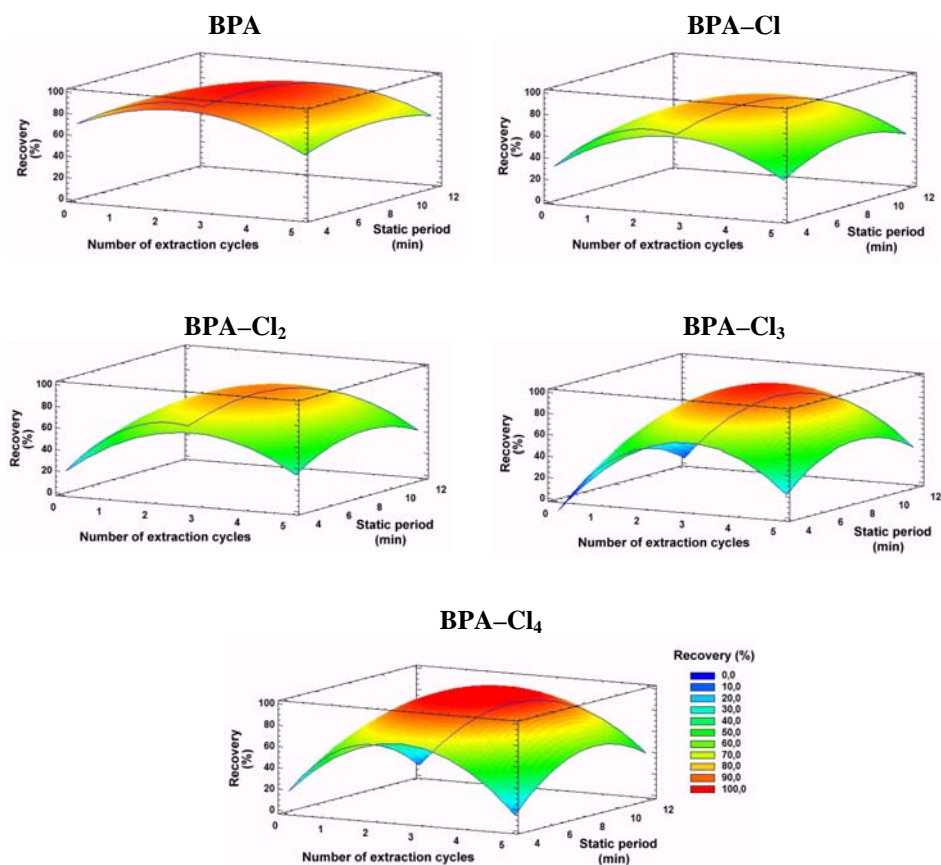
Optimization of temperature in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge using PLE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) and extracted at the following PLE conditions: Preheating, 2.5 min; Pressure, 1150 psi; Static, 8 min; Number of extraction cycles, 3; Purge, 75 s; Flush, 30%.



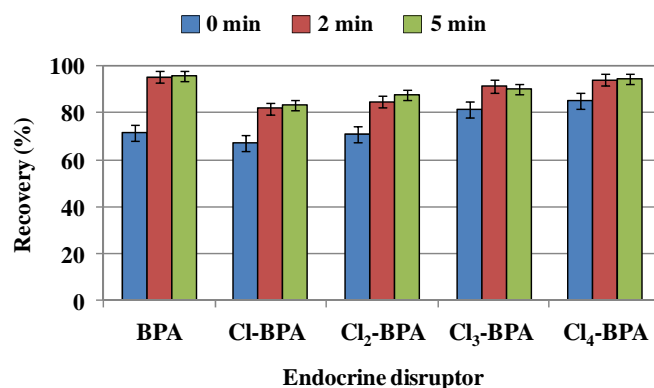
Optimization of pressure in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge using PLE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) and extracted at the following PLE conditions: Preheating, 2.5 min; Temperature, 100°C; Static, 8 min; Number of extraction cycles, 3; Purge, 75 s; Flush, 30%.



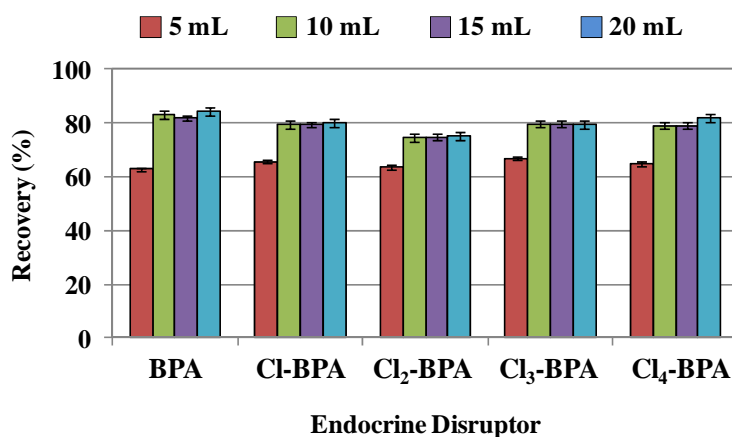
Optimization of number of cycles and time in PLE. Response surfaces for BPA and its chlorinated derivatives according to Doehlert experimental design. Recovery of spiked sludge samples (200 ng g^{-1}) is shown as a function of number of extraction cycles and static time.



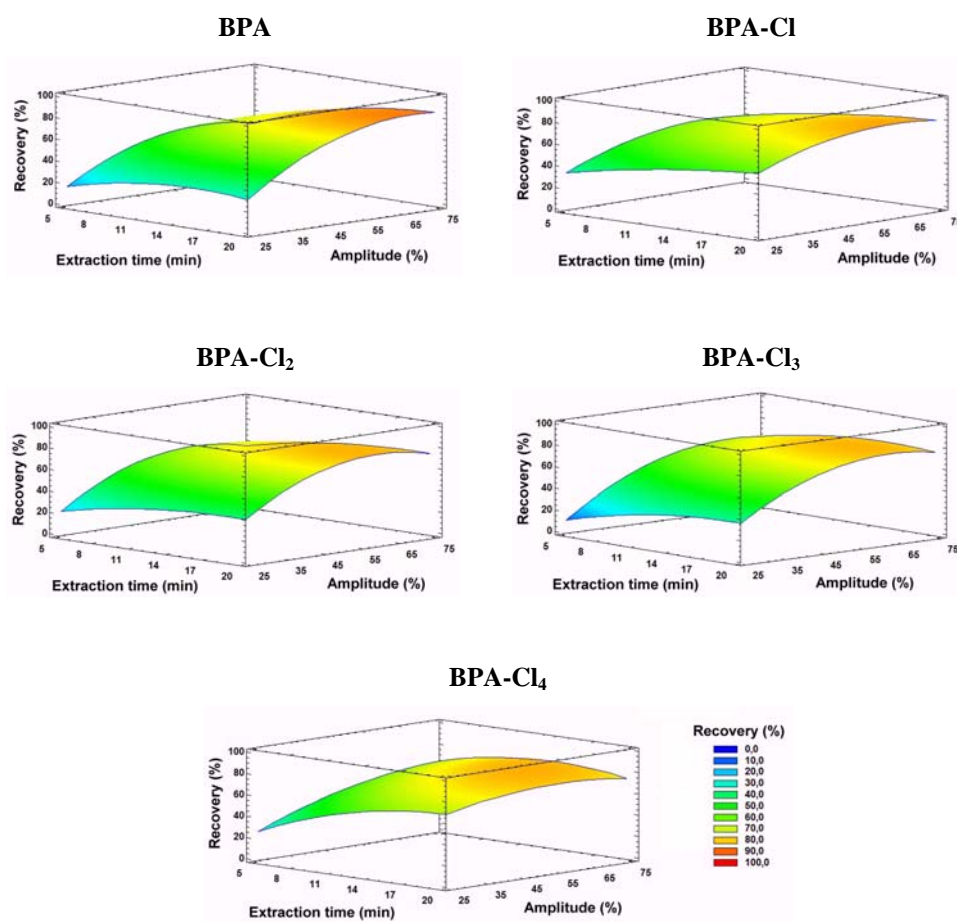
Optimization of preheating time in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge using PLE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) and extracted at the following PLE conditions: Temperature, 100°C ; Pressure, 1000 psi; Static, 8 min; Number of extraction cycles, 3; Purge, 75 s; Flush, 30%.



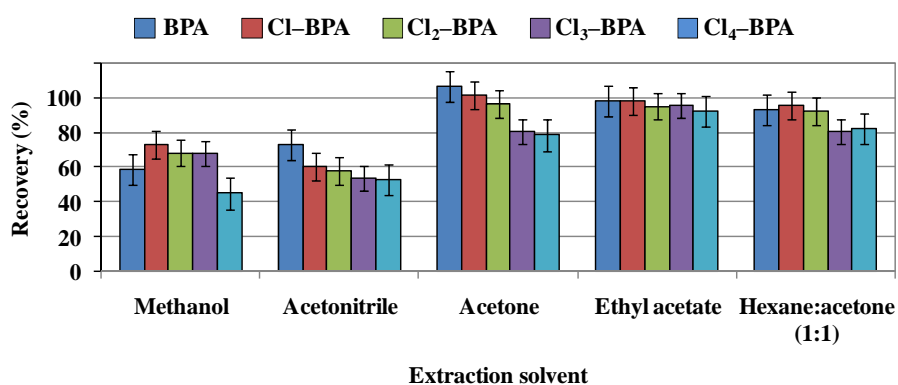
Optimization of extraction volume in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge by USE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) and extracted with ethyl acetate. USE conditions: amplitude, 70%; extraction time, 20 min; one extraction cycle.



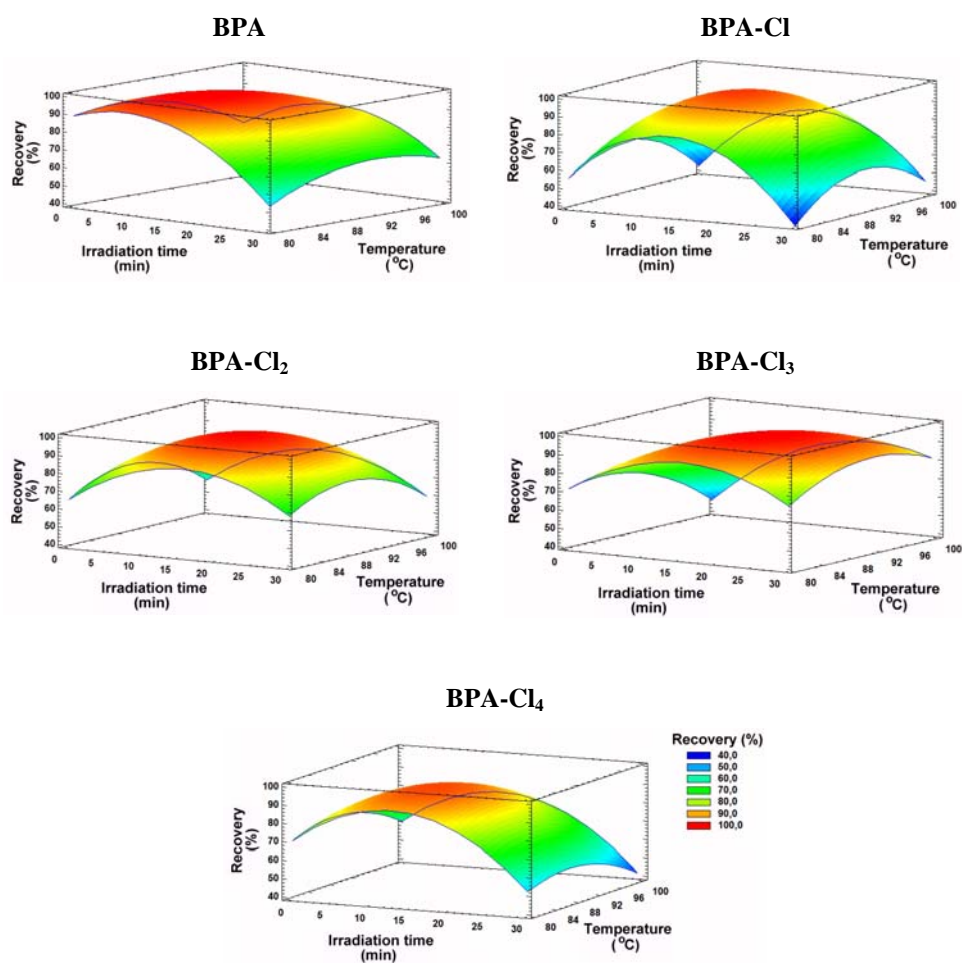
Optimization of number of cycles and time in USE. Response surfaces for studied endocrine disruptors according to Doehlert experimental design. Recovery of spiked sludge samples (200 ng g^{-1}) is shown as a function of extraction time and amplitude, using 20 mL of ethyl acetate as extraction solvent and 1 extraction cycle.



Optimization of extraction solvent in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge using MAE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) and extracted with different solvents at the following MAE conditions: temperature, 100°C ; extraction time, 15 min; microwave power, 1000 W; one extraction cycle.



Optimization of Irradiation time and temperature in MAE. Response surfaces for BPA and its chlorinated derivatives according to Doehlert experimental design. Recovery of spiked sludge samples (200 ng g^{-1}) is shown as a function of temperature and irradiation time.



3. PUBLICACIÓN III

Talanta, 101: 1-10
DOI: 10.1016/j.talanta.2012.08.045

Improved sample treatment for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry

N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez*, A. Navalón, J.L. Vilchez

Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

ABSTRACT

A selective, sensitive, robust and accurate method for the determination of bisphenol A (BPA) and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is presented. Prior to instrumental analysis, an extraction procedure using pressurized liquid extraction (PLE) was carried out in order to obtain the highest recoveries and improve sensitivity. After LC separation, the MS conditions, in negative atmospheric pressurized chemical ionization (APCI) mode, were individually optimized for each analyte to obtain maximum sensitivity in the selected reaction monitoring (SRM) mode. The use of two reactions for each compound allowed simultaneous quantification and identification in one run. The analytes were separated in less than 6 min.

BPA-d₁₆ was used as internal standard. The limits of detection of the method ranged from 4 to 8 ng g⁻¹ and the limits of quantification from 14 to 26 ng g⁻¹, while inter- and intra-day variability was under 6% in all cases. Due to the absence of certified materials, the method was validated using matrix-matched calibration and a recovery assay with spiked samples. Recovery rates ranged from 97.7% to 100.6%. The method was satisfactorily applied for the determination BPA and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples collected from wastewater treatment plants (WWTPs) located in the province of Granada (Spain). The sludge samples came from a conventional activated sludge (AS) plant and from a membrane bioreactor (MBR) pilot plant.

Keywords: Endocrine disrupting chemicals; Bisphenol A; LC-MS/MS; Sewage sludge; Pressurized liquid extraction; Matrix effect.

* Corresponding author: Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

1. Introduction

The impact on human health and environment of endocrine disrupting chemicals (EDCs), even at ng L^{-1} levels, is increasingly becoming an important focus for scientific research [1]. EDCs encompass a wide variety of synthetic and natural chemicals that have the ability to mimic hormones and might, therefore, interfere or disrupt normal hormonal functions [2]. Exposure to EDCs has become a highly controversial public health issue. Although sexual differentiation has been the major endpoint for the toxicological assessment of EDCs, concern with these substances also stems from their potential to affect reproductive, metabolic, immune and development functions, growth, behaviour and memory [3]. Effects of EDCs are associated with reduced fertility, congenital malformations of the reproductive tract, and increased incidence of cancer in estrogen-responsive tissues [4]. Recent studies are focused on anthropogenic EDCs, such as synthetic hormones used as contraceptives, a variety of pharmaceuticals and personal care products, as well as large amounts of industrial chemicals, with bisphenol A (BPA), PCBs, dioxins, pesticides, phthalates, alkylphenols and alkylphenol ethoxylates being of special importance [5].

In recent years, most attention has focused on exposure to BPA, a widely used industrial plasticizer with known estrogenic properties. Over 2.000 million tons/year of BPA are used in the manufacture of epoxy resins and polycarbonate plastics, which are, in turn, used in a wide variety of domestic products [6]. BPA is present in dental fillings, plastic food and water containers, baby bottles, food wrap, as well as in the lining of beverage and food cans, presenting a large number of routes for human exposure. Numerous studies have confirmed leaching of BPA from food containers, and detectable levels of BPA have been found in a wide range of

packaged foods [7] being oral exposure the primary source of human exposure to BPA [8]. BPA also accounts for most estrogenic activity that leaches from landfills into the surrounding ecosystem; effluent from industrial activity, including treatment of leachate, may serve as an additional route of human exposure, particularly if it finds its way into aquatic species [9]. Wastewater containing BPA is also a source of contamination of aquatic environments from where BPA could reach ground waters, rivers, streams and, eventually, drinking water, resulting in a continuous low-level exposure to BPA [6, 7]. Even the low levels of BPA found in aquatic ecosystems pose a serious threat to aquatic life [10].

On the other hand, due to its highly lipophilic behaviour, BPA also tends to strongly associate with particulate matter and can, therefore, be found in solid matrices, such as sewage sludge produced during wastewater treatment [11, 12]. This represents a serious hazard because the use of sewage sludge as organic amendment of soils has become a common practice in Europe since the last decade, facilitating the “arrival” of these pollutants to humans through the food chain [13]. Given the ubiquity of BPA in human environments, it is not surprising that exposure to BPA is virtually universal. It is also known that BPA easily reacts with sodium hypochlorite—used as bleaching agent in paper factories and in water disinfection—to produce chlorinated derivatives of BPA (mono-, di-, tri- and tetrachlorobisphenol A) (ClBPAs) that can be released into the environment [14]. BPA chloroderivatives, especially tri- and tetrachlorobisphenol A, also represent a serious concern, because in both, *in-vitro* and *in-vivo* studies, they have proved to be even more active than BPA in competing with 17β -estradiol for human estrogen receptors- α and $-\beta$ (ER- α and ER- β) binding sites [15], even at lower concentrations than BPA [14, 16]. Furthermore, using human breast carcinoma MCF7 cells, it was

determined that ClBPAs had greater potential to stimulate growth than BPA [17], which was also confirmed in *in-vivo* experiments performed with ovariectomized female rats. In addition to their strong estrogenic activity, BPA and their chloroderivatives caused a significant increase in the weight of the uterine tissue and endometrium, leading to an increased risk of cancer. Chronic exposure to ClBPAs even at very low doses may cause more uterotrophic activity than BPA [17]. In chicken and frogs, it was reported that ClBPAs inhibited the binding of 3,3',5-triiodothyronine (T3) to transthyretin (TTR), responsible for the plasma transport of thyroid hormone, more strongly than BPA [18].

On the other hand, the effects of chlorination on the acute toxicity of BPA and its derivatives have raised concerns because they have not been clarified yet. It is known that ClBPAs can photodegrade, producing more toxic oxygen reactive species. Acute cytotoxicity of ClBPAs was increased by UVB and UVC irradiation [19]. These results are interesting, because ClBPAs, which return to the environment from wastewater treatment after a slow and even failed biodegradation [20, 21], will be exposed to sunlight that will enhance their cytotoxicity by the generation of photodegradation subproducts.

Moreover, it is known that BPA is metabolized to glucuronide in rat liver [22] and the metabolites are rapidly eliminated in the faeces and urine, but ClBPAs are degraded slowly and accumulated through the food chain in the human body where they act as persistent EDCs.

There is a growing need to determine the fate of EDCs in the environment, since it has been reported that EDCs with high estrogenic activity have a great tendency to associate with particulate matter and sediments [23]. However, although there are data regarding the levels of BPA in treated sludge, the same is not true for its chlorinated derivatives,

and this information is required to determine which processes could improve the removal of these EDCs from wastewaters in WWTPs. Furthermore, the determination of the partition coefficient between the solid and liquid phases in biological treatment units will certainly help to explain the fate and behaviour of BPA and its derivatives in WWTPs. Since the studies involving the determination of the dissolved phase fraction of these contaminants are much more numerous than those involving the determination in solid matrices, it seems reasonable to develop selective, sensitive and robust analytical methods for determination of these substances in treated sludge.

Until the 1990s, traditional approaches for the extraction of EDCs in solid matrices were based almost exclusively on Soxhlet extraction and steam-distillation. However, these techniques make the analysis procedure excessively time consuming (up to 48 h) and require large amounts of hazardous organic solvents [24]. To overcome these limitations, new extraction approaches have been developed for the extraction of organic pollutants. One of the most widely used techniques for sewage sludge matrices is ultrasound-assisted extraction (USE) [25–28]. Although this technique is considerably faster than Soxhlet extraction, it also requires relative large volumes of toxic and costly organic solvents. More efficient techniques have therefore been developed such as pressurized liquid extraction (PLE) [29–31] or microwave-assisted extraction (MAE) [32]. PLE is a very efficient technique that can be applied to thermally stable compounds. It offers important improvements over other techniques including shorter extraction time, lower amount of solvent, higher level of automation and the ability to perform multiple extractions simultaneously [33]. Moreover, although there are several methods for the determination of BPA in sludge matrices, almost all of them include a solid-phase extraction

(SPE) procedure after the extraction process; this improves preconcentration of the analytes and help reduce the matrix effect. However, these extraction methodologies lead to a long, tedious and expensive analytical process without a clear improvement of the final extracts. It is important to highlight that there are not methods for the determination of each and every chlorinated BPA in sewage sludge. Table 1 summarizes the most relevant methods available.

Table 1

Analytical methods for the determination of BPA and derivatives in sewage sludge.

Analyte	Analytical technique	LOQ	Reference
BPA	USE-SPE-GC-MS	130 ng g ⁻¹ (LOD)	[35]
BPA	USE-SPE-GC-MS	108 ng g ⁻¹	[25]
BPA	Selective pressurized liquid extraction-GC-MS	35.7 ng g ⁻¹	[37]
BPA	USE-SPE-GC-MS	1.84 µg g ⁻¹	[27]
BPA	USE-SPE-LC-MS/MS	9.8 ng g ⁻¹ (LOD)	[28]
BPA	MAE-SPE-LC-MS/MS	2.3 ng g ⁻¹	[32]
BPA	USE-SPE-UHPLC-MS/MS	0.7 ng g ⁻¹	[36]
BPA Cl ₄ -BPA	Soxhlet-SPE-LC-MS/MS	0.15 ng g ⁻¹ (BPA) 0.03 ng g ⁻¹ (Cl ₄ -BPA)	[34]

LOQ, limit of quantification; LOD, limit of detection; SPE, solid-phase extraction; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; USE, ultrasound extraction; MAE, microwave assisted extraction; GC, gas chromatography, UHPLC, ultra high performance liquid chromatography.

The main objective of the present work is to develop a rapid, robust, sensitive and accurate method for the determination of BPA and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples using PLE followed by LC-MS/MS analysis. In addition, the efficiency of the SPE procedure to reduce the matrix effect is also evaluated. The method will allow the analysis of a larger number of samples in a short time. Finally, this method

will allow the development of further research on the environmental occurrence, contamination pathways, fate and risk assessment of this important group of EDCs.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Analytical grade standards of BPA, tetrachlorobisphenol A (Cl₄-BPA) and deuterated bisphenol A (BPA-d₁₆)—used as internal standard—were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Mono-, di- and trichloro- bisphenol A (Cl-BPA, Cl₂-BPA, Cl₃-BPA) were synthesized in our laboratory [38]. Individual standard solutions of compounds (200 µg mL⁻¹) were prepared in methanol and stored at -20 °C. These solutions were prepared fresh monthly. Working standard mixtures were prepared by diluting the individual stock solution in methanol or in the initial mobile phase immediately before use. They were stored at 4 °C and prepared fresh weekly. All solutions were stored in amber glass bottles. Water (18.2 MΩ cm) was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). LC-MS grade water and methanol—used for the preparation of standards and mobile phases—were purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). Disodium hydrogen phosphate and citric acid, as well as sodium hydroxide for the preparation of McIlvaine buffer solution [39] were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Ammonia (> 25%), acetonitrile, ethyl acetate, dichloromethane, hexane and acetone were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The SPE cartridges were LiChrolut RP-18 (500 mg, 3 mL) from Merck (Darmstadt, Germany). Sample extracts were

filtered through a 0.45 μm cellulose acetate disk filter (Millipore) prior to analysis.

2.2. Instrumentation and software

Extraction procedure was performed in a Dionex Accelerated Solvent Extractor, ASE[®] 200 (Sunnyvale, CA, USA), equipped with a solvent controller. The cell tray holds 24 sample cells and 4 rinse tubes. The vial tray holds 26 collection vials and 4 rinse vials. ASE[®] 200 whole operation cycles as well as the control of modules (air and nitrogen pressure, temperature, solvent and rinse procedures) can be controlled from the ASE[®] 200 front panel.

A Crison 2000 digital pH-meter with a combined glass-Ag/AgCl (KCl 3 M) electrode (Crison Instruments S.A, Barcelona, Spain) was used for pH measurements. A vortex-mixer (Yellow line, Wilmington, NC, USA), a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttligen, Germany), and a Memmert oven (Schwabach, Germany) were also used. Statgraphics software package was used for statistical treatment of data.

2.3. Sample collection and storage

Samples of sewage sludge were collected from two WWTPs located in the province of Granada (Spain). The samples were kept in amber glass bottles and decreased biological activity was achieved by adding 1% (v/v) formaldehyde. Once in the laboratory, samples were centrifuged at $3634 \times g$ for 15 min and the solid components recovered, dried in a heater at 60 °C to constant weight and finely ground (≤ 1.41 mm). The samples were stored in the dark at 4 °C until analysis.

2.4. Preparation of fortified samples

Due to the absence of certified materials, blank samples for recovery studies were spiked at different concentrations by adding 1 mL of a methanolic standard solution containing the different analytes under study to 1.0 g of dry sewage sludge sample. This volume allows the analytes to come in contact with the whole sample. In order to attain sorption equilibrium, the mixtures were shaken for 10 min and were then left to stand for 24 h at room temperature in the dark before analysis.

2.5. Basic procedure

Dried samples of 1.0 g sewage sludge were weighted and transferred into an 11 mL stainless steel extraction cell of the Dionex extractor. Ethyl acetate was used as extraction solvent. The operating conditions were: extraction temperature, 100 °C; extraction pressure, 1000 psi; preheating period, 2 min; static extraction period, 8 min; number of extraction cycles, 3; solvent flush, 30% of the cell volume and nitrogen purge, 75 s. Final extraction volume was approximately 15 mL. The extracts were evaporated to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen and 500 µL of the initial mobile phase containing the internal standard were added to dissolve the residues. The obtained extracts were centrifuged again at $3634 \times g$ for 30 min, and supernatants were directly injected into the LC system.

2.6. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis

Detection and quantification of the analytes were performed using an Agilent 1200 series (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) LC

system equipped with a binary pump, a vacuum membrane degasser, a thermostated column compartment, an automatic autosampler and an automatic injector. The LC system is coupled “on line” to an API 2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) triple quadrupole mass spectrometer system that can use either atmospheric pressurized chemical ionization (APCI) or electrospray ionization (ESI) interfaces. Analyst software version 1.5.2 was used for instrument control, data acquisition and analysis.

Chromatographic analysis was performed using a Gemini C₁₈ column (100 mm × 2.0 mm i.d., 3 μm particle size) and a C₁₈ guard column, both supplied by Phenomenex (Torrance, CA, USA). The flow rate was 350 μL min⁻¹, the column was maintained at 40 °C and the injection volume was 40 μL. A gradient mobile phase consisting of 0.025% (v/v) ammoniacal aqueous solution (solvent A) and 0.025% (v/v) ammonia in methanol (solvent B) was used. Gradient conditions were: 0.0–3.5 min, 60% B; 3.5–4.0 min, 60–100% B; 4.0–5.0 min, 100% B and back to 60% in 1.0 min. The total run time was 6 min, and the post-delay time for reconditioning the column with 60% B was 4 min.

The mass spectrometer (MS) was operated with APCI ionization in negative ion mode. The tandem mass spectrometer was operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode and Q1 and Q3 quadrupoles were set at unit mass resolution. Mass spectrometric conditions were optimized for each compound by continuously infusing the standard solutions (50 μg mL⁻¹). The ion source temperature was maintained at 350 °C. The IonSpray voltage was set at -3 kV. Nitrogen was used as curtain gas at 30 psi and as ion source gas 1 and 2 at 50 and 30 psi, respectively; collision gas was air at 10 psi. The horizontal and vertical positions of the interface were 3 mm.

Additional parameters that were optimized included declustering potential (DP), focusing potential (FP), entrance potential (EP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP) and dwell time, in order to obtain the maximum sensitivity with the highest amount of product ions available, as well as the two most sensitive MRM transitions (one used for quantification and the other for confirmation).

For quantification, the most abundant transition was selected to obtain the maximum sensitivity. The interscan delay was set at 5 ms. In terms of sensitivity, the most influential parameters were DP and CE. Only one transition was selected for the internal standard because this substance is an isotopically labelled compound that is unlikely to be found in environmental samples.

Table 2 lists the optimized parameters for BPA and BPA-d₁₆ as well as the mass transitions and retention times.

Table 2

Selected MRM transitions, optimized voltages, dwell times and retention times of the target compounds.

Compound	Transitions	Dwell Time (ms)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	t _R (min)
BPA	227.2→212.2 ^a	685.7	-41	-255	-10	-30	-30	6.01
	227.2→132.9 ^b							
Cl-BPA	261,1→182,1 ^a	600.0	-45	-170	-10	-40	-18	5.01
	261,1→210,0 ^b							
Cl ₂ -BPA	295,1→244,1 ^a	428.6	-42	-240	-9	-30	-25	4.17
	295,1→215,2 ^b							
Cl ₃ -BPA	329,1→250,1 ^a	471.4	-46	-150	-10	-47	-31	1.94
	329,1→278,0 ^b							
Cl ₄ -BPA	365,0→314,2 ^a	214.3	-50	-260	-10	-41	-31	1.34
	365,0→286,1 ^b							
BPA-d ₁₆	241.2→142.0 ^a	428.6	-43	-160	-11	-32	-20	5.78

^a MRM transition used for quantification; ^b MRM transition used for confirmation.

DP, declustering potential; FP, focusing potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential.

3. Results and discussion

3.1. *Liquid chromatographic separation*

Preliminary studies were carried out to optimize chromatographic separation and signal intensity using a standard mixture of compounds (100 ng g⁻¹). A Gemini C18 liquid chromatography column (100 mm × 2 mm i.d., 3 μm particle size) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) and an Acquity UPLC column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm particle size) from Waters (Mildford, MA, USA) were evaluated. Although both columns offered similar resolution for all compounds, the Gemini C18 column was chosen because the Acquity column generated pressures close to the maximum allowed by the system.

3.1.1 *Effect of the interface and mobile phase on the development of the chromatographic method*

The ESI interface in negative mode and a mixture of pure methanol and water, as mobile phase, were used as initial conditions [40]. Nonetheless, the results obtained were not satisfactory because BPA showed a very low response. The MS interface was then changed to APCI and different additives were used in mobile phases to improve ionization processes. The use of 1% (v/v) aqueous acetic acid as solvent A [41] was evaluated, because acid mobile phases help to suppress the ionic mobility of the analytes, therefore, ensuring appropriate retention on the stationary phase [42]. However using these conditions, the sensitivity for the detection of BPA did not improve. Then, alkaline additives were also studied because ionization of phenolic compounds (acid groups) is better achieved under

basic conditions. A 20 mM solution of ammonium formate, a mixture of 5 mM of acetic acid and 5 mM triethylamine, and a 0.025% (v/v) solution of ammonia were assayed and the best results were obtained using ammonia, which was also added to methanol (solvent B) at the same concentration.

3.1.2 Effect of column temperature, flow rate and injection volume

In general, chromatograms of BPA and its chlorinated derivatives showed good peaks separation. However, some parameters were optimized in order to obtain strongest responses, and shorter times of analysis. First, the column temperature was optimized. Considering the manufacturer's specifications, temperatures from 30 °C to 50 °C were studied. Good peak separation was observed with all temperatures and there were no significant changes in sensitivity or peak shapes with the increase of temperature. However, temperatures > 40°C provided significantly shorter retention times. This was selected as the optimal temperature. Then, the effect of flow rates from 0.2 to 0.5 mL min⁻¹ was assayed. Although according to the product specifications, the maximum flow for the Gemini C18 column is 0.5 mL min⁻¹, pressure increased significantly at flow rates over 0.35 mL min⁻¹. Results demonstrated that the influence of the flow rate was more important than temperature and a significant improvement in resolution, intensity of peaks and marked reduction in retention times were observed with higher flow rate. A flow rate of 0.35 mL min⁻¹ was therefore chosen as the optimal flow rate. Finally, injection volumes from 5 to 40 µL (the highest acceptable injection volume) were assayed and 40 µL was selected as optimal. Although a slightly peak broadening was observed, a marked increase in sensitivity without loss of resolution was obtained. Figure 1 shows a standard chromatogram for the studied analytes.

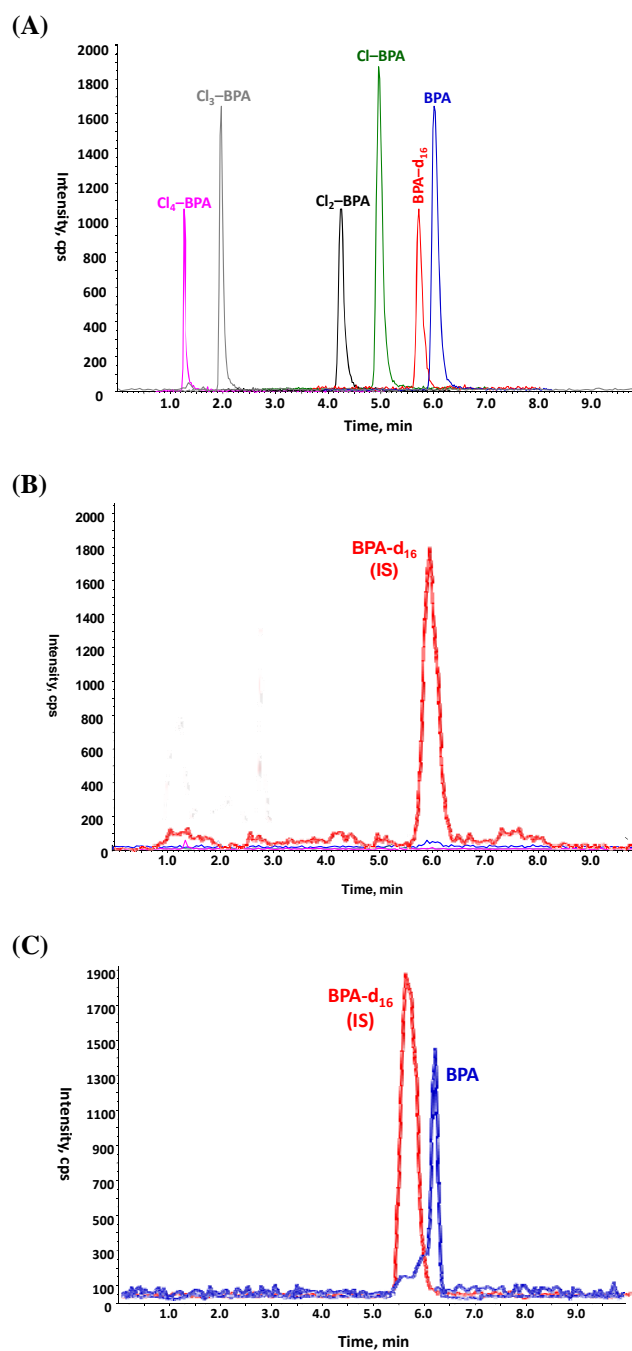


Fig. 1. MRM mode chromatograms of: **(A)** A standard mixture of BPA and its chlorinated derivatives (200 ng g^{-1} of each compound). **(B)** Not contaminated (blank) sewage sludge sample. **(C)** Contaminated sewage sludge sample with BPA. Flow rate: 0.35 mL min^{-1} , temperature: $40 \text{ }^\circ\text{C}$ and injection volume: $40 \text{ }\mu\text{L}$.

3.2. Optimization of pressurized liquid extraction (PLE)

BPA has a relatively high octanol–water partition coefficient ($\log K_{ow} = 2.2\text{--}3.8$) [43], characteristic of hydrophobic compounds. This entails poor hydrosolubility and a high tendency to sorb to organic material of the sludge matrix [44]. Sorption of BPA to sludge is mainly a physical process, which occurs rapidly when BPA comes into contact with sludge [45]. These characteristics made necessary an exhaustive optimization of the extraction process that would make possible a quantitative and selective recovery of the EDCs from sludge samples. Parameters such as pH, extraction solvent and the most influential variables affecting the PLE procedure were optimized. Samples spiked with 200 ng g^{-1} were used for optimization. The initial PLE conditions were temperature, $75 \text{ }^\circ\text{C}$; pressure, 1500 psi; static extraction time, 5 min; two cycles; purge time, 120 s, and flush volume, 30% [30]. The values of the optimization are shown in the supplementary material.

3.2.1 Effect of extraction pH

BPA and its chlorinated derivatives have phenolic groups that are weak acids; therefore, pH could have an influence in the extraction step. Mixtures of aqueous buffer at different pH and methanol (1:4) were evaluated. McIlvaine buffer solution [39] was selected because it covers a wide range of pH values (from 2 to 8). pH values from 10 to 13 were adjusted with NaOH solutions. Given the low water solubility of BPA and its chlorinated derivatives, a mixture with a higher proportion of organic solvent was used. We observed that recoveries were pH-dependent but were very low ($< 65\%$) in all cases. These recoveries were even lower at pH

values where the ionized form of analyte was more abundant. The reason for this is that the dissociated form could not be efficiently extracted using a mixture with a high percentage of organic solvent. There is a pH interval (2-6) within which the recoveries of all analytes are optimal. On the other hand, the low recoveries showed that the optimization of extraction solvent was necessary.

3.2.2 *Effect of extraction solvent*

Different extraction solvents were tested. Since we presumed that given the low water solubility of analytes, the presence of water in the extraction solvent could be the responsible for the observed low recoveries, only organic solvents were assayed. Solvents were slightly acidified with formic acid prior to extraction assays. Acetone, ethyl acetate, methanol, dichloromethane and a mixture of acetone-hexane (50:50, v/v) were evaluated. It was difficult to choose only one optimal solvent that would work for all analytes, but we observed that pure methanol instead the aqueous mixture increased the recoveries in about 20%. Nonetheless, ethyl acetate was chosen as compromise solvent because it provided higher recoveries (>80%) than methanol for all studied compounds. Dichloromethane and acetonitrile provided recoveries < 70%.

3.2.3 *Selection of significant PLE variables by Plackett–Burman design*

Plackett–Burman design (PB) was used in the preliminary optimization process to determine the most influential factors in PLE, given the multiple parameters involved in this extraction technique. The experimental PB design resulted in 12 experiments plus three replicates for

the central point. Variables were examined at two levels, low and high, as well as the intermediate level for the central point. A total of seven variables were analyzed: pressure (600 and 1700 psi), temperature (60 and 160 °C), static time (4 and 12 min), number of extraction cycles (1 and 5), preheating time (0 and 5 min), N₂ purge time (30 and 120 s) and flush (30 and 150%).

The PB design allows the screening of the most influential variables from a large number of variables. The application of the PB design was very useful in this preliminary study to differentiate the more influential variables—which will be further optimized— from those that are not. A 95% confidence interval was used for the statistical evaluation of the results. A minimum *t*-value —indicated by the vertical line in Figure 2— was obtained. Variables with higher *t*-values were considered statistically significant factors. Figure 2 shows the statistically significant effect of each variable.

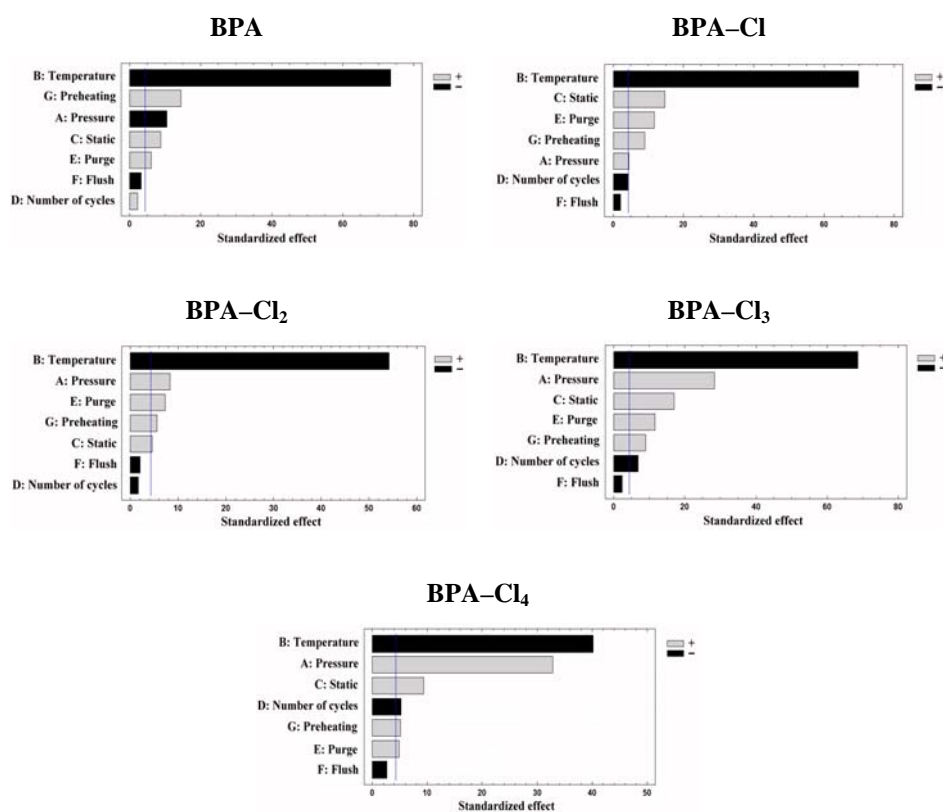


Fig. 2. Standardized main effect Pareto charts for the Plackett–Burman design.

As shown in Figure 2, temperature is the most influential parameter in all cases. Flush (%) was not an influential factor and it did not require optimization. It was set at the minimum value (30%), which was high enough to remove the extracted analytes and to clean the system but was low enough to avoid extreme dilutions of the extracts. The other significant parameters, such as pressure, static, preheating and purge times were positive for all compounds, except for BPA where pressure had a negative effect. The number of extraction cycles was the least influential variable.

3.2.4 Optimization of temperature and pressure

The first PLE variable that was optimized was temperature. The initial conditions for the other parameters were similar to that established for the central point in the PB design, except for flush value, previously determined. An increase in temperature has a negative effect on the recoveries of analytes, especially in cases of highly chlorinated BPA. A temperature of 100°C was selected as compromise temperature. Probably, the higher amounts of matrix components that are extracted at higher temperatures affect the extraction of the analytes. This could be a first evidence of significant matrix effects.

Pressure was also optimized but it did not have a pronounced effect on recoveries, except for very high pressures. A value of 1000 psi was selected because values > 1000 psi had a negative effect on BPA.

3.2.5 Optimization of extraction time and number of extraction cycles

Since the two variables are closely related and there is a chance of interaction between them, the optimization was done according to a Doehlert experimental design. The Doehlert matrix consisted of 9 experiments, including three central points. Five levels for number of extraction cycles (from 1 to 5) and three levels for static time (from 4 to 12 min) were considered. Figure 3 shows the response surfaces obtained.

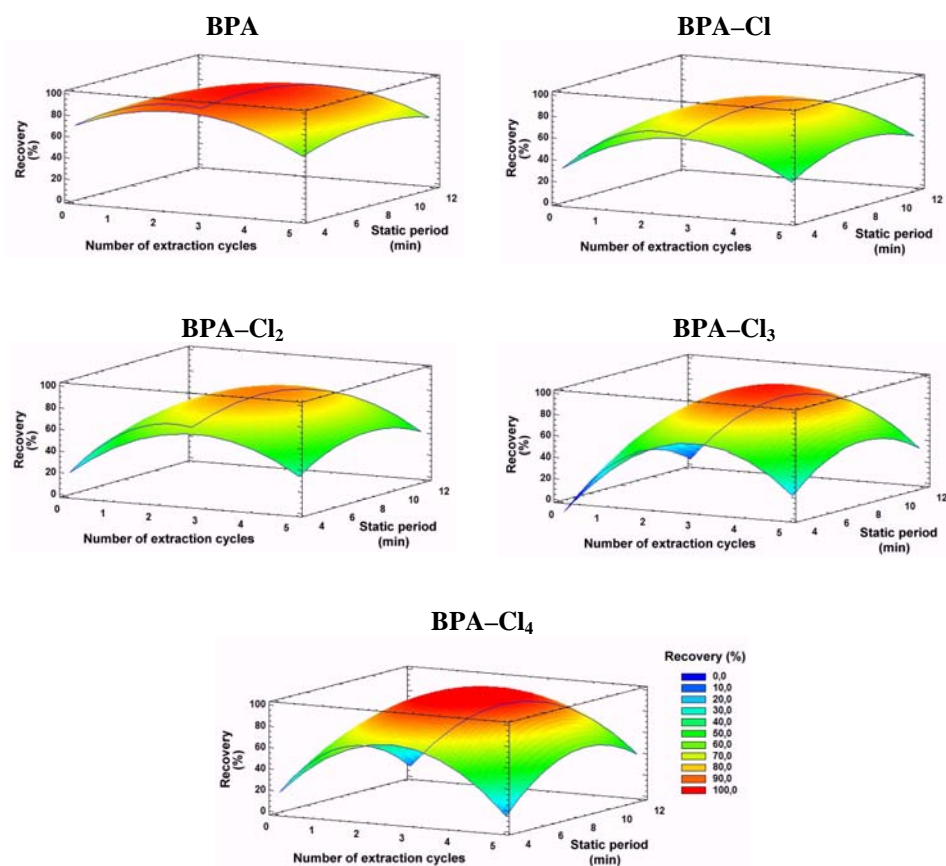


Fig. 3 Response surfaces according to Doehlert experimental design. Recovery of spiked sludge samples (200 ng g^{-1}) is shown as a function of number of extraction cycles and static time.

To identify the influence of variables on the recovery of each compound, the data were evaluated by ANOVA. The test gave a determination coefficient (R^2) over 0.969, therefore the fitted regression equations explain more than 96.9% of the total variation in the data. Since the P value for the *lack-of-fit* test is >0.05 in all cases, the model appears to be satisfactory for the obtained data at the 95% confidence level. Both parameters, particularly their quadratic terms, resulted statistically significant for all compounds. In general, static time showed a positive

influence, whereas the number of extraction cycles had a negative effect. Significant interactions were also observed between the variables. As a compromise solution, a static time of 8 min and 3 extraction cycles (or 24 min of total extraction time were selected, with recoveries > 85%.

3.2.6 Other extraction parameters

Preheating time is usually a fixed parameter that is not considered during the optimization process. However, in this study, the PB design determined that this variable had a positive effect on the extraction process by PLE, especially for BPA. Three different preheating times were evaluated and 2 min was established as the optimal value. Purge also was a significant variable but according to the PB design and as reported by other studies [46], its influence is not crucial. Its value was established at 75 s.

3.3. Method validation

The method performance was evaluated by determining the linearity, sensitivity, accuracy (trueness, repeatability, reproducibility) and matrix effects.

3.3.1 Linearity

Due to the presence of a strong matrix effect, quantification was performed by using the matrix-matched calibration, based on peak areas. BPA-d₁₆, was used as internal standard. Seven calibration points were generated in the range from the limit of quantification to 1 µg g⁻¹ dry weight. Each calibration level was made in triplicate, and analyzed twice.

The linearity was quantified by both linear correlation coefficient (R^2) and the lack-of-fit test (P_{lof}). Table 3 shows the main calibration parameters. Linearity for all compounds within this wide concentration range was achieved with R^2 ranging from 99.77% to 99.94% and P values of the *lack-of-fit* test were $> 5\%$ in all cases; these facts indicated a good linearity within the stated ranges.

Table 3
Analytical and statistical parameters.

Parameter ^a	BPA	BPA-Cl	BPA-Cl ₂	BPA-Cl ₃	BPA-Cl ₄
R^2	99.89	99.94	99.82	99.77	99.80
n	42	42	42	42	42
b (g ng ⁻¹)	$7.3 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$	$5.8 \cdot 10^{-3}$	$3.8 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$
s_b (g ng ⁻¹)	$5.5 \cdot 10^{-5}$	$7.7 \cdot 10^{-5}$	$5.5 \cdot 10^{-5}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$	$1.7 \cdot 10^{-5}$
$s_{y/x}$	0.085	0.120	0.086	0.066	0.025
LOD (ng g ⁻¹)	5	4	7	8	8
LOQ (ng g ⁻¹)	18	14	23	26	25
LDR (ng g ⁻¹)	18 – 1000	14 – 1000	23 – 1000	26 – 1000	25 – 1000

^a R^2 , determination coefficient; n, points of calibration; b, slope; s_b , slope standard deviation; $s_{y/x}$, regression standard deviation; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; LDR, linear dynamic range.

3.3.2 Selectivity

The specificity of the method could be demonstrated by LC-MS/MS analysis of blank sludge samples. Retention times of the analytes showed no interferences after analysis of the blank samples and after analysis of spiked matrices with all studied EDCs. These observations approve the high

selectivity of the LC-MS/MS method. A blank chromatogram is also shown in Figure 1.

3.3.3 Sensitivity

Two fundamental aspects need to be examined in the validation of any analytical method to determine whether an analyte is present in the sample: the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ). These parameters were determined as the minimum detectable amount of analyte with a signal-to-noise ratio of 3 and 10 for the LOD and LOQ, respectively. Table 3 shows the obtained values.

3.3.4 Accuracy: precision and trueness

To assure precise quantifications, the precision of the method in terms of intra- and inter-day variability was evaluated at three concentration levels (50, 250 and 500 ng g⁻¹). Precision was determined from triplicate spiked sludge samples at different levels during the same day (repeatability) and in nine successive days (reproducibility). Precision was expressed as relative standard deviation (RSD, %). The values obtained are summarized in Table 4. RSD values fell between 0.7% and 5.7%. Precision data indicated that method is highly reproducible and robust.

Due to the absence of certified materials, a recovery assay to validate the method in terms of trueness was carried out. Blank spiked samples previously analyzed to ensure they did not contain the compounds of interest or that these were below the LOD of the method were used. Trueness was evaluated by determining the recovery of known amounts of tested compounds in sludge samples. Samples were analyzed using the

proposed method and the concentration of each compound was determined by interpolation from the standard calibration curve within the linear dynamic range and compared with the amount of analytes previously added to the samples. As is shown in Table 4, the recoveries are close to 100% (97.7% to 100.6%).

Table 4

Accuracy of the method. Precision and trueness of target compounds in samples.

Compound	Spiked level (ng g ⁻¹)	Trueness (n = 54) Recovery (%)	Precision	
			Intra-day (%) ^a (n = 6)	Inter-day (%) ^a (n = 54)
BPA	50	99.4	1.0	1.6
	250	99.5	1.0	1.3
	500	99.4	0.7	0.9
BPA-Cl	50	99.0	1.6	2.4
	250	100.6	1.0	2.0
	500	99.3	1.3	1.7
BPA-Cl ₂	50	99.0	2.8	3.2
	250	98.9	3.0	4.0
	500	99.4	1.8	2.4
BPA-Cl ₃	50	99.7	3.8	4.9
	250	97.7	2.3	4.6
	500	99.7	1.3	2.5
BPA-Cl ₄	50	98.7	4.6	5.7
	250	97.7	3.1	4.9
	500	99.3	2.1	5.0

^a RSD (%) percentages

3.3.5 Quantification of matrix effects

Depending on the complexity of the samples, the matrix co-extracted with the analytes can modify the signal, leading to ion suppression or enhancement when using these ionization techniques. It has been reported that APCI is less sensitive to matrix effects than ESI [47], however, both ion suppression and enhancement by co-extractive substances from sample have also been observed for LC-MS/MS using APCI [48].

Some operational strategies can be used for the compensation of interference effect caused by the matrix components. Extensive cleanup procedures prior to LC-MS/MS analysis could help to reduce the introduction of matrix components into the analytical system. However, these are sometimes laborious, costly, and cannot eliminate matrix constituents efficiently. Another approach is to dilute the final sample extract as much as possible to be injected into the analytical column. In some instances, this method is effective for eliminating signal suppression, while achieving acceptable sensitivity.

Matrix effect was evaluated by calculating the percentage of signal suppression or enhancement. The peak areas from the analysis of spiked sludge extracts were compared with the ones corresponding to the spiked solvent (mobile phase) at the same concentration. The results of signal suppression in extracts are shown in Figure 4A.

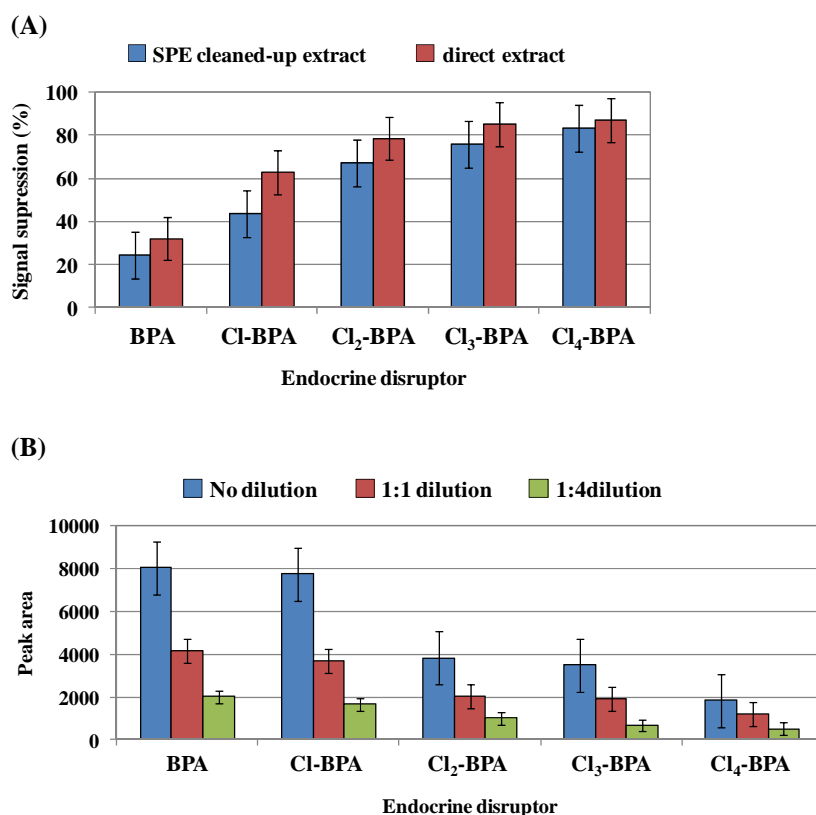


Fig. 4 (A) MS ion suppression of sludge extracts obtained from comparison of injection to LC of extracts with and without previous clean-up by SPE. (B) Sample extracts dilutions for eliminating matrix effects.

Figure 4 shows that chlorinated derivatives of BPA exhibited significant matrix effects, and the ion suppression increases with the degree of chlorination, reaching values $> 80\%$ for BPA-Cl₄. However, in spite of strong matrix effects, especially for the chlorinated derivatives, the accuracy obtained was satisfactory for the target EDCs (Table 4) because of the use of matrix matched calibration.

In order to evaluate whether the SPE clean-up reduces effectively the matrix components, a comparison of extracts was performed, one was directly injected to the LC system after the extraction procedure, following to section 2.5. The results are presented in figure 4A (left bars). The second

extract was prepared reconstituting an evaporated residue with a small volume of methanol and diluting with water until 500 mL. This aqueous solution was cleaned-up by SPE, following a procedure published elsewhere [41] and obtaining a final extract with the same concentration level than the first one. The results of signal suppression for these extracts are also shown in figure 4A (left bars). It was observed that the clean up using SPE procedures reduced the matrix effects, but not as efficiently as expected. The SPE process was not carried out in order to reduce analysis time and operational costs.

Other alternative to overcome this problem is the dilution of the extracts obtained by the extraction of sludge samples. Dilution of samples proved to be an effective approach in cases when the preconcentration of matrix components during sample preparation magnified matrix effect. In some cases, it has been noted that dilution is sufficient to minimize the signal suppression increasing the signal intensity of the analytes, thus making possible to correct the results of quantitative analysis. In this work, a process of sequential dilution (1:1 and 1:4) of extracts of sludge samples were injected into the LC–MS/MS system and the signal intensity was compared to that obtained from non-diluted extract. Dilution led in all cases to a decrease in sensitivity (Figure 4B), being therefore not a suitable alternative to improve method sensitivity by elimination of matrix effects.

3.4. Application of the method

The developed method was applied for the determination of BPA and its chlorinated derivatives in sewage sludge from two WWTPs located in the province of Granada (South-East, Spain). The sludge samples came from a conventional activated sludge (AS) plant and from a membrane bioreactor

(MBR) pilot plant. Concentration values for six replicate samples are shown in Table 5. Figure 1 also shows an example of chromatograms corresponding to some of the analyzed samples.

Table 5

Method application to samples from different WWTPs and from different treatments.

	Wastewater treatment ^b	Sample label	Concentration (ng g ⁻¹) ^a				
			BPA	BPA Cl	BPA Cl ₂	BPA Cl ₃	BPA Cl ₄
Granada	AS	GAS-1 ^c	48.3	nd	nd	nd	nd
		GAS-2 ^c	d	nd	nd	nd	nd
		GAS-3 ^c	107	nd	nd	nd	nd
		GAS-4 ^c	41.4	nd	nd	nd	nd
		GAS-5 ^c	d	nd	nd	nd	nd
	MBR	GMB-1 ^c	nd	nd	nd	nd	nd
		GMB-2 ^c	nd	nd	nd	nd	nd
		GMB-3 ^c	45.9	nd	nd	nd	nd
		GMB-4 ^c	23.5	nd	nd	nd	nd
		GMB-5	680	nd	nd	nd	nd
		GMB-6	30.8	nd	nd	nd	nd
		GMB-7	nd	nd	nd	nd	nd
		GMB-8	205	nd	nd	nd	nd
		GMB-9	31.1	nd	nd	nd	nd
Motril	AS	MAS-1	32.0	nd	nd	nd	nd
		MAS-2	133	nd	nd	nd	nd
		MAS-3	29.4	nd	nd	nd	nd

^a Mean of six determinations. ^b AS: Activated sludge treatment; MBR: Membrane bioreactor treatment. ^c Sewage samples produced from parallel treatments of AS and MBR fed with the same wastewater. nd, not detected (<LOD); d, detected (between LOD and LOQ).

None of the analyzed samples contained any of the chlorinated derivatives of BPA, but BPA appeared in several of the analyzed samples. In addition, lower concentrations of BPA were found in the sewage sludge from the MBR pilot plant than in the AS plant, both fed with similar raw

wastewater. This could prove the higher efficiency of MBR technology in the elimination of these substances from sludge.

4. Conclusions

The developed method allows extraction and analysis of BPA and its chlorinated derivatives from complex sewage sludge matrices using a sensitive procedure that involves pressurized liquid extraction, and determination and quantification by LC–MS/MS. The obtained data indicate strong MS signal suppression effects, which were not effectively reduced by a SPE clean-up step. The analytical performance of the method was validated, achieving very low LOD (between 4 and 8 ng g⁻¹), high recoveries and precision, which is an important achievement in comparison with other methods involving more clean-up procedures and using less efficient extraction techniques. This method allows for the determination of the levels of BPA and its chlorinated derivatives and it may be used to perform screening studies about the presence and final fate of these substances in the environment, taking into consideration that sludge or sludge-derived compost is used on agricultural land, where they pose a serious environmental threat.

Acknowledgements

This study was supported by the regional Government of Andalusia (Research Contract N° 3017-00) and by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (Project N° CTQ2011-24210). The authors are grateful to the Spanish Ministry of Foreign Affairs (Agency for International Cooperation) for the fellowship granted to N. Dorival-García.

References

- [1] V.K. Sharma, G.A.K. Anquandah, R.A. Yngard, H. Kim, J. Fekete, K. Bouzek, A.K. Ray, D. Golovko, *J. Environ. Sci. Health, Part A* 44 (2009) 423-442.
- [2] M. Yang, M. Seon Park, H. Sun Lee, *J. Environ. Sci. Health, Part C* 24 (2006) 183-224.
- [3] L.N. Vandenberg, M.V. Maffini, C. Sonnenschein, B.S. Rubin, A.M. Soto, *Endocrine Reviews* 30 (2009) 75-95.
- [4] E.C. Bonefeld-Jørgensen, M. Long, M.V. Hofmeister, A.M. Vinggaard, *Environ. Health Perspect.* 115 (2007) 69-76.
- [5] F. Anca Caliman, M. Gavrilescu, *Clean* 37 (2009) 277-303.
- [6] J.H. Kang, F. Kondo, Y. Katayama, *Toxicology* 226 (2006) 79-89.
- [7] I. Nascimento Filho, *Chemosphere.* 50 (2003) 657-663.
- [8] N. Ranjit, K. Siefert, V. Padmanabhan, *J. Perinatol.* 30 (2009) 2-9.
- [9] D.A. Crain, M. Eriksen, T. Iguchi, S. Jobling, H. Laufer, G.A. LeBlanc, L.J. Guillette, Jr., *Reprod. Toxicol.* 24 (2007) 225-239.
- [10] C.E. Talsness, A.J.M. Andrade, S.N. Kuriyama, J.A. Taylor, F.S. Von Saal, *Phil. Trans. R. Soc. B* 364 (2009) 2079-2096.
- [11] P. Ivashechkin, P.F.X. Corvini, M. Dohmann, *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 133-140.
- [12] D.P. Mohapatra, S.K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, *Chemosphere* 78 (2010) 923-941.
- [13] M. Petrović, E. Eljarrat, M.J. López, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 637-648.
- [14] H. Fukazawa, M. Watanabe, F. Shiraishi, H. Shiraishi, T. Shiozawa, H. Matsushita, Y. Terao, *J. Health Sci.* 48 (2002) 242-249.

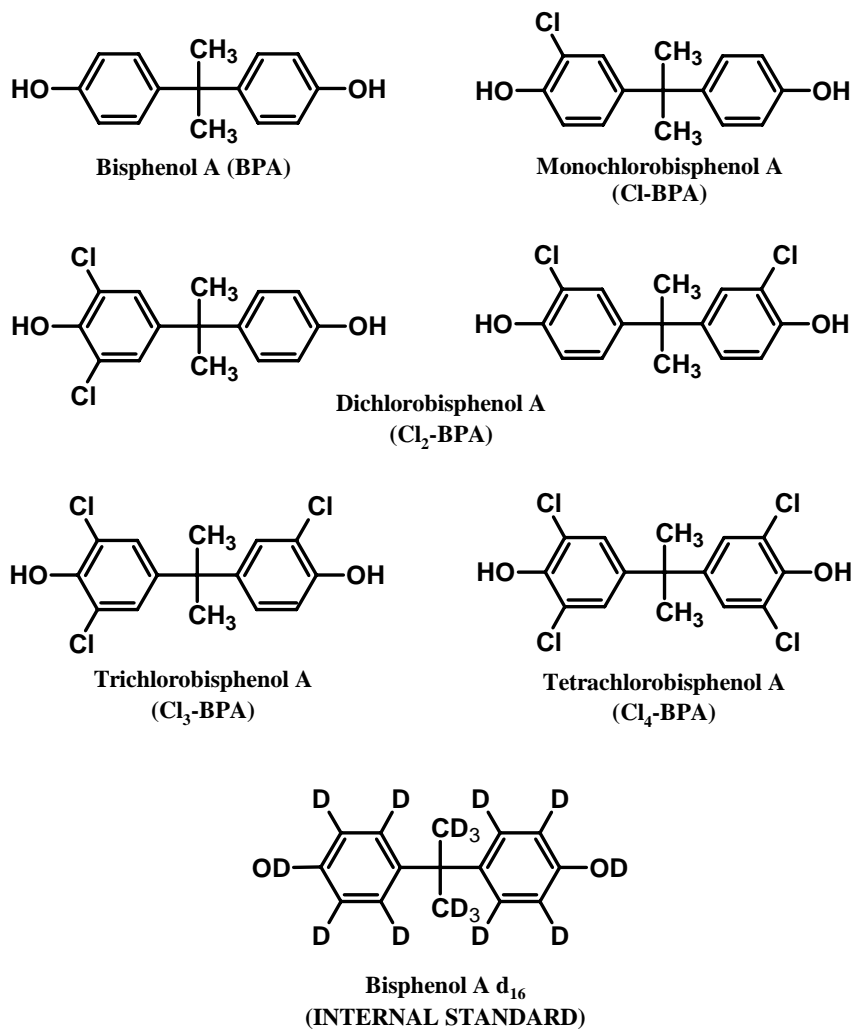
- [15] H. Ju, T. Aizawa, S. Ookubo, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1980-1987.
- [16] R. Kuruto-Niwa, Y. Terao, R. Nosawara, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 12 (2002) 27-35.
- [17] H. Takemura, J. Ma, K. Sayama, Y. Terao, B.T. Zhu, K. Shimoi, *Toxicology* 207 (2005) 215-221.
- [18] K. Yamauchi, A. Ishihara, H. Fukazawa, Y. Terao, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187 (2003) 110-117.
- [19] Y. Mutou, Y. Ibuki, Y. Terao, S. Kojima, R. Goto, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 2116-2119.
- [20] H. Fukazawa, K. Hoshino, T. Shiozawa, *Chemosphere* 44 (2001) 973-979.
- [21] R. Kuruto-Niwa, Y. Terao, R. Nozawa, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 12 (2002) 27-35.
- [22] L.H. Pottenger, J.Y. Domoradzki, D.A. Markham, S.C. Hansen, S.Z. Cagen, J.M. Waechter Jr., *Toxicol. Sci.* 54 (2000) 3-18.
- [23] M. Clara, B. Strenn, E. Saracevic, N. Kreuzinger, *Chemosphere* 56 (2004) 843-851.
- [24] M. Petrović, D. Barceló, *Chromatographia* 56 (2002) 535-544.
- [25] V.G. Samaras, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2549-2561.
- [26] Y. Niea, Z. Qianga, H. Zhanga, C. Adams, *J. Chromatogr., A* 1216 (2008) 7071-7080.
- [27] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, *J. Chromatogr., A* 1138 (2007) 32-41.
- [28] T. Vega-Morales, Z. Sosa, J.J. Santana-Rodríguez, *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 701-711.
- [29] R.J.W. Meesters, H.F. Schroder, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3566-3574.

- [30] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 224-230.
- [31] V. Gabet-Giraud, C. Miege, B. Herbreteau, G. Hernández-Raquet, M. Coquery, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 1841-1851.
- [32] T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *Talanta* 85 (2011) 1825-1834.
- [33] M. Fountoulakis, P. Drillia, C. Pakou, A. Kampioti, K. Stamatelatos, G. Lyberatos, *J. Chromatogr., A* 1089 (2005) 45-51.
- [34] S. Chu, G.D. Haffner, R.J. Letcher, *J. Chromatogr., A* 1097 (2005) 25-32.
- [35] M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4560-4567.
- [36] Y. Yu, Q. Huang, J. Cui, K. Zhang, C. Tang, X. Peng, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 891.
- [37] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2513-2522.
- [38] J.L. Vilchez, M. del Olmo, A. González-Casado, A. Navalón, Spanish Patent ES 2 190 852 A1 (2005).
- [39] T.C. McIlvaine, *J. Biol. Chem.* 49 (1921) 183-186.
- [40] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galcerán, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 4039-4048.
- [41] A. Zafra-Gómez, O. Ballesteros, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Microchem. J.* 88 (2008) 87-94.
- [42] T.C.R. Santos, J.C. Rocha, D. Barceló, *J. Chromatogr. A.* 879 (2000) 3-12.
- [43] C.A. Staples, P.B. Dom, G.M. Klecka, S.T. O'Block, L.R. Harris, *Chemosphere* 36 (1998) 2149-2173.
- [44] S. Stangroom, C. Collins, J. Lester, *Environ. Technol.* 21 (2000) 865-882.

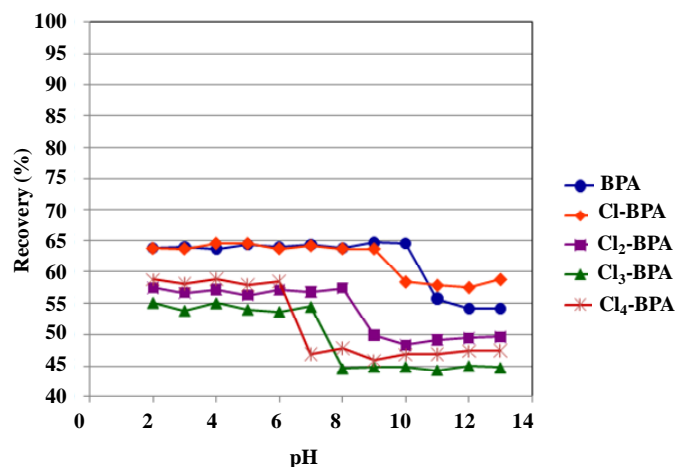
- [45] E. Lindblom, K. Press-Kristensen, P.A. Vanrolleghem, P.S. Mikkelsen, M. Henze, *Water Res.* 43 (2009) 3169-3176.
- [46] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5619-5625.
- [47] B.J. Vanderford, R.A. Pearson, D.J. Rexing, S.A. Snyder, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6265-6274.
- [48] X. Zhao, C.D. Metcalfe, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2010-2017.

Supplementary Material

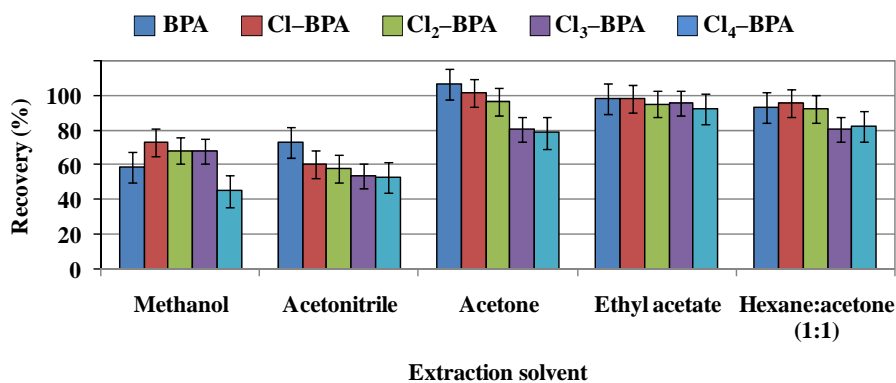
Structural formula and acronyms of the studied EDCs.



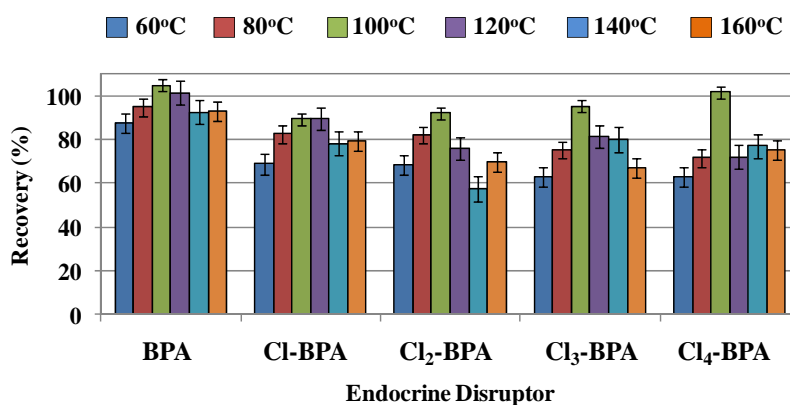
Influence of pH in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives by PLE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) followed by PLE with a mixture of McIlvaine buffer solution and methanol (1:4) and LC-MS/MS analysis. The buffer solution was adjusted at different pH values.



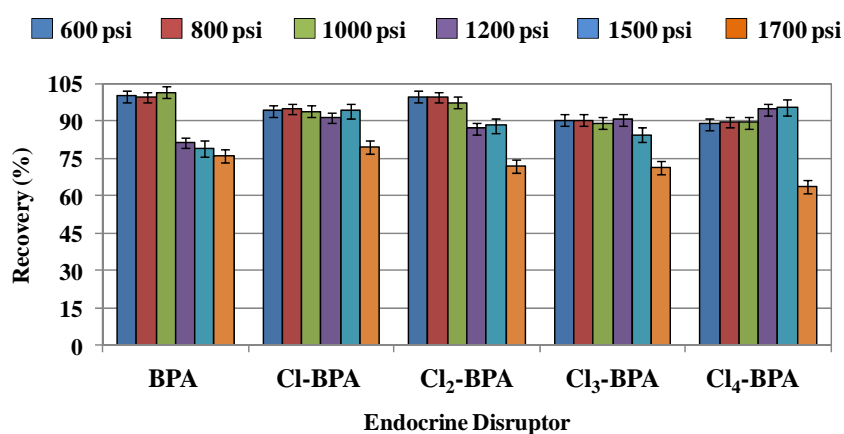
Recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) followed by PLE with different solvents and LC-MS/MS analysis.



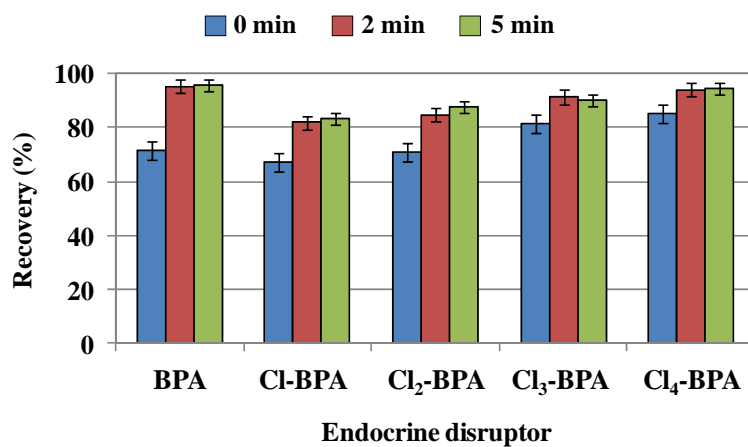
Optimization of temperature in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge using PLE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) and extracted at the following PLE conditions: Preheating, 2.5 min; Pressure, 1150 psi; Static, 8 min; Number of extraction cycles, 3; Purge, 75 s; Flush, 30%.



Optimization of pressure in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge using PLE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) and extracted at the following PLE conditions: Preheating, 2.5 min; Temperature, 100°C; Static, 8 min; Number of extraction cycles, 3; Purge, 75 s; Flush, 30%.



Optimization of preheating time in the recovery of BPA and its chlorinated derivatives from sludge using PLE. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) and extracted at the following PLE conditions: Temperature, 100°C ; Pressure, 1000 psi; Static, 8 min; Number of extraction cycles, 3; Purge, 75 s; Flush, 30%.



4. PUBLICACIÓN IV

Talanta

Enviado 02/10/2012 (TAL-D-12-02729)

Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Comparison of the efficiency of three extraction techniques

N. Dorival–García, A. Zafra–Gómez*, F.J. Camino–Sánchez, A. Navalón, J.L. Vilchez

Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

ABSTRACT

This work presents a comparison of three extraction techniques—ultrasound–assisted extraction (USE), microwave–assisted extraction (MAE) and pressurised liquid extraction (PLE)—and evaluates their efficiency in the determination of quinolone antibiotics in sewage sludge samples. Extraction parameters for each technique were optimized using design of experiments, and the compounds were detected and quantified using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), operating in positive electrospray ionization (ESI) mode. The use of two selected reaction monitoring transitions for each compound allowed simultaneous quantification and identification in one run. Analytes were separated in less than 10 min. Marbofloxacin and cincophen were used as

surrogates for amphoteric and acid quinolones, respectively. The limits of detection (LODs) were between 2 and 5 ng g⁻¹, and the limits of quantification (LOQs) were between 4 to 18 ng g⁻¹ for the various analytes. The inter- and intra-day variability was < 7%. Due to the absence of certified reference materials (CRMs), the method was validated using matrix-matched calibration and a recovery assay with spiked samples. Recovery rates were between 97.9% and 104.8%. Statistical comparison demonstrated no significant differences between the three extraction techniques. The methods were successfully applied for the determination of quinolones in sewage sludge samples collected from different wastewater treatments plants (WWTPs) located in the province of Granada (Spain). The analytical methods developed here may be useful for the development of more in-depth studies on the occurrence and fate of these commonly used pharmaceuticals in WWTPs and in the environment.

Keywords: Antibiotics; Quinolones; LC-MS/MS; Sewage sludge analysis; Extraction techniques; Matrix effect.

* Corresponding author: Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

1. Introduction

Pharmaceuticals and personal care products are used worldwide in healthcare, household products and animal husbandry. Since the last decade, growing attention has been paid to the environmental behaviour and impact of these compounds [1, 2] and they are now being recognised as “emerging” pollutants because of their bioactivity, wide usage, and potential health and ecological risks [3]. Antibiotics and their metabolites are among the most commonly used drugs. The use of antibiotics remains a subject of discussion because of their potential role in the spread and maintenance of (multi-) resistance of bacterial pathogens. This poses a serious threat to public health and deserves much more attention than it has received so far. Several studies have detected many antibiotic-resistant bacteria in drinking water supplies. Moreover, trace concentrations of antibiotics in the environment can severely affect wildlife. The European Union recommends the prudent use of antimicrobial agents in medicine [4, 5].

Quinolones and fluoroquinolones represent an important class of antibacterial agents widely used worldwide to treat many human and animal infectious diseases and to promote animal growth when used at subtherapeutic levels. They are a broad-spectrum family of antibiotics that are active against gram-positive and gram-negative bacteria [6]. According to the European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC), consumption of quinolones exceeds the defined daily doses per 1000 inhabitants per day (DID) per country [7] being ciprofloxacin *one of the most frequently prescribed medications in the world* [8].

After administration, antibiotics are incompletely absorbed and portions of parent compound, conjugated forms and metabolites are excreted, flushed towards the WWTPs and, ultimately, released into the

environment via WWTP effluents [9]. As a result, much of the research effort is focused on the occurrence and fate of these compounds during the wastewater treatment processes [2, 10, 11]. Moreover, considerable amounts are sorbed to suspended solids present in wastewater. Concentrations of these compounds, in the order of milligrams per kilogram, have been reported in sewage sludge treated according to current regulations—that does not include emerging contaminants—to be used as fertilizer [12, 13].

Because of their physicochemical properties, quinolones and fluoroquinolones tend to accumulate in sewage sludge and persist in the environment [14]. In fact, any loss of compounds occurring during wastewater treatment is usually secondary to their sorption to sludge. Studies indicate that approximately 70% of the total quinolone derivatives that enter WWTPs can be found in sludge [15, 16]. In addition to the application of sludge as fertilizer, these antibiotics may be transported to soils, and may enter surface water via runoff, leach into groundwater, or may be assimilated by vegetation or other living organisms. The development of analytical methods for the determination of these substances is therefore crucial. Nonetheless, most studies focus on their determination in aqueous matrices [17, 18] and their behaviour and effect in other environments is unknown.

Although some analytical methods have already been developed for the determination of quinolones in soils and sediments [19–24], very few of them focused on the determination of these antibiotics in sewage sludge [25–28]. These methods can determine no more than five quinolones and always involve a solid–phase extraction (SPE) step after the extraction process. These procedures involve long and tedious analytical processes, and sometimes they are not effective enough to improve the analytical performance of the method. Different techniques have been used to extract

pollutants from solid samples. The most commonly used technique is ultrasound-assisted extraction (USE) [25], but microwave-assisted extraction (MAE) or pressurised liquid extraction (PLE) [26–28] have also been successfully applied. These techniques provide shorter extraction times, low solvent consumption and better recoveries than classical extraction techniques.

Traditionally, an extraction method is optimized by investigating and modifying one-variable-at-a-time, but this approach cannot solve the problem of dependence and interaction of multiple variables when obtaining optimal conditions [29]. Consequently, it was decided to apply the experimental design in order to evaluate the relative significance of variables and to determine the best conditions for the desired response. During recent years, experimental design approach has been increasingly applied in analytical chemistry. As for extraction procedures, the recovery of the target analytes is usually affected by many variables that depend on the extraction method and the interactions between the variables prevent the possibility of one-variable-at-a-time traditional optimization approach, which fails to take into account the interaction between variables.

The main objective of the present work was to develop accurate, selective, robust and sensitive analytical methods for the simultaneous determination of residues of 13 quinolones and fluoroquinolones in sewage sludge by LC–MS/MS. The Doehlert design was used to optimize the extraction conditions for MAE. A Plackett-Burman experimental design was used to determine the significance of each one of the multiple parameters involved in PLE and then four of the most influential parameters were optimized with a Doehlert design. This approach allowed for simultaneous determination of the effects of different variables affecting the extraction efficiency. Then extraction efficiency of USE, MAE and PLE was

compared. The proposed methods allow the analysis of a greater number of samples in shorter times and will facilitate the development of further studies on the occurrence, contamination pathways, fate and risk assessment of this important class of antibiotics in the environment.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Water (18.2 M Ω cm) was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). Analytical grade quinolones—pipemidic acid (PIP), enoxacin (ENO), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), ofloxacin (OFL), enrofloxacin (ENR), lomefloxacin (LOM), moxifloxacin (MOX), cinoxacin, (CIN), nalidixic acid (NAL), oxolinic acid (OXO), flumequine, (FLU), piromidic acid (PIR)—and the surrogates—marbofloxacin (MAR) and 2-phenyl-4-quinoline carboxylic acid (cincophen, CIC)—were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Individual standard solutions of compounds (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in a water/methanol mixture (1:4) and stored at -20 °C. These solutions were prepared fresh monthly. Working standard mixtures were prepared by diluting each stock solution in methanol or in the initial mobile phase (i.e. mobile phase composition at the beginning of chromatographic gradient conditions: 90% of formic acid solution 0.2% (v/v) and 10% of methanol) immediately before use. All solutions were stored in dark glass bottles to avoid photodegradation. PIP, ENR, OFL, OXO, and FLU underwent significant degradation in stock standard solutions after 5 months.

LC–MS grade water and methanol, acetonitrile, sodium hydroxide, ammonia (> 25%) and formic acid (98%)—used for the preparation of standards, mobile phases and pH adjustments—were purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). Disodium hydrogen phosphate and citric acid, for the preparation of McIlvaine buffer solution [30] were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile, hexane, acetone and ethyl acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Instrumentation and software

A Branson digital Sonifier[®] unit model S–450D (Danbury, CT, USA), operated with a standard 12.7 mm titanium disruptor horn, a flat and replaceable 12.7 mm titanium tip and a temperature probe was used for USE. A Milestone ETHOS SEL extraction Labstation (Sheldon, CT, USA), operated at 2455 MHz with a maximum delivered power of 1000W was used for MAE. Time, temperature and microwave power control were adjusted and controlled throughout the process using the easyWAVE 3 software, version 3.2.1.0. An optical fibre temperature sensor was used to monitor the temperature. A Dionex Accelerated Solvent Extractor, ASE[®] 200 (Sunnyvale, CA, USA) equipped with a solvent controller was used for PLE. The cell tray holds 24 sample cells and 4 rinse tubes.

The detection and quantification of the analytes was performed using an Agilent 1200 series LC system (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with a binary pump, a vacuum membrane degasser, a thermostated column compartment, and an automatic autosampler. The LC system was coupled to an API 2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) triple quadrupole mass spectrometer system that can use atmospheric pressurised chemical ionization (APCI) or electrospray ionization (ESI)

interfaces. Analyst software version 1.5.2 was used for instrument control, data acquisition and result processing. A Crison 2000 digital pH-meter with a combined glass–Ag/AgCl (KCl 3 M) electrode (Crison Instruments S.A, Barcelona, Spain) was used for pH measurements. A vortex-mixer (Yellow line, Wilmington, NC, USA), a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttlingen, Germany), and a Memmert oven (Schwabach, Germany) were also used. Statgraphics Plus version 5.0 software (Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA. 2000) was used for statistical treatment of data.

2.3. Sample collection and storage

Samples were collected from two WWTPs located in the province of Granada (Spain). The samples were stored in amber glass bottles and 1% (v/v) formaldehyde was added to reduce the biological activity. Once in the laboratory, samples were centrifuged at $3634 \times g$ for 15 min and the solid components recovered, dried in a heater at 60 °C to constant weight and finely ground (≤ 1.41 mm). The samples were stored in the dark at 4 °C until analysis.

2.4. Preparation of fortified samples

Due to the absence of Certified Reference Materials (CRMs), blank samples for recovery studies were spiked at different concentrations by adding 0.5 mL of a methanolic standard solution containing the different analytes under study to 0.5 g of dry sewage sludge sample. This volume allows the analytes to come in contact with the whole sample. To ensure sorption equilibrium, the mixtures were shaken on a vortex mixer for 10 min

and were then left to stand for 24 h at room temperature in the dark before analysis.

For the optimization of the extraction parameters, the procedures were also performed by extraction of spiked blank samples in triplicate with the target antibiotics (200 ng g^{-1}) and the corresponding blank sample in parallel at all the evaluated extraction conditions.

2.5. Basic procedures

2.5.5 Ultrasound–assisted extraction

Dried sewage sludge samples were accurately weighed (0.5 g) into stainless steel capsules and 5 mL of the extraction buffer solution (MeOH/McIlvaine buffer, 50:50 (v/v), pH = 3) and the surrogates were added. The capsules were vortexed for 2 min and sonicated for 15 min at 75% amplitude. Four samples could be simultaneously extracted. Two extraction cycles were required. The combined extracts were centrifuged for 30 min at $3634 \times g$. The supernatant was then decanted into an amber glass vial and evaporated to dryness. The initial mobile phase (250 μL) was added to re–dissolve the residues. The obtained extract was centrifuged again at $3634 \times g$ for 30 min, and directly injected into the LC system.

2.5.6 Microwave–assisted extraction

Sewage sludge samples was (0.5 g) placed in a microwave vessel and 10 mL of extraction buffer solution (MeOH/McIlvaine's buffer, 50:50; v/v, pH = 3) and the surrogates were added. Ten vessels were processed simultaneously. The extraction process lasted 17 min (5 min for holding)

and was performed at 87 °C and 1000 W. Only one extraction cycle was required. After microwave irradiation, an airflow cooled the vessels (< 45 °C). The extracts were centrifuged for 30 min at 3634 × g and the supernatants decanted into a glass vial and evaporated to dryness. The residues were dissolved in 250 µL of initial mobile phase, centrifuged at 3634 × g for 30 min and directly injected into the LC system.

2.5.7 Pressurised liquid extraction

The samples (0.5 g) and the surrogates were transferred into an 11 mL stainless steel extraction cell of the extractor. The operating conditions were as follows: extraction temperature, 86 °C; extraction pressure, 1000 psi; preheating time, 1 min; static extraction time, 5 min; number of extraction cycles, 5; solvent flush, 30% of the cell volume and nitrogen purge, 90 s. The extraction solvent was a mixture MeOH/McIlvaine buffer (50:50; v/v, pH = 3). Final extraction volume was approximately 15 mL. The extracts were evaporated to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen and 250 µL of the initial mobile phase were added to dissolve the residues. The extracts were centrifuged for 30 min at 3634 × g and the supernatants were directly injected into the LC.

2.5.8 Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis

Chromatographic separations were achieved on a Kinetex C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm i.d., 2.6 µm particle size) and a C₁₈ guard column, both supplied by Phenomenex (Torrance, CA, USA). The flow rate was 400 µL min⁻¹. The column was maintained at 45 °C and the injection volume was 5 µL. A gradient mobile phase consisting of 0.2% (v/v) formic acid aqueous

solution (solvent A) and methanol (solvent B) was used. Gradient conditions were as follows: 90 % solvent A was linearly decreased to 30% over 5.0 min and to 0% over 0.5 min and held for 2.5 min to clean the column using 100% organic mobile phase. After returning to the starting conditions in 0.5 min, the column was equilibrated for 4.5 min before the next injection. Total run time was 13 min.

The mass spectrometer (MS) was operated with electrospray ionization (ESI) in positive ion mode. Both Q1 and Q3 resolutions were set to unit mass. Mass spectrometric conditions were optimised for each compound by continuous infusion of the standard solutions ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), using the $[\text{M}+\text{H}]^+$ adduct as precursor ion. The ion source temperature was maintained at $400 \text{ }^\circ\text{C}$. The IonSpray voltage was set at +5 kV. Nitrogen (curtain gas) was used at 55 psi, and air (nebulizing and desolving gas) was used at 50 and 60 psi respectively. The collision gas was air at 6 psi. Additional parameters optimised are shown in Table 1. The two most intense SRM transitions (one used for quantification and the other for confirmation) were selected. For quantification, the most abundant transition was selected to obtain the maximum sensitivity. In terms of sensitivity, the most influential parameters were declustering potential (DP) and collision energy (CE).

Table 1
Optimised SRM conditions for the studied antibiotics.

	Transitions	Identity of product ions	Dwell time (ms)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
PIP	304.1→286.2 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	112.5	+50	+200	+10	+35	+35
	304.1→217.1 ^b	MH ⁺ – CO ₂ – Pip ^c						
MAR	363.1→345.4 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	150.0	+50	+200	+10	+40	+40
	363.1→320.0 ^b	MH ⁺ – C ₂ H ₅ N						
OFL	362.2→344.2 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	150.0	+60	+200	+10	+40	+35
	362.2→318.3 ^b	MH ⁺ – CO ₂ – Pip ^c						
ENO	321.1→303.1 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	112.5	+60	+200	+10	+40	+35
	321.1→234.3 ^b	MH ⁺ – CO ₂ – Pip ^c						
NOR	320.1→302.3 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	123.8	+60	+200	+10	+40	+35
	320.1→276.0 ^b	MH ⁺ – CO ₂						
CIP	332.1→313.9 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	112.5	+50	+200	+10	+40	+35
	332.1→288.1 ^b	MH ⁺ – CO ₂						
ENR	360.2→342.3 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	112.5	+60	+200	+10	+20	+30
	360.2→316.2 ^b	MH ⁺ – CO ₂						
LOM	352.2→334.0 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	112.5	+50	+200	+10	+20	+30
	352.2→265.2 ^b	MH ⁺ – CO ₂ – Pip ^c						
MOX	402.2→384.1 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	112.5	+75	+200	+9	+40	+20
	402.2→260.2 ^b							
CIN	263.1→244.9 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	225.0	+25	+380	+7	+27	+33
	263.1→216.9 ^b	MH ⁺ – H ₂ O – N-1 ^d						
OXO	262.0→244.0 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	262.5	+50	+200	+10	+35	+35
	262.0→216.1 ^b	MH ⁺ – H ₂ O – N-1 ^d						
NAL	233.4→214.9 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	187.5	+30	+360	+5	+25	+30
	233.4→187.0 ^b	MH ⁺ – H ₂ O – N-1 ^d						
FLU	262.0→244.0 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	262.5	+50	+200	+10	+35	+35
	262.0→202.0 ^b	MH ⁺ – H ₂ O – C ₃ H ₆						
CIC	249.9→222.3 ^a		112.5	+40	+380	+9	+50	+24
	249.9→203.6 ^b	MH ⁺ – H ₂ O – N-1 ^d						
PIR	289.1→271.1 ^a	MH ⁺ – H ₂ O	206.3	+20	+380	+8	+33	+38
	289.1→243.1 ^b	MH ⁺ – H ₂ O – N-1 ^d						

^aSRM transition used for quantification; ^bSRM transition used for confirmation; ^c Loss of CO₂ followed by rupture of piperazine ring (Pip); ^d Loss of water followed by loss of an alkyl group attached to N-1. DP, declustering potential; FP, focusing potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential.

3. Results and discussion

3.1. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis*

The optimization of the chromatographic separation and the signal intensity was carried out using a 100 ng g⁻¹ standard mixture of compounds. The following columns were tested: Gemini C₁₈ liquid chromatography column (100 mm × 2 mm i.d., 3 μm particle size); Kinetex C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm i.d., 2.6 μm particle size) from Phenomenex (Torrance, CA, USA); and Acquity UPLC column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm particle size) from Waters (Mildford, MA, USA). Although similar resolution was achieved on the three columns, Acquity UPLC column generated pressures close to the maximum allowed by the chromatographic system, and separation times were longer on Gemini C₁₈. Consequently, the Kinetex C₁₈ column was selected for our study.

The main variables affecting the chromatographic separation and the signal intensity were studied. Methanol, acetonitrile and acetonitrile-methanol mixtures were evaluated as organic mobile phases (solvent B) and methanol was selected. Deionised water (solvent A) with different additives was studied. In this respect, the addition of organic acids improves the chromatographic separation of quinolones and the ionization in positive ESI mode, especially for amphoteric quinolones (pK_{a1} 5.5–6.0), since the cationic form is the most abundant at acid pH values [31, 32]. However, the sensitivity for acidic quinolones was not significantly enhanced by acidification since the non dissociated forms are predominant due to the absence of the piperazine ring at C-7 (pK_a 2.3–5.0) [33]. Concentrations from 0.0% to 0.3% (v/v) of formic acid used as additive were assayed. The 0.2% (v/v) concentration provided the optimal results. Higher

concentrations resulted in significant sensitivity loss because, at high concentrations, formic acid may also suppress the ionization efficiency [34].

The effect of column temperature, flow rate and injection volume were also studied. Flow rates from 0.1 to 0.5 mL min⁻¹ (maximum recommended for ESI interface) were tested. This parameter significantly improved the resolution, peak shape, intensity of the response and retention times. 0.4 mL min⁻¹ provided optimal values. Lower flow rates showed poor resolution and decrease in peak separation, while greater flow rates showed less eluent vaporization capacity in the interface. Following column specifications, temperatures from 30 to 50 °C were investigated, and 45 °C provided the highest resolution, greatest number of separated peaks and strongest response. Finally, in order to enhance the signal intensity, injections volumes between 5 to 40 µL (maximum allowed by the chromatographic system) were evaluated. An injection volume of 5 µL was selected because volumes ≥ 10 µL resulted in excessive peak broadening.

3.2. Electrospray mass spectral behaviour and MS/MS reactions of the studied quinolones

For all the target antibiotics, except for cincophen, the major product ion corresponded to the loss of H₂O from the carboxylic group. For most of the amphoteric quinolones, the second major fragment was produced by the loss of CO₂. Neutral loss of 87 amu that corresponds to rupture of the piperazine ring was also observed in these quinolones. Second product ion of marbofloxacin was characterised by the direct loss of a fragment of piperazine ring (C₂H₅N). Acid quinolones produced fewer product ions due to the lack of the reactive C-7 substituent (piperazine ring) [32]. H₂O loss from the carboxyl group at C-3, followed by the loss of R₁ (as C₂H₄) from

the ethyl groups at N-1 was characteristic as the second ion product in most of the acidic quinolones. Flumequine exhibited a neutral loss of 42 amu from $[M-H - H_2O]^+$ to produce the ion at m/z 202, probably corresponding to loss of $CH_3-CH=CH_2$ from the ring structure between N-1 and C-8. Table 1 shows the product ions selected.

3.3. Optimization of ultrasound assisted extraction

In addition to the strong interactions (hydrophobic and electrostatic) of quinolones with organic matter, main component of sewage sludge [35], they are also capable of forming stable complexes with metal cations [26, 36, 37]. Moreover, the behaviour of quinolones in different media is also determined by their characteristic acid–base properties. These factors are crucial for quinolones adsorption in sludge, and make necessary an exhaustive optimization of the extraction process for quantitative and selective recovery of the antibiotics from samples. pH, extraction solvent and the most influential variables affecting the USE procedure were optimised. Samples (0.5 g) spiked at 200 ng g^{-1} were used for optimization, because these concentration level has been previously found in sludge samples [26, 38]. The highest recommended amplitude (75%) as initial working conditions was selected. The extraction procedure involved two cycles of 20 min. The extraction volume was to 5 mL per cycle to avoid solvent saturation. The experimental values of the optimization are shown in the supplementary material.

3.3.1 Effect of extraction solvent and pH

All quinolones are acids due to the presence of a carboxylic group at 3 position, however, depending on the presence or absence of substitution of piperazinyl group at C-7 position, quinolones are divided in two groups, amphoteric (with cationic, zwitterionic and acid forms), and acids (with neutral or anionic forms). The reported pKa for acid quinolones ranges from 6.0 to 6.9. For amphoteric quinolones, pKa₁ and pKa₂ were between 5.5 and 6.6, and between 7.2 and 8.9 [39]. The acid quinolones analysed here were FLU, OXO, NAL, CIN and PIR; and the amphoteric quinolones were CIP, ENR, NOR, PIP, OFL, LOM, MOX and ENO.

In order to select the extraction solvent, methanol, acetonitrile, acetone and ethyl acetate were evaluated. Since the cationic form of amphoteric quinolones is predominant at low pH values, electrostatic repulsion between quinolones and sludge surface may partly account for the higher extraction efficiency at acidic pHs [26]. Then 10% formic acid (v/v) was added to each solvent [40]. For the majority of compounds, methanol and acetone offered similar recovery, and ethyl acetate was the least effective. Methanol was selected, as it was also the organic solvent of the mobile phase for the chromatographic separation. It was observed that the recoveries with all solvents were lower than 70% for all the analytes, except for PIR (90%). Therefore, it was necessary to improve solvent efficiency and to study the influence of pH.

Following previous studies [25], we evaluated a mixture 1:1 of aqueous buffer and methanol for the determination of the optimal extraction pH. McIlvaine's buffer solution [30] was selected because of its wide range of pH values (2 to 8) and a NaOH solution was used for pH values of 10 and 11. The use a methanol/aqueous buffer solution mixture increased

recoveries between 20% and 40% for amphoteric quinolones, achieving recoveries between 80–90%. For acid quinolones, the recoveries only improved between 9% and 15%, with recoveries between 65 and 85%, except for PIR (95%). Amphoteric quinolones exhibited lower recoveries above pH 5 and acid quinolones did not show a clear behaviour pattern with pH variations. A pH value of 3 was selected as optimal, because it improved the analysis of most of the quinolones under study, especially those that are commonly found in environmental samples.

Finally, the effect of the aqueous/organic solvent ratio was also studied. Different buffer/methanol mixtures (10:90; 30:70; 50:50; 70:30; and 90:10; v/v) were studied and it was confirmed that the highest recoveries were obtained with a 50:50 (v/v) ratio.

3.3.2 *Effect of the number of extraction cycles and extraction time*

To investigate the effects of extraction time, times from 5 to 20 min were assayed. Times >20 min were not evaluated, because longer times cause system overheating. 15 min per cycle was selected as compromise extraction time. To determine the number of cycles, extractions with 1 to 3 cycles were carried out. Two cycles were necessary for quantitative recovery of compounds with the selected extraction times.

The results obtained for USE optimization confirm the strong interactions between these antibiotics and sludge matrix, since the conditions required were two extraction cycles, 30 min of total extraction time at the maximum ultrasonic amplitude (75%). Despite the drastic conditions that the USE required, the mean recovery was approximately 80%.

Finally, to avoid bonding of antibiotics with metallic ions present in sludge matrix, the effect of Na₂EDTA as a chelating agent was also evaluated. Na₂EDTA (0.25 g) was added to 0.5 g of sludge before the extraction but no effect on recovery rates was observed.

3.4. Optimization of pressurised liquid extraction

For PLE optimization, the aqueous buffer solution/methanol mixture was used as extraction solvent. A Plackett–Burman (PB) design was used in the preliminary optimization process to determine the most influential factors in PLE, given the multiple parameters involved in this extraction technique. PB design was selected, among other screening methods, to minimize experimental runs and to determine the significant variables in PLE extraction efficiency. Then ANOVA was employed for the determination of significant variables. The experimental PB design resulted in 24 experiments and three replicates for the central point. Variables were evaluated at low and high level. The central point was evaluated at intermediate level. The following variables were analysed: sample weight (0.5 and 2.0 g), temperature (60 and 160 °C), pressure (600 and 1500 psi), Na₂EDTA concentration (0 and 1g/g sample), static time (4 and 12 min), number of extraction cycles (1 and 5), preheating time (0 and 2 min) and flush (30 and 150%). Samples spiked with 200 ng g⁻¹ of antibiotics were used for optimization. These conditions were proposed following the methodology presented in previous studies [9, 26]. Purge time was not included for optimization because it does not significantly affect recoveries [41], and it was set at 90 s. The fitness of the model was determined, and statistically significant effects of the variables were screened using a

Student's *t*-test for ANOVA. Variables having a confidence greater than 95.0% were considered to have a significant effect on the extraction efficiency. Figure 1 shows the statistically significant effect of each variable included in the PB design, presented as the sum of recoveries of each one, considering the differences between amphoteric and acid quinolones.

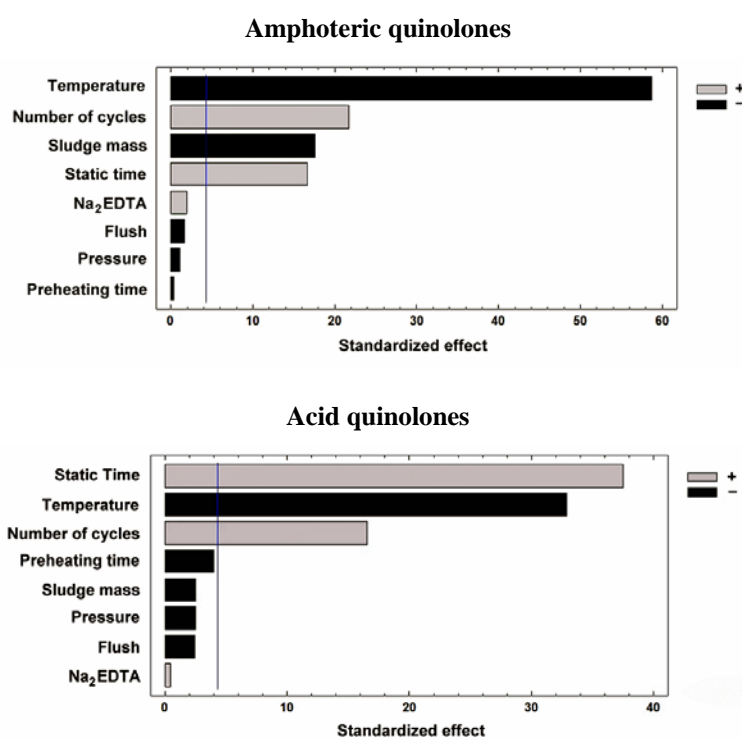


Fig. 1. Standardized main effect Pareto charts for the Plackett–Burman design.

A minimum *t*-value—represented by the vertical line in Figure 1—was obtained. Variables with higher *t*-values were considered as statistically significant factors. Temperature was one of the most statistically significant parameters for both groups of quinolones, followed by static time and number of extraction cycles. Sample weight only affected amphoteric quinolones. Pressure, flush, preheating time and presence of Na₂EDTA did not have a significant influence on the extraction efficiency of both groups

of quinolones. Consequently, these factors were set during the rest of the optimization process. The central point values were chosen for pressure (1000 psi) and preheating time (1 min). However, the use of the minimum flush setting (30%) was enough to clean the system and avoid extreme dilutions of the extracts and to handle large volumes.

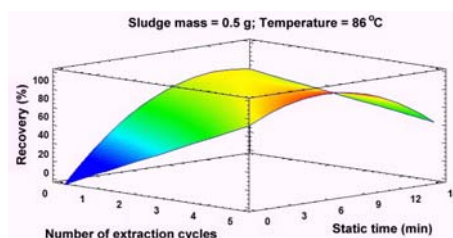
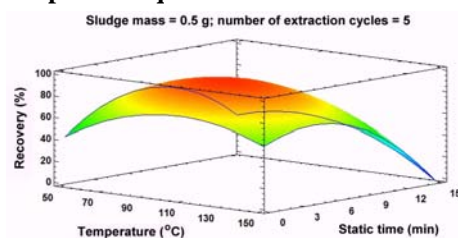
3.2.4 Optimization of the PLE variables by response surface methodology.

RSM was applied to evaluate the effects of the selected process variables—according to results of PB design—and their interaction on response variables. RSM is a collection of statistical and mathematical techniques that have been successfully used for developing, improving and optimizing processes; especially in the chemical, biochemical and industrial fields. A multivariate Doehlert experimental design was used. The Doehlert design is very useful for second-order models, which are easily applied to optimize variables, offering more advantages and more efficacy than central composite and Box-Behnken designs. Doehlert designs involve fewer experiments, which are more efficient and can move through the experimental domain. The Doehlert design describes a spherical experimental domain and it stresses uniformity in space filling. Although this is not an orthogonal or rotating matrix, the matrix does not significantly diverge from the required quality for effective use [42]. In Doehlert designs, the number of levels is not the same for all variables. This property allows a free choice of the factors to be assigned to a large or small number of levels. Different criteria can be used to assign the factors. As a general rule, it is preferable to choose the variable with the stronger effect as the factor with the highest number of levels in order to obtain maximum information of the system [42].

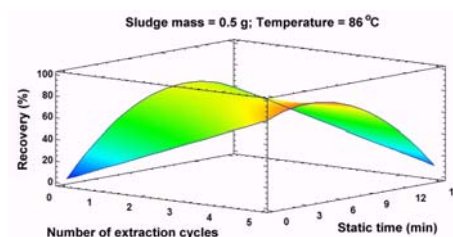
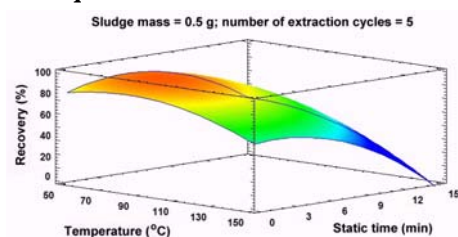
The matrix for 4 factors consisted of 21 experiments, including three central points. Seven levels for temperature (from 60 to 150 °C) and static time (from 1 to 13 min), and five levels for number of cycles (from 1 to 5), and three levels for sludge mass (from 0.5 to 2 g) were considered. Figure 2A shows the response surfaces for the sum of recoveries for each one of the two groups of quinolones —amphoteric and acid quinolones—.

(A)

Amphoteric quinolones

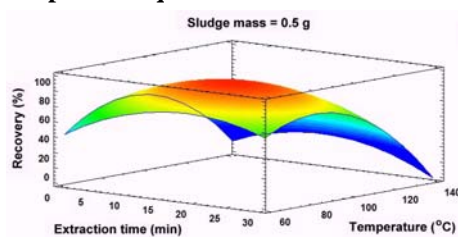


Acid quinolones



(B)

Amphoteric quinolones



Acid quinolones

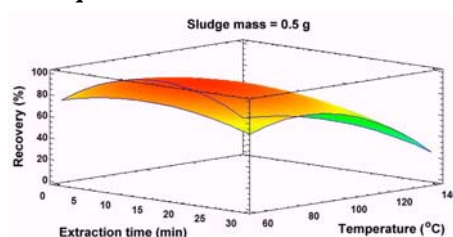


Fig. 2. Optimization of most influential variables on extraction efficiency in PLE (A) and MAE (B). Representative response surfaces for studied antibiotics divided in two groups of quinolones according to Doehlert experimental design. Sludge samples were spiked with 200 ng g⁻¹ of each antibiotic.

Data were evaluated by ANOVA, in order to identify the effect of variables on the recovery of each compound. ANOVA test gave a determination coefficient (R^2) over 0.949 and 0.977, for amphoteric and acid quinolones, respectively. Since the P value for the *lack-of-fit* test is >0.05 in all cases, the model appears to be satisfactory for the obtained data at the 95.0% confidence level.

Temperature and static time, particularly their quadratic terms, were the most influential parameters. In general, temperatures over 100 °C were detrimental to quinolones recoveries, probably due to thermal degradation processes [43]. Likewise, at higher extraction temperatures, it was observed that darker extracts were obtained and, consequently, a loss of selectivity of the method due to the extraction of matrix components [27]. In the static method, the long exposure to solvent allows the matrix to swell, thus improving the penetration of solvent into the sample interstices and the contact of the solvent with the analyte. However, due to the significant interactions between temperature and static time, static times > 6 min had a negative effect, probably due to degradation of analytes [44]. As compromise solution, temperature was set at 86 °C and static time at 5 min.

The number of cycles was also an important parameter, with a linear and positive effect. With each new cycle, the introduction of fresh solvent maintains a favourable solvent/sample equilibrium and, hence, improving partitioning into the liquid phase and increasing recoveries [26]. A total of 5 cycles was established as optimum value.

It was also confirmed that sample weight can only affect amphoteric quinolones, having a linear negative effect, since the larger sample amounts are analysed, the higher amounts of matrix components are extracted. This probably results in solvent saturation, thus, reducing the extraction efficiency. Consequently, 0.5 g of sludge was chosen as optimal sample

weight. At these conditions, mean recoveries were 94.6% and 90.4% for amphoteric and acid quinolones, respectively.

3.5. Microwave-assisted extraction optimization

A multivariate Doehlert experimental design was also used. The Doehlert matrix was established for 3 factors and consisted of 3 experiments, including three central points. The temperature was studied at seven levels (from 60 to 130 °C), irradiation time at five levels (from 5 to 30 min), and sample weight at three levels (from 0.5 to 2 g). The same aqueous buffer/methanol mixture was used as extraction solvent. In order to simplify the procedure, only one extraction cycle was performed and 10 mL used as extraction volume (minimum possible volume for our microwave unit). The microwave power was fixed at 1000 W to reach the highest temperatures. Figure 2B shows the response surfaces for the two groups of quinolones. Data were evaluated by ANOVA, in order to identify the effect of variables on the recovery of each compound. Therefore the fitted regression equations explain more than 98.9% and 99.7% of the total variation in the data for amphoteric and acid quinolones, respectively. Since P value for *lack-of-fit* test is >0.05 in all cases, the model appears to be satisfactory for the obtained data at the 95.0% confidence level.

As for PLE, temperature and irradiation time, particularly their quadratic terms, showed a significant influence on extraction efficiency, especially for amphoteric quinolones, since temperatures and extraction times different from the optimal caused a decrease in recoveries of about 60 and 30%, for amphoteric and acid quinolones, respectively. The optimal temperature and irradiation time for amphoteric quinolones was 87 °C and 17 min, respectively. The sludge mass had also a negative effect on

recoveries for both amphoteric and acid quinolones, which corroborates the more drastic conditions characteristic of MAE, since more matrix components are extracted with the analytes, facilitating solvent saturation and reducing extraction efficiency. Consequently, the minimum sludge mass (0.5 g) was selected as the optimal sample weight. With the selected experimental conditions, amphoteric and acid quinolones had mean recoveries of 96.7 and 93.9%, respectively.

3.6. Comparison of extraction techniques

3.5.3 Extraction efficiency

The results of the comparison of the extraction efficiency of the three techniques are shown in Figure 3A. Mean values of relative recoveries for each target antibiotic with the evaluated extraction techniques were compared using the Least Significant Difference (LSD) multiple range test with a 95.0% confidence level. The results showed statistically significant differences.

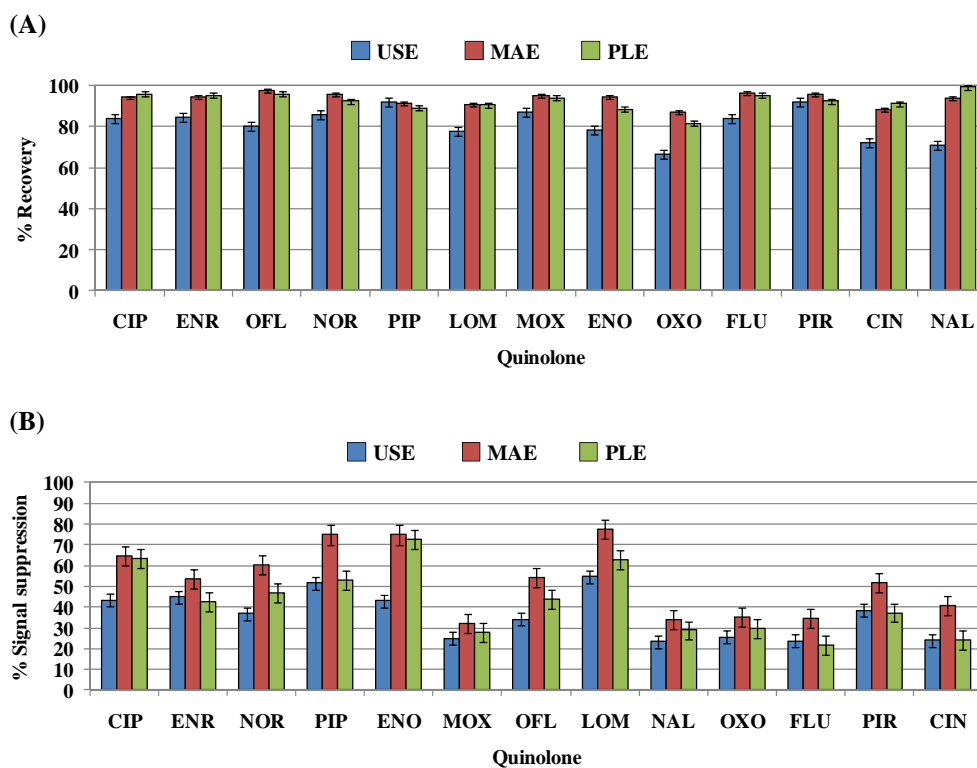


Fig. 3. (A) Antibiotics extraction efficiencies by the three evaluated techniques. LSD values are given in parentheses: CIP (1.97); ENR (1.45); OFL (1.51); NOR (1.86); PIP (2.26); LOM (2.13); MOX (1.71); ENO (2.86); OXO (2.15); FLU (3.48); PIR (2.75); CIN (1.27); NAL (1.38). (B) Percentages of MS ion suppression in sewage sludge extracts obtained from the evaluated extraction techniques. LSD values are given in parentheses: CIP (1.58); ENR (1.27); OFL (3.84); NOR (1.65); PIP (3.88); LOM (3.68); MOX (4.57); ENO (3.18); OXO (3.98); FLU (3.72); PIR (1.24); CIN (2.50); NAL (2.75). $n = 6$ and significance level of 95.0% was selected for all cases.

MAE and PLE provided the highest recoveries (> 90%) in comparison with USE (80%). USE was clearly not as efficient as MAE and PLE, especially for acidic quinolones. MAE was slightly better than PLE, with a maximum difference in recoveries of 6%.

3.5.4 Matrix effects

One of the major drawbacks of LC-ESI-MS/MS is the signal suppression/enhancement caused by those coeluting components in sample extracts that have similar ions in the MS/MS experiment. Coeluting components influence the ionization efficiency and affect the reproducibility, sensitivity and accuracy of the method. Humic substances in particular have been proved to cause significant matrix effects [35, 44], which therefore have to be investigated.

The matrix effect was evaluated by calculating the percentage of signal suppression in the extracts obtained with the three extraction techniques. The peak areas from the analysis of spiked sludge extracts were compared with the ones corresponding to the spiked solvent (mobile phase) at the same concentration levels [45]. The results of signal suppression in extracts spiked at 50 ng g^{-1} with the studied analytes are shown in Figure 3B.

Mean values of signal suppression for each target antibiotic with the evaluated extraction techniques were compared using LSD multiple range test with a 95.0% confidence level. The results showed that in general, matrix effects were significantly different between the three techniques. The highest signal suppression was clearly observed in MAE extracts, probably due to the more drastic experimental conditions. PLE generally resulted in more matrix effects than USE. It was also noted that amphoteric quinolones exhibited higher signal suppression than acid quinolones, which showed a signal suppression of about 20%. Moxifloxacin, an amphoteric fluoroquinolone of third generation, also exhibited low signal suppression.

3.7. Method validation

A seven-point matrix-matched calibration curve was obtained for each method in the range from the limit of quantification (LOQ) to 800 ng g⁻¹. Calibration curves were constructed using analyte/surrogate peak area ratio *versus* concentration of analyte. Marbofloxacin and cincophen were selected as surrogates for amphoteric and acidic quinolones, respectively. Marbofloxacin is used in veterinary medicine, which is unlikely to be found in urban wastewaters. Cincophen is not a quinolone, but it shows a similar structural core. Additionally, the chromatographic retention times of each group of quinolones are close to the corresponding surrogate and neither marbofloxacin nor cincophen were detected in samples. Each calibration level was made in triplicate and analysed twice. The curves for each extraction technique were compared (Student's *t*-test) with the ones generated in solvent (mobile phase). Statistically significant differences were observed between the slopes for the matrix-matched calibration curves and their corresponding ones in the solvent for the three methods and for the thirteen analytes. This confirms that a correct quantification of the analytes in sludge samples requires the use of matrix-based calibration curves. The analytical methods were validated in terms of linearity, selectivity, sensitivity and accuracy (trueness and precision). Table 2 shows the main calibration and validation parameters.

Table 2
Analytical and statistical parameters.

Parameter ^a	USE						
	CIP	ENR	NOR	PIP	ENO	MOX	NAL
n	42	42	42	42	42	42	42
b (g ng ⁻¹)	2.4·10 ⁻²	2.5·10 ⁻²	1.6·10 ⁻²	1.4·10 ⁻²	1.8·10 ⁻²	2.6·10 ⁻²	2.3·10 ⁻²
s _b (g ng ⁻¹)	9.7·10 ⁻⁵	1.0·10 ⁻⁴	6.5·10 ⁻⁵	9.1·10 ⁻⁵	7.1·10 ⁻⁵	1.3·10 ⁻⁴	5.3·10 ⁻⁵
S _{y/x}	0.185	0.176	0.113	0.159	0.123	0.234	0.092
% R ²	99.93	99.94	99.93	99.83	99.94	99.89	99.98
LOD (ng g ⁻¹)	4	3	3	5	3	4	2
LOQ (ng g ⁻¹)	12	11	11	18	10	14	6
LDR (ng g ⁻¹)	LOQ – 800						

Parameter ^a	USE					
	OXO	FLU	PIR	OFL	LOM	CIN
n	42	42	42	42	42	42
b (g ng ⁻¹)	1.5·10 ⁻³	1.4·10 ⁻²	8.7·10 ⁻²	1.1·10 ⁻²	8.8·10 ⁻³	7.7·10 ⁻³
s _b (g ng ⁻¹)	8.7·10 ⁻⁶	9.6·10 ⁻⁵	1.9·10 ⁻⁴	3.3·10 ⁻⁵	3.7·10 ⁻⁵	3.8·10 ⁻⁵
S _{y/x}	0.015	0.166	0.328	0.058	0.064	0.066
% R ²	99.87	99.82	99.98	99.97	99.93	99.90
LOD (ng g ⁻¹)	5	5	2	2	3	4
LOQ (ng g ⁻¹)	15	18	6	8	11	13
LDR (ng g ⁻¹)	LOQ – 800					

Table 2 (Cont)
Analytical and statistical parameters.

Parameter ^a	MAE						
	CIP	ENR	NOR	PIP	ENO	MOX	NAL
n	42	42	42	42	42	42	42
b (g ng ⁻¹)	3.6·10 ⁻²	4.7·10 ⁻²	3.6·10 ⁻²	1.6·10 ⁻²	3.0·10 ⁻²	6.9·10 ⁻²	6.3·10 ⁻²
s _b (g ng ⁻¹)	1.6·10 ⁻⁴	1.2·10 ⁻⁴	1.5·10 ⁻⁴	6.3·10 ⁻⁵	1.3·10 ⁻⁴	1.6·10 ⁻⁴	2.4·10 ⁻⁴
S _{y/x}	0.281	0.216	0.255	0.110	0.226	0.274	0.425
% R ²	99.92	99.97	99.94	99.94	99.93	99.98	99.94
LOD (ng g ⁻¹)	4	2	3	3	3	2	3
LOQ (ng g ⁻¹)	12	7	11	11	11	6	10
LDR (ng g ⁻¹)	LOQ – 800						

Parameter ^a	MAE					
	OXO	FLU	PIR	OFL	LOM	CIN
n	42	42	42	42	42	42
b (g ng ⁻¹)	4.4·10 ⁻³	5.5·10 ⁻²	1.5·10 ⁻¹	1.4·10 ⁻²	1.5·10 ⁻²	4.2·10 ⁻²
s _b (g ng ⁻¹)	1.4·10 ⁻⁵	2.2·10 ⁻⁴	6.9·10 ⁻⁴	6.5·10 ⁻⁵	8.8·10 ⁻⁵	1.6·10 ⁻⁴
S _{y/x}	0.025	0.381	1.203	0.114	0.153	0.280
% R ²	99.96	99.94	99.92	99.92	99.87	99.94
LOD (ng g ⁻¹)	3	3	4	4	5	3
LOQ (ng g ⁻¹)	9	11	12	12	15	10
LDR (ng g ⁻¹)	LOQ – 800					

Table 2 (Cont)

Analytical and statistical parameters.

Parameter ^a	PLE						
	CIP	ENR	NOR	PIP	ENO	MOX	NAL
n	42	42	42	42	42	42	42
b (g ng ⁻¹)	3.6·10 ⁻²	5.6·10 ⁻²	3.3·10 ⁻²	1.4·10 ⁻²	4.1·10 ⁻²	7.1·10 ⁻²	8.7·10 ⁻²
s _b (g ng ⁻¹)	1.3·10 ⁻⁴	2.0·10 ⁻⁴	9.4·10 ⁻⁵	9.2·10 ⁻⁵	1.7·10 ⁻⁴	2.4·10 ⁻⁴	2.3·10 ⁻⁴
s _{y/x}	0.233	0.345	0.164	0.160	0.287	0.412	0.408
% R ²	99.94	99.95	99.97	99.82	99.94	99.96	99.97
LOD (ng g ⁻¹)	3	3	2	5	3	3	2
LOQ (ng g ⁻¹)	10	9	8	18	11	9	7
LDR (ng g ⁻¹)	LOQ – 800						
Parameter ^a	PLE						
	O XO	FLU	PIR	OFL	LOM	CIN	
n	42	42	42	42	42	42	
b (g ng ⁻¹)	4.7·10 ⁻³	4.4·10 ⁻²	2.2·10 ⁻¹	2.5·10 ⁻²	2.6·10 ⁻²	6.5·10 ⁻²	
s _b (g ng ⁻¹)	2.3·10 ⁻⁵	7.3·10 ⁻⁵	5.3·10 ⁻⁴	1.6·10 ⁻⁴	1.1·10 ⁻⁴	1.6·10 ⁻⁴	
s _{y/x}	0.041	0.128	0.928	0.272	0.188	0.271	
% R ²	99.90	99.99	99.98	99.85	99.93	99.98	
LOD (ng g ⁻¹)	4	1	2	5	3	2	
LOQ (ng g ⁻¹)	13	4	6	16	11	6	
LDR (ng g ⁻¹)	LOQ – 800						

^an = points of calibration; b = slope; s_b = slope standard deviation; s_{y/x} = regression standard deviation; R² = determination coefficient; % LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification; LDR = linear dynamic range.

Linearity. The determination coefficient (R²) and the lack-of-fit test (P_{lof}) were evaluated. Good linearity was observed within the concentration range (LOQ–800 ng g⁻¹) and P_{lof} values were > 5% in all cases.

Selectivity. This parameter was demonstrated by LC–MS/MS analysis of blanks. The chromatogram of a blank sample and a spiked blank sample were compared with the chromatograms of the target compounds were extracted using the three extraction methods. Figure 4 shows a characteristic SRM chromatogram of extracts obtained using USE, MAE, PLE and a blank. These data demonstrated the high selectivity of the methods.

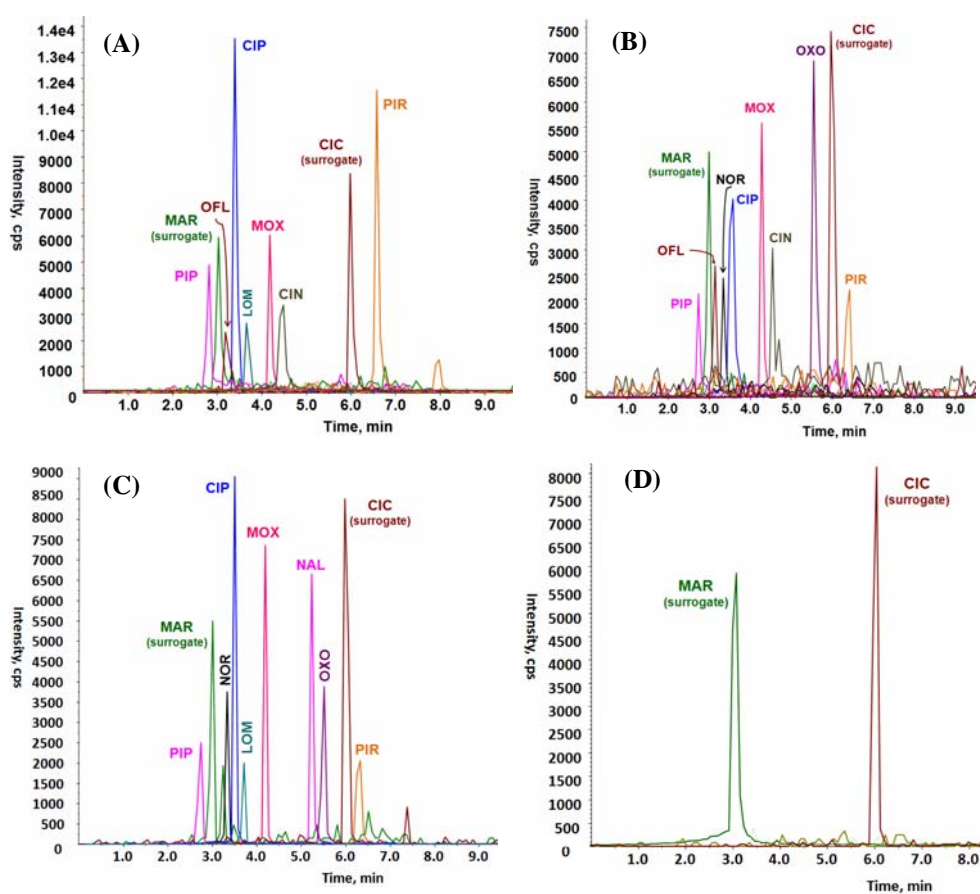


Fig. 4. SRM mode chromatograms of the extracts of sewage sludge from different wastewater treatment plants of Granada, obtained with different extraction methods (A) USE, (B) MAE and (C) PLE. (D) Chromatogram of a non contaminated (blank) sewage sludge sample.

Sensitivity. Two fundamental aspects need to be examined in the validation of any analytical method to determine whether an analyte is present in the sample: the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ). These parameters were determined as the minimum detectable amount of analyte with a signal-to-noise ratio of 3 and 10 for the LOD and LOQ, respectively. Table 3 shows the values obtained.

Accuracy (precision and trueness). The precision of the method in terms of intra- and inter-day variability was evaluated at three

concentration levels (20, 200 and 600 ng g⁻¹) and for sewage sludge samples collected from three different WWTPs of the province of Granada, Spain. Precision (expressed as relative standard deviation, RSD [%]) was determined from triplicate spiked sludge samples during the same day (repeatability) and in nine different days (reproducibility). The values obtained are also summarised in Table 3. RSD values fell between 0.3% and 6.7%. The data indicate that the methods are highly reproducible, and there were not significant differences between the recoveries in the case of the sludge samples from the three WWTPs.

Table 3

Accuracy of the methods. Precision and trueness in sewage sludge samples from three different WWTPs.

Parameter	USE										
	Level (ng g ⁻¹)			Level (ng g ⁻¹)							
	20	200	600	20	200	600					
CIP	1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.6	99.6	100.3	OXO	99.3	98.9	100.2	
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.5	1.1	0.3		3.2	1.3	1.0	
			Inter-day ^b (%)	2.6	1.0	0.5		3.3	1.9	1.3	
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	102.1	100.7	101.2	98.7	98.5	98.8		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.0	1.8	0.6	3.2	1.9	2.2		
			Inter-day ^b (%)	2.5	2.3	0.6	4.4	2.1	2.8		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	98.7	100.0	99.9	103.6	98.0	102.1		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.9	1.6	0.2	3.5	1.3	1.0		
			Inter-day ^b (%)	2.9	3.0	0.4	4.2	2.3	1.9		
	ENR	1	Trueness	Recovery (%) ^a	98.4	99.7	99.9	FLU	102.7	100.5	99.3
			Precision	Intra-day ^b (%)	2.6	1.6	1.5		2.4	1.6	0.6
				Inter-day ^b (%)	2.9	2.3	1.8		3.0	3.6	1.0
2		Trueness	Recovery (%) ^a	96.1	96.4	100.9	103.0	97.4	100.1		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.2	1.4	1.1	2.6	1.5	1.1		
			Inter-day ^b (%)	3.0	2.7	2.4	3.4	2.2	1.4		
3		Trueness	Recovery (%) ^a	97.2	98.5	98.7	99.7	97.9	100.1		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.6	1.9	1.5	2.4	1.9	0.6		
			Inter-day ^b (%)	3.2	2.9	1.9	3.3	3.3	1.5		
NOR		1	Trueness	Recovery (%) ^a	98.2	100.8	100.1	PIR	100.1	101.0	100.3
			Precision	Intra-day ^b (%)	4.1	2.6	0.6		2.4	0.4	0.7
				Inter-day ^b (%)	5.6	2.8	1.1		3.1	0.6	0.7
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	96.8	99.4	97.2	98.4	100.0	100.6		
		Precision	Intra-day ^b (%)	4.3	3.0	1.1	3.1	0.4	0.3		
			Inter-day ^b (%)	5.1	3.7	1.6	3.4	1.4	0.9		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	100.3	103.6	101.8	97.5	101.0	101.0		
		Precision	Intra-day ^b (%)	5.0	2.6	0.4	2.4	0.4	0.7		
			Inter-day ^b (%)	6.3	3.3	1.5	4.4	0.9	1.0		
	PIP	1	Trueness	Recovery (%) ^a	100.1	99.6	99.4	OFL	100.5	99.9	100.1
			Precision	Intra-day ^b (%)	3.4	2.3	1.0		2.3	1.7	0.9
				Inter-day ^b (%)	4.1	2.3	1.7		2.7	2.9	1.0
2		Trueness	Recovery (%) ^a	98.7	101.2	101.3	97.4	97.0	100.8		
		Precision	Intra-day ^b (%)	4.0	2.4	1.0	2.2	2.3	0.6		
			Inter-day ^b (%)	4.4	2.8	2.5	3.0	2.7	1.5		
3		Trueness	Recovery (%) ^a	103.8	98.7	98.9	98.0	98.1	100.1		
		Precision	Intra-day ^b (%)	4.1	2.3	0.8	2.3	1.8	0.9		
			Inter-day ^b (%)	5.1	3.5	1.9	2.4	3.1	2.4		
ENO		1	Trueness	Recovery (%) ^a	97.9	99.8	99.8	LOM	98.0	99.0	99.8
			Precision	Intra-day ^b (%)	2.9	1.6	0.4		1.7	2.0	0.8
				Inter-day ^b (%)	5.5	1.6	0.9		2.8	2.9	1.4
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	98.6	101.6	98.9	98.9	101.9	100.1		
		Precision	Intra-day ^b (%)	3.1	1.8	0.9	2.5	1.5	0.8		
			Inter-day ^b (%)	5.1	2.0	1.7	2.7	3.0	1.1		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	96.8	98.6	100.8	97.6	100.9	100.4		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.9	1.6	0.4	2.4	2.5	0.6		
			Inter-day ^b (%)	6.0	2.2	1.5	3.4	3.2	1.6		
	MOX	1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.5	98.9	100.1	CIN	100.0	98.7	99.1
			Precision	Intra-day ^b (%)	1.4	1.1	0.5		1.7	2.5	0.9
				Inter-day ^b (%)	2.9	1.5	0.5		3.0	4.8	1.9
2		Trueness	Recovery (%) ^a	101.3	96.6	100.6	99.2	98.6	98.0		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.4	1.7	0.6	1.7	2.5	0.9		
			Inter-day ^b (%)	2.7	2.1	1.5	2.8	4.3	2.6		
3		Trueness	Recovery (%) ^a	98.7	101.3	100.8	101.5	97.2	99.4		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.4	2.1	1.1	2.1	2.2	1.1		
			Inter-day ^b (%)	3.1	2.8	1.3	2.4	3.7	2.1		
NAL		1	Trueness	Recovery (%) ^a	98.7	98.2	99.6				
			Precision	Intra-day ^b (%)	1.6	1.0	0.6				
				Inter-day ^b (%)	3.7	1.4	1.0				
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	97.9	99.4	100.9					
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.7	1.0	1.0					
			Inter-day ^b (%)	3.6	2.0	1.6					
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	98.0	97.9	98.1					
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.4	1.7	0.4					
			Inter-day ^b (%)	3.9	2.2	1.4					

^aMean value of 54 determinations; ^bRSD (%), relative standard deviation. (n=6); ^cRSD (%), relative standard deviation. (n=54)

Table 3 (cont)

Accuracy of the methods. Precision and trueness in sewage sludge samples from three different WWTPs.

Parameter	MAE											
	Level (ng g ⁻¹)			Level (ng g ⁻¹)								
	20	200	600	20	200	600						
CIP	1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.3	99.2	101.7	OXO	99.1	104.8	99.3		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.2	1.6	2.6		2.8	1.0	0.5		
			Inter-day ^b (%)	2.4	2.5	3.4		3.7	1.6	1.3		
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	96.7	97.5	96.0		98.4	98.0	100.0		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.4	2.1	3.3		3.5	1.0	0.7		
			Inter-day ^b (%)	2.2	2.6	4.1		4.0	1.7	1.0		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	97.5	99.1	99.5		97.1	100.5	101.0		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.8	1.7	2.7		2.7	1.2	0.5		
			Inter-day ^b (%)	2.6	3.0	3.6		3.5	2.3	1.5		
	ENR	1	Trueness	Recovery (%) ^a	98.7	99.4		99.8	FLU	99.6	102.0	99.7
			Precision	Intra-day ^b (%)	2.6	1.5		0.9		2.3	2.1	2.1
				Inter-day ^b (%)	3.1	2.0		1.0		3.9	3.3	3.6
2		Trueness	Recovery (%) ^a	99.3	103.2	101.3	101.7	99.9		100.0		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.6	1.5	0.9	2.2	2.6		2.4		
			Inter-day ^b (%)	4.1	3.0	1.4	3.3	3.1		3.2		
3		Trueness	Recovery (%) ^a	100.4	97.8	98.4	98.7	99.4		98.3		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.1	1.8	0.6	1.8	3.1		2.1		
			Inter-day ^b (%)	3.6	2.7	1.4	2.8	3.5		3.0		
NOR		1	Trueness	Recovery (%) ^a	98.4	99.8	100.1	PIR		99.5	99.4	100.3
			Precision	Intra-day ^b (%)	3.7	1.2	1.1			3.3	1.0	1.7
				Inter-day ^b (%)	6.7	1.9	2.3			3.5	2.1	2.3
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	98.3	102.1	99.1	97.2		100.0	99.4		
		Precision	Intra-day ^b (%)	4.1	2.2	1.1	3.7		2.5	2.7		
			Inter-day ^b (%)	7.3	2.5	2.2	4.2		3.0	3.2		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	99.1	101.8	103.8	99.6		98.2	104.7		
		Precision	Intra-day ^b (%)	3.1	2.3	0.8	3.3		2.7	3.3		
			Inter-day ^b (%)	6.3	2.4	1.6	3.6		3.5	4.1		
	PIP	1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.1	99.7	99.3		OFL	100.3	99.8	100.2
			Precision	Intra-day ^b (%)	4.1	0.7	2.0			2.4	1.6	1.4
				Inter-day ^b (%)	4.6	1.1	2.7			3.0	1.9	2.5
2		Trueness	Recovery (%) ^a	96.8	98.9	101.5	98.9	100.4		104.5		
		Precision	Intra-day ^b (%)	3.4	1.2	2.1	3.1	2.2		1.4		
			Inter-day ^b (%)	4.9	1.7	3.1	3.6	2.6		3.9		
3		Trueness	Recovery (%) ^a	96.9	100.0	100.8	99.6	99.8		98.7		
		Precision	Intra-day ^b (%)	4.1	0.7	1.7	2.4	1.9		1.9		
			Inter-day ^b (%)	5.6	1.4	3.2	3.4	2.4		2.6		
ENO		1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.1	99.4	99.8	LOM		101.6	100.2	98.8
			Precision	Intra-day ^b (%)	4.4	0.8	0.5			3.3	2.6	1.6
				Inter-day ^b (%)	6.3	1.1	0.8			5.9	3.5	2.8
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	98.5	98.7	98.2	97.8		100.4	101.0		
		Precision	Intra-day ^b (%)	5.2	0.8	0.5	3.5		3.0	1.9		
			Inter-day ^b (%)	5.7	1.2	1.4	4.3		3.6	2.6		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	97.7	98.2	99.9	99.0		101.0	103.5		
		Precision	Intra-day ^b (%)	5.4	0.4	0.9	3.4		2.1	2.4		
			Inter-day ^b (%)	5.8	1.7	1.2	4.6		4.2	3.3		
	MOX	1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.1	99.6	99.6		CIN	99.4	98.7	101.4
			Precision	Intra-day ^b (%)	2.3	1.4	1.3			3.7	3.6	1.8
				Inter-day ^b (%)	3.2	1.6	1.8			4.6	5.0	2.5
2		Trueness	Recovery (%) ^a	100.8	99.0	99.2	97.5	99.7		100.5		
		Precision	Intra-day ^b (%)	3.0	1.8	2.0	3.7	3.6		1.8		
			Inter-day ^b (%)	4.3	2.3	2.3	4.0	5.2		3.1		
3		Trueness	Recovery (%) ^a	100.1	99.1	101.2	98.4	99.4		101.2		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.1	1.4	1.1	4.1	4.1		2.1		
			Inter-day ^b (%)	3.5	2.0	2.1	5.7	5.5		2.7		
NAL		1	Trueness	Recovery (%) ^a	100.5	98.2	99.2					
			Precision	Intra-day ^b (%)	4.7	1.7	1.9					
				Inter-day ^b (%)	6.1	3.4	2.7					
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	98.9	99.3	99.0						
		Precision	Intra-day ^b (%)	5.1	1.4	2.5						
			Inter-day ^b (%)	6.7	4.6	2.9						
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	101.1	101.8	98.9						
		Precision	Intra-day ^b (%)	4.6	1.7	1.8						
			Inter-day ^b (%)	5.7	4.0	3.3						

^aMean value of 54 determinations; ^bRSD (%), relative standard deviation. (n=6); ^cRSD (%), relative standard deviation. (n=54)

Table 3 (cont)

Accuracy of the methods. Precision and trueness in sewage sludge samples from three different WWTPs.

Parameter	PLE						PLE					
	Level (ng g ⁻¹)						Level (ng g ⁻¹)					
	20	200	600		20	200	600		20	200	600	
CIP	1	Trueness	Recovery (%) ^a	98.5	99.7	100.0	OXO	98.7	99.8	100.1		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.2	1.2	2.2		3.8	2.4	1.6		
			Inter-day ^b (%)	2.0	1.6	2.5		3.9	3.3	2.4		
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	94.9	96.8	97.3		100.2	99.5	99.8		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.0	1.5	3.0		4.2	2.4	1.6		
			Inter-day ^b (%)	2.4	2.2	3.2		4.8	3.7	2.1		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	97.7	97.3	98.6		98.1	99.6	100.5		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.2	0.8	1.7		3.0	2.2	1.5		
			Inter-day ^b (%)	2.7	1.9	2.8		3.6	3.6	3.0		
ENR	1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.0	99.9	100.0	FLU	99.9	99.8	100.1		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.1	1.1	1.2		1.6	1.3	0.7		
			Inter-day ^b (%)	2.4	1.9	2.0		2.2	1.6	0.9		
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	98.5	98.3	100.1		97.7	99.0	100.6		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.1	0.9	1.1		2.4	1.5	1.0		
			Inter-day ^b (%)	2.1	1.6	2.3		2.7	2.2	1.7		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	96.7	99.7	103.4		100.0	99.9	100.2		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.7	1.4	1.6		1.6	1.2	1.0		
			Inter-day ^b (%)	2.8	2.0	2.2		2.8	2.5	1.4		
NOR	1	Trueness	Recovery (%) ^a	101.1	100.3	99.2	PIR	100.5	100.1	99.9		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.7	0.8	1.5		1.5	1.2	0.6		
			Inter-day ^b (%)	1.9	1.2	2.1		2.3	1.3	0.9		
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	99.7	100.3	101.9		99.3	100.5	100.4		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.9	1.5	1.5		1.2	2.0	1.4		
			Inter-day ^b (%)	2.1	2.5	1.8		2.4	2.4	2.2		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	100.8	98.6	97.5		98.4	97.6	99.3		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.1	0.7	2.1		1.5	2.1	0.6		
			Inter-day ^b (%)	2.4	2.2	2.8		2.2	2.6	1.1		
PIP	1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.8	98.6	100.7	OFL	99.4	98.6	101.1		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.5	2.2	3.0		1.7	1.9	1.4		
			Inter-day ^b (%)	1.8	4.9	3.9		3.4	3.9	1.7		
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	98.0	97.9	98.6		98.1	97.7	103.8		
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.0	2.3	2.7		1.7	1.9	2.3		
			Inter-day ^b (%)	2.5	5.2	4.0		2.8	4.1	2.4		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	103.0	99.8	102.1		97.5	97.1	100.5		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.8	2.1	3.0		1.6	1.6	2.1		
			Inter-day ^b (%)	2.0	4.3	4.2		3.2	3.0	2.5		
ENO	1	Trueness	Recovery (%) ^a	98.8	101.2	99.9	LOM	100.1	101.4	100.9		
		Precision	Intra-day ^b (%)	3.0	1.8	1.7		0.6	3.2	3.8		
			Inter-day ^b (%)	3.1	2.9	1.8		1.7	3.6	4.0		
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	97.6	100.1	97.2		100.9	102.6	98.6		
		Precision	Intra-day ^b (%)	3.4	2.2	2.0		0.6	4.2	3.8		
			Inter-day ^b (%)	4.0	3.4	1.9		2.4	4.6	4.8		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	98.5	104.8	99.5		98.9	99.4	99.5		
		Precision	Intra-day ^b (%)	3.5	1.8	1.7		1.0	3.0	4.2		
			Inter-day ^b (%)	3.5	3.2	2.2		2.9	3.8	5.1		
MOX	1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.2	100.9	99.4	CIN	100.3	100.6	99.7		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.4	4.9	1.1		0.7	1.4	1.1		
			Inter-day ^b (%)	2.4	5.0	1.5		1.0	2.8	1.7		
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	99.7	103.0	97.8		100.7	101.7	97.3		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.8	3.8	1.4		1.0	1.1	1.1		
			Inter-day ^b (%)	2.6	4.9	2.1		2.0	2.6	1.9		
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	98.1	99.9	101.9		99.4	104.2	99.1		
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.9	5.2	1.2		0.9	1.3	1.5		
			Inter-day ^b (%)	2.8	6.0	1.6		1.6	2.0	2.3		
NAL	1	Trueness	Recovery (%) ^a	99.1	99.4	100.9						
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.1	1.8	1.3						
			Inter-day ^b (%)	3.1	2.2	1.5						
	2	Trueness	Recovery (%) ^a	99.0	98.7	101.0						
		Precision	Intra-day ^b (%)	2.1	1.8	2.0						
			Inter-day ^b (%)	3.3	2.6	2.3						
	3	Trueness	Recovery (%) ^a	103.3	99.6	103.2						
		Precision	Intra-day ^b (%)	1.9	2.1	1.5						
			Inter-day ^b (%)	3.5	2.5	1.6						

^aMean value of 54 determinations; ^bRSD (%), relative standard deviation. (n=6); ^cRSD (%), relative standard deviation. (n=54)

Additionally, due to the absence of CRMs, recovery assays were carried out to validate the methods in terms of trueness. Blank spiked samples previously analyzed to ensure they did not contain the compounds of interest or that these were below the LOD of the method were used. Trueness was evaluated by determining the recovery of known amounts of tested compounds in sludge samples. As shown in Table 3, the recoveries were close to 100% (97.9% to 104.8%) in all cases.

3.5 Comparison of methods

Quinolones and fluoroquinolones concentrations were determined in different sewage samples using UAE, MAE and PLE with the aim of comparing statistically the efficiency of these extraction techniques. Regression curves were used for comparing the analytical methods [46]. Although none of the studied extraction techniques is considered as a reference method, this regression study was still used, since these graphs provide valuable information on the nature of any differences among the methods. The results are presented in Table 4.

Table 4
Method comparison results by linear regression.

Analyte (Concentration range)	Compared methods (x vs y)	Slope	Intercept	n	r	Bias (%)
CIP (20 – 95 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	1.001	-0,093	40	0.994	0.10
	USE vs PLE	1.005	-0,242	40	0.993	-0.20
	PLE vs MAE	0.995	0.167	40	0.993	0.40
CIP (183 – 834 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	0.998	-0,620	22	0.999	-0.30
	USE vs PLE	0.999	-0,227	22	0.999	-0.20
	PLE vs MAE	0.999	-0,376	22	0.999	-0.20
NOR (25 – 115 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	0.982	0,618	15	0.998	-0.60
	USE vs PLE	0.994	0.772	15	0.996	0.90
	PLE vs MAE	0.986	0.009	15	0.998	-1.40
PIP (13 – 130 ng g ⁻¹)	MAE vs USE	0.999	-0.109	20	0.998	-0.93
	USE vs PLE	0.994	0.645	20	0.998	0.93
	MAE vs PLE	0.994	0.445	20	0.999	0.61
PIP (169 – 600 ng g ⁻¹)	MAE vs USE	0.998	0.586	15	0.998	0.23
	USE vs PLE	1.002	0.105	15	0.997	0.26
	MAE vs PLE	0.999	0.656	15	0.997	0.27
MOX (15 – 83 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	1.001	-0.036	36	0.994	0.23
	USE vs PLE	0.992	0.275	36	0.997	-0.19
	MAE vs PLE	0.991	0.338	36	0.991	-0.30
MOX (197 – 741 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	1.001	-0.624	14	0.996	-0.22
	USE vs PLE	0.995	-0.314	14	0.996	-0.31
	MAE vs PLE	0.998	-0.378	14	0.997	0.24
OFL (15 – 129 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	0.996	0.049	25	0.995	-0.30
	USE vs PLE	0.998	0.183	25	0.992	0.47
	MAE vs PLE	1.003	0.137	25	0.996	0.37
PIR (13 – 61 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	0.991	0.373	13	0.995	0.40
	USE vs PLE	0.993	0.401	13	0.995	0.60
	PLE vs MAE	0.998	-0.017	13	0.994	-0.34
NAL (12 – 44 ng g ⁻¹)	USE vs MAE	1.010	0.027	12	0.994	1.1
	USE vs PLE	1.002	0.044	12	0.998	0.40
	PLE vs MAE	1.008	-0.015	12	0.995	0.60

A bias less than 1.5%, excellent correlation coefficients, and insignificant intercepts were obtained at both concentration ranges. This proves that the variation in measurements was mainly due to random measurement errors. A difference plot between the analysed sludge samples was also calculated, helping to determine the agreement or disagreement between methods. The differences between concentrations in every split sample were plotted against the means of each pair. This plot allows us to investigate any possible relationship between the measurement error and the true value. The true value is not known, so that the mean of the two measurements is the best estimate. The lack of agreement between methods is measured by the deviation of the points from the horizontal nil-bias line. In general, there was a narrow scatter around the zero line of no difference, with a homogeneous distribution above and below the zero line, suggesting the absence of significant proportional systematic errors between the evaluated methods. An example of a difference plot is shown in Figure 5.

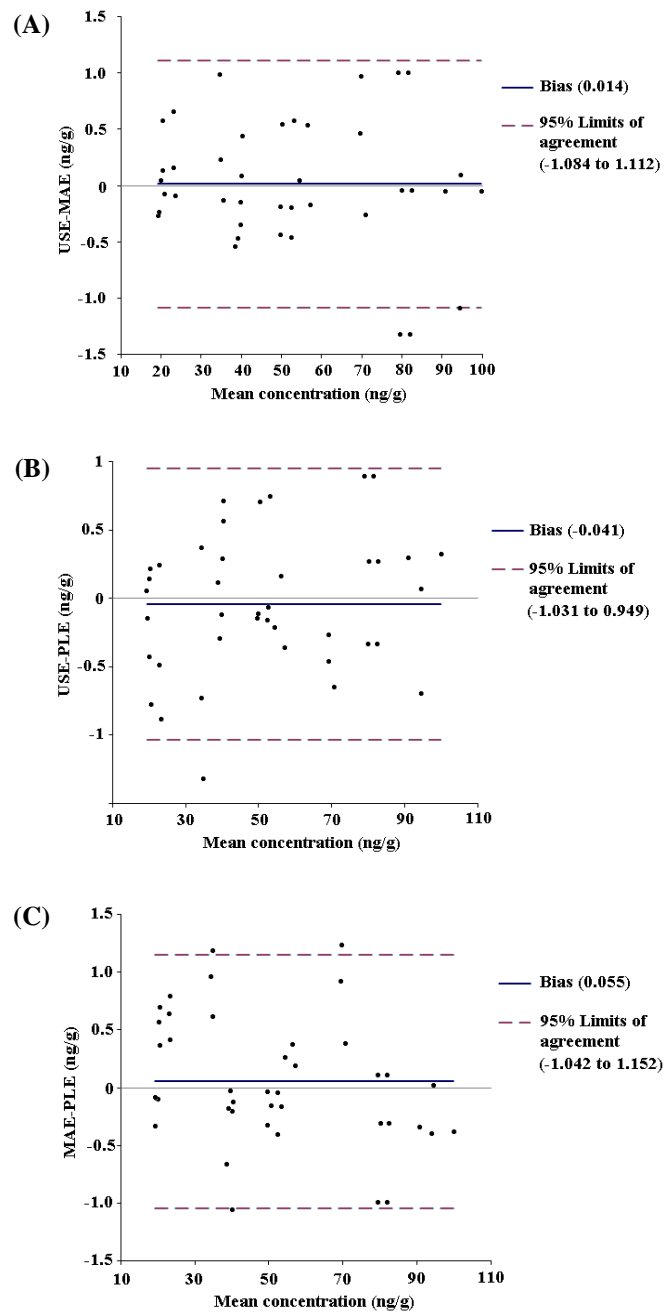


Fig. 5. Overview of difference-plots for the comparison of the extraction techniques for the determination of CIP in sludge samples in the concentration range of 20 – 95 ng g⁻¹.

From this graph it was also possible to calculate the limits of agreement, or the differences of the measured concentration from one method below and above in relation to other. In the example showed in Figure 5 for ciprofloxacin, it could be observed that limits of agreement for the three methods are quite similar and small enough to be acceptable and confident that any extraction method can be used interchangeably. The short 95% confidence intervals for these limits are evidence of few variations of the differences. A similar behaviour was observed for the other analysed antibiotics. A maximum difference of 1 ng g^{-1} was also observed for MOX, PIR and NAL, followed by OFL, NOR and PIP, with a maximum difference of 2 ng g^{-1} , for the low concentration range. These limits of agreement were also similar among the three extraction methods.

In consequence, it can be concluded that the three methods can be used because they are completely reliable. However, the best options to be considered are MAE and PLE, because along with their higher extraction efficiency, the throughput of samples is an important advantage of these techniques, since extractions of serial samples can be completed in a fraction of the time, with a higher degree of automation compared to USE. However, we should keep in mind the use of MAE- and PLE-based techniques is also determined by cost-related issues, because of the high initial investment costs of MAE or PLE units. Nonetheless, the proposed USE procedure has the advantage of using simpler equipment and similar amounts of solvent than MAE and PLE, so that USE must also be considered as an appropriate and robust technique for the extraction of these contaminants from sewage sludge samples.

4. Conclusions

In this paper, three analytical methods based on the use of three different extraction techniques—USE, MAE and PLE—followed by LC–MS/MS analysis are proposed for the determination of 13 quinolone derivatives in sewage sludge samples. Although the extracts showed significant matrix effects, the optimization of the extraction procedures using design of experiments, together with the sensitive detection and quantification provided by LC–MS/MS, allowed the validation of the analytical performance of the methods. These methods provided low LODs (between 1 and 5 ng g⁻¹), high recoveries and good precision, which is an important achievement in comparison with other methods involving more clean-up procedures. MAE and PLE were considered as the best options for extraction, because of their higher extraction yields, easy operation, shorter analysis times and high automation degree. USE offers a simpler extraction procedure, requiring similar amounts of solvent than MAE and PLE, but technique is very tedious and requires much longer analysis times. One of the most important contributions of this work is that despite the differences in the extraction procedures, we have developed three analytical methods that exhibited good analytical parameters and no statistically significant differences in relation to sensitivity, selectivity, accuracy and precision in the determination of the selected compounds.

Acknowledgements

This study was supported by the regional Government of Andalusia (Research Contract N^o 3017–00) and by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (Project N^o CTQ2011–24210). The authors are grateful

to the Spanish Ministry of Foreign Affairs (Agency for International Cooperation) for the fellowship granted to N. Dorival–García and to the company Air Liquide España for its valuable contribution to this study.

References

- [1] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122–159.
- [2] T.A. Ternes, A. Joss, H. Siegrist, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 392A–399A.
- [3] C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Environ. Health Persp.* 107 (1999) 907–938.
- [4] S. Kim, D.S. Aga, J. *Toxicol. Environ. Health B* 10 (2007) 559–573.
- [5] K. Kümmerer, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 5–7.
- [6] K. Kaur, A. Kumar, A.K. Malik, B. Singh, A.L.J. Rao, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 38 (2008) 2–18.
- [7] M. Ferech, S. Coenen, S. Malhotra–Kumar, K. Dvorakova, E. Hendrickx, C. Suetens, H. Goossens, *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (2006) 423–427.
- [8] L.A. Cardoza, C.W. Knapp, C.K. Larive, J.B. Belden, M. Lydy, D.W. Graham, *Water Air Soil Pollut.* 161 (2004) 383–398.
- [9] M.S. Díaz–Cruz, M.J. López Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1130 (2006) 72–82.
- [10] X.S. Miao, F. Bishay, M. Chen, C.D. Metcalfe, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3533–3541.
- [11] N. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, *Water Res.* 41 (2007) 1001–1012.

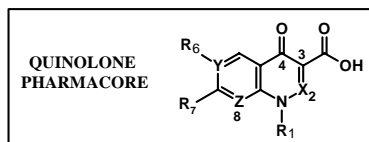
- [12] C.A. Kinney, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, M.R. Burkhardt, S.L. Werner, J.D. Cahill, G.R. Jorgensen, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7207–7215.
- [13] S.R. Smith, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 367 (2009) 4005–4041.
- [14] S. Montesdeoca–Esponda, Z. Sosa–Ferrera, J.J. Santana–Rodríguez, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 33–40.
- [15] B. Li, T. Zhang, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 3468–3473.
- [16] R.H. Lindberg, K. Björklund, P. Rendahl, M.I. Johansson, M. Tysklind, B.A.V. Andersson, *Water Res.* 41 (2007) 613–619.
- [17] Y. Xiao, H. Chang, A. Jia, J. Hu, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 100–108.
- [18] R. López–Serna, S. Pérez, A. Ginebreda, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta* 83 (2010) 410–424.
- [19] Y. Picó, V. Andreu, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1287–1299.
- [20] A. Speltini, M. Sturini, F. Maraschi, A. Profumo, A. Albin, *Trends in Anal. Chem.* 30 (2011) 1337–1350.
- [21] A. Karci, I. Akmeahmet Balcioğlu, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 4652–4664.
- [22] M. Ötker Uslu, A. Yediler, I. Akmeahmet Balcioğlu, S. Schulte-Hostede, *Water Air Soil Pollut.* 190 (2008) 55–63.
- [23] M. Ferdig, A. Kaleta, W. Buchberger, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1448–1456.
- [24] E. Turiel, A. Martín-Esteban, J.L. Tadeo, *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 30–35.
- [25] W. Chenxi, A.L. Spongberg, J.D. Witter, *Chemosphere* 73 (2008) 511–518.
- [26] E.M. Golet, A. Strehler, A.C. Alder, W. Giger, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5455–5462.

- [27] M. Lillenberg, S. Yurchenko, K. Kipper, K. Herodes, V. Pihl, K. Sepp, R. Lõhmus, L. Nei, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5949–5954.
- [28] J. Radjenović, A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1685–1695.
- [29] A.B. Marcos, E.S. Ricardo, P.O. Eliane, *Talanta* 76 (2008) 965–977.
- [30] T.C. McIlvaine, *J. Biol. Chem.* (1921) 183–186.
- [31] F. Tamtam, F. Mercier, J. Eurin, M. Chevreuil, B. Le Bot, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1709–1718.
- [32] D.A. Volmer, B. Mansoori, S.J. Locke, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4143–4155.
- [33] J. Hu, W. Wang, Z. Zhu, H. Chang, F. Pan, B. Lin, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 4806–4812.
- [34] B. Li, T. Zhang, Z. Xu, H.H. Ping Fang, *Anal. Chim. Acta* 645 (2009) 64–72.
- [35] H.C. Holten Lutzhoft, W.H.J. Vaes, A.P. Freidig, B. Halling-Sorensen, J.L.M. Hermens, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 4989–4994.
- [36] J. Tolls, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3397–3406.
- [37] C. Gu, K.G. Karthikeyan, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 9166–9173.
- [38] E.M. Golet, I. Xifra, H. Siegrist, A.C. Alder, W. Giger, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3243–3149.
- [39] J.A. Hernández-Arteseros, J. Barbosa, R. Compañó, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 1–24.
- [40] J. Xu, L. Wu, W. Chen, A.C. Chang, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 189–195.
- [41] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5619–5625.

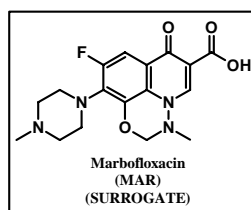
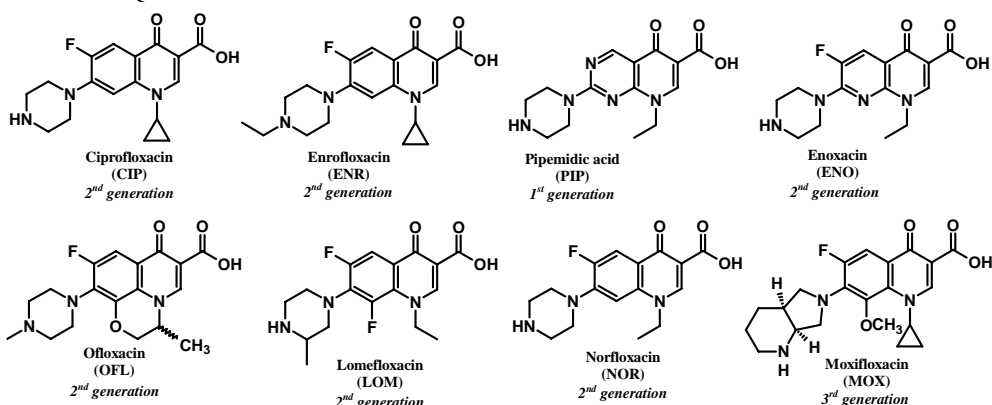
- [42] S.L.C. Ferreira, W.L.N. do Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta* 63 (2004) 1061–1067.
- [43] M. Roca, M. Castillo, P. Marti, R.L. Althaus, M.P. Molina, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5427–5431.
- [44] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta* 70 (2006) 678–690.
- [45] A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta* 80 (2009) 363–371.
- [46] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed., Pearson Education Limited, Essex, 2005.

Supplementary Material

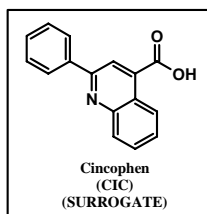
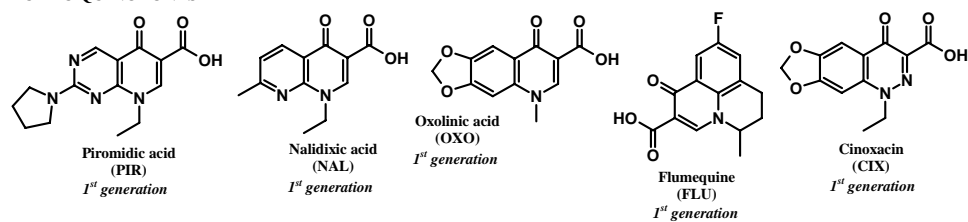
Chemical structure of quinolone and fluoroquinolones



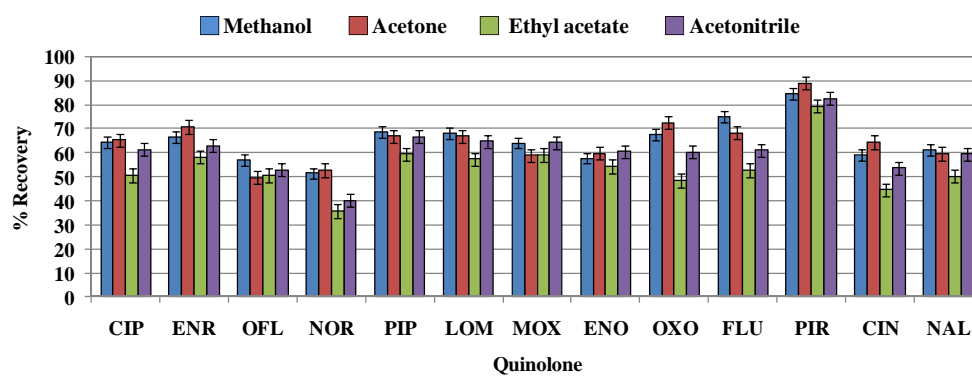
AMPHOTERIC QUINOLONES



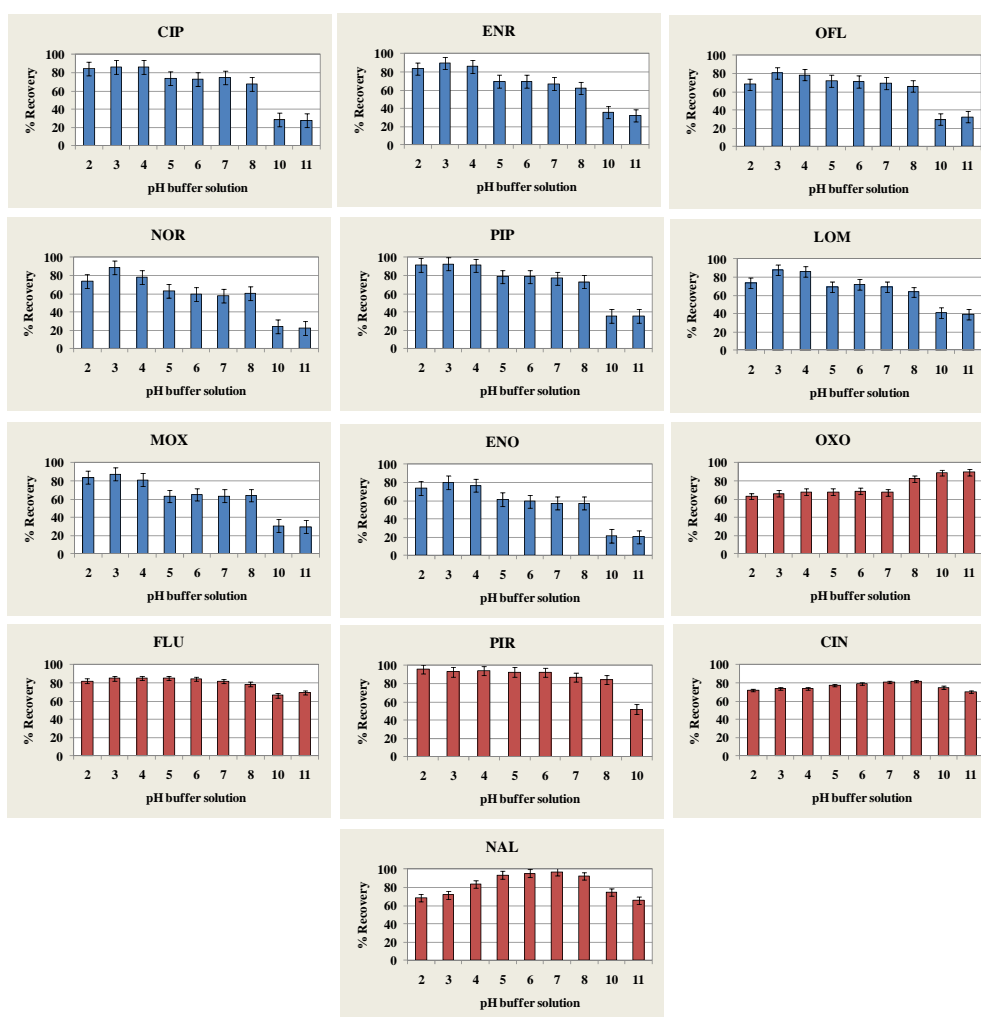
ACIDIC QUINOLONES



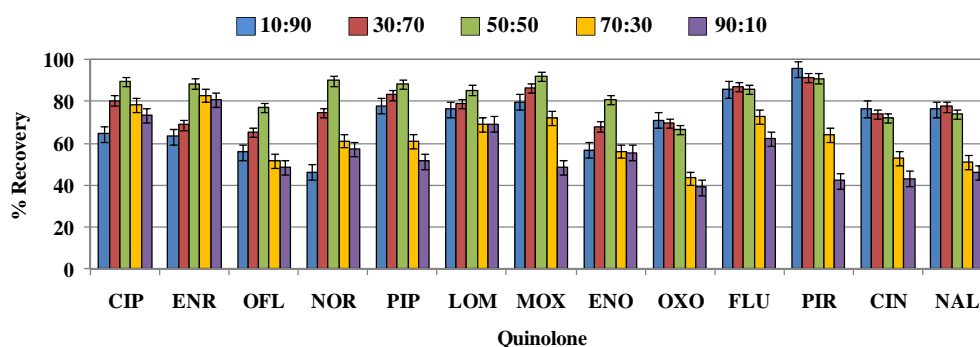
Recovery of quinolones from sludge spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) followed by USE with different solvents and LC-MS/MS analysis. USE conditions: 5 mL of solvent, 75% amplitude, 20 minutes per extraction cycle, 2 extraction cycles.



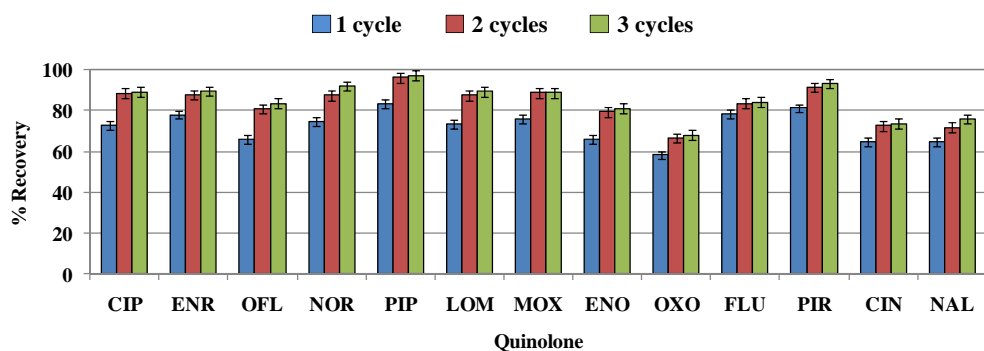
Influence of pH in the recovery of quinolones from sludge. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) followed by USE with a mixture of McIlvaine buffer solution and methanol (1:1). The buffer solution was adjusted at different pH values (which are shown on the graph). USE conditions: 5 mL of solvent, 75% amplitude, 20 minutes per extraction cycle, 2 extraction cycles.



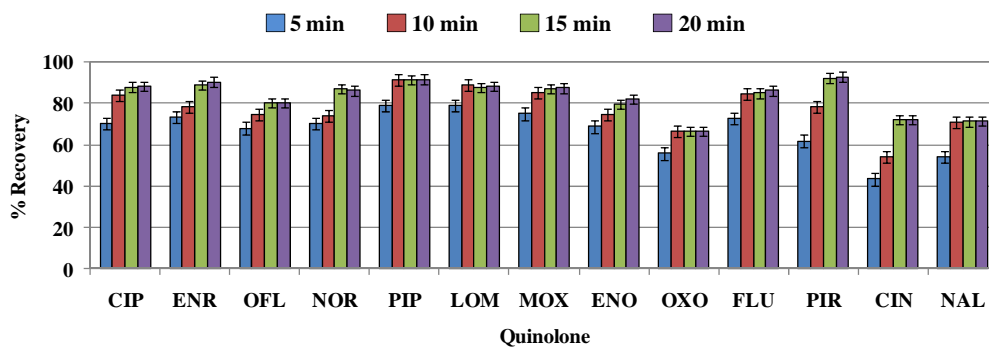
Influence of various buffer/methanol mixtures in the recovery of quinolones from sludge. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) followed by USE with the indicated mixture of McIlvaine buffer solution and methanol. USE conditions: 5 mL of solvent, 75% amplitude, 20 minutes per extraction cycle, 2 extraction cycles.



Influence of the number of extraction cycles in the recovery of quinolones from sludge. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) followed by USE with a mixture of McIlvaine buffer solution:methanol 1:1. USE conditions: 5 mL of solvent, 75% amplitude, 20 min of extraction per cycle.



Influence of the extraction time in the recovery of quinolones from sludge. Samples were spiked with target compounds (200 ng g^{-1}) followed by USE with a mixture of McIlvaine buffer solution:methanol 1:1 at different extraction times. USE conditions: 5 mL of solvent, 75% amplitude, 2 extraction cycles.



CAPÍTULO III

Estudio de Contaminantes
a Escala de Planta Piloto

1. OBJETIVOS

Los principales objetivos de los trabajos realizados y presentados en este capítulo son:

- Estudiar el destino final y las principales rutas de eliminación del bisfenol A y sus derivados clorados en una depuradora de aguas residuales en la que se emplea la tecnología de biorreactores de membrana (MBR).
- Emplear como alternativa el uso de oxígeno para fijar condiciones aeróbicas más oxidantes en el interior del biorreactor.
- Realizar un experimento en planta piloto y evaluar y comparar la eficiencia de depuración en dos situaciones diferentes; inyectando aire por un lado y oxígeno puro por otro.
- Estudiar la evolución de la actividad enzimática en el bioreactor, durante el proceso de eliminación del bisfenol A y sus derivados clorados para comparar los efectos sobre la biota de la inyección de aire y de oxígeno puro.
- Demostrar la viabilidad económica del proceso gracias al aumento en la eficiencia de depuración con el uso de oxígeno puro. Disminuyendo los costes de una forma notable.

3. PUBLICACIÓN V

International Journal of Environmental Science and
Technology
Revised, Minor Revision (03/10/2012)

Effect of the injection of pure oxygen into a membrane bioreactor on the elimination of bisphenol A

Running title: Removal of contaminants in wastewaters

N. Dorival-García^a, A. Zafra-Gómez^a, B. Oliver-Rodríguez^a, A. Navalón^a, J. Gozález-López^b, J.L. Vilchez^a

^a *Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain*

^b *Research Group of Microbiology and Environmental Technologies, Water Research Institute, University of Granada, E-18071 Granada, Spain.*

Abstract This work investigates the effect of the injection of pure oxygen instead of air in a membrane bioreactor (MBR) for the elimination of bisphenol A (BPA), one of the most important endocrine disrupting chemicals. A dynamic experiment was carried out in a pilot plant where the aerobic reactor was continuously spiked with 1 mg L⁻¹ BPA. Air was injected during 10 days and then pure oxygen was injected for another 10 days. The BPA concentration was determined in aqueous phases and activated sludge using simple and sensitive analytical methods based on different extraction procedures and LC-MS/MS analysis. Enzymatic activity was also determined and toxicity tests were performed to rule out that the spiked BPA concentration could negatively affect the microorganisms in the

bioreactor and, thus, MBR performance. The effluent BPA concentration increased up to 0.26 mg L^{-1} after 4 days in the air injection treatment, and up to 0.48 mg L^{-1} after only 12 h in the oxygen injection treatment. In both cases, this was followed by a decrease in concentration despite the continuous spiking of BPA into the bioreactor. In presence of pure oxygen, BPA concentration reached background levels (below the limit of quantification) after 5 days. In contrast, when using air a total of 10 days were required to reach background levels. The injection of pure oxygen instead of air is an important innovation in wastewater treatment, allowing permanent elimination of organic contaminants, avoiding their return to the environment and ensuring the safety of water.

Keywords Membrane bioreactor • Bisphenol A • LC-MS/MS • Wastewater • Sewage sludge.

* Corresponding author: Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are known to mimic natural hormones thus causing adverse effects in humans and wildlife. Their effects lead to reduced fertility, congenital malformations of the reproductive tract and increased incidence of cancer in estrogen-responsive tissues (Bonefeld-Jørgensen et al. 2007). Recent studies focus on anthropogenic EDCs, such as synthetic hormones, a great variety of pharmaceuticals and personal care products, as well as a large amount of industrial chemicals, being of especial importance BPA, PCBs, dioxins, pesticides, phthalates, alkylphenols and alkylphenol ethoxylates (Smith al. 2009).

BPA is the EDC causing the greatest concern in the scientific and medical community, because its effects are even more pernicious than those caused by other EDCs. BPA can interact with estrogen receptors and is a human androgen receptor antagonist, even at low doses. It is thought that BPA can negatively affect the neuroendocrine, behavioural and cognitive functions of individuals (Takayanagi et al. 2006). In addition, BPA may also cause feminization of numerous species, inhibition of male phenotype and spermatogenesis, stimulate the growth of breast tumour cells, act as teratogenic and carcinogenic agent, and can affect the thyroid function (Furuya et al. 2006; Stowell et al. 2005). The presence of BPA in blood is also associated with recurrent miscarriage and development of polycystic ovary syndrome (Meeker et al. 2009).

BPA is one of the most produced chemicals in the world, with an annual production of more than 3.2 million tons (EPA 2005). It is used in the manufacture of polycarbonate plastics and epoxy resins used to line metal cans, and in many plastic products including baby bottles, toys, water pipes, drinking and food containers and other food-contact items, eyeglass

lenses, dental monomers (composites and sealants) and medical equipments. The migration from food and beverage containers is considered as the primary route of human exposure to BPA. As a consequence, it can be found in biological fluids and tissues (Vandenberg et al. 2007). Environmental exposure to BPA is also a cause of concern. Wastewater containing BPA is a source of contamination of the aquatic environment (Kang et al. 2006), and low concentrations of BPA are able to cause effects if the exposure is continuous. BPA is not completely removed by currently available wastewater treatments, consequently it remains in effluents, at concentrations ranging from very low levels — ng L^{-1} (Drewes et al. 2005; Lagana et al. 2004)— to high levels — mg L^{-1} (Clara et al. 2005; Vethaak et al. 2005)— including extremely high levels in WWTP effluents from factories — mg L^{-1} (Mohapatra et al. 2010)—. The discharge from such effluents is the main responsible for the wide distribution and occurrence of BPA in surface waters, from 0.5 ng L^{-1} (Kuch and Ballschmiter 2001) to 1 mg L^{-1} (Vethaak et al. 2005); ground waters, up to 0.93 mg L^{-1} (Hohenblum et al. 2004); and even in drinking waters, up to 5 ng L^{-1} (Rodríguez-Mozaz et al. 2004). Incomplete removal of BPA by existing WWTPs is the result not only of the fluctuation of BPA levels in the influent, but also of the processes that take place at the WWTPs, and as well as the operational conditions.

Effluents containing BPA after landfill leachate treatment are known to be a source of BPA contamination in the aquatic environment; from groundwater enters rivers, streams and drinking waters (Nascimento Filho 2003). Evidence exists demonstrating that BPA poses a serious threat to aquatic life even at the low concentrations at which is found in aquatic ecosystems (Talsness et al. 2009).

As the conventional activated sludge process is not capable of removing all the BPA, new treatments need to be considered to minimize

the discharge of this compound. Membrane bioreactors (MBR) are a satisfactory alternative providing significant improvements over conventional treatments, like separation of treated waters by membrane filtration, which ensures the absence of solid particles and microorganisms in the effluents. MBRs are operated at higher biomass concentration, which means that the plant can operate at longer solids retention time (SRT) facilitating additional biological transformation of micropollutants in general. While some studies exist on the fate of BPA in MBRs (Hu et al. 2007; Chen et al. 2008), there is little information about the final fate of the compound in WWTPs. Elimination of BPA from waters do not ensure its ultimate degradation because the hydrophobic properties of BPA facilitate its adsorption on the sludge and on the ultrafiltration membrane during wastewater treatment, and complete degradation is not achieved under these conditions (Spring et al. 2007). More research is required regarding the water/sludge partition ratio of BPA in order to develop processes that help to minimize sorption of the compound on sludge (Ivashechkin et al. 2004).

Other problem related to BPA is the generation of by-products during depuration process and improving the efficiency of the treatments has become therefore strictly necessary. In this respect, several studies have focused on the application of tertiary treatments, which usually include an oxidative process. These treatments are usually effective (Lenz et al. 2004; Schröder 2006) but they may result in high expenses and secondary pollution, caused by the presence of residual amounts of the oxidants or their by-products in water.

The aim of this work is to study the final fate and the main elimination pathways of BPA using the MBR technology. In addition, the work proposes an alternative to use pure oxygen instead of air in order to increase significantly the driving force for oxygen mass transfer for aeration and provide more oxidative conditions into the bioreactor, enhancing the

degradation processes. Although aeration represents the major power input in a MBR system (about 90% of biological treatment), this alternative becomes feasible because the use of pure oxygen can lead to a reduction in the operating costs of about 20% in comparison with air, resulting in an oxygen positive balance, because the required energy for processes is much lower (15–20%). In order to fulfill this objective, we carried out a dynamic experiment in a MBR pilot plant. The BPA removal efficiency was evaluated and compared in two different situations: air injection and pure oxygen injection into the bioreactor. The enzymatic activity was also tested during the whole experiment to determine the effect of air and pure oxygen on the microbiological activity in the bioreactor.

Materials and Methods

Chemicals

Analytical grade standards of BPA and deuterated BPA (BPA-d₁₆), the substrates for testing enzymatic activity and nutrient broth for toxicity tests were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chlorinated derivatives of bisphenol A (Cl-BPA, Cl₂-BPA, Cl₃-BPA, Cl₄-BPA) were synthesized in our laboratory (Vilchez et al. 2005). Stock solutions of BPA and derivatives were prepared in methanol, stored at -20 °C and prepared fresh monthly. Working standard mixtures were prepared by diluting the individual stock solution in methanol or in the initial mobile phase immediately before use. They were stored at 4 °C in dark glass bottles and prepared fresh weekly. The aqueous solutions of substrates for testing enzymatic activity, and the corresponding buffer solutions, were prepared at the established concentrations, stored at 4 °C and prepared fresh weekly.

LC-MS grade methanol and water—used for preparation of standards—, acetone, ethyl acetate and ammonia (>25%) were purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). Substrates and reagents for enzymatic activity and toxicity tests, as well as the salts for the culture media were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Water (18.2 MΩ cm) was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). Solid-phase extraction (SPE) sorbents were silica-based bonded C18 cartridges LiChrolut RP-18 (500 mg, 3 mL) from Merck (Darmstadt, Germany). Wastewater samples were filtered through a 0.45 μm cellulose acetate disk filter (Millipore) before analysis.

Instrumentation and software

Extraction procedures of sludge were performed in a Milestone (ETHOS SEL) microwave solvent extraction Labstation (Sheldon, CT, USA), operating at 2455 MHz with a maximum delivered power of 1000W. The time, temperature and microwave power control were adjusted and controlled throughout the process using the easyWAVE 3 software, version 3.2.1.0. Detection and quantification of the analytes were performed using an Agilent 1200 series (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) liquid chromatograph (LC) coupled “on line” to an API 2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) triple quadrupole mass spectrometer using an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface. A Gemini C₁₈ column (100 mm × 2.0 mm i.d., 3 μm particle size) and a C₁₈ guard column, both supplied by Phenomenex (Torrance, CA, USA) were used. For pH measurements, a Crison 2000 digital pH-meter with a combined glass-Ag/AgCl (KCl 3 M) electrode (Crison Instruments S.A, Barcelona, Spain) was used. A vortex-mixer (Yellow line, Wilmington, NC,

USA); a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttlingen, Germany), and a Memmert oven (Schwabach, Germany) were also used. Sludge used for blank assays of enzymatic activity was autoclaved in a RAYPA autoclave (Barcelona, Spain) and samples were incubated in a Memmert incubator (Schwabach, Germany). Absorbance of supernatants for enzymatic activity and toxicity tests was measured in a UNICAM 5625 UV/Vis spectrophotometer (ATI UNICAM, Brackley, UK). SPE was carried out in a Supelco (Madrid, Spain) vacuum manifold for 12 columns connected to a Supelco vacuum tank and to a vacuum pump. Data were analyzed by either one-way or multi-factor analysis of variance (ANOVA), using the software package Statgraphics 5.0 (STSC, Rockville, MD, USA) (Statgraphics 1982-2009) to identify significant differences between measurements. A level of 95% ($P < 0.05$) was considered statistically significant.

Membrane bioreactor pilot plant description and operational conditions

The MBR pilot plant used in the experiments (Figure 1) was provided by Air Liquide España from Zenon S.A. The MBR pilot plant has a sidestream configuration and consisted of a cylindrical bioreactor with an operational volume of 385 L into which air or pure oxygen is applied; and a rectangular bioreactor of 89 L, where two polyvinylidene difluoride (PVDF) hollow fibre membrane module (Zenon[®]), with an effective area of 1.86 m² and a nominal pore size of 0.04 μm (ZW-10 Zenon[®]) were installed. Control devices to monitor membrane pressure, temperature of the activated sludge, suspension solids and dissolved oxygen (DO) were also available. The MBR was operated using urban wastewater from the primary settling tank of the wastewater treatment plant (WWTP) located in the city of Granada (Spain).

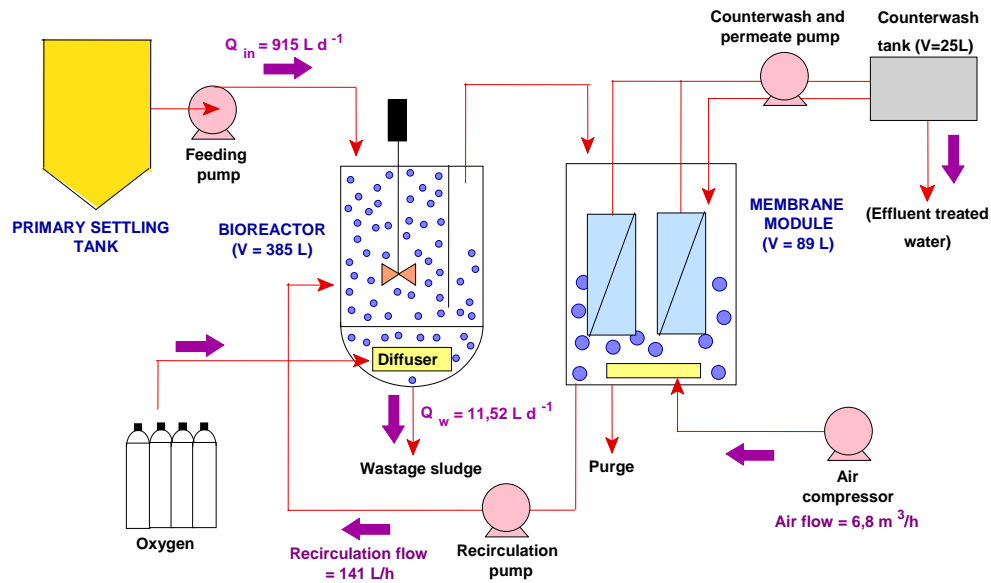


Fig. 1. Schematic diagram and picture of the MBR pilot plant including dimensions and typical flow rates.

Table 1 summarizes the operational conditions of the pilot plant for the experiments.

Table 1 Operational and physicochemical parameters of the MBR pilot plant during the experiments.

Physicochemical parameters of influent and effluent water of the MBR pilot plant ^a		
Parameter	Influent	Effluent
pH	7.6	7.5
Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1419	1016
COD (mg L^{-1})	330.0	30.6
BOD ₅ (mg L^{-1})	359.8	26.4
MLSS (mg L^{-1})	120.3	2.8
Total nitrogen (mg L^{-1})	80.0	7.6
MLVSS (mg L^{-1})	105.0	2.5

Operational conditions of the MBR pilot plant		
Parameter	Unit	Value
Influent flow rate	Q_{in} (L d ⁻¹)	915.6
Wastage sludge flow rate	Q_w (L d ⁻¹)	11.52
Hydraulic retention time	HRT (d)	0.5
Sludge retention time	SRT (d)	32
Aeration (oxygen flow)	g h ⁻¹	500
Membrane module aeration	m ³ h ⁻¹	6.8
Recirculation flow	L h ⁻¹	141

Physicochemical parameters of the bioreactor for each experimental period ^a		
	Experiment 1 (with air)	Experiment 2 (with pure oxygen)
pH	7.02	6.98
Temperature (°C)	23.8	27.3
MLSS (mg L ⁻¹)	9300	8500
MLVSS (mg L ⁻¹)	8000	7500
Conductivity (μS cm ⁻¹)	1156	1063
Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	2.09	3.06
Oxidation–reduction potential (mV)	+155.6	+227.3

^a It was reported the mean value for each 10 days examination period.

The characteristics of wastewater were analyzed daily during the whole experiment. The average values for each parameter used to feed the bioreactor were: 330 mg L⁻¹ total chemical oxygen demand (COD), 360 mg L⁻¹ biochemical oxygen demand at 5 days (BOD₅), 80 mg total N L⁻¹. Removal was around 90% for total COD and for nitrogen. The elimination performance was 97% for suspended solids. The bioreactor was started up with no previous inoculation; thus, the microorganisms in the sludge came from the influent wastewater. Air or pure oxygen was applied into the

cylindrical bioreactor in order to provide suitable aerobic conditions for the biological processes that will take place. DO was within the range of 2–4 mg L⁻¹. In the rectangular bioreactor, aeration was applied to create turbulence and delaying membrane fouling. The biomembrane process uses a vacuum system to pull the wastewater through the membrane that is then stored in a third tank (25 L). The flow is reversed regularly for turbulence promotion, which allows passing treated water through the membrane in the reverse direction. This contributes to the cleaning of the membrane surface and avoids increase in transmembrane pressure (TMP) value, which is an indicator of the degree of membrane fouling. Plant operation consisted of 10-min cycles: a filtration cycle lasting 9 min 45 s followed by a back flush cycle lasting 15 s. A system for the purge of excess sludge was also provided.

Experimental protocol

The bioreactor was continuously spiked with 893 mg of BPA per day, equivalent to a total influent BPA concentration of 1 mg L⁻¹. This concentration was selected based on a previous study (Lindblom et al. 2009) in order to evaluate the MBR capability for BPA removal from waters under conditions of high pollution levels of this contaminant. In order to establish differences between the use of air and pure oxygen to provide aerobic conditions in the bioreactor, two experiments were performed during spring 2010, with a mean temperature inside the bioreactor of 26 °C. The experimental work in the plant was divided in two consecutive stages: the first experiment was performed during 10 days and involved the use of air from a compressor as source of oxygen for the bioreactor. Once the first experiment was completed, the second one was immediately initiated,

involving the use of pure oxygen during other 10 days. The mean values for the physicochemical parameters measured in the bioreactor during the two 10-day experiments are presented in Table 1. During both experiments, samples of influent, effluent water and sewage sludge were collected at defined time intervals in order to determine BPA concentration. Samples from the bioreactor mixed liquor were also taken for the analysis of the enzymatic activity of the bacterial populations living in the bioreactor. Before the spiking of the bioreactor with BPA, samples of the bioreactor mixed liquor were taken for the corresponding toxicity tests.

Sample collection and analysis

Sampling and extraction of samples for EDCs determination. All water and sewage sludge samples were collected and stored in amber glass bottles. Immediately after the sampling, decreased biological activity was achieved by addition of 1% (v/v) aqueous formaldehyde. Once in the laboratory, water samples were centrifuged, filtered and stored in the dark at 4 °C, until analysis. Sludge samples were also centrifuged and the solid fraction was recovered, dried in a heater at 60 °C to constant weight and finely ground (≤ 1.41 mm). The samples were kept in the dark at 4 °C until analysis. Both types of samples were processed within the allowable holding period. The determination of BPA concentration in water samples was performed according to a method described elsewhere (Zafra-Gómez et al. 2008) with some modifications. Briefly, BPA was extracted from samples using a SPE procedure with LiChrolut RP-18 cartridges. 100 mL of wastewater were passed through the cartridges and after extraction; the analytes were eluted with a mixture of diethyl ether–methanol (90:10; v/v). Eluents were evaporated to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen. The residues

were re-dissolved in 500 μL of the initial mobile phase and directly injected into the LC system. The determination of adsorbed BPA in sludge samples was performed using a modified analytical method that was adapted for sludge samples (Liu and Zhou 2004). Briefly, Sludge sample (1.0 g) was placed in a microwave Teflon vessel with 10 mL of ethyl acetate as extraction solvent. The suspensions were extracted for 10 min (10 min for holding) at 90 °C and at 1000 W. After microwave irradiation, the vessels were allowed to air-cool inside the microwave to below 45 °C. The extract was centrifuged for 35 min at $3634 \times g$ and evaporated to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen. The residue was resuspended with 500 μL of the initial mobile phase, centrifuged at $3634 \times g$ for 10 min and the supernatant was directly injected into the LC system. In order to study the efficiency of the extraction procedures, a recovery assay was carried out. Water and sludge samples were spiked in triplicate with a standard solution of compounds (1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for wastewater and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for sludge samples). Spiked samples and a blank sample were analyzed and the recoveries of the analytes were above 96% and 94% on average for wastewater and sludge, respectively. The limit of quantification (LOQ) of the method was calculated on the basis of a signal-to-noise ratio (S/N) of 10. For BPA, the LOQ was 52 ng L^{-1} in wastewater and 18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in sludge. For the derivatives, the LOQ were between 24–43 ng L^{-1} for wastewater and 20–30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for sludge.

LC-MS/MS analysis. A Gemini C_{18} column (100 mm \times 2.0 mm i.d., 3 μm particle size) and a C_{18} guard column were used for LC analysis. The flow rate was 350 $\mu\text{L min}^{-1}$, the column was maintained at 40 °C, and the injection volume was 40 μL . The standards and samples were separated using a mobile phase consisting of 0.025% (v/v) ammoniacal aqueous

solution and 0.025% (v/v) ammonia in methanol, with a methanol gradient from 60% to 100% in 5 min. Multiple reaction monitoring (MRM) was used. APCI was performed in the negative ion mode. The mass spectrometric conditions were as follows: ion source temperature, 350 °C; IonSpray voltage, -3 kV, nitrogen was used as both the curtain gas at 30 psi and ion source gas 1 and 2 at 50 and 30 psi, respectively; collision gas was air at 10 psi. To optimize MRM conditions, a full scan and a product ion spectrum for each compound were first acquired by infusion of standard solutions of each analyte. Declustering potential, focusing potential, entrance potential, collision energy, and collision cell exit potential were optimized in order to obtain the maximum sensitivity with the highest amount of product ions available. Two pairs of Q1/Q3 were chosen for each compound, except for the surrogate, because it was an isotopically labelled compound that is unlikely to be found in environmental samples (BPA: 227.2, 212.2/132.9; Cl-BPA: 261.1, 182.1/210.0; Cl₂-BPA: 295.1, 244.1/215.2; Cl₃-BPA: 329.1, 250.1/278.0; Cl₄-BPA: 365.0, 314.2/286.1; BPA-d₁₆: 241.2, 142).

Determination of enzymatic activities. The samples for the determination of enzymatic activity were collected in sterile plastic containers and immediately transported to the laboratory at 4 °C. The determinations were performed no later than 8 h after sampling. The activity of six enzymes was determined: alkaline and acid phosphatase (Goel et al. 1998), α -glucosidase (Goel et al. 1998), esterase (Boczar et al. 2001), protease (Cadoret et al. 2002) and dehydrogenase (Awong et al. 1985). All enzyme assays were based on colorimetric methods, and are described in literature. Enzymatic activity was expressed as $\text{mM min}^{-1} \text{g MLVSS}^{-1}$.

Determination of physicochemical parameters. The concentration of mixed liquor suspended solids (MLSS), mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS), COD, BOD₅, and total nitrogen were determined by standard methods (APHA 2001). Temperature, pH, DO, oxidation-reduction potential, and conductivity were determined by specific sensor electrodes (Crison Instruments).

Toxicity tests. Growth inhibition of activated sludge. The information obtained from this test is helpful for choosing suitable BPA spiking concentration, in other words, a concentration that will not cause toxic effects to microorganisms in sludge reducing their ability to degrade the evaluated substances. The growth inhibitory effect of BPA on activated sludge microorganisms was performed in accordance with the ISO 1995 guideline (Strotmann and Pagga 1996). Flasks containing organic test medium and test substance were inoculated with an overnight culture of mixed sewage microorganisms and incubated at 22 ± 2 °C for up to 6 h. The test was completed when the exponential growth in the controls ceased. The bacterial biomass was quantified as turbidity in both control and test vessels spectrophotometrically at DO 530 nm. Results were reported as the effect concentration to 50% inhibition (EC₅₀), obtained by interpolation from the obtained inhibition curve using ten concentration levels.

Calculations

Removal efficiency of BPA was calculated using a mass balance in each experiment, using the obtained data of concentrations in water and adsorbed on sewage sludge (Stasinakis et al. 2007). After calculating the biodegraded BPA mass, the biotransformation rates were calculated, assuming a pseudo–

first-order degradation kinetic (Clara et al. 2005). The solid-water distribution coefficients (K_d) were calculated to analyze the amount of BPA adsorbed on sludge in the MBR process during treatments (Wu et al. 2011).

Results and Discussion

During the experiments, no BPA concentrations above the LOD of the method were found in influent wastewater, but at the beginning of the experiments, $680 \mu\text{g kg}^{-1}$ of adsorbed BPA were detected in the activated sludge.

Effect of spiked BPA on the growth of microorganisms in the bioreactor

From the inhibition curve, it was determined that BPA caused growth inhibition at very high concentrations ($EC_{50} = 29.4 \text{ mg L}^{-1}$). It was observed that concentrations $< 1 \text{ mg L}^{-1}$ did not cause not noticeable acute toxic effects on the microorganisms in the bioreactor. The slight acute toxicity of BPA on bacteria is supported by some previously published studies (Engineers BKH Consulting 2001; Zhang et al. 2007). Therefore, the working concentrations of BPA had no acute toxic effects and did not interfere with the biological activity in the bioreactor.

Comparison of BPA removal between the two treatments

The response to the treatments with air and pure oxygen, in relation to the elimination of the spiked BPA in the bioreactor, is shown in Figure 2 a and b. In both treatments, the measured effluent BPA concentrations did not converge eventually towards the spiked influent concentration, as it could be

expected. The highest BPA concentrations in the effluent were 0.26 mg L^{-1} and 0.48 mg L^{-1} for air and oxygen, respectively. The results constitute evidence that removal processes in the fast dynamic region, like sorption, contribute significantly to the fate of BPA, as Figure 2 shows. Subsequently, as the experiment progresses, the removal of BPA increased until the measured concentrations in effluent reached the background BPA level, which was below the LOD of the method. In presence of oxygen, BPA concentrations in the effluents reached the background level after only 5 days, which was faster than in the case of the treatment with air, where spiked BPA concentration after 5 days was about 9% and 10 days were required for reaching the background level.

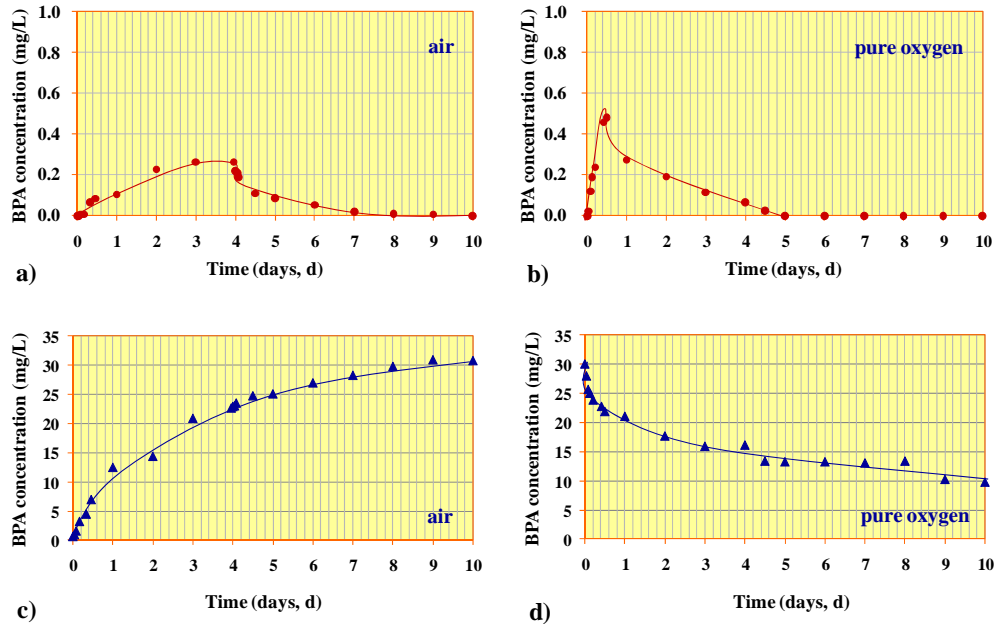


Fig. 2. Measured curves for BPA during each experimentation period with air and pure oxygen. a) and b) evolution of effluent BPA concentrations; c) and d) evolution of adsorbed BPA concentrations to activated sludge in the bioreactor.

Distribution of BPA in the MBR system

Mass balances were performed for both experiments. For the calculations, it was assumed that the main routes for the elimination of BPA from water were only biodegradation and sorption to sludge, since it is known that no other transformation pathways are possible. BPA is a non-volatile compound and tends to adsorb to soil. On the other hand, the physical and chemical properties of BPA suggest that hydrolysis is likely to be negligible (UK, Risk assessment of bisphenol A 2000). Furthermore, although BPA has the potential to photolyze in water, this is not a probable mechanism in activated sludge systems, where the presence of humic acids compete in absorbing photons protecting BPA from an effective photodegradation, causing a shielding effect (Schmitt-Kopplin 1999). Steady-state conditions

were assumed when effluent concentrations stabilized around the background concentrations after each experiment. As a result of mass balances in the bioreactor, it was obtained the whereabouts of BPA treated under MBR conditions. The results are presented in Figure 3.

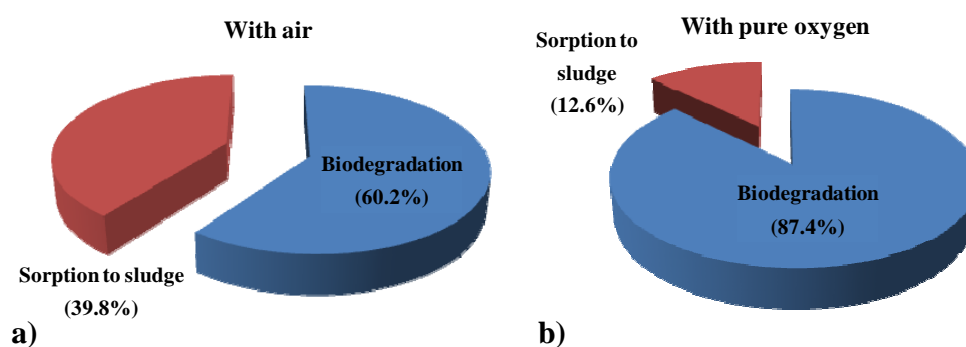


Fig. 3. Mass flow chart demonstrating the fate of BPA during the two treatments.

Influence of biodegradation and study of enzymatic activities. It could be concluded that biodegradation was the main elimination pathway for BPA, which is responsible for the return to a new steady-state effluent concentration in both treatments, even though BPA was continuously being spiked into the bioreactor. Biodegradation rate also increases over time with both air and oxygen, and it is logical to assume that the biomass capable of degrading BPA in the system also increases. The simplest explanation is the growth of specific heterotrophic organisms of activated sludge. A large part of BPA was rapidly biodegraded (about 44%) during the first days of BPA spiking into the bioreactor, suggesting that the enzymes required for BPA biodegradation were already present. Over the following days of the experiment, biomass acclimatization to BPA resulted in a gradual increase of its biodegradation potential. These observations are consistent with the

assumption that such degraders are naturally present in the activated sludge, growing under aerobic conditions, since no biological degradation is observed during anoxic or anaerobic conditions (Chen et al. 2008; Schröder 2006; Press-Kristensen et al. 2008). This work has proved that the source of oxygen is of crucial importance in the final fate of BPA. The change from air (traditional source of oxygen) to pure oxygen improved the biodegradation and sorption mechanisms. The use of pure oxygen increased the biodegradation percentages from 60.2% (air) to 87.4% after a 10-day period of exposure. The biotransformation rates also confirm this behaviour, since k_{obs} value was higher for the treatment with oxygen ($0.23 \text{ L g } X_{VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$) than for the treatment with air ($0.15 \text{ L g } X_{VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Moreover, with pure oxygen the biodegraded mass of BPA per day increased over time since day two and more rapidly than in the presence of air, where the biodegradation rates increased significantly from day four. Eventually, biodegradation rates reached a background level in both cases. The study of activities showed the changes that bacterial enzymes underwent during both treatments (Figure 4).

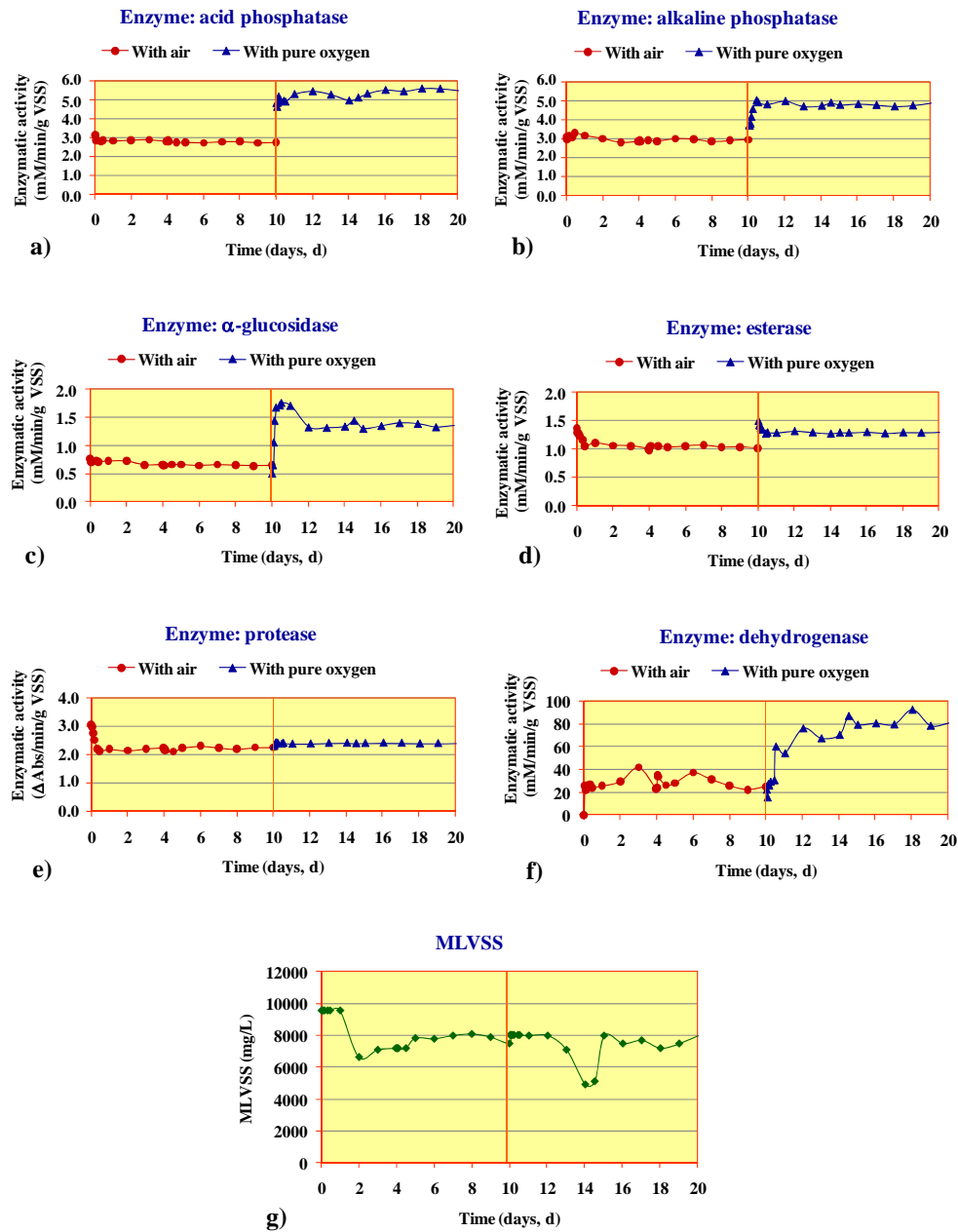


Fig. 4. Evolution curves for enzymatic activities (a–f) during the experimentation period for both treatments (with air and pure oxygen). g) Evolution curve for MLVSS during the experimentation time.

It was observed that the change from air to oxygen had a clear impact on the activity of certain enzymes in activated sludge, since other important

parameters that could determine this behaviour, such as MLVSS, pH and temperature were approximately constant during both treatments. The composition of the inlet (raw wastewater) is a very difficult to control parameter because of its complexity; however, considering the relatively short duration of the experiments and its permanent urban nature, the influence of the inlet was not considered. Acid and alkaline phosphatases, dehydrogenases, and α -glucosidases increased rapidly and significantly their activity as a result of the change to pure oxygen, which could explain the increase in the biodegradative potential of microorganisms in the bioreactor. This study corroborates the importance of the dehydrogenase enzyme as indicator of biological activity, since some studies have proved good correlations between dehydrogenase activity and other indicators of sludge viability like oxygen uptake rate (Awong et al. 1985). For this reason, this enzyme assay is considered an indicator of activity in activated sludge (Awong et al. 1985; Dutton et al. 1983). Moreover, this study provides clear evidence that other enzymes, like acid and alkaline phosphatases and α -glucosidase, are also indicators of the bacterial activity into the bioreactor. Dehydrogenase and α -glucosidase exhibited an increase in their activity of about 100% as a result of the change from air to oxygen, whereas acid (83%) and alkaline (61%) phosphatases also showed significant but lower increases. These enzymes are therefore good indicators of microbial metabolic activity of activated sludge. Lastly, protease and esterase did not show significant changes during both treatments. The degradative activity of these enzymes is related to their hydrolytic activity which is mainly associated with the cell or lies within the extracellular polymers (ECP) of the floc. ECP could indeed hold and keep a large pool of extracellular enzymes (Goel et al. 1998), and centralized the biological activity in this place.

Influence of sorption to sludge. BPA has a relatively high octanol–water partition coefficient ($\log K_{ow} = 2.2\text{--}3.8$) (Staples et al. 1998), which is characteristic for hydrophobic compounds. This is associated with poor hydrosolubility and high tendency to adsorb on organic material of the sludge matrix (Stangroom et al. 2000), and suggests that sorption may be an effective mechanism, in addition to biodegradation, for the elimination of BPA from waters. According to our results, in presence of air (Figure 2c), adsorbed BPA tends to remain accumulated in sludge, making it less available to be degraded and persistent. Usually, sludge undergoes various treatments in order to reduce the adsorbed contaminants, such as anaerobic digestion, chemical treatment and composting. However, it is known that these procedures are not effective, and contaminants persist in the environment for long periods of time. It was observed that oxygen stimulated not only biodegradation, but also favoured BPA desorption from sewage sludge (Figure 2d). During the treatment with air, 30 mg kg^{-1} of BPA was adsorbed to sludge, which began to be gradually desorbed 3 h after the beginning of treatment with oxygen. Desorbed BPA was transferred to water, which could explain the increase in BPA concentration in the effluents at the beginning of the treatment with oxygen. It was calculated that 67.4% of the BPA bound to sludge underwent desorption, which was almost entirely biodegraded once it passed to water system. The differences in the adsorption capacity of BPA to sludge were also demonstrated by the calculation of the solid-water distribution coefficients (K_d) for both treatments ($4574 \text{ L kg-SS}^{-1}$ and 508 L kg-SS^{-1} for air and pure oxygen, respectively). The K_d value, in the order of thousands, for the treatment with air indicated a high tendency of BPA to partition onto the sludge. This behaviour changed dramatically with the use of pure oxygen,

which diminished the adsorption tendency of BPA to sludge and favoured desorption process.

Effect of application of pure oxygen into the bioreactor. Based on studies that establish that BPA degradation requires aerobic conditions (Mohapatra et al. 2010), the novelty of our study is the use of pure oxygen instead of air to improve its permanent removal from wastewaters and sludge. A very distinct difference between both treatments is the significant increase in the enzymatic activity responsible for the biodegradation processes in sludge. These activities contribute to rupture and partially solubilise suspended solids, less complex molecules, including many organic contaminants, increase the soluble COD, decrease viscosity and improve the overall biodegradability (Verma et al. 2007). This could explain the positive effect of the application of pure oxygen on BPA biodegradation in the MBR. Nonetheless, further research is needed to achieve a complete understanding of the effect of pure oxygen on biological processes, especially on enzymatic activities. Some of them are significantly influenced by the redox state of the system, whereas others like protease and esterase are not apparently affected, although they play a crucial role in the hydrolysis of relevant macromolecules and many contaminants. Likewise, further research is needed to determine the effect of oxygen on adsorption/desorption equilibrium. Finally, this procedure has demonstrated to be environmentally friendly because it avoids the application of a tertiary oxidative treatment that usually causes secondary pollution (Lenz et al. 2004). Moreover, the economical balance is positive despite the higher cost of pure oxygen because the use of oxygen also reduces sludge production, which means lower operating time and lower electricity consumption.

Conclusions

The injection of pure oxygen instead of air into the bioreactor of a MBR pilot plant is relevant innovation for wastewater treatment, allowing the permanent elimination of BPA by increasing the microbial activity inside the bioreactor, which results in an increase of the biodegradation rates of BPA. Likewise, application of pure oxygen facilitated desorption of BPA from sludge, which was subsequently biodegraded. Further studies are required to completely understand the mechanisms and processes involved in the positive effects of pure oxygen. It would also be interesting to study this effect on other emerging organic microcontaminants, which are a serious threat to ecosystems. The successful application of this innovation in the MBR technology could guarantee the permanent elimination of these substances, avoiding their return to environment and ensuring the safety of treated water.

Acknowledgements

This work was supported by the regional Government of Andalusia (Research Contract N° 3017-00 and Project P09-CTS-4470) and by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (Project N° CTQ2011-24210). The authors are grateful to the Spanish Ministry of Foreign Affairs (Agency for International Cooperation) for the fellowship granted to N. Dorival-García and to the company Air Liquide España for its valuable contribution to this study.

References

- Bonefeld-Jørgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM (2007) Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-N-nonylphenol, and 4-N-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect* 115(1):69–76. doi: 10.1289/ehp.9368.
- APHA (2001) Standard methods for the examination of water and wastewater, in: Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds). 20th Edn. American Public Health Association, Washington, D. C.
- Awong J, Bitton G, Koopman B (1985) ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams. *Water Res* 19(7):917–921. doi: 10.1016/0043-1354(85)90151-4.
- Boczar BA, Forney LJ, Begley WM, Larson RJ, Federle TW (2001) Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Water Res* 35(17):4208–4216. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00150-6.
- Cadoret A, Conrad A, Block JC (2002) Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. *Enzyme Microb Tech* 31(1–2):179–186. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00097-2.
- Chen J, Huang X, Lee D (2008) Bisphenol A removal by a membrane bioreactor. *Process Biochem* 43:451–456. doi: 10.1016/j.procbio.2008.01.001.
- Clara M, Kreuzinger N, Strenn B, Gans O, Kroiss H (2005) The solids retention time - a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Res* 39(1):97–10. doi: 10.1016/j.watres.2004.08.036.
- Drewes JE, Hemming J, Ladenburger SJ, Schaaauer J, Sonzogni W (2005) An assessment of endocrine disrupting activity changes during wastewater treatment through the use of bioassays and chemical measurements. *Water Environ Res* 77:12–23. doi: 10.2175/106143005X41573.

- Dutton RJ, Bitton G, Koopman B (1983) Malachite Green-INT (MINT) method for determining active bacteria in sewage. *Appl Environ Microb* 46(6):1263–1267. doi: 0099-2240/83/121263-05\$02.00/0.
- Engineers BKH Consulting, RIKZ (2001) Chemical study on Bisphenol A. 1-94.
- Environmental Protection Agency (2005) Cross-species mode of action information assessment: a case study of bisphenol A. Government Reports Announcements & Index, Issue 26, National Center for Environmental Assessment.
- Furuya M, Adachi K, Kuwahara S, Ogawa K, Tsukamoto Y (2006) Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by Bisphenol A. *Life Sci* 78(15):1767–1776. doi: 10.1016/j.lfs.2005.08.016.
- Goel R, Mino T, Satoh H, Matsuo T (1998) Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. *Water Res* 32(7):2081–2088. doi: 10.1016/S0043-1354(97)00425-9.
- Hohenblum P, Gans O, Moche W, Scharf S, Lorbeer G (2004) Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. *Sci Total Environ* 333:185–193. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.05.009.
- Hu JY, Chen X, Tao G, Kekred K (2007) Fate of endocrine disrupting compounds in membrane bioreactor systems. *Environ Sci Technol* 41(11):4097–4102. doi: 10.1021/es062695v.
- Ivashechkin P, Corvini PFX, Dohmann M (2004) Behaviour of endocrine disrupting chemicals during the treatment of municipal sewage sludge. *Water Sci Technol* 50(5):133–140.
- Kang JH, Kondo F, Katayama Y (2006) Human exposure to bisphenol A - Review. *Toxicology* 226(2-3):79–89. doi: 10.1016/j.tox.2006.06.009.
- Kuch ML, Ballschmiter K (2001) Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the pictogram per liter range. *Environ Sci Technol* 35:3201–3206. doi: 10.1021/es010034m.

- Lagana A, Bacaloni A, Leva ID, Faberi A, Fago G, Marino A (2004) Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal Chim Acta* 501:79–88. doi: 10.1016/j.aca.2003.09.020.
- Lenz K, Beck V, Fuerhacker M (2004) Behaviour of bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (4-NP) and oxidative water treatment processes. *Water Sci Technol* 50(5):141–147.
- Lindblom E, Press-Kristensen K, Vanrolleghem PA, Mikkelsen PS, Henze M (2009) Dynamic experiments with high bisphenol-A concentrations modelled with an ASM model extended to include a separate XOC degrading microorganism. *Water Res* 43(13):3169–3176. doi: 10.1016/j.watres.2009.04.030.
- Liu R, Zhou JL, Wilding A (2004) Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography – mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *J Chromatogr A* 1038(1-2):19–26, doi: 10.1016/j.chroma.2004.03.030.
- Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH (2009) Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Phil Trans R Soc B* 364:2097–2113. doi: 10.1098/rstb.2008.0268.
- Mohapatra DP, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY (2010) Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater sludge, fate of bisphenol A. *Chemosphere* 78(8):923–941. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.12.053.
- Nascimento Filho I (2003) Identification of some plasticizers compounds in landfill leachate. *Chemosphere* 50(5):657–663. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00581-7.
- Press-Kristensen K, Lindblom E, Schmidt JE, Hense M (2008) Examining the biodegradation of endocrine disrupting bisphenol A and nonylphenol in WWTPs. *Water Sci Technol* 57(8):1253–1256. doi: 10.2166/wst.2008.229.
- Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda M, Barcelo D (2004) Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography

- mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1045:85–92. doi: 10.1016/j.chroma.2004.06.040.
- Schmitt-Kopplin P, Burhenne J, Freitag D, Spiteller M, Kettrup A (1999) Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase. *J Chromatogr A* 837(1-2):253–265. doi: 10.1016/S0021-9673(99)00079-5.
- Schröder HF (2006) The elimination of the endocrine disruptors 4-nonylphenol and bisphenol A during wastewater treatment - Comparison of conventional and membrane assisted biological wastewater treatment followed by an ozone treatment. *Water Pract Technol* 1:1–9. doi: 10.2166/WPT.2006060.
- Smith SR (2009) Organic contaminants in sewage sludge (biosolids) and their significance for agricultural recycling. *Phil Trans R Soc A* 367:4005–4041. doi: 10.1098/rsta.2009.0154.
- Spring AJ, Bagley DM, Andrews RC, Lemanik S, Yang P (2007) Removal of endocrine disrupting compounds using a membrane bioreactor and disinfection. *J Environ Eng Sci* 6(2):131–137. doi: 10.1139/S06-049.
- Stangroom S, Collins C, Lester J (2000) Abiotic behaviour of organic micropollutants in soils and the aquatic environment. A review: 2 Transformations. *Environ Technol* 21(8):845–863. doi: 10.1080/09593332108618060.
- Staples CA, Dom PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR (1998) A Review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36(10):2149–2173. doi: 10.1016/S0045-6535(97)10133-3.
- Stasinakis AS, Petalas AV, Mamais D, Thomaidis NS, Gatidou G, Lekkas TD (2007) Investigation of triclosan fate and toxicity in continuous-flow activated sludge system. *Chemosphere* 68(2):75–381. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.01.047.
- Statgraphics CENTURION XVI, vs 16.0.07 (1982-2009), StatPoint Technologies Inc.

- Stowell CL, Barvian KK, Young PCM, Bigsby RM, Verdugo DE, Bertozzi CR, Widlanski TS (2006) A role for sulfation-desulfation in the uptake of bisphenol A into breast tumor cells. *Chem Biol* 13(8):891–897. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.06.016.
- Strotmann UJ, Pagga U (1996) A growth inhibition test with sewage bacteria. Results of an international ring test 1995. *Chemosphere* 32(5):921–933. doi: 10.1016/0045-6535(95)00357-6.
- Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y (2006) Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett* 167(2):95–105. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.08.012.
- Talsness CE, Andrade AJM, Kuriyama SN, Taylor JA, Von Saal FS (2009) Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philos Trans R Soc B* 364:2079–2096. doi: 10.1098/rstb.2008.0281.
- UK (2000), Risk assessment of bisphenol A. Environment draft of May 2000.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). A Review. *Reprod Toxicol* 24(2):139–177. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.07.010.
- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Sahai V, Prévost D, Valéro JR, Surampalli RY (2007) Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme Microb Tech* 41(6-7):764–771. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.06.013.
- Vethaak AD, Lahr J, Schrap SM, Belfroid AC, Rijs GB, Gerritsen A (2005) An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of the Netherlands. *Chemosphere* 59:511–524. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.12.053.
- Vílchez JL, del Olmo M, González-Casado A, Navalón A (2005) Patrones químicos monocloro, dicloro y tricloro derivados del bisfenol-A. Spanish Patent N° 2190852.

- Wu C, Xue W, Zhou H, Huang X, Wen X (2011) Removal of endocrine disrupting chemicals in a large scale membrane bioreactor plant combined with anaerobic-anoxic-oxic process for municipal wastewater reclamation. *Water Sci Technol* 64(7):1511–1518. doi: 10.2166/wst.2011.140.
- Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navalón N, Vilchez JL (2008) Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using LC-MS. *Microchem J* 88(1):87–94. doi: 10.1016/j.microc.2007.10.003.
- Zhang C, Zeng G, Yuan L, Yu J, Li J, Huang G, Xi B, Liu H (2007) Aerobic degradation of bisphenol A by achromobacter xylooxidans strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. *Chemosphere* 68(1):181–190. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.012.

CAPÍTULO IV

Biorreactores a escala de Laboratorio

1. OBJETIVOS

Los principales objetivos de los trabajos realizados y presentados en este capítulo son:

- Evaluar y medir la eficiencia de eliminación de seis antibióticos de la familia de las quinolonas, elegidos entre las más habitualmente presentes en las aguas residuales urbanas, empleando un biorreactor a escala de laboratorio con licor mezcla procedente de un biorreactor de membrana.
- Evaluar y comparar el potencial de eliminación de los compuestos seleccionados en condiciones tanto aeróbicas y nitrificantes con en condiciones anóxicas. Para seleccionar las mejores.
- Investigar las rutas de eliminación (biodegradación, adsorción, volatilización o hidrólisis) de los contaminantes seleccionados en las aguas residuales.
- Analizar las cinéticas de biodegradación de las quinolonas seleccionadas en los reactores de laboratorio.
- Evaluar la influencia de las variables de proceso, como la cantidad de sólidos en suspensión (MLSS), la temperatura y la demanda química de oxígeno inicial en el proceso de eliminación de los antibióticos.

2. PUBLICACIÓN VI

Science of the Total Environment (In press)
DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.026

Removal of quinolone antibiotics from wastewaters by sorption and biological degradation in laboratory-scale membrane bioreactors

N. Dorival-García^a, A. Zafra-Gómez^{a*}, A. Navalón^a, J. González^b, J.L. Vílchez^a

^a *Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain.*

^b *Research Group of Microbiology and Environmental Technologies, Water Research Institute, University of Granada, E-18071 Granada, Spain.*

ABSTRACT

Laboratory-scale batch experiments were developed to investigate the main removal routes for 6 commonly found quinolones (ciprofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin, piperimidic acid, and piromidic acid) in wastewaters from a wastewater treatment plant, at $\mu\text{g L}^{-1}$ levels in an aerobic sludge system from a membrane bioreactor (MBR) pilot plant. It was demonstrated that biotransformation and sorption were the main removal routes for the target antibiotics over other possible pathways, as volatilization or hydrolysis, under the experimental conditions. Mass balances indicated that sorption on sludge played a dominant role in the elimination of antibiotics from waters. The sorption coefficient K_d depended

strongly on temperature and on the quinolone type and were higher at lower temperatures and for piperazinylic quinolones. K_d values were between 516 and 3746 L kg⁻¹ in the temperature range of 9-38°C. Higher mixed liquor suspended solids (MLSS) increased quinolone removal efficiency mainly by sorption. Quinolone biodegradation constituted a secondary pathway, and could be described by first-order kinetics with degradation-rate constants ranging from $8.0 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ to $1.4 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ within the same temperature range and MLSS from 7,000 to 15,000 mg L⁻¹. Biodegradation depended on the MLSS and temperature, but also on the initial chemical oxygen demand (COD). Higher biodegradation rates were observed at higher MLSS and temperature, as well as at low initial COD. Ciprofloxacin and moxifloxacin registered the highest biodegradation percentages (52.8% and 47.2%, respectively, at 38°C and 15,000 mg L⁻¹ MLSS), which is evidence that, despite the known persistence of this group of antibiotics and removal from waters mainly by sorption, it was possible to improve their removal by biodegradation, with an appropriate selection of conditions and control of process variables, as a preliminary step towards the elimination of these antibiotics from the environment. Further research is needed on the possibilities of removing sorbed antibiotics from sludge.

Keywords Quinolone antibiotics; Membrane Bioreactor technology; Wastewater; Sewage sludge; Biodegradation; Sorption.

* Corresponding author: Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez)

1. Introduction

The increasing public concern about the hazards associated with pharmacologically active compounds (PhACs) in the environment has triggered activities by scientific, industrial, and regulatory bodies to assess the exposure and effects of these chemicals in different environmental compartments (Golet et al., 2002a; Fatta-Kasinos et al., 2011). Thousands of tons of PhACs are used to treat human and animal diseases. Depending on the nature of the compound, up to 95% of the administered dose is excreted unchanged or as metabolites. Since elimination by conventional wastewater treatment plants (WWTPs) is often incomplete, substantial quantities of these compounds are released into the environment (Gracia-Lor et al., 2012). More than 100 PhACs have already been detected in municipal sewage and surface waters (Ternes et al., 2004a, Verlicchi et al., 2012). Despite that these compounds are detected in low concentrations (ng L^{-1} – $\mu\text{g L}^{-1}$), their adverse effects cannot be dismissed, given that pharmaceuticals cause biological effects at very low doses (Kümmerer, 2009).

Antibiotics, the pharmaceuticals most often discussed worldwide (Kümmerer, 2009; Homem et al., 2011), are administered for treating infections, in animal feeding operations, and in aquaculture (Segura et al., 2009). WWTPs act as point sources of the aquatic environment and play an important role in the life cycle of antibiotics. In addition, sorption to sewage sludge can be used as a possible removal pathway for many PhACs, being very important for some antibiotics, antihypertensives, lipid regulators and psychiatric drugs (Verlicchi et al., 2012; Jelic et al., 2011), so that the application of sewage sludge as soil fertilizer represents an additional entry route into the environment (Nieto et al., 2010). Therefore, it is not surprising

that antibiotics are routinely present at detectable concentrations in surface and ground water, treated wastewater, biosolids, soils and sediments (Miège et al., 2009; Monteiro et al., 2010), and although in many cases these concentrations are sub-inhibitory, they have been linked to global proliferation of antibiotic resistant strains of bacteria and the diminished effectiveness of human therapeutic drugs. In this sense, the continued detection of antibiotics in the natural environment is cause for concern.

One major family of antibiotics is composed of quinolone derivatives (Batt et al., 2006). These are used in human, veterinary, and agricultural applications (Picó and Andreu, 2007). Ciprofloxacin, the most prescribed fluoroquinolone in Europe (Ferech et al., 2006; Goossens et al., 2007), has been detected at levels of hundreds of ng L^{-1} in surface waters (Tello et al., 2012), and up to $5 \mu\text{g L}^{-1}$ in WWTP secondary effluents (Rosal et al., 2010). Moreover, it has been observed that in effluents from hospitals and drug manufacturers, the concentrations are extremely high, at mg L^{-1} levels (Larsson et al., 2007). This raises concerns about potential ecotoxicity and genotoxicity of these compounds (Kümmerer, 2009; Jia et al., 2012). Furthermore, quinolone derivatives are characterized by their persistence in the aquatic environment (Le-Minh et al., 2010), e.g. ciprofloxacin has been classified as poorly biodegradable (De Bel et al., 2009).

Removal efficiencies of quinolone derivatives from the aqueous phase during wastewater treatment has been reported to be usually high, but the predominant removal mechanism for those compounds has been suggested by several authors to be sorption to sludge rather than biodegradation (Batt et al., 2007; Golet et al., 2003; Lindberg et al., 2006; Zorita et al., 2009; Jelic et al., 2011). For several of the common quinolone derivatives used in human and veterinary medicine, the removal percentage due to sorption is in the range of 60–100%. In general, these antibiotics appear not be readily

biodegradable, suggesting biodegradation is of minor importance in the removal of quinolones in WWTPs (Ternes and Joss, 2006; Jia et al., 2012). These findings explain that sludge is the main reservoir of quinolone derivatives, and their potential entry into the environment via biosolid application. These high efficiency rates of removal from waters do not represent a successful treatment, because instead of being eliminated from environment the compounds are transferred to other environmental compartments, spreading the problem to other ecosystems.

Currently, there is a lack of information on improvements in WWTP performance for removing quinolone derivatives and ensuring the complete elimination from environment. First, it is necessary to establish the operational parameters, conditions, and process variables that influence the removal process, focusing attention on designing a suitable treatment that increases the biotransformation of quinolones—a secondary removal pathway—which will constitute a key step towards the ultimate goal of eliminating antibiotics from the environment.

Some studies examined the biodegradability of antibiotics in controlled batch tests (Halling-Sørensen et al., 2000; Halling-Sørensen et al., 2003; Kümmerer et al., 2000), and some data are available for full-scale wastewater treatment plants regarding the overall removal of these antibiotics from the aqueous phase (Verlicchi et al., 2012; Jelic et al., 2011; Jia et al., 2012), but they do not answer how to improve wastewater treatment performance in relation to these antibiotics.

A broad number of quinolone derivatives have been developed and are commercially available around the world. Besides the most widely known ones, a new generation such as moxifloxacin (Goossens et al., 2007) has been introduced to provide better therapeutic effects and counteract bacterial resistance. The significant disadvantages of the new generations, however,

have resulted in their restricted use due to serious side effects (Jia et al., 2012). For these reasons, the study of a broad range of quinolone derivatives is important for understanding their environmental risks. In previous studies, very few quinolone derivatives have been included as target compounds, possibly due to a lack of sensitive analytical methods that include a wide variety of these antibiotics, especially to determine these compounds in solid samples (sludge), given the difficulty of developing a method with high extraction efficiency and low matrix effects for so many antibiotics in wastewaters and sewage sludge. The methods require complex sample-treatment steps and sensitive detection methods (e.g. LC-MS/MS) that involve high analysis costs.

Due to the recognized limitations of conventional treatments, the implementation of new technologies is an important step in the improvement of wastewater treatment. In the last 20 years the use of membranes in wastewater reclamation has attracted much interest (Le-Clech, 2010). Membrane technology is a technically and economically feasible alternative for wastewater treatment, especially because of the high SRTs achieved within compact reactor volumes (Le-Minh et al., 2010). Membrane bioreactor (MBR) technology combines the biological degradation process using activated sludge with a direct solid-liquid separation by membrane filtration (Schröder et al., 2012). In MBRs the concentration of microorganisms can be increased to up to 20 g L^{-1} (Weiss and Reemtsma, 2008). Because of this high biomass concentration the rate of degradation is higher and can be an alternative for problematic compounds in relation to their poor biodegradability. The performance, in terms of effluent quality, has proved to be better (Le-Clech, 2010), but there is still a limited knowledge concerning the behaviour of PhACs in MBRs,

especially for those recognized as persistent (Schröder et al., 2012; Le-Minh et al., 2010; Petrovic et al., 2009; Senta et al., 2011).

Despite their recognized advantages, to perform and control field studies at WWTPs remains problematic. To overcome the difficulties, a few pioneer works with well-controlled laboratory reactors have been developed for antibiotics at relevant environmental concentrations in an activated sludge process, but very few specifically for quinolones (Li and Zhang, 2010). Overall, up to now, the information on the removal and fate of quinolone antibiotics in WWTPs is still general and limited.

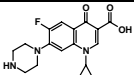
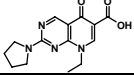
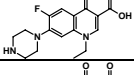
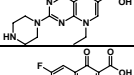
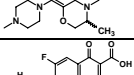
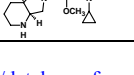
The main goal of the present work was to evaluate the feasibility of the MBR technology in improving the removal efficiency of the target quinolone derivatives from wastewaters, through laboratory-scale reactors that simulated specific MBR conditions. The aims of this study were: (1) to measure the removal efficiency of 6 quinolone antibiotics using laboratory-scale batch reactors with aerobic mixed liquor from a membrane bioreactor (MBR) at $\mu\text{g L}^{-1}$ levels; (2) to investigate the removal routes (biodegradation, sorption, volatilization or hydrolysis) of the target antibiotics from waters; (3) to analyse the biodegradation kinetics, (4) to evaluate the influence of process variables such as mixed liquor suspended solids (MLSS), temperature, and initial chemical oxygen demand (COD) in the removal process of the target antibiotics from waters. The quinolones were selected among those that are routinely found in urban wastewaters.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

The following quinolones of analytical grade standards (Table 1) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): pipemidic acid (PIP), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), ofloxacin (OFL), moxifloxacin (MOX), piromidic acid (PIR), the surrogates: marbofloxacin (MAR), and 2-phenyl-4-quinoline carboxylic acid (cincophen, CIC), and caffeine (CAF). Individual standard solutions of compounds (200 mg L^{-1}) were prepared in a water/methanol mixture (1:4, v/v) and stored at -20°C . They were prepared fresh monthly. Working standard mixtures were prepared by diluting the individual stock solution in methanol or in the initial mobile phase (i.e. mobile-phase composition at the beginning of chromatographic gradient conditions: 80 % of formic acid solution 0.2 % (v/v) and 20% of methanol) immediately before use. They were stored at 4°C and prepared fresh weekly. Water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). LC-MS grade water and methanol, sodium hydroxide and formic acid, 98% (v/v) —used for the preparation of standards, mobile phases, and pH adjustments— were purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). For water analysis, Oasis[®] HLB (500 mg, 6 mL) SPE cartridges from Waters Corporation (Milford, MA, USA) were used. For sludge analysis, reagents for McIlvaine buffer solution (McIlvaine, 1921) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Table 1
Structures and physicochemical properties of the studied quinolones.

Antibiotic	Properties							Structure
	Molecular formula	MW ^(a)	pK _a	log K _{ow} at pH=6.78 ^(b)	Henry's Law Constant (atm.m ³ /mol) ^(c)	Molar volume (cm ³) ^(d)	Polarizability (cm ³) ^(d)	
Ciprofloxacin (CIP)	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331.35	pK ₁ =6.09 ^(a) pK ₂ =8.74	1.32	5.09 · 10 ⁻¹⁹	226.7	33.00 · 10 ⁻²⁴	
Piromidic acid (PIR)	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₃	288.31	pK ₁ =2.28 ^(b)	2.00	8.42 · 10 ⁻¹⁵	205.9	29.15 · 10 ⁻²⁴	
Norfloxacin (NOR)	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319.33	pK ₁ =6.30 ^(a) pK ₂ =8.38	1.48	8.70 · 10 ⁻¹⁹	237.4	31.99 · 10 ⁻²⁴	
Pipemidic acid (PIP)	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	303.32	pK ₁ =5.80 ^(a) pK ₂ =8.75	1.05	1.43 · 10 ⁻¹⁸	219.6	30.48 · 10 ⁻²⁴	
Ofloxacin (OFL)	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	361.37	pK ₁ =6.05 ^(a) pK ₂ =8.22	0.61	4.98 · 10 ⁻²⁰	243.9	36.11 · 10 ⁻²⁴	
Moxifloxacin (MOX)	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	401.43	pK ₁ =6.3 ^(b) pK ₂ =9.3	2.49	(not found)	284.9	40.36 · 10 ⁻²⁴	

(a) Renew and Huang, 2004; (b) Hu et al., 2007 (c) http://www.syrres.com/what-we-do/database_forms.aspx?id=386; (d) Calculated by ACD/Labs Freeware v.12.00 (Advanced Chemistry Development, Inc.)

2.2. Instrumentation and software

Extraction procedures for sludge were performed in a Dionex Accelerated Solvent Extractor, ASE® 200 (Sunnyvale, CA, USA) equipped with a solvent controller. SPE of wastewaters was carried out on a Supelco (Madrid, Spain) vacuum manifold for 12 columns connected to a Supelco vacuum tank and to a vacuum pump.

UPLC-MS/MS analysis was performed using a Waters Acquity UPLC™ H-Class (Waters, Manchester, UK), consisting of an Acquity UPLC™ binary solvent manager and an Acquity UPLC™ sample manager. The compounds were separated with Acquity UPLC BEH™ C18 column (1.7 μm; 2.1 mm × 50 mm) (Waters, UK). A Xevo TQS tandem quadrupole mass spectrometer (Waters) equipped with an orthogonal Z-spray™

electrospray ionization (ESI) source was used for detection. Chromatographic separation was performed using a binary gradient mobile phase consisting of 0.2% (v/v) aqueous formic acid solution (solvent A) and methanol (solvent B). The flow rate was 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, the column was maintained at 40°C, and the injection volume was 5 μL . Gradient conditions started with initial mobile phase, 80% (A), which was linearly decreased to 30% (A) within 5.0 min. Total run time was 10 min, including column cleaning and equilibration for the following injection.

Mass-spectrometer parameters were as follows: capillary voltage, 0.60 kV; source temperature, 150°C; desolvation temperature, 500°C; cone gas flow, 150 L h^{-1} ; desolvation gas flow, 500 L h^{-1} ; collision gas flow, 0.15 mL min^{-1} , and nebuliser gas flow, 7.0 bar. Nitrogen ($\geq 99.995\%$) was used as the cone and desolvation gas, and argon (99.999 %) as a collision gas. After selecting the precursor ions, product ions were obtained for maximum sensitivity. The two most sensitive MRM transitions (one used for quantification and the other for confirmation) were selected. Dwell time for each transition was 25 ms, and interscan delay was set at 3 ms. Data acquisition was performed under time-segmented conditions based on the chromatographic separation of the target compounds. MassLynx software 4.1 was used for instrument control and for peak detection and integration.

For pH measurements, a Crison 2000 digital pH-meter with a combined glass-Ag/AgCl (KCl 3 M) electrode (Crison Instruments S.A, Barcelona, Spain) was used. A vortex-mixer (Yellow line, Wilmington, NC, USA), a RAYPA autoclave (Barcelona, Spain) and a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttlingen, Germany) were also used. Statgraphics Plus version 5.0 software package (Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA) was used for statistical treatment of data.

2.3. Batch experiments design and operation

2.3.1. MBR sludge collection and bioreactor assemblage

A series of batch experiments were conducted to investigate the removal processes of the target compounds by using laboratory-scale bioreactors. The mixed liquor was collected from a MBR pilot plant (Fig. 1a) operated using urban wastewater from the primary settling tank of a WWTP located in the city of Granada (Spain). The MBR pilot plant had a sidestream configuration and consisted of a cylindrical bioreactor with an operational volume of 385 L. Oxygen was applied at a final concentration within the range of 2–4 mg L⁻¹. The sludge was retained and the treated water filtered by two polyvinylidene difluoride (PVDF) hollow fibre membrane module (Zenon[®]), with an effective area of 1.86 m² and a nominal pore size of 0.04 µm (ZW-10 Zenon[®]). Operational parameters of MBR pilot plant are shown in Table 2a.

Table 2

Operational parameters of the MBR pilot plant during the experiments and experimental conditions of batch experiments.

(a) Operational conditions of the MBR pilot plant				
Parameter		Unit	Value	
Influent flow rate		Q_{in} (L d ⁻¹)	915.6	
Wastage sludge flow rate		Q_w (L d ⁻¹)	11.52	
Hydraulic retention time		HRT (d)	0.5	
Sludge retention time		SRT (d)	32	
Aeration (oxygen flow)		g h ⁻¹	500	
Membrane module aeration		m ³ h ⁻¹	6.8	
Recirculation flow		L h ⁻¹	141	
(b) Experimental conditions of batch experiments				
Treatment	N ^o	Main experimental condition	Specific parameters	General parameters
I. Influence of MLSS	1	MLSS = 7 000 mg L ⁻¹	T = 31 ± 1°C	DO = 3 – 4 mg L ⁻¹ ORP = +210 – +250 mV pH = 7.0 – 7.5 Conductivity = 1 000 – 2 400 µS cm ⁻¹
	2	MLSS = 10 000 mg L ⁻¹		
	3	MLSS = 15 000 mg L ⁻¹		
II. Influence of temperature	4	T = 9 ± 1°C	MLSS = 13 000 mg L ⁻¹ COD = 358 mg L ⁻¹	DO = 3 – 4 mg L ⁻¹ ORP = +210 – +250 mV pH = 7.0 – 7.5 Conductivity = 1 000 – 2 400 µS cm ⁻¹
	5	T = 28 ± 1°C		
	6	T = 40 ± 1°C		
III. Influence of COD ^(a)	7	COD = 0 mg L ⁻¹	T = 25 ± 1°C MLSS = 10 000 mg L ⁻¹	DO = 3 – 4 mg L ⁻¹ ORP = +210 – +250 mV pH = 7.0 – 7.5 Conductivity = 1 000 – 2 400 µS cm ⁻¹
	8	COD = 300 mg L ⁻¹		
	9	COD = 500 mg L ⁻¹		
Control A	10	Aerated reactor containing analytes dissolved in autoclaved ^(b) wastewater. It controls abiotic losses (volatilization and sorption to glass vessel).		
Control B	11	Aerated reactor containing mixed liquor without analytes. It was used to monitor the effect of antibiotics on the sludge biological activity (organic matter removal).		

^(a) This treatment was performed using synthetic wastewater unlike the others.

^(b) The sterilization procedure was modified according to a previous method (Wang and Grady, 1994). The sample was sterilized using an autoclave at 120°C for 30 min.

The laboratory-scale bioreactors (Fig. 1b and 1c) were covered to prevent photodegradation and were equipped with an aeration-control unit that allowed the soluble-oxygen concentration to be maintained between 2 and 4 mg L⁻¹. Oxygen sparging in fine bubbles was performed using a porous diffuser in order to optimise gas solubilization. The pH, temperature, dissolved oxygen (DO), oxidation-reduction potential (ORP), and conductivity were determined by specific sensor electrodes (Crison

Instruments). The concentration of MLSS and COD were determined by standard methods (APHA, 2001).

Sludge for the experiments was collected from the MBR pilot plant 24 h before the start of them. During this time, MBR sludge was aerated at room temperature ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) to allow residual contaminants in the sludge to be reduced or completely degraded. The biological activity of sludge was evaluated by spiking caffeine at a final concentration of $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Caffeine was used as reference chemical, since it is readily biodegradable and has no measurable sorption to sludge (Kim and Aga, 2007).

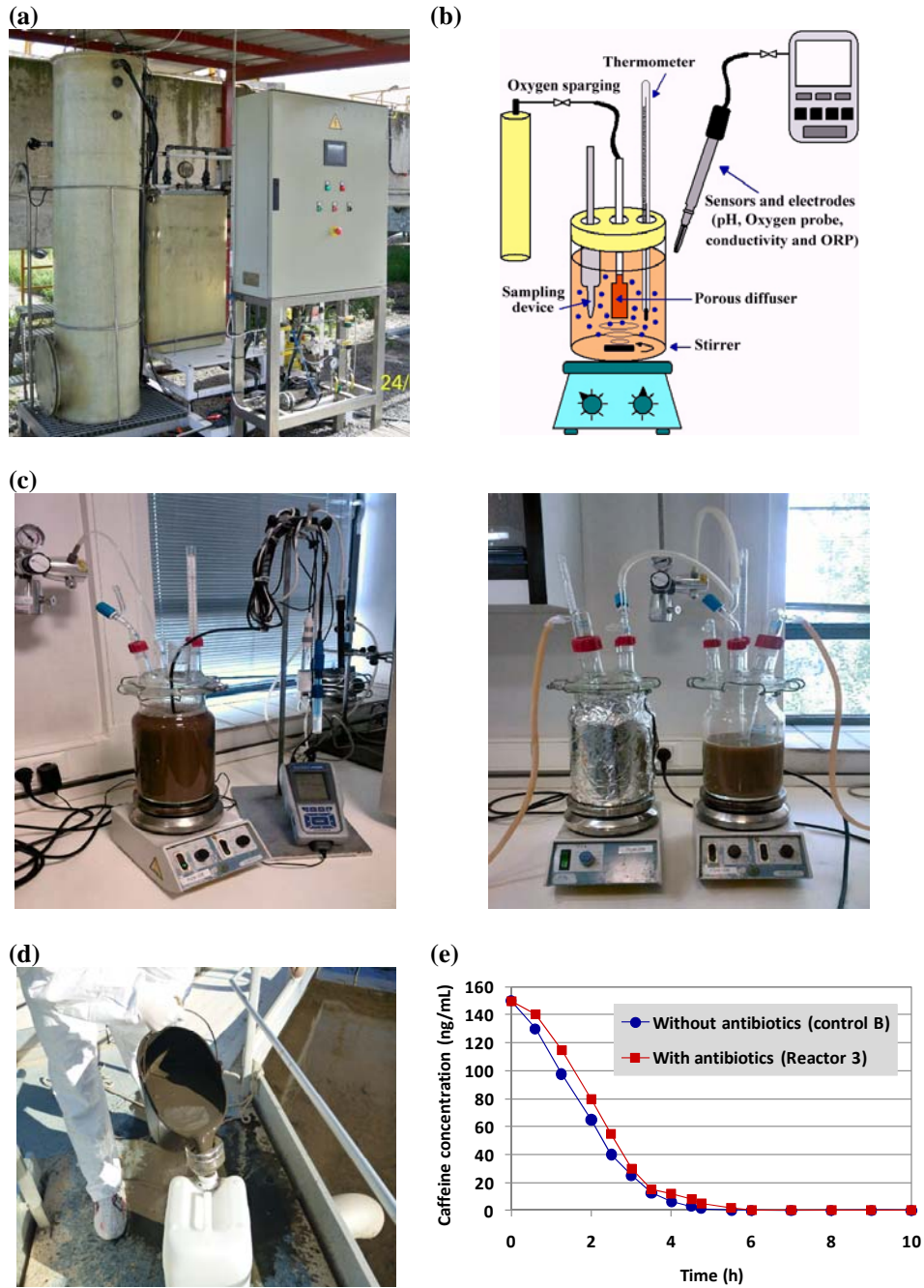


Fig. 1. (a) Image of MBR pilot plant. Schematic setup (b) and images (c) of the assembled laboratory-scale bioreactors used. (d) View of MBR sludge sampling. (e) Caffeine test as an indicator of the impact of antibiotics on the MBR sludge activity.

2.3.2. Batch-experiment protocol

The influence of MLSS, temperature and COD was examined on the removal of antibiotics, following three series of batch experiments, described in Table 2b. To adjust MLSS levels, sludge was centrifuged three times and after the last centrifugation, sludge was suspended in filtrated wastewater to the desired MLSS concentration. Urban wastewater was used for more an accurate evaluation of the real removal efficiencies. Next, reactors were filled with 3 L of the prepared sludge at the established MLSS value. For the study of the influence of the temperature, the reactors were placed in thermostatic water baths at the specified temperatures. The influence of COD was assessed using synthetic wastewater instead of urban wastewater, since this is a suitable procedure to adjust COD levels controlling the other parameters in reactors. The synthetic wastewater was composed of water, supplemented with nutrients, trace elements, and buffering compounds (Reyes-Lara and Reyes-Mazzoco, 2009). The initial COD concentration in the synthetic wastewater was adjusted proportionally with the spiked amount of the organic substrates.

Throughout the experiment, the bioreactors were continuously stirred at 150 rpm and aerated to maintain the DO concentration within the specified interval. The pH of the sludge ranged from 7.0 to 7.5 with little change in any treatment. When all the reactors were completely assembled, antibiotics were spiked in each reactor with an aqueous stock-solution mixture to reach a final concentration of $500 \mu\text{g L}^{-1}$ in each case. At each designed sampling time—0 min (just before the spiking), 30 min; 1, 2, 3, 6, 12 h; 1, 2, 3, 4 days—homogenized mixed liquor was withdrawn from each bioreactor, and samples were immediately processed. The concentrations of the antibiotics were analysed in the water phase as well as in the solid phase.

Samples from control reactor A (Table 1) were taken only at the beginning and at the end of the experiment.

2.4. Sample collection and antibiotic determination

Immediately after sampling, biological activity was diminished by addition of 1% (v/v) aqueous formaldehyde. Grab samples were centrifuged at $3634 \times g$ for 20 min to separate the solid from aqueous phases. Water samples were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nitrocellulose disk filter (Millipore). The solid portion was dried in a heater at 60°C to constant weight and finely ground ($\leq 1.41 \text{ mm}$). Both samples were kept in the dark at 4°C until analysis, which was made with the minimum possible delay. Samples analysis was performed in duplicate.

The analysis of the antibiotics and caffeine in the water samples was performed according to a previous method (Li et al., 2009), with some modifications. Briefly, 100 mL of wastewater filtrates spiked with the surrogates and acidified to pH 3.0 with 98% (v/v) formic acid were passed through Oasis HLB SPE cartridges. The analytes were eluted with 8 mL of methanol and the extracts were evaporated to dryness. Prior to LC injection, 1 mL of the initial mobile phase was added to dissolve the residues.

The determination of sorbed quinolones in sludge samples was also performed using a modified method (Golet et al., 2002b). Briefly, 0.5 g of sample with the surrogates was transferred into an 11 mL stainless-steel extraction cell of the extractor. The operating conditions were: extraction temperature, 86°C ; extraction pressure, 1000 psi; preheating period, 1 min; static extraction period, 5 min; number of extraction cycles, 5; solvent flush, 30% of the cell volume and nitrogen purge, 90 s. The mixture MeOH/McIlvaine buffer, 50:50 (v/v), pH 3.0, was used as solvent

extraction. Final extraction volume was approximately 15 mL. The extracts were evaporated to dryness and 250 μL of the initial mobile phase were added to dissolve the residues. The extracts were centrifuged for 30 min at $3634 \times g$ and the supernatant was injected into the LC system.

A recovery assay with blank spiked samples was made to check the accuracy of the methods. Water and sludge samples were spiked with a standard solution of quinolones in triplicate and at three levels of concentration (0.25, 1.00 and 3.00 $\mu\text{g L}^{-1}$ for water samples and 20, 200 and 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for sludge samples). The recoveries and data precision, as well as limits of quantification (LOQs) —calculated on the basis of signal-to-noise ratio (S:N) of 10— are shown in supplementary material. The maximum data variability for the concentrations measurements in replicate samples of water and sludge was within the range of $\pm 3 \mu\text{g L}^{-1}$ and $\pm 5 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

2.5. *Studies of sorption onto sludge*

The same treatment to evaluate the influence of temperature was performed by using sterilized sludge to avoid the effect of biodegradation. The sludge samples were sterilized in an autoclave at 120°C for 30 min (Wang and Grady, 1994). The inactivated sludge was prepared for the experiments as natural sludge in Section 2.3.2. The ability of a compound to sorb to sludge is described by the sorption coefficient, K_d , which is defined as the ratio between the concentration of the compound in the sorbent and in the water at equilibrium:

$$K_d = \frac{q}{C_e} \quad (1)$$

where q is the quantity of a chemical sorbed to the solid phase (mg kg^{-1}) and C_e is the concentration of the chemical in solution (mg L^{-1}). K_d is expressed as L kg^{-1} . In addition, it has been established that the removal by sorption in a municipal WWTP is negligible in comparison to the total mass balance for K_d values of less than 500 L kg^{-1} (or $\text{Log } K_d < 2.7$) (Ternes et al., 2004b). After the sorption-equilibrium time was determined, the experiments for the determination of K_d values were performed.

2.6. Biodegradation kinetics models

Previous studies have reported that removal of trace amounts of organic pollutants in sewage during the activated-sludge process can be described by a pseudo-first-order reaction (Hashimoto and Murakami, 2009; Li et al., 2005) as given in Eq. (2), due to the relatively low substrate concentration compared to the biomass concentrations (Li and Zhang, 2010).

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (2)$$

where t is the reaction time (h) and k is the first-order reaction constant (h^{-1}); C is the concentration of residual target compound in the water phase when sorption is ignored. Eq. (2) can be rewritten in the linear form:

$$\ln \left[\frac{C_o - C_d}{C_o} \right] = -kt \quad (3)$$

where C_d is the degraded quinolone concentration by activated sludge (mg L^{-1}), and C_o the initial quinolone spiked concentration in the wastewater (mg L^{-1}). Using Eq. (3), the reaction constant k can be calculated as the

slope of linear regression from the data points for each antibiotic. Then half-lives, $t_{1/2}$, can be calculated from Eq. (4):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (4)$$

3. Results and discussion

During the experiments, removal due to the volatilization and sorption to the glass walls of vessels could be ignored on the basis of the results from control A without MBR sludge (Table 2b), so that all quinolone antibiotics were found to be stable and no hydrolysis occurred. No volatile loss was detected during the experiments because of their very low Henry's Law constants, greater molecular weight (>300), and presence of several polar and ionisable groups in the target antibiotics (Table 1). Therefore, it was assumed that the elimination of selected antibiotics in the bioreactors is achieved by sorption and biotransformation (e.g. biodegradation), being the almost exclusive mechanisms for the elimination of quinolones from waters. Based on the determined concentrations of quinolones in water and solid phases, mass balances were performed for target compounds in order to calculate the amount of biodegraded quinolones, according to Eq. (5) (Clara et al., 2005):

$$C_d = C_o - C_e - q \frac{X}{1000} \quad (5)$$

where C_e the quinolone concentration remaining in the water phase ($\mu\text{g L}^{-1}$), q the amount of quinolone sorbed on the sludge ($\mu\text{g kg}^{-1}$), and X is the MLSS concentration in the system (g L^{-1}).

The concentration of the analytes in natural samples was determined before spiking both the wastewater and the sludge in order to take them into account in further calculations (i.e. mass balances, determination of K_d , and biodegradation kinetics). Target quinolones in waters and sludge were in the $\mu\text{g L}^{-1}$ range (from 2.4 to 4.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ in waters and from 12.3 to 61.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ in sludge), except for OFL and PIR, for which the concentrations in water were below LOD.

The results for all experiments demonstrated that quinolones were eliminated quickly by sorption in the first 60 min from the beginning of the experiments, and thus sorption equilibrium was rapidly reached. Afterwards, antibiotic concentrations gradually decreased from 24 h onwards probably due to their biodegradation by sludge microorganisms. Contribution of sorption and biodegradation to the elimination of the quinolones studied depended on parameters as MLSS, temperature, and COD.

3.1. Effect of antibiotic concentration on biological activity of sludge

Quinolones are broad-spectrum antibiotics and therefore, the inhibition of the bacterial growth in presence of these compounds must be evaluated. Caffeine-biodegradation profiles were performed in control B and reactor 3 under the same conditions, except for the presence of the antibiotics studied only in reactor 3. This experiment allowed us to determine that antibiotics at the concentrations under study did not significantly affect the biological activity in the sludge. Caffeine was completely and similarly degraded in both tested reactors, with and without antibiotics within 5 h. The results are presented in Fig. 1e.

These results indicate that despite the broad spectrum of pathogenic bacteria targeted by antibiotics, only the activity of a minority of the species

present in the sludge is inhibited (Kümmerer et al., 2000). Inactivation of the antibiotic, e.g. by sorption, might also explain the reduced activity of quinolones in reactors (Al-Ahmad et al., 1999), since it was also demonstrated that desorption did not significantly occur under the experimental conditions. Another factor could be the bacterial adaptation to antibiotics, given the continual introduction of these substances into waste-receiving waters, especially from hospital effluents where the presence of antibiotic-adapted bacteria is quite likely (Heath and Kosjek, 2012).

3.2. Study of sorption process of quinolones onto sludge

Quinolone antibiotics exhibited high-sorption-potential onto MBR sludge, as mentioned in previous studies (Golet et al., 2003; Jia et al., 2012; Li et al., 2010; Batt et al., 2007; Zorita et al., 2009; Lindberg et al., 2007; Xu et al., 2007). This high sorption potential corresponded to the calculated K_d values (Table 3), and were of similar magnitude, though slightly higher, with those for NOR, CIP and OFL in a previous batch reactors study (from 367.2 to 664.8 L kg⁻¹ at 22°C) (Li and Zhang, 2010). The differences in results were possibly due to the different characteristics of sludge or the experimental conditions applied. The octanol-water partition coefficients ($\log K_{ow}$) can be used to assess the hydrophobic sorption for uncharged molecules (Golet et al., 2003). Compounds with $\log K_{ow} < 2.5$ are considered to have low sorption potential (Verlicchi et al., 2012). The low $\log K_{ow}$ values of the quinolones studied (Table 1) contrast with the high K_d values found, which are higher than 500 L kg⁻¹ (except for PIR at 28 and 38°C; Table 3), with evidence of a high sorption potential (Ternes et al., 2004b), so that association of antibiotics to sludge is much stronger than predicted from hydrophobic interactions. This behaviour could be because

most of the quinolones studied have acidic and basic groups in their structure, as indicated by their chemical structures in Table 1. Consequently, they can exist as cationic, anionic, or zwitterionic forms, depending on pH value, the zwitterionic forms being predominant at the working pH values (7.0–8.0; see pK_a values in Table 1), except for PIR, which does not have basic groups and therefore exists as an anionic form at the working pH values. In any case, all studied quinolones exist as charged forms in solution at the experimental conditions. Therefore, it was concluded that hydrophobic partitioning is not likely to drive the sorption of charged antibiotic molecules. According to previous studies, the sorption of quinolones on activated sludge seems to occur mainly by electrostatic forces, such as cation exchange, ion bridging, surface complexation, ion dipole and hydrogen bonding (Conkle et al., 2010; Golet et al., 2003; Tolls, 2001; Vasudevan et al., 2009).

Also, the K_d of the antibiotics consistently showed a positive correlation with their removal percentages, suggesting that high sorption potentials to the MBR sludge resulted in high removal efficiency rates for these compounds.

3.2.1. Effect of MLSS.

As it is shown in Fig. 2c for moxifloxacin and in supplementary material for the other target antibiotics, the sorption of all the quinolones studied was influenced by the amount of sludge in the system. The increase in MLSS or the amount of sludge encouraged the sorption of the antibiotics, favouring their removal from waters, since the number of reactive sites available to sorb antibiotics from solution increased at higher solid portions in the system. In addition, the increase in MLSS weakened the sorption

capacity, defined as the ratio of the amount of sorbed antibiotic (sorbate) to the unit of mass sludge (sorbent), as reflected in Fig. 2a for MOX, exemplifying the behaviour for all the quinolones studied. This behaviour may be a consequence of the greater the number of available sorption sites in the sludge at higher MLSS values.

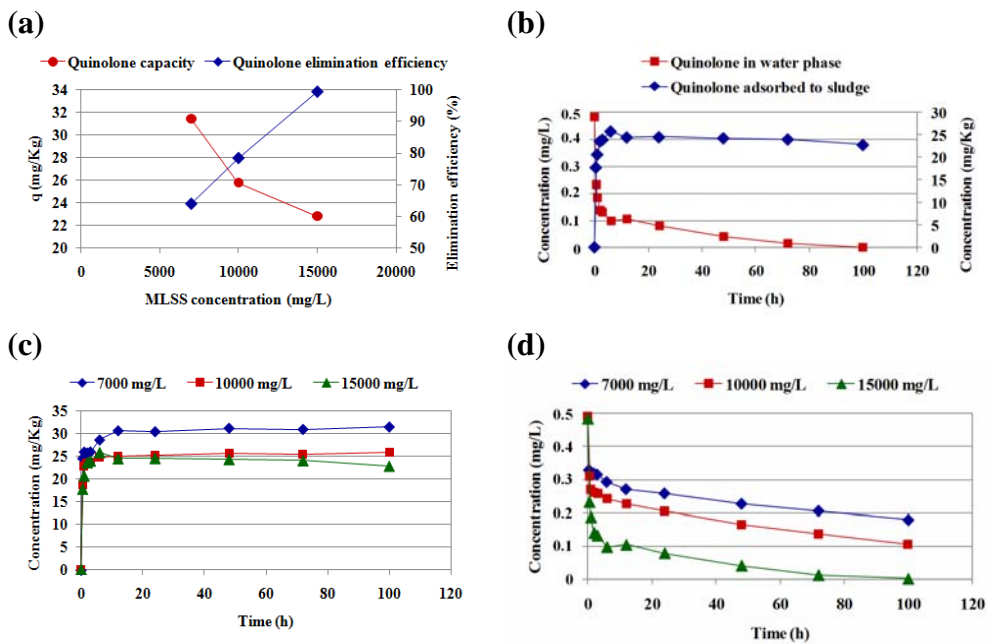


Fig. 2. Removal of MOX in MBR sludge system in laboratory scale bioreactors. (a) Effect of MLSS on MOX sorption. Changes in MOX concentration (b) in water and solid phases during aerobic process at 15,000 mg L⁻¹ MLSS (c) in MOX sorbed concentration at the three evaluated MLSS and (d) in MOX concentration in water at the three evaluated MLSS.

According to the mass balances of Fig 3a, sorption constituted the most important mechanism for the removal of the target antibiotics from waters at any MLSS value (Fig 2c and supplementary material). At MLSS of 7,000 mg L⁻¹, sorption ranged for most antibiotics between 62.5–72.4% and at 15,000 mg L⁻¹, it increased between 74.0–77.4%. OFL and NOR

were highlighted as the quinolones with the highest sorption potential to sludge at the evaluated MLSS values, which was also supported by their corresponding K_d (Table 3).

This behaviour of amphoteric quinolones can be explained on the basis of their acid-base properties. At the pH values studied, zwitterions are the predominant species (>80%), those determining the interactions (Vasudevan et al., 2009) and thereby greatly influencing sorption to components of sludge. According to a previous study, at pH 5.0–8.0, zwitterionic species of quinolones determined the distribution pattern of isotherm curves for minerals containing Ca^{+2} , Al^{+3} and Fe^{+3} (Gu and Karthikeyan, 2005), as well as it explained the strong interaction of quinolones with positively charge amine group in humic acids (Holten Lützhøft et al., 2000). This strong sorption potential is determined mainly by the interaction between carboxylic and ketonic groups of the quinolones with the sorbents. In addition, the cation-exchange capacity is also an important mechanism in the sorption of quinolone derivatives, although it has been proved that it is less important in biosolids (Conkle et al., 2010).

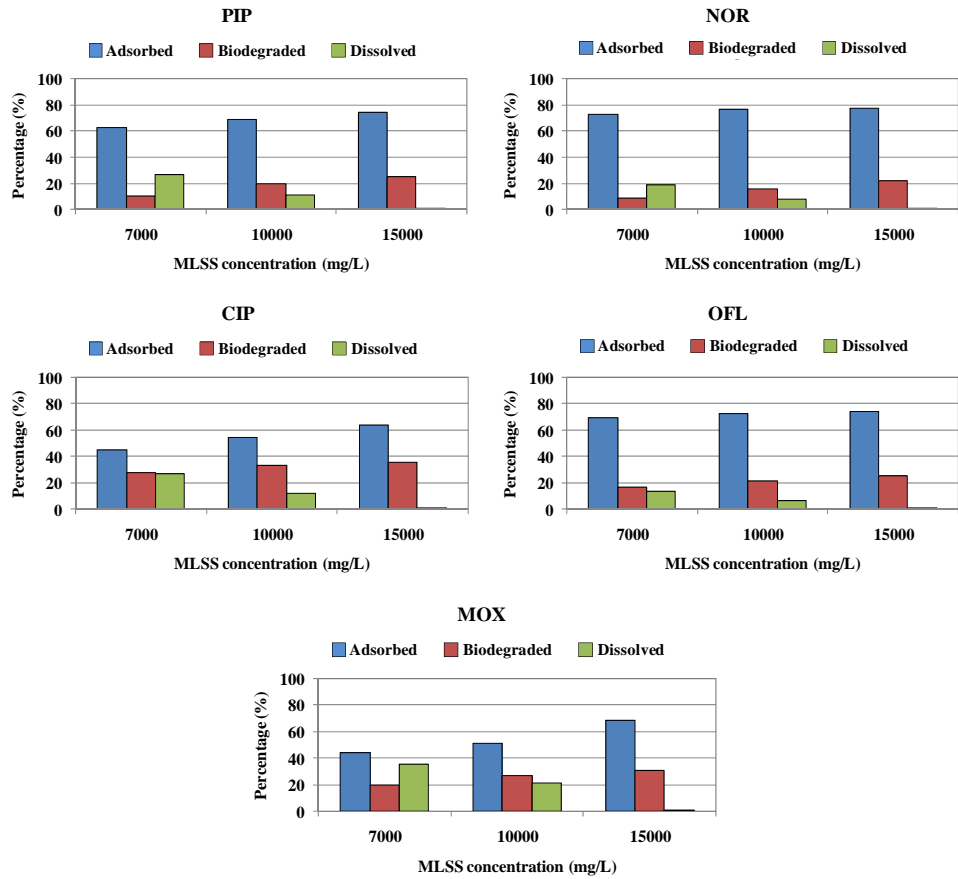
In addition, the observed sorption potential within the group of amphoteric quinolones could be explained on the basis of polarizability, since it was found that polarizability contributes between 15% and 40% of sorption-free energy. Therefore, compounds that are more polarizable are more likely to bind (Zhu and Pignatello, 2005).

NOR and OFL exhibited the highest sorption potentials because they are among the most polarized compounds among the quinolones studied (Table 1). On the other hand, CIP and MOX were the amphoteric quinolones with the lowest capability to sorb onto sludge, with sorption mass percentages of 45.2% and 44.0% at $7,000 \text{ mg L}^{-1}$ and 64.0%, and 68.5 at $15,000 \text{ mg L}^{-1}$, respectively, which also fit with their lowest K_d values in

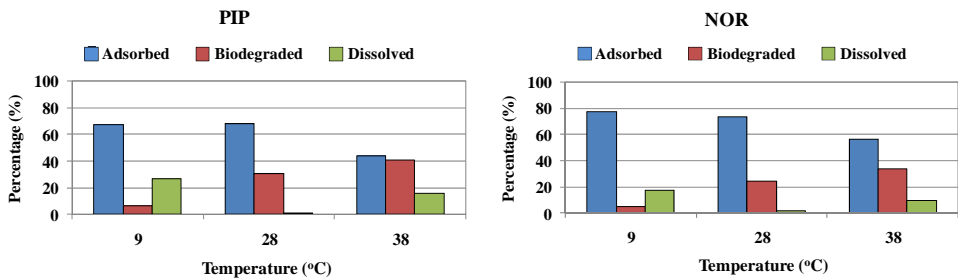
comparison with the other studied amphoteric quinolones. In the case of MOX, this behaviour could be explained on the basis of steric hindrance. The presence of bulky substituents hampers the approach of molecules to the sorption sites. This in turn lowers the binding energy of the interactions involved because all they are all distance-dependant (Carrasquillo et al., 2008; Conkle et al., 2010). In the case of CIP, it is difficult to establish an explanation of its low sludge-sorption potential, considering its good sorption characteristics, but a possible disadvantageous competition of CIP with the other quinolones could be postulated, as already established elsewhere (Conkle et al., 2010).

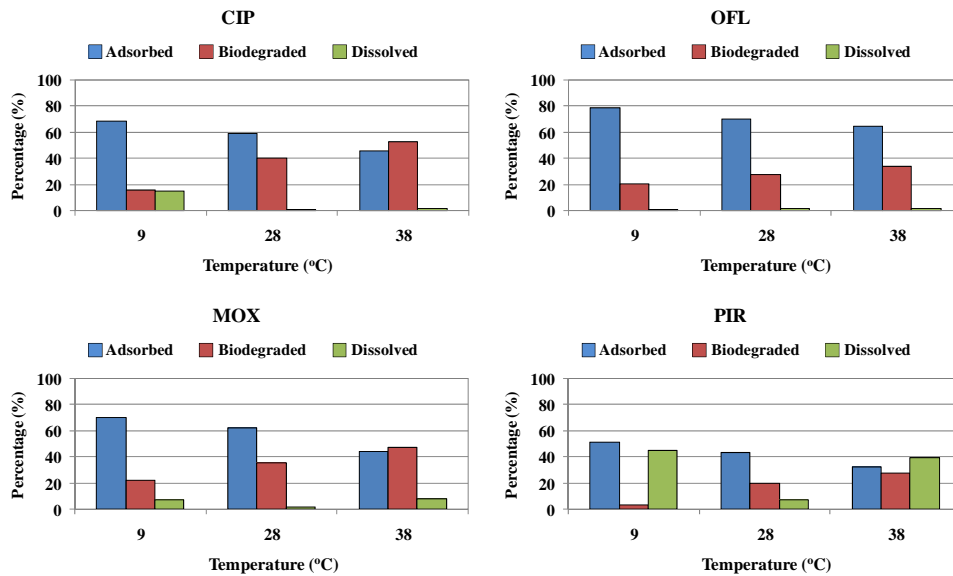
Although the sorption potential of PIR (an acid quinolone) was evaluated at only 13,000 mg L⁻¹ MLSS, it exhibited the least ability to sorb to sludge at all tested temperatures, and this was supported by its registering the lowest K_d values in comparison with the other quinolones (Table 3). PIR is the only quinolone that does not present the piperazine ring at C-7, where the basic (protonated) groups are found, and therefore PIR can be only neutral or anionic, (Vasudevan et al., 2009). At the working pH value (7.0-7.5), the acidic functional groups of organic matter in sludge as well as in PIR are likely to be deprotonated ($pK_{aCOOH} = 3-6$) (Conkle et al., 2010), both acquiring a significant negative charge (Tolls, 2001). The result could be an electrostatic repulsion with PIR at this pH, and this might explain the reduced sorption characteristics of PIR. Moreover, PIR is the least polarizable of the studied quinolones (Table 1), suggesting that its lower charge separation within the molecule will not permit an orientation that would allow optimal interactions with sorption sites.

(a) Treatment I: Effect of MLSS



(b) Treatment II: Effect of Temperature





(c) Treatment III: Effect of initial COD

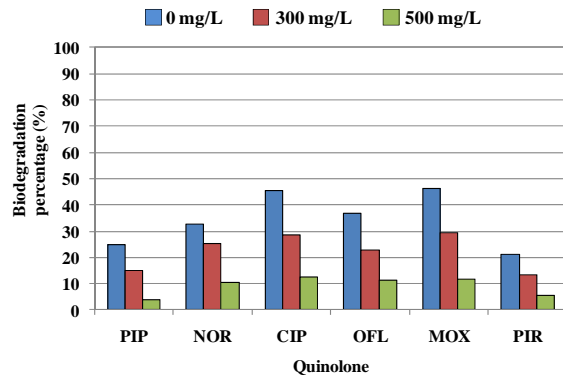


Fig. 3. Mass balances expressed as percentages of sorbed, biodegraded and dissolved quinolones after 100 h of batch experiments, which evaluated (a) effect of MLSS; (b) effect of temperature; (c) effect of COD. LSD values are given in parentheses (sorbed, biodegraded, dissolved): (a) MLSS: PIP (1.47, 0.45, 0.58); NOR (1.84, 0.28, 0.61); CIP (1.42, 0.41, 0.60); OFL (1.51, 0.61, 0.55); MOX (1.27, 0.28, 0.68); (b) temperature: PIP (1.41, 0.25, 0.63); NOR (1.50, 0.20, 0.58); CIP (1.33, 0.33, 0.63); OFL (1.23, 0.21, 0.54); MOX (1.32, 0.28, 0.73); PIR (1.12, 0.33, 1.07); (c) COD (biodegraded): PIP (0.41); NOR (0.42); CIP (0.31); OFL (0.39); MOX (0.76); PIR (0.69). A 95% of significance level was selected in all cases.

Table 3

K_d values ($L\ Kg^{-1}$) of quinolones sorbed onto the sludge at different temperatures. LSD values are given in parentheses: PIP (15.15); NOR (9.55); CIP (15.04); OFL (11.69); MOX (27.8); PIR (10.63). A 95% of significance level was selected in all cases.

Quinolone	Temperature ($^{\circ}C$) ^(a)		
	9	28	38
PIP	2642	956	498
NOR	3530	1270	686
CIP	2806	690	522
OFL	3746	1096	872
MOX	3018	724	516
PIR	1194	458	240

^(a) Conditions corresponding to treatment II.

3.2.2. Effect of temperature

Temperature plays an important role in partitioning between water and sludge phases of target quinolone derivatives. Sorption decreased with increasing temperature (Fig. 4), indicating that sorption was an exothermic process (Fig. 4) (Zhang et al., 2012; Zhao et al., 2008). Consequently, lower K_d values were found at higher temperatures (Table 3). There is evidence that sorption is determined by enthalpy-related forces in the case of polar substances such as quinolones, due to the additional contribution of electrostatic interactions (Delle Site, 2001). In sludge systems, the significant presence of humic acids and other components of organic matter are presumably responsible for the main electrostatic interactions between the target antibiotics and the sludge (Holten Lützhøft et al., 2000; Tolls, 2001).

OFL and NOR registered the highest sorption percentages at all temperatures, from 64.5% and 56.5% at 38°C to 78.7% and 77.7% at 9°C, respectively (Fig. 3b), these findings being supported by their giving the highest K_d values at all temperatures (Table 3). On the other hand, PIR was the antibiotic with the lowest K_d values at all temperatures. However, among amphoteric quinolones, CIP and MOX again showed lower sorption capabilities. Generally, at 9°C and 28°C, sorption onto sludge constitutes the most important removal route for target antibiotics from waters (Conkle et al., 2010; Lindberg et al., 2007). At 38°C, sorption and biodegradation contributes significantly.

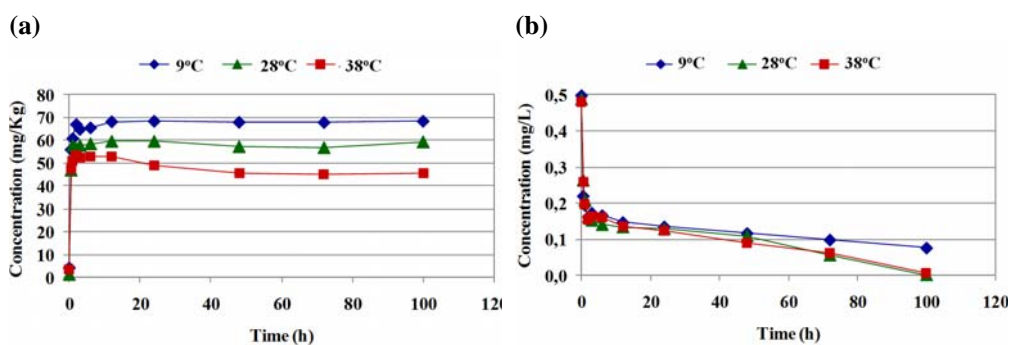


Fig. 4. Removal of CIP in MBR sludge system in laboratory scale bioreactors. Effect of temperature (a) on CIP sorption, and (b) on remaining CIP concentration in the aqueous phase.

3.3. Study of biodegradation of quinolones and overview of both removal processes

The biodegradation of quinolones fitted well to the first-order kinetics model (Table 4) with all R^2 values ranging from 97.45 to 99.74%. Half-lives were between 55.5 and 866.4 h under the different conditions of MLSS and temperatures evaluated.

Table 4

Pseudo first-order kinetics model parameters for studied quinolones ($C_0 = 0.5 \text{ mg L}^{-1}$).

	(a) Influence of MLSS ^(a)				(b) Influence of temperature ^(c)			
	MLSS (mg L^{-1})	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	$R^{2(b)}$	T (°C)	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	$R^{2(d)}$
PIP	7000	$2.1 \cdot 10^{-3}$	330.1	99.36	9	$1.8 \cdot 10^{-3}$	385.1	98.97
	10000	$4.1 \cdot 10^{-3}$	169.1	98.75	28	$5.9 \cdot 10^{-3}$	117.5	99.21
	15000	$6.5 \cdot 10^{-3}$	106.6	98.54	38	$7.2 \cdot 10^{-3}$	96.3	98.77
NOR	7000	$1.6 \cdot 10^{-3}$	433.2	99.72	9	$1.3 \cdot 10^{-3}$	533.2	99.46
	10000	$3.0 \cdot 10^{-3}$	231.0	97.45	28	$3.8 \cdot 10^{-3}$	182.4	99.23
	15000	$4.8 \cdot 10^{-3}$	144.4	97.86	38	$4.1 \cdot 10^{-3}$	169.1	98.59
CIP	7000	$6.2 \cdot 10^{-3}$	111.8	99.21	9	$2.9 \cdot 10^{-3}$	239.0	99.33
	10000	$8.1 \cdot 10^{-3}$	85.6	98.76	28	$7.7 \cdot 10^{-3}$	90.0	98.57
	15000	$1.3 \cdot 10^{-2}$	55.5	97.88	38	$1.4 \cdot 10^{-2}$	49.5	99.54
OFL	7000	$4.6 \cdot 10^{-3}$	150.7	98.65	9	$3.2 \cdot 10^{-3}$	216.6	98.21
	10000	$6.5 \cdot 10^{-3}$	106.6	99.71	28	$5.6 \cdot 10^{-3}$	123.8	99.12
	15000	$8.3 \cdot 10^{-3}$	83.5	99.66	38	$4.6 \cdot 10^{-3}$	150.7	99.74
MO	7000	$5.1 \cdot 10^{-3}$	135.9	98.77	9	$3.9 \cdot 10^{-3}$	177.7	98.90
	10000	$7.7 \cdot 10^{-3}$	90.0	99.34	28	$7.1 \cdot 10^{-3}$	97.6	98.59
	15000	$9.6 \cdot 10^{-3}$	72.2	98.98	38	$9.2 \cdot 10^{-3}$	75.3	98.99
PIR	---	---	---	---	9	$8.0 \cdot 10^{-4}$	866.4	98.45
	---	---	---	---	28	$2.2 \cdot 10^{-3}$	315.1	99.36
	---	---	---	---	38	$3.3 \cdot 10^{-3}$	210.0	99.56

^(a) Conditions corresponding to treatment I. ^(b) From linear form equation (Eq. 3).

^(c) Conditions corresponding to treatment II. ^(d) From linear form equation (Eq. 3).

These values confirm that biodegradation is a slow process during wastewater treatment with activated sludge because, despite the high density and diversity of bacteria, biodegradation is still a secondary removal route, and sorption slows the mineralizing process, so that complete mineralization has not been noted (Cardoza et al., 2004; Golet et al., 2002a; Kümmerer et al., 2000). The results are consistent with similar studies investigating

primary degradation of antibiotics (Halling-Sørensen et al., 2000). Consequently, quinolone antibiotics are persistent in sludge, and biodegradation is not a dominant process.

3.3.1. Effect of MLSS on total removal processes

The concentration of the quinolone derivatives declined over the time, with the most marked decreasing trend in all cases being associated with the treatment having the highest MLSS (15,000 mg L⁻¹; Fig. 2d and supplementary material). After 100 h of treatment, removal efficiency rose from 64.0–86.0% to 99.4–99.9% with the increase of MLSS from 7,000 to 15,000 mg L⁻¹ (Fig. 3a). Then it was found that at 15,000 mg L⁻¹ MLSS, less than 1% of any antibiotic remained in solution after treatment. Therefore, these experimental conditions allowed almost the complete removal of quinolones from the waters. These results indicate that the removal efficiency of quinolones depended consistently on the levels of MLSS in the reactor. However, despite most of the removed quinolones remained sorbed to the sludge, the higher MLSS concentration signified that more microorganisms were capable of degrading quinolones and that degradation rates were thus faster, as evidenced by the increase of *k* values at higher MLSS concentrations (Table 4a). From 7,000 to 15,000 mg L⁻¹ of MLSS, biodegradation percentages rose between 8.9–27.7% to 22.5–32.7% (Fig. 3a). CIP and MOX showed the highest biodegradation percentages, 35.7% and 30.9%, respectively, at 15,000 mg L⁻¹, because sludge can possibly be acclimated to these antibiotics.

Although at a MLSS concentration of 15,000 mg L⁻¹ most of the studied antibiotics were removed from waters by sorption, an important fraction (22.5–35.7%) was biodegraded, this representing a strong

improvement, since this type of antibiotic has been considered so far as not readily biodegradable (Martínez Bueno et al., 2012). These results reflect the notable advantages of MBR over CAS treatments, since due to the need of sludge settling in CAS, the clarification is generally carried on with low biomass concentrations, which facilitate settling conditions so that these high MLSS values are possible only in MBR systems.

3.3.2. Effect of temperature on total removal processes

Temperature had the strongest effect on the biodegradation in comparison with MLSS values in the tested range 9–38°C (Table 4b; Fig. 4). Unlike sorption, the rising temperature favoured the elimination of quinolone derivatives from waters by biodegradation, as well as their degradation rates. The temperature change from 9°C to 38°C, which simulates environmental conditions during winter and summer in Granada, respectively, induced an increase from 3.7–22.1% to 28.1–52.8% of the biodegraded mass (Fig. 3b). The corresponding kinetic constants (Table 4) showed that PIR was the least biodegraded compound. However, rising temperatures notably improved its biodegradation rates and mass percentages of biodegradation (from 3.7% at 9°C to 28.1% at 38°C. It was concluded that higher temperatures significantly improved biodegradation processes for all the quinolone derivatives.

Mass balances (Fig 3b) indicated that, although quinolone derivatives removal from waters occurred mainly by sorption onto sludge, biodegradation also should be considered, and its influence was noted especially with the temperature change. At low temperatures, quinolone removal from waters occurred almost exclusively by sorption, because the contribution of biodegradation was reduced to below 20% of the biodegraded mass at 9°C. At high temperatures, although biodegradation

increased significantly, a reduced removal by sorption was also observed. The highest removal efficiencies from waters occurred at 28°C (92.7–99.6%), which reduced at 9°C (55.1–99.3%) and at 38°C (60.5–98.5%), evidencing the importance of both factors.

3.3.3. Effect of COD on biodegradation

Figure 3c shows the effect of initial COD concentration on quinolone removal by biodegradation. Biodegradation proved higher at low initial COD concentrations. The highest biodegradation values (between 21.3–46.3%) were recorded when there was no organic substrate added (COD = 0 mg L⁻¹), which reduced by between 4.0 and 12.5% in environments with high amounts of organic matter (COD = 500 mg L⁻¹, usually indicative of heavily polluted wastewaters). The results suggest that, when easily biodegradable substrates were not available, microorganisms in the mixed liquor utilized quinolone derivatives as the carbon source. As organic substrates in synthetic wastewater including glucose, yeast, and urea (Reyes-Lara and Reyes-Mazzoco, 2009), were more easily degraded by MBR sludge than any present xenobiotic, the presence of these organic substrates in the system inevitably slowed quinolone degradation. This same behaviour has been shown in previous studies for other micropollutants (Urase and Kikuta, 2005). Consequently, for high removal efficiency by biodegradation, some pre-elimination of easily biodegradable organic compounds is recommended.

4. Conclusions

The removal process of most commonly found quinolone antibiotics in wastewaters was studied in laboratory-scale reactors, using mixed liquor from a MBR pilot plant. The processes in the aerobic MBR sludge system were characterized by sorption onto sludge as main removal mechanism and subsequent biodegradation, which followed first-order kinetics. Decreasing MLSS concentration or increasing temperature decreased sorption of quinolone derivatives onto the sludge. Removal efficiency by sorption was found to be positively correlated with the corresponding K_d . However, the high K_d values, in contrast to the characteristic low $\log K_{ow}$ values, evidence the significant and even dominant influence of electrostatic interactions on sorption of these compounds to sludge surfaces.

Biodegradation processes also depended strongly on MLSS, temperature, and initial COD. The degradation rates of the target compounds increased with the decrease in the initial COD concentration and the increase of MLSS and temperature. First-order degradation-rate constants ranged from $8.0 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ to $1.4 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ within the temperature range of 9 to 38°C and MLSS from 7000 mg L^{-1} to 15,000 mg L^{-1} . Based on these results, it can be concluded that the highest removal efficiencies in aerobic MBR sludge-treatment systems are guaranteed by working under high MLSS concentrations, possibly only in MBR systems, which may compensate the adverse impact caused by uncontrollable variables such as low temperatures. In addition, the elimination of easily biodegradable organic compounds is essential in order to achieve high degradation rates of quinolones.

This study lays the foundations for the development of efficient processes that improve the removal of quinolone derivatives from water by

biodegradation, through the correct selection of conditions and control of process variables. This constitutes a preliminary step towards the ultimate goal of eliminating those antibiotics from the environment. Further research should address the possibilities of removing sorbed antibiotics from sludge.

References

- APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater, in: Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds), 20th Ed. American Public Health Association, Washington, DC, 2001.
- Batt AL, Bruce IB, Aga DS. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environ Pollut* 2006; 142:295–302.
- Batt AL, Kim S, Aga DS. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere* 2007; 68:428–35.
- Cardoza LA, Knapp CW, Larive CK, Belden JB, Lydy M, Graham DW. Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems. *Water Air Soil Poll* 2004; 161:383–98.
- Carrasquillo AJ, Bruland GL, Mackay AA, Vasudevan D. Sorption of ciprofloxacin and oxytetracycline zwitterions to soils and soil minerals: influence of compound structure. *Environ Sci Technol* 2008; 42:7634–42.
- Clara M, Kreuzinger N, Strenn B, Gans O, Kroiss H. The solids retention time — a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Res* 2005; 39:97–106.
- Conkle JL, Lattao C, White JR, Cook RL. Competitive sorption and desorption behavior for three fluoroquinolone antibiotics in a wastewater treatment wetland soil. *Chemosphere* 2010; 80:1353–59.
- De Bel E, Dewulf J, De Witte B, Van Langenhove H, Janssen C. Influence of pH on the sonolysis of ciprofloxacin: Biodegradability, ecotoxicity and antibiotic activity of its degradation products. *Chemosphere* 2009; 77:291–5.

- Delle Site A. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *J Phys Chem Ref Data* 2001; 30:187–439.
- Fatta-Kasinos D, MERIC S, Nikolaou A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem* 2011; 399:251–75.
- Ferech M, Coenen S, Malhotra-Kumar S, Dvorakova K, Hendrickx E, Suetens C, et al. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe. *J Antimicrob Chemoth* 2006; 58:423–7.
- Golet EM, Alder AC, Giger W. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environ Sci Technol* 2002a; 36:3645–51.
- Golet EM, Strehler A, Alder AC, Giger W. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Anal Chem* 2002b; 74:5455–62.
- Golet EM, Xifra I, Siegrist H, Alder AC, Giger W. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ Sci Technol* 2003; 37:3243–49.
- Goossens H, Ferech M, Coenen S, Stephens P. Comparison of outpatient systemic antibacterial use in 2004 in the United States and 27 European countries. *Clin Infect Dis* 2007; 44:1091–5.
- Gracia-Lor E, Sancho JV, Serrano R, Hernández F. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere* 2012; 87:453–62.
- Gu C, Karthikeyan KG. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides. *Environ Sci Technol* 2005; 39:9166–73.
- Halling-Sørensen B, Holten Lützhøft H, Andersen HR, Ingerslev F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemoth* 2000; 46:53–8.

- Halling-Sørensen B, Sengeløv G, Ingerslev F, Jensen LB. Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes. *Arch Environ Con Tox* 2003; 44:7–16.
- Hartmann A, Golet EM, Gartiser S, Alder AC, Koller T, Widmer RM. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Arch Environ Con Tox* 1999; 36:115–9.
- Hashimoto T, Murakami T. Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments. *Water Res* 2009; 43:573–82.
- Heath E, Kosjek T. Sources, occurrence and fate of halogenated heterocyclic pharmaceuticals in the environment. *Top Heterocycl Chem* 2012; 27:247–68.
- Holten Lützhøft HC, Vaes WHJ, Freidig AP, Halling-Sørensen B, Hermens JLM. Influence of pH and other modifying factors on the distribution behavior of 4-quinolones to solid phases and humic acids studied by “Negligible-Depletion” SPME-HPLC. *Environ Sci Technol* 2000; 34:4989–94.
- Homen V, Santos, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices—A review. *J Environ Manage* 2011; 92:2304–47.
- Hu J, Wang W, Zhu Z, Chang H, Pan F, Lin B. Quantitative structure-activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials. *Environ Sci Technol* 2007; 41:4806–12.
- Jelic A, Gros M, Ginebreda A, Cespedes-Sánchez R, Ventura F, Petrovic M, Barcelo D. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Res* 2011; 45:1165–76.
- Jia A, Wan Y, Xiao Y, Hu J. Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. *Water Res* 2012; 46:387–94.

- Kim S, Aga DS. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J Toxicol Env Heal B* 2007; 10:559–73.
- Kümmerer K, Al-Ahmad A, Mersch-Sundermann V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 2000; 40:701–10.
- Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment—A review—Part I. *Chemosphere* 2009; 75:417–34.
- Larsson DGJ, de Pedro C, Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Mater* 2007; 148:751–5.
- Le-Minh N, Khana SJ, Drewes JE, Stuetz RM. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Res* 2010; 44:4295–323.
- Le-Clech P. Membrane bioreactors and their uses in wastewater treatments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 88:1253–60.
- Li A, Zhang T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environ Sci Technol* 2010; 44:3468–73.
- Li B, Zhang T, Xu Z, Ping Fang HH. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2009; 645:64–72.
- Li F, Yuasa A, Obara A, Mathews AP. Aerobic batch degradation of 17- β estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures. *Water Res* 2005; 39:2065–75.
- Lindberg RH, Björklund K, Rendahl P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BAV. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. *Water Res* 2007; 41:613–9.
- Lindberg RH, Olofsson U, Rendahl P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BAV. Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environ Sci Technol* 2006; 40:1042–48.

- Martínez Bueno MJ, Gómez MJ, Herrera S, Hernando MD, Agüera A, Fernández-Alba AR. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot survey monitoring. *Environ Pollut* 2012; 164:267–73.
- McIlvaine TC. A Buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* 1921; 49:183–186.
- Miège C, Choubert JM, Ribeiro L, Eusèbe M, Coquery M. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants—conception of a database and first results. *Environ Pollut* 2009; 157:1721–26.
- Monteiro SC, Boxall ABA. Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. *Rev Environ Contam T* 2010; 202:53–154.
- Nieto A, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environ Toxicol Chem* 2010; 29:1484–89.
- Petrovic M, López de Alda MJ, Díaz-Cruz S, Postigo C, Radjenovic J, Gros M, Barcelo D. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. *Phil Trans R Soc A* 2009; 367:3979–4003.
- Picó Y, Andreu V. Fluoroquinolones in soil – risks and challenges. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387:1287–99.
- Renew JE, Huang CH. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004; 1042:113–21.
- Reyes-Lara S, Reyes-Mazzoco R, Efecto de las cargas hidráulica y orgánica sobre la remoción másica de un empaque estructurado en un filtro percolador. *Rev Mex Ing Quím* 2009; 8:101–9.
- Rosal R, Rodríguez A, Perdigón-Melón JA, Petre A, García-Calvo E, Gómez MJ, Agüera A, Fernández-Alba AR. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res* 2010; 44:578–88.

- Schröder HFr, Tambosi JL, Sena RF, Moreira RFPM, José HJ, Pinnekamp J. The removal and degradation of pharmaceutical compounds during membrane bioreactor treatment. *Water Sci Technol* 2012; 65:833–9.
- Segura PA, François M, Gagnon C, Sauvé S. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environ Health Perspect* 2009; 117:675–84.
- Senta I, Matošić M, Jakopović HK, Terzic S, Ćurko J, Mijatović I, Ahel M. Removal of antimicrobials using advanced wastewater treatment. *J Hazard Mater* 2011; 192:319–28.
- Tello A, Austin B, Telfer TC. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environ Health Perspect* 2012; 120:1100–6.
- Ternes TA, Joss A, Siegrist H. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 2004a; 38:392A–399A.
- Ternes TA, Herrmann N, Bonerz M, Knacker T, Siegrist H, Joss A. A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res* 2004b; 38:4075–84.
- Ternes TA, Joss A. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances. The challenge of micropollutants in urban water management. London: IWA Publishing; 2006. p. 243–277, 406–39.
- Tolls J. Critical review sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environ Sci Technol* 2001; 35:3397–406.
- Urase T, Kikuta T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Res* 2005; 39:1289–300.
- Vasudevan D, Bruland GL, Torrance BS, Upchurch VG, Mackay AA. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma* 2009; 151:68–76.
- Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci Tot Environ* 2012; 429:123–55.

- Wang X, Grady CPL. Comparison of biosorption isotherms for di-n-butyl phthalate by live and dead bacteria. *Water Res* 1994; 28:1247–51.
- Weiss S, Reemtsma T. Membrane bioreactors for municipal wastewater treatment – A viable option to reduce the amount of polar pollutants discharged into surface waters?. *Water Res* 2008; 42:3837–47.
- Xu W, Zhang G, Li X, Zou S, Li P, Hu Z, Li J. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Res* 2007; 41:4526–34.
- Zhang Q, Zhao L, Dong Y-H, Huang G-Y. Sorption of norfloxacin onto humic acid extracted from weathered coal. *J Environ Manage* 2012; 102:165–72.
- Zhao J, Li Y, Zhang C, Zeng Q, Zhou Q. Sorption and degradation of bisphenol A by aerobic activated sludge. *J Hazard Mater* 2008; 155:305–11.
- Zhu D, Pignatello JJ. A concentration-dependent multi-term linear free energy relationship for sorption of organic compounds to soils based on the hexadecane dilute-solution reference state. *Environ Sci Technol* 2005; 39:8817–28.
- Zorita S, Mårtensson L, Mathiasson L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Sci Total Environ* 2009; 407:2760–70.

Supplementary Material

Table S1. Method validation for determination of studied quinolones in wastewaters by SPE-ESI-UPLC-MS/MS. Limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ) and accuracy of the method (precision and trueness).

	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Spiked level (ng mL ⁻¹)	Trueness	Precision	
				(n = 42) Recovery (%)	Intra-day (%) ^a (n = 6)	Inter-day (%) ^a (n = 42)
MOX	0.03	0.11	0.25	100.1	1.4	3.2
			1.00	101.2	1.5	2.3
			3.00	99.4	0.3	0.4
OFL	0.02	0.07	0.25	99.4	0.7	1.6
			1.00	102.4	0.9	1.1
			3.00	99.3	0.4	0.6
CIP	0.03	0.09	0.25	99.8	2.2	2.8
			1.00	100.2	1.9	2.2
			3.00	99.5	0.7	1.5
NOR	0.02	0.07	0.25	99.1	1.8	2.3
			1.00	102.6	1.6	1.7
			3.00	100.3	1.0	1.2
PIP	0.03	0.12	0.25	100.8	2.0	2.9
			1.00	102.7	1.1	1.2
			3.00	99.4	1.1	1.0
PIR	0.03	0.11	0.25	99.4	2.5	3.4
			1.00	99.1	1.6	3.0
			3.00	99.6	1.2	1.1

^a Relative standard deviation (RSD, %)

Table S2. Method validation for determination of studied quinolones in sewage sludge by PLE and UPLC-MS/MS. Limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), accuracy of the method (precision and trueness).

	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	Spiked level (ng g ⁻¹)	Trueness	Precision	
				(n = 54) Recovery (%)	Intra-day (%) ^a (n = 6)	Inter-day (%) ^a (n = 54)
MOX	3	9	20	99.2	1.4	2.4
			200	100.9	4.9	5.0
			600	99.4	1.1	1.5
OFL	5	16	20	99.4	1.7	3.4
			200	98.6	1.9	3.9
			600	101.1	1.4	1.7
CIP	3	10	20	98.5	1.2	2.0
			200	99.7	1.2	1.6
			600	100.0	2.2	2.5
NOR	2	8	20	101.1	1.7	1.9
			200	100.3	0.8	1.2
			600	99.2	1.5	2.1
PIP	5	18	20	99.8	1.5	1.8
			200	98.6	2.2	4.9
			600	100.7	3.0	3.9
PIR	2	6	20	100.5	1.5	2.3
			200	100.1	1.2	1.3
			600	99.9	0.6	0.9

^a Relative standard deviation (RSD, %)

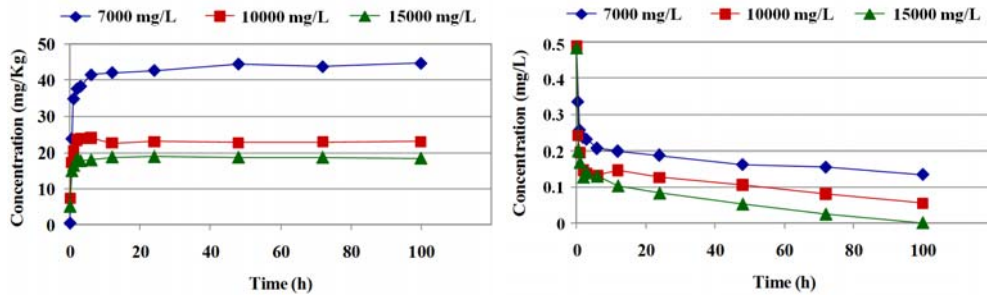
Table S3. Control tests data to determine abiotic losses (volatilization and sorption to glass vessel). It corresponds to conditions of Control A (Table 2).

Compound	Concentration ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	$t = 0 \text{ h}$	$t = 100 \text{ h}$
MOX	0.503 ± 0.002	0.498 ± 0.003
OFL	0.498 ± 0.004	0.501 ± 0.002
CIP	0.519 ± 0.003	0.515 ± 0.005
NOR	0.501 ± 0.002	0.497 ± 0.004
PIP	0.506 ± 0.001	0.503 ± 0.001
PIR	0.490 ± 0.004	0.494 ± 0.003

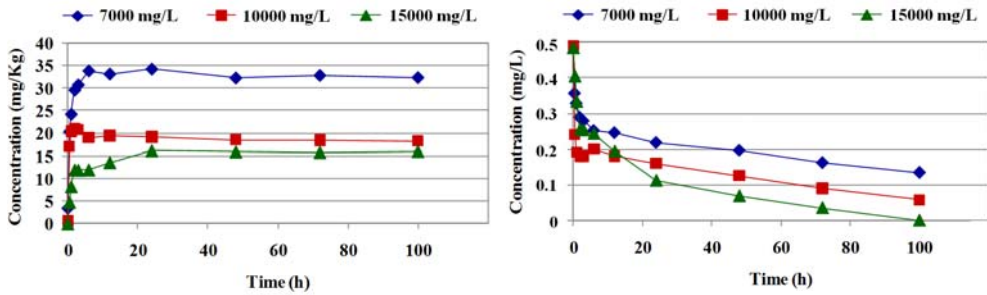
^aMean values of three determinations \pm standard deviation.

Figure S1. Influence of MLSS in removal of studied quinolones in laboratory-scale reactors.

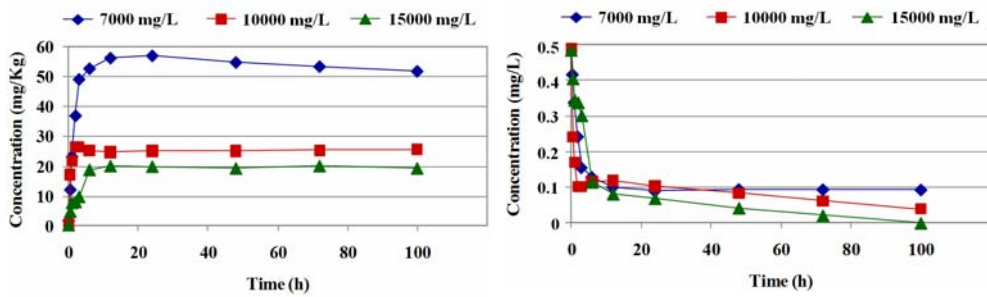
PIP



CIP



NOR



OFL

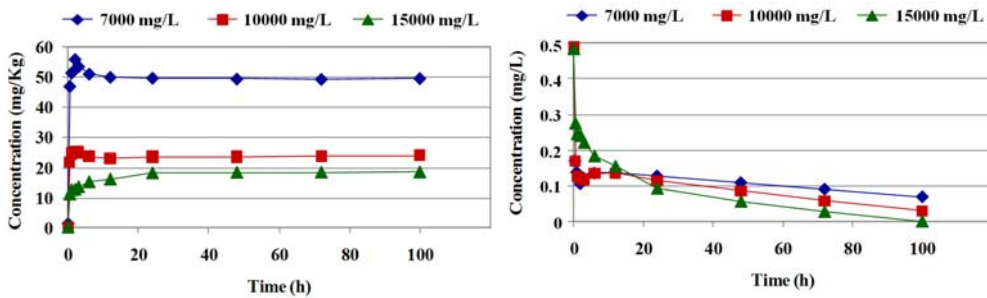
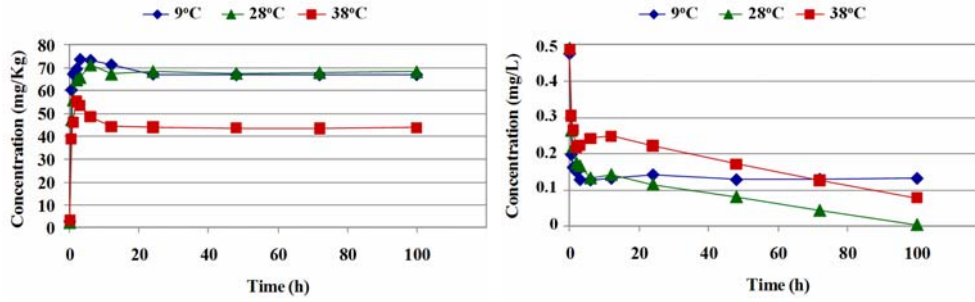
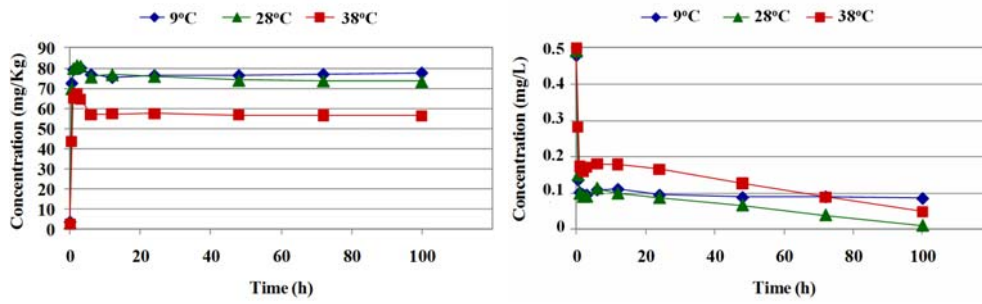


Figure S2. Influence of temperature in removal of studied quinolones in laboratory-scale reactors.

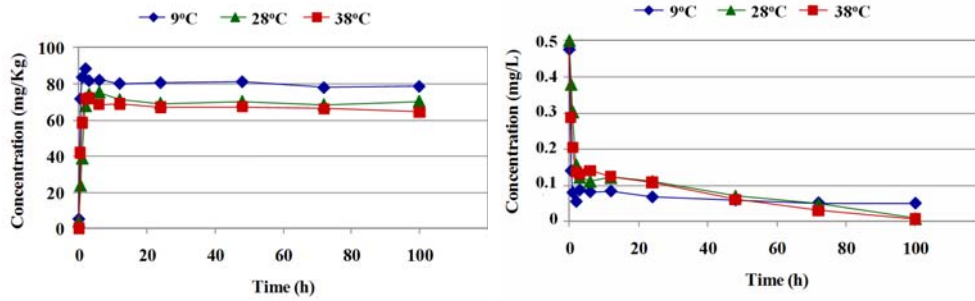
PIP



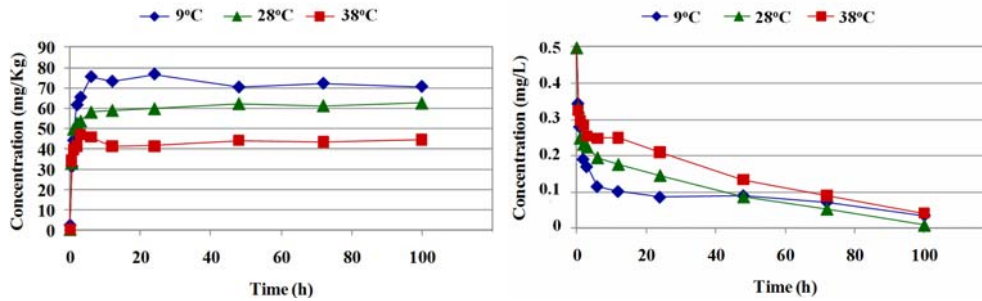
NOR

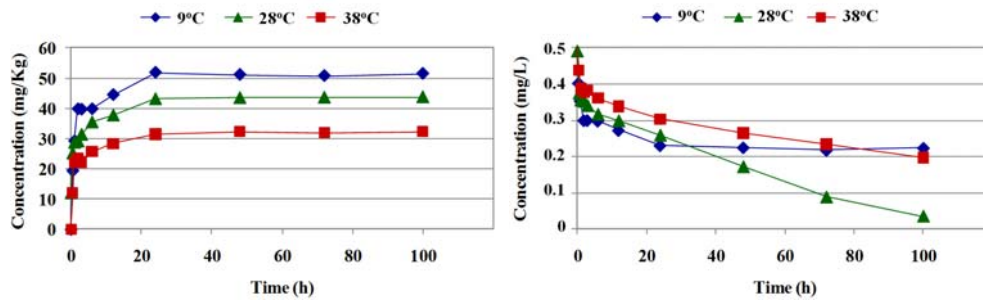


OFL



MOX



PIR

2. PUBLICACIÓN VII

Journal of Environmental Management
Enviado 12/09/2012 (JEMA-D-12-02043)

Removal and degradation characteristics of quinolone antibiotics in laboratory-scale membrane bioreactors under aerobic, nitrifying and anoxic conditions

N. Dorival-García^a, A. Zafra-Gómez^{a*}, A. Navalón^a, J. González^b, J.L. Vilchez^a

^a *Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain.*

^b *Research Group of Microbiology and Environmental Technologies, Water Research Institute, University of Granada, E-18071 Granada, Spain.*

ABSTRACT

This work describes the removal of 6 quinolone antibiotics from wastewaters under different redox conditions (aerobic, nitrifying and anoxic) through batch experiments in laboratory scale bioreactors using mixed liquor from a membrane bioreactor pilot plant (MBR). The main removal pathways for antibiotics from wastewaters involved in each treatment are described. Mass balances indicated that sorption on sludge played a dominating role in the elimination of antibiotics. Sorption potential depended on the redox conditions, being lower in nitrifying (K_d , 414–876 L kg⁻¹) and anoxic (K_d , 471–930 L kg⁻¹) sludge in comparison with aerobic sludge (K_d , 534–1137 L kg⁻¹). K_d was higher for piperazinylic quinolones.

Redox conditions also influenced biodegradation, a secondary pathway, which followed first-order kinetics with degradation rates constants ranging from $1.8 \cdot 10^{-3}$ to $8.2 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$. Biodegradation rates under anoxic conditions were negligible. The experimental results have also demonstrated much higher removal efficiency by biodegradation (36.2–60.0%) under nitrifying conditions in comparison with aerobic conditions (14.9–43.8%). The addition of allylthiourea, an ammonia monooxygenase inhibitor, inhibited nitrification completely and reduced significantly the biodegradation of target antibiotics (16.5–29.3%). The residual biodegradation in the presence of allylthiourea may be due to the activity of heterotrophs in the enriched nitrifier culture. The removal of the selected antibiotics under the studied redox conditions depended significantly on the bacteria composition of the sludge. These results suggest that despite the known persistence of this group of antibiotics it is possible to enhance their degradation using nitrifying conditions, which at adequate working conditions as high SRT, typical in MBR, become a promising alternative for improving quinolones removal from environment.

Keywords Quinolone antibiotics; Redox conditions; Aerobic/anoxic reactors; Nitrifying activated sludge; Biodegradation; Sorption.

* Corresponding author: Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

1. Introduction

The occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment is recognized as an emerging issue due to their potential to cause undesirable environmental and human health effects (Rosal et al., 2010). Pharmaceutical residues from human use are introduced to the environment primarily from discharges of wastewater treatment plants (WWTPs) (Batt et al., 2006), municipal wastewater being therefore the major source of micropollutants. Most WWTPs are not designed to treat many of these substances, which cannot be completely removed (Batt et al., 2006). Actually, effluents from WWTPs are relevant point sources for pharmaceuticals and although these substances are present at very low concentrations (i.e. $\mu\text{g L}^{-1}$ to ng L^{-1} range), there is evidence that they pose environmental and health hazards (Golet et al., 2002a).

Antimicrobial agents are among the most used pharmaceuticals and are widely used in human and veterinary medicine. The total consumption of antibiotics in human medicine was approximately 250–300 tons per year, with 85% used in outpatient treatment. One of the major consequences of this practice is the generation and transmission of antibiotic resistance, especially to quinolones and sulphonamides (Schmidt et al., 2012), caused by the constant input of low concentrations of antimicrobials to waste-receiving waters, which is responsible for the reduction in effectiveness of these drugs.

Quinolones and fluoroquinolones are extremely effective antibacterial agents, particularly because of their broad spectrum of activity and good oral absorption (Lee et al., 2007). They are primarily applied for treating human infections (Golet et al., 2002b). They have been detected at levels of up to 36 and 450 ng L^{-1} in surface waters and wastewater effluents,

respectively (Batt et al., 2007). In addition to the associated resistance issues, this family of antibiotics raises concerns about their potential ecotoxicity and genotoxicity (Hartmann et al., 1999), especially that caused by the last generations of quinolones, introduced to provide better therapeutic effects and counteract bacterial resistance. Despite this, the use of new generation quinolones is associated with serious side effects, which have resulted in their restricted use (Jia et al., 2012).

During wastewater treatment, quinolones are significantly removed from the water stream (>80%), but their fate is associated with sewage sludge because of their strong sorption properties (Golet et al., 2003) and their poor degradation (Al-Ahmad et al., 1999). The application of sewage sludge to soils may therefore be a potential route for these pharmaceuticals to enter the terrestrial environment and then the human food chain. Therefore, it is not surprising that these antibiotics can be detected even at sub-inhibitory concentrations in surface and ground waters, treated wastewater, biosolids, soils and sediments (Giger et al., 2003). Quinolones are therefore very persistent compounds and their definitive removal from the environment represents a real challenge.

Concerns over the removal of pharmaceuticals have motivated laboratory, pilot- and full-scale investigations exploring removal mechanisms during wastewater treatment, especially those that ensure their definitive removal from environment. The removal efficiency for pharmaceuticals at WWTPs depends mainly on biological treatments (Kasprzyk-Hordern et al., 2009), and activated sludge process is the most frequently used. Yet despite over a decade of study, much remains to be understood, because although some promising technologies have been implemented, more studies are required to develop really effective treatments, especially for the most persistent chemicals. The removal

mechanisms for conventional contaminants under different redox conditions are well understood and have been efficiently applied in most full-scale WWTPs, but the same cannot be said for micropollutants. For the latter, the contribution of other redox conditions, different from typical aerobic, such as anoxic or nitrifying conditions has not been analyzed. There are some exceptions such as, for example, the experiments on the removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals (EDCs) under aerobic, anoxic and anaerobic redox conditions (Joss et al., 2004; Abegglen et al., 2009; Hashimoto and Murakami, 2009; Suarez et al., 2010). However, very little is known about the application of alternative microbial treatment technologies, such as processes for nitrogen removal. This treatment is of particular interest because it removes some toxic nitrogen species, such as ammonium, responsible for eutrophication and toxicity to aquatic organisms (Khin and Annachhatre, 2004). This process involves different bacterial populations and consequently different degradation pathways, becoming an alternative for the removal of those micropollutants that are not effectively degraded by the commonly involved aerobic heterotrophs. There is some studies available focusing on contaminant removal under nitrifying conditions that have yielded promising results (Young Kim et al., 2007; Zhou and Oleszkiewicz, 2010; Falås et al., 2012).

Understanding the behaviour of PPCPs under different redox conditions is not only essential for achieving deeper knowledge of the whole wastewater treatment process, but also for finding some alternative pathways for pollutant removal, especially those that improve the degradation process. Despite of their well-known advantages, there are many difficulties involved in performing and controlling field studies at WWTPs. To overcome the difficulties, a few pioneering works using well-controlled laboratory reactors have been conducted on the removal of

specific antibiotics at environmentally relevant concentrations in activated sludge process, but very few exist on quinolone removal (Li and Zhang, 2010). To date, the information on the removal and fate of quinolones in WWTPs is still non-specific and limited.

The objective of the present work was to evaluate and compare the potential of aerobic, nitrifying and anoxic conditions for the removal of 6 quinolone antibiotics in wastewaters. Laboratory-scale batch reactors fed mixed liquor from a membrane bioreactor (MBR) were operated to better understand the overall removal process for such micropollutants in wastewater treatments at $\mu\text{g L}^{-1}$ level. Studies on the sorption behaviour and biodegradation kinetics were carried out under different redox conditions. In addition, efficient alternatives for improving the removal of these persistent substances from the environment are proposed. The quinolones analyzed were selected among those that are usually found in the urban wastewaters of Granada, Spain.

2. Materials and Methods

2.1. Target antibiotics and chemicals

Analytical grade standards of quinolones (Table 1), the surrogates marbofloxacin (MAR), cincophen (CIC) and caffeine (CAF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Table 1
Structures and physicochemical properties of quinolones under study.

	Properties						Structure	
	Molecular formula	MW ^(a)	pK _a	log K _{ow} pH = 6.78 ^(b)	Henry's Law Constant (atm.m ³ /mol) ^(c)	Molar volume (cm ³) ^(d)		Polarizability (cm ³) ^(d)
CIP	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331.35	pK ₁ =6.09 ^(a) pK ₂ =8.74	1.32	5.09 x 10 ⁻¹⁹	226.7	33.00 x 10 ⁻²⁴	
PIR	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₃	288.31	pK ₁ =2.28 ^(b)	2.00	8.42 x 10 ⁻¹⁵	205.9	29.15 x 10 ⁻²⁴	
NOR	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319.33	pK ₁ =6.30 ^(a) pK ₂ =8.38	1.48	8.70 x 10 ⁻¹⁹	237.4	31.99 x 10 ⁻²⁴	
PIP	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₃	303.32	pK ₁ =5.80 ^(a) pK ₂ =8.75	1.05	1.43 x 10 ⁻¹⁸	219.6	30.48 x 10 ⁻²⁴	
OFL	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	361.37	pK ₁ =6.05 ^(a) pK ₂ =8.22	0.61	4.98 x 10 ⁻²⁰	243.9	36.11 x 10 ⁻²⁴	
MOX	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	401.43	pK ₁ =6.3 ^(b) pK ₂ =9.3	2.49	(not found)	284.9	40.36 x 10 ⁻²⁴	

(a) (Renew and Huang, 2004); (b) (Hu et al., 2007); (c) <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>; (d) Calculated by ACD/Labs Freeware v.12.00 (Advanced Chemistry Development, Inc.)

Individual standard solutions of the compounds (200 mg L⁻¹) were prepared fresh monthly in a water/methanol mixture (1:4, v/v) and stored at -20°C. Working standard mixtures were prepared by diluting the individual stock solution in methanol or in the initial mobile phase immediately before use. They were stored at 4°C and prepared fresh weekly. Water (18.2 MΩ cm) was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). LC-MS grade water and methanol, NaOH, NaHCO₃, HCl 36% (v/v), and formic acid 98% (v/v) —used for the preparation of standards, mobile phases and pH adjustments— were purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). For water analysis, Oasis[®] HLB (500 mg, 6 mL) SPE cartridges from Waters Corporation (Milford, MA, USA) were used. For sludge analysis,

reagents for McIlvaine buffer solution (McIlvaine, 1921), as well as the components of the mineral-salts medium (MSM) and the supplements were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). The composition of MSM was Na_2CO_3 , 1514 mg L^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 41.6 mg L^{-1} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 50 mg L^{-1} ; NaH_2PO_4 , 50.5 mg L^{-1} ; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 75.6 mg L^{-1} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg L^{-1} ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg L^{-1} and $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg L^{-1} (Han Tran et al., 2009). The MSM was supplemented with NH_4Cl , yeast extract and allylthiourea. KNO_3 was also used to create anoxic conditions.

2.2. Instrumentation and software

The analytes were extracted using a Dionex Accelerated Solvent Extractor, ASE[®] 200 (Sunnyvale, CA, USA). Solid phase extraction (SPE) of wastewaters was carried out in a Supelco vacuum manifold (Madrid, Spain) for 12 columns connected to a Supelco vacuum tank and to a vacuum pump. Ultra Performance Liquid Chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) analysis was performed using a Waters Acquity UPLC[™] H-Class (Waters, Manchester, UK). Compounds were separated using an ACQUITY UPLC BEH[™] C18 column (1.7 μm ; 2.1 mm \times 50 mm) (Waters, UK). A Xevo TQS tandem quadrupole mass spectrometer (Waters) equipped with an orthogonal Z-spray[™] electrospray ionization (ESI) source was used for detection. Chromatographic separation was performed using a binary gradient mobile phase consisting of 0.2% (v/v) aqueous formic acid solution (solvent A) and methanol (solvent B). The flow rate was 300 $\mu\text{L min}^{-1}$; column temperature, 40°C and the injection volume, 5 μL . Gradient conditions started with initial mobile phase, 80% (A), which was linearly decreased to 30% (A) within 5 min. Total run time was 8 min, including column cleaning and equilibration for next injection.

Mass spectrometer parameters were as follows: capillary voltage, 0.60 kV; source temperature, 150°C; desolvation temperature, 500°C; cone gas flow, 150 L h⁻¹; desolvation gas flow, 500 L h⁻¹; collision gas flow, 0.15 mL min⁻¹, and nebulizer gas flow, 7.0 bar. Nitrogen (≥99.995%) was used as cone and desolvation gas, and argon (99.999%) as collision gas. After selecting the precursor ions, the two most sensitive MRM transitions were selected for accurate quantification and confirmation of compounds. Dwell time for each transition was 25 ms, and interscan delay was set at 3 ms. MassLynx software 4.1 was used for instrument control and peak detection and integration, and Statgraphics software for statistical treatment of data.

A Crison 2000 digital pH-meter with an Ag/AgCl (KCl 3M) combination glass electrode (Crison Instruments S.A, Barcelona, Spain), a vortex-mixer (Yellow line, Wilmington, NC, USA), a RAYPA autoclave (Barcelona, Spain) and a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttlingen, Germany) were also used.

2.3. Description and performance of the MBR pilot plant.

The experiments were developed using activated sludge from an MBR pilot plant (Fig. 1a) operated with urban wastewaters from the primary settling tank of a WWTP from Granada (Spain). The pilot plant had a sidestream configuration and consisted of a cylindrical bioreactor with an operating volume of 385 L. The final oxygen concentration was maintained within the range of 2–4 mg L⁻¹. Sludge retention and treated water filtration was achieved by two polyvinylidene difluoride (PVDF) hollow fibre membrane module (Zenon[®]), with an effective area of 1.86 m² and a nominal pore size of 0.04 μm (ZW-10 Zenon[®]). Table 2a shows the operating conditions of the MBR plant.

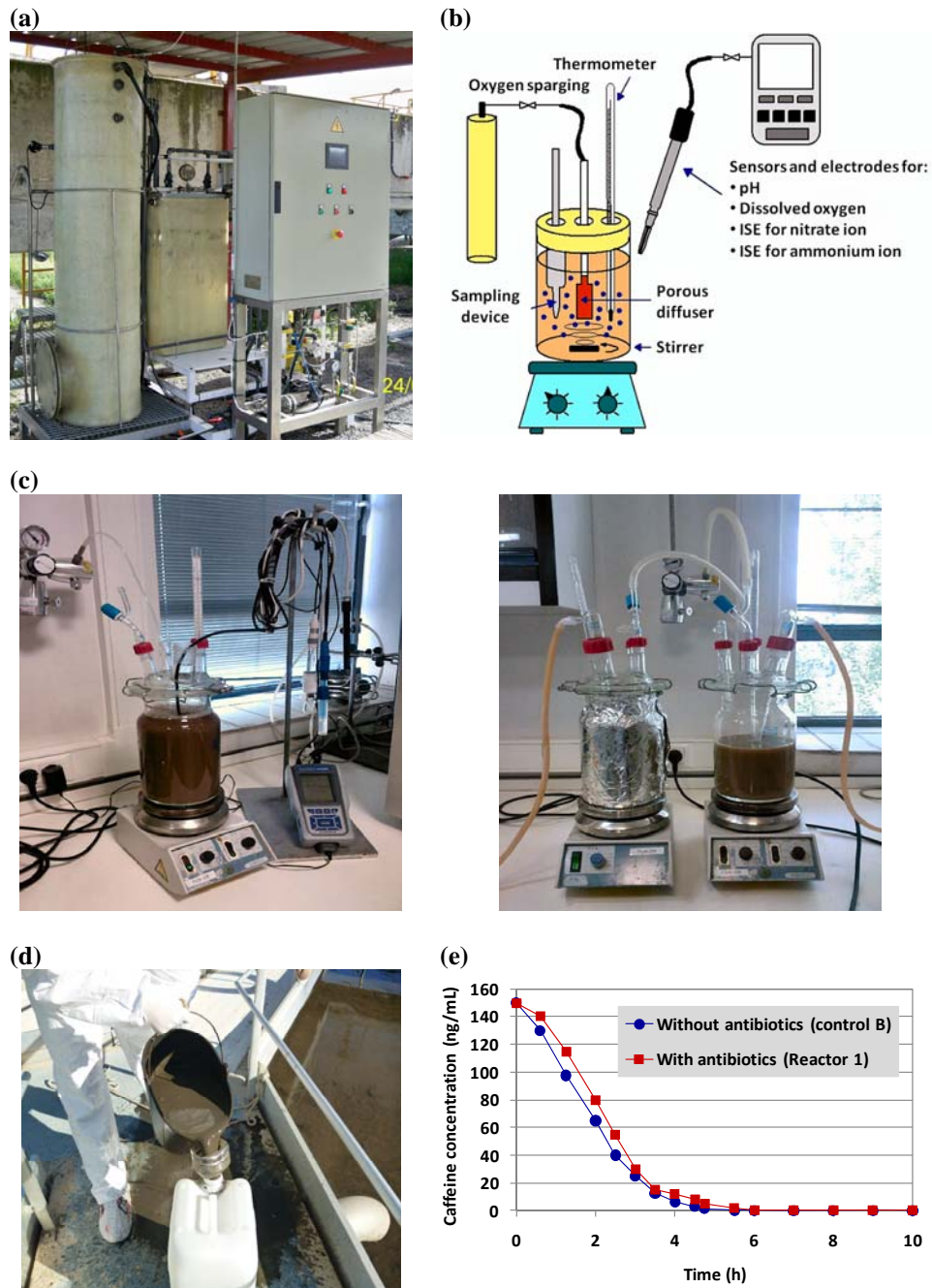


Fig. 1. (a) Image of the MBR pilot plant. Schematic setup (b) and images (c) of the assembled laboratory-scale bioreactors used. (d) View of activated sludge sampling. (e) Caffeine test as indicator of the impact of antibiotics on the aerobic activated sludge activity.

2.4. *Enrichment of nitrifying activated sludge*

Activated sludge with nitrifying activity lower than $5 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ MLSS h}^{-1}$ was collected from the MBR pilot plant. From this collection, the nitrifying activated sludge (NAS) was enriched in a sequencing batch reactor (SBR) for more than 2 months. MSM supplemented with yeast extract and NH_4Cl at 50 mg L^{-1} and $50\text{--}300 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, respectively, was used. The NH_4Cl concentration was gradually increased during the enrichment phase depending on the growth of nitrifying activity of the sludge. The pH in the reactor was maintained at 7.5–8.0 using NaHCO_3 30 g L^{-1} . Pure oxygen was used to maintain a dissolved oxygen level of $6.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ or higher. Some sludge was withdrawn for inoculation of batch experiments or for controlling solids retention time (kept in the range of 20–30 days).

2.5. *Design and operation of the batch experiments*

Four series of batch experiments using laboratory-scale bioreactors (Fig. 1b, c) were performed under the redox conditions shown in Table 2b. The bioreactors were covered to prevent photodegradation. Temperature, pH and dissolved oxygen (DO) were determined by specific sensor electrodes. N-NH_4^+ and N-NO_3^- were measured by ion selective electrodes (CRISON Instruments). MLSS concentration was determined by standard methods (APHA, 2001).

2.5.1. Protocol for the batch experiments

Prior to treatment with the antibiotics, the collected biomass was aerated for 1 day to reduce dissolved organic matter content. Appropriate amounts of MBR sludge sample or nitrifying sludge (section 2.4) were centrifuged and washed. After centrifugation, the sludge for aerobic and anoxic reactors was suspended in filtrated urban wastewater to the desired MLSS concentration. For nitrifying reactors, NAS was inoculated to MSM supplemented with $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ until the desired MLSS value. Then, all reactors were filled with 3 L of the prepared sludge at a MLSS value of 7000 mg L^{-1} and maintained at 30°C by a thermostatic water bath. They were continuously stirred at 150 rpm during the whole experiment.

For the experiments performed under aerobic conditions, the bioreactor was equipped with an aeration control unit allowing the soluble oxygen concentration to be maintained between $2\text{--}4 \text{ mg L}^{-1}$. Oxygen sparging was performed using a porous diffuser to optimise solubilisation of the gas. The pH of the activated sludge ranged from 7.0–7.5, and it showed little change during the experiments. In the anoxic reactor, designed as described by a previous study (Plosz et al., 2003), N_2 was initially sparged, at approximately 3 L h^{-1} , for 30 min. Nitrate was added as dissolved KNO_3 with an initial concentration of $80 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3^-$. The pH was maintained between 7.3 and 7.7 with HCl (1M) or NaOH (1M).

In nitrifying reactors, initial pH was adjusted to 7.5 and kept at approximately 7.5–8.0 using $30 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ during the experiments. Reactors were oxygenated in the same way than the aerobic reactor, and DO was maintained higher than 6 mg L^{-1} (Falås et al., 2012). To assess studies under suppressed ammonium oxidation activity, 10 mg L^{-1} of allylthiourea was used as inhibitor.

When all reactors were completely assembled, the antibiotics of interest were spiked in each reactor with a stock solution mixture to obtain a final concentration of $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of each one. At each designed sampling time—0 min (immediately before spiking), 30 min; 1, 2, 3, 6, 12 h; 1, 2, 3, 4 days—, homogenized mixed liquor was withdrawn from each bioreactor, and samples were immediately processed. Antibiotic concentrations in water and solid phases were analyzed separately. Samples from control reactor A (Table 2b) were taken only at the beginning and at the end of the experiments.

2.5.2. Biological activity measurements

The biological activity of aerobic sludge was evaluated by spiking caffeine at a final concentration of $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Caffeine was used as reference chemical, since it is readily biodegradable and exhibits no measurable sorption to sludge (Kim and Aga, 2007). Caffeine biodegradation was compared between the reactor 1 containing antibiotics and control B at the same conditions but without antibiotics. Biological activity of NAS was measured through nitrification efficiency. It was considered that nitrification fully proceeded when ammonia was transformed to nitrate in the SBR. NAS activity was compared between the reactor 3 containing antibiotics and control C at the same conditions without antibiotics.

2.5.3. Studies of sorption to sludge

Sorption experiments with fully inactivated sludge were performed to distinguish adsorption from biodegradation. Inactivation of sludge was

performed by autoclaving at 120°C for 30 min (Wang and Grady, 1994). The sterilized sludge was prepared for sorption experiments and K_d determination using the process described for natural sludge in section 2.5.1. The ability of a compound to sorb to sludge is estimated by the sorption (or partition) coefficient, K_d , which is defined as the ratio between the concentration of the compound sorbed to the solid phase to the amount of compound remaining in solution at equilibrium. Sorption to sludge is considered as a relevant removal process when $K_d > 300 \text{ L kg}^{-1}$ (i.e. $\log K_d > 2.48$) (Tolls, 2001).

2.6. Antibiotics determination

Immediately after sampling, biological activity was diminished by addition of 1% (v/v) aqueous formaldehyde. To separate solid from aqueous phase, samples were centrifuged at $3634 \times g$ for 20 min. The aqueous phase was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nitrocellulose disk filter (Millipore) and the solid portion was dried at 60°C until constant weight and finely ground ($\leq 1.41 \text{ mm}$). Both samples were kept in the dark at 4°C until analysis, which occurred with the minimum possible delay.

The determination of compounds in water samples was performed according to a method described elsewhere (Li et al., 2009) with some modifications. Briefly, 100 mL of filtrates spiked with the surrogates and acidified to pH 3 with 98% (v/v) formic acid were passed through Oasis HLB SPE cartridges. The analytes were eluted with 8 mL of methanol and the extracts evaporated to dryness. 1 mL of initial mobile phase was added in order to dissolve the residues and the resulting extracts were injected into the LC system.

For sludge samples, a method described elsewhere with slight modifications was also used (Golet et al., 2002b). Briefly, 0.5 g of sample with the surrogates was transferred into an 11 mL stainless steel extraction cell of the ASE extractor. The operating conditions were the following: temperature, 86°C; pressure, 1000 psi; preheating period, 1 min; static extraction period, 5 min; number cycles, 5; solvent flush, 30% of the cell volume and N₂ purge, 90 s. The mixture MeOH/McIlvaine buffer, 50:50 (v/v), pH 3, was used as solvent extraction. The extracts (approx. 15 mL) were evaporated to dryness and 250 µL of the initial mobile phase were added to dissolve the residues. The extracts were centrifuged for 30 min at 3634 × *g* and the supernatant was injected into the LC system.

2.7. Biodegradation kinetics models

Previous studies have reported that removal of trace amounts of organic pollutants in sewage during the activated sludge process can be described by a pseudo-first-order reaction, due to the relatively low substrate concentration compared to the biomass concentrations (Hashimoto and Murakami, 2009; Li and Zhang, 2010). Using the equations previously described in those works, we calculated the reaction constants (*k*) and the half-life (*t*_{1/2}) for the quinolones of interest.

3. Results and discussion

During the experiments, removal due to volatilization and sorption to glass walls of vessels can be neglected on the basis of the results obtained from control A (Table 2b). Quinolones were found to be stable and no hydrolysis occurred. No volatile loss was observed because of their very

low Henry's Law constants, greater molecular weight (>300) as well as the presence of several polar and ionizable groups (Table 1). Therefore, it was assumed that removal of the selected antibiotics in the bioreactors is achieved only by sorption and biodegradation, being the almost exclusive mechanisms for their removal. Mass balances were performed in order to calculate sorption and biodegradation percentages.

3.1. Effect of antibiotic concentration on biological activity of sludge

Quinolones are broad-spectrum antibiotics; therefore, the inhibition of the bacterial growth in presence of these compounds must be evaluated. Caffeine biodegradation profiles allowed us to determine that antibiotics at the concentrations under study did not affect significantly the biological activity in aerobic sludge. Caffeine was completely and similarly degraded in both tested reactors, with and without antibiotics within 5 h. Results are presented in Fig. 1e.

In the case of NAS, a predominantly nitrifying bacterial population in the sludge, after enrichment for more than 2 months, was obtained. The biological generation of nitrate from ammoniacal nitrogen under aerobic conditions (nitrification) takes place in two distinct stages (Khin and Annachatre, 2004) and each of them is catalyzed by two types of aerobic, chemolithoautotrophic bacteria: ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria, which are collectively known as nitrifying bacteria.

They are less numerous and extremely slow-growing microorganisms; hence their growth in activated sludge is favoured at relatively longer SRT (Batt et al., 2006). Ammonium oxidizing activity estimated from the rate of disappearance of ammonium gradually increased and reached $20 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ MLSS h}^{-1}$ after 2 months of enrichment, and during the

experimentation period the nitrifying activity of this sludge was maintained at around this value. Fig. 2b shows the profile of batch oxidations of ammonium measured during the experiment in the nitrifying reactor. It was confirmed that the seeding sludge taken from the SBR could be considered enriched nitrifying activated sludge with high nitrification activity, in comparison with the aerobic reactor (Fig. 2a), where it was not observed any important nitrifying activity. The comparison of variations in ammonium and nitrate concentrations during the experiments in the nitrifying reactor and in control C (without antibiotics) confirmed that the presence of the target antibiotics did not affect significantly the activity of nitrifying bacteria at the concentration under study. This test was necessary, since it is known that autotrophic nitrifying bacteria are very sensitive to the presence of antibiotics (Schmidt et al., 2012). The nitrite oxidation is particularly sensitive to the action of antibiotics. Inhibition of nitrite oxidation leads to accumulation of nitrite, a particularly toxic compound, which affects effluents quality. A previous study (Schmidt et al., 2012) reported no influence of low antibiotic concentrations on nitrification for $CIP \leq 0.3 \text{ mg L}^{-1}$, all ammonia was nitrified to nitrate, with efficiencies $>70\%$. Similar results were observed for OFL (Dokianakis et al., 2004), which inhibited nitrite oxidation at concentrations $\geq 3 \text{ mg L}^{-1}$.

These tests allowed us to confirm that the presence of antibiotics did not cause any significant negative effect in the microorganisms present in aerobic sludge and NAS during the treatments. This indicates that despite the broad spectrum of pathogenic bacteria targeted by antibiotics, only the activity of a minority of the species present in the sludge is inhibited (Kümmerer et al., 2000). Inactivation of the antibiotic, e.g., by sorption, might be also an explanation for the reduced activity of quinolones in reactors (Al-Ahmad et al., 1999), since it has also been proved that

desorption did not significantly occur during wastewater treatment. Other factor could be the bacterial adaptation to antibiotics, given the continual introduction of these substances to waste-receiving waters, especially from hospital effluents where the presence of antibiotic-adapted bacteria is quite likely (Al-Ahmad et al., 1999).

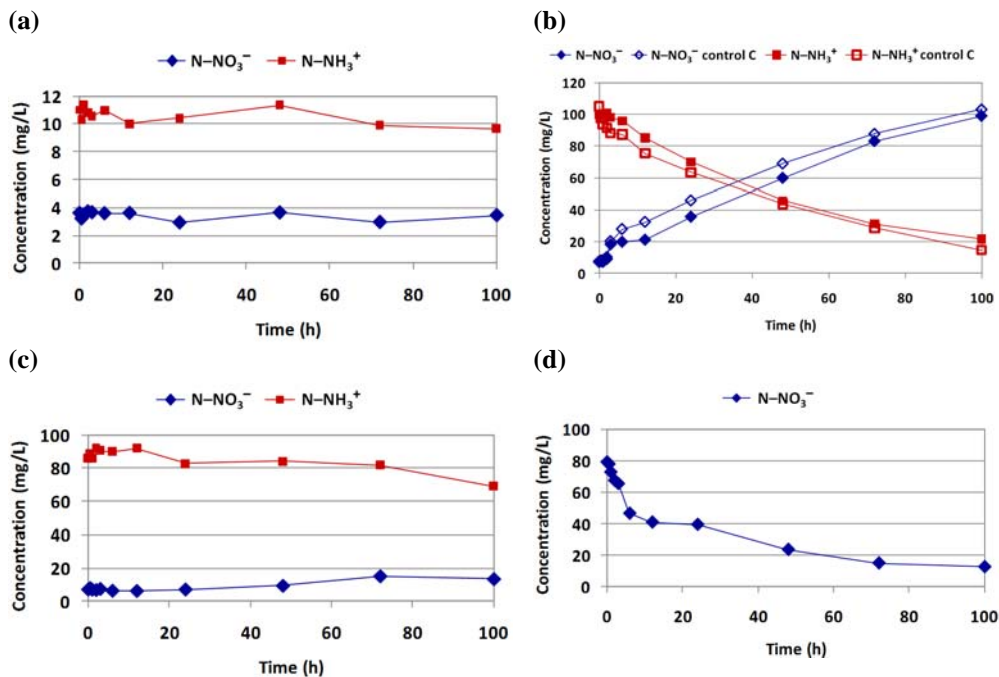


Fig. 2. Changes in N-NH_4^+ and N-NO_3^- concentrations during the experiments under the studied redox conditions at 30°C and 7000 mg L^{-1} MLSS. (a) Aerobic sludge; (b) Nitrifying sludge; (c) Nitrifying sludge + inhibitor (allylthiourea); (d) Anoxic sludge.

3.2. Study of sorption process of quinolones to sludge

The results yielded by all the experiments demonstrated that quinolones were removed quickly by sorption in the first 60 min of the experiments, as it is shown on Fig 3a exemplified for MOX. Sorption to

activated sludge is initially a rapid process (Ternes et al., 2004) but antibiotic concentrations gradually decreased from 24 h onwards probably due to their biodegradation by sludge microorganisms.

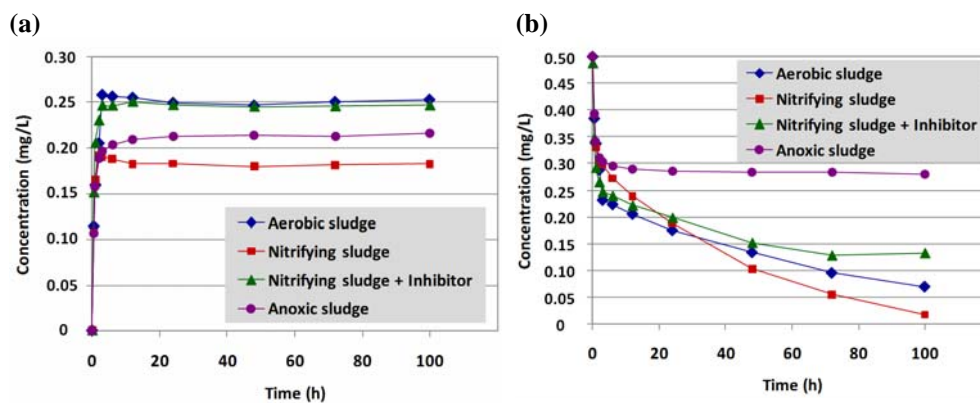


Fig. 3. Removal of MOX in activated sludge system in laboratory scale bioreactors under the studied redox conditions. **(a)** Effect on MOX sorption. **(b)** Effect on MOX remaining concentration in aqueous phase.

Quinolones exhibited a very high sorption potential to activated sludge, which has been also observed in previous studies (Golet et al., 2003; Jia et al., 2012). According to the mass balances (Fig. 4a), in general, sorption constitutes the most important mechanism for the removal of antibiotics from waters under any of the studied redox conditions. This high affinity to sludge correlates with the calculated K_d values (Table 3), but these values were higher than those obtained in previous studies (Li and Zhang, 2010). These differences in results were possibly due to different characteristics of sludge or the experimental conditions applied. Octanol-water partition coefficients ($\log K_{ow}$) can be used to assess the hydrophobic sorption for uncharged molecules (Golet et al., 2003). Uncharged antibiotics with $\log K_{ow} < 2.5$ are considered to have low sorption potential (Tolls, 2001). The low $\log K_{ow}$ values of the studied quinolones (Table 1) is in contrast with the high K_d values obtained, so that sorption of antibiotics to

sludge is much stronger than that predicted for hydrophobic interactions, which could be explained by the presence of ionizable groups (Table 1). It can be therefore concluded that hydrophobic partitioning is not likely to drive the sorption of charged antibiotic molecules. Sorption of quinolones to activated sludge seems to be mainly affected by electrostatic forces, such as cation exchange, ion bridging, surface complexation, ion dipole and hydrogen bonding (Golet et al., 2003; Conkle et al., 2010; Tolls, 2001).

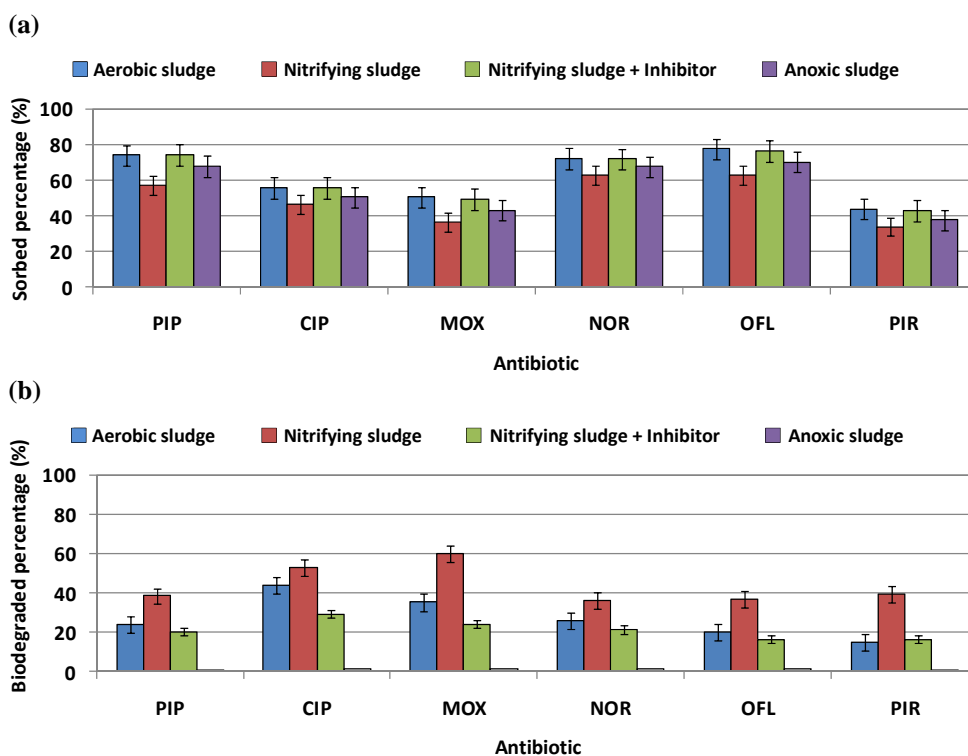


Fig. 4. Comparison of percentages of sorbed (a) and biodegraded (b) mass under the studied redox conditions for the target antibiotics after 100 h of reactors operation. Error bars represent the standard deviation of replicates.

Table 3

K_d values ($L\ Kg^{-1}$) of quinolones sorbed onto the sludge at different redox conditions.

Quinolone	Redox conditions		
	Aerobic	Nitrifying	Anoxic
PIP	1137	876	930
NOR	1423	1242	1309
CIP	1188	989	1002
OFL	984	801	888
MOX	802	578	731
PIR	534	414	471

It was also observed that K_d showed always a significant positive correlation with the removal percentages of quinolones, suggesting that the high sorption to sludge resulted in high removal efficiency. This confirmed that sorption to sludge is the major removal mechanism of quinolones (Golet et al., 2003).

From mass balances and calculated K_d , it was found that the highest sorption potentials occurred under aerobic conditions. Previous studies have confirmed a diminished ability of anaerobic sludge to sorb OFL in comparison with aerobic sludge (Drillia et al., 2005). This behaviour can be attributed to a decrease in charged groups on the sludge surface that would be able to interact with antibiotics; e.g. anaerobic soils cause reduction of ferric to ferrous ions (not able to complex quinolones) (Delle Site, 2001).

It was also observed a much diminished ability of sorption to sludge under nitrifying conditions. NAS composition is different from that of aerobic and anoxic sludge, and different interactions with target antibiotics are therefore expected. The sorption ability of quinolones depends on many factors such as pH, ionic strength, nature of organic matter and inorganic

compounds, because they determine the predominant quinolone species and therefore their sorption ability, as well as the aggregate capacity of organic matter that determine the access of quinolones to the interaction sites in sludge. Moreover, differences in bacterial communities in NAS can also change the nature of extracellular polymeric substances that are synthesized by bacteria and that would modify the sorption potential of pollutants. Further studies are necessary to establish which factors are responsible for the diminished quinolone sorption under nitrifying conditions.

PIR exhibited the least capacity to sorb to sludge under all the evaluated redox conditions. PIR is the only quinolone that does not present the piperazine ring at C-7, where the basic (protonated) groups are found. Therefore, PIR can be only neutral or anionic, whereas the other quinolones can also exist as zwitterionic species (Vasudevan et al., 2009). At the working pH, the acidic groups of organic matter in sludge as well as those of PIR are likely to be deprotonated ($\text{pK}_{\text{aCOOH}}=3-6$) (Tolls, 2001; Conkle et al., 2010), resulting in high electrostatic repulsion that would explain the reduced sorption of PIR. Moreover, PIR is the least polarizable of the studied quinolones (Table 1), suggesting that its lower charge separation within the molecule will not permit an orientation that would allow optimal interactions with the sorption sites. It was found that polarizability provides between 15%–40% of sorption free energy, so compounds that are more polarizable are more likely to bind (Conkle et al., 2010).

At the studied pH, zwitterionic species of quinolones will determine interactions that greatly influence sorption to components of sludge (Vasudevan et al., 2009), considering they are the predominant species (>80%) for this group of quinolones. According to a previous study (Holten Lutzhoft et al., 2000), at pH 5–8, zwitterions explained the observed strong interactions of quinolones with humic acids.

NOR and CIP were the quinolones with the highest sorption affinity. They are among the most polarized of the studied quinolones. Additionally, MOX and OFL were the amphoteric quinolones with the lowest sorption potential. The most probable cause of the decreased sorption affinity could be the increasing molecular size of these quinolones, which may result in steric hindrance. The presence of bulky substituents makes difficult the approach of the molecules to the sorption sites. This in turn, lowers the binding energy of the interactions involved because all they all are distance-dependant (Conkle et al., 2010).

3.3. *Biodegradation of quinolones under different redox conditions*

Biodegradation of quinolones under all the studied redox conditions fitted well first-order kinetics model (Table 4) with R^2 values ranging from 98.27–99.89%. Half-life for the studied quinolones was between 84.5 and 385.1 h, confirming that quinolones biodegradation occurs slowly during wastewater treatment, still being a secondary removal route. Sorption makes the mineralizing process slow and complete mineralization has not been noted (Halling-Sorensen et al., 2000; Kümmerer et al., 2000; Golet et al., 2002a).

The results on antibiotics degradation under the studied redox conditions after 100 hours of operation are shown in Fig. 4. Removal efficiency for aerobic sludge varied between 20.3%–25.9% for PIP, NOR and OFL. CIP and MOX were the most biodegraded quinolones (43.8% and 35.3%, respectively). PIR was biodegraded in only 14.9%. The corresponding kinetic constants supported these observations (Table 4). Piperazinylic quinolones exhibited the highest biodegradation rates,

indicating that the presence of the piperazine ring could result in an increased biodegradation rates at aerobic conditions.

Table 4

Pseudo first-order kinetics model parameters for studied quinolones ($C_0 = 0.5 \text{ mg L}^{-1}$) under different redox conditions.

Quinolone	Redox condition	$k \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$	$R^2\text{^{(a)}}$
PIP	Aerobic	$4.2 \cdot 10^{-3}$	165.0	99.34
	Nitrifying	$6.3 \cdot 10^{-3}$	110.0	98.27
	Nitrifying + Inhibitor (ATU)	$3.0 \cdot 10^{-3}$	231.0	98.50
NOR	Aerobic	$4.8 \cdot 10^{-3}$	144.4	98.76
	Nitrifying	$5.9 \cdot 10^{-3}$	117.5	99.74
	Nitrifying + Inhibitor (ATU)	$3.9 \cdot 10^{-3}$	177.7	98.34
CIP	Aerobic	$7.3 \cdot 10^{-3}$	95.0	99.32
	Nitrifying	$8.0 \cdot 10^{-3}$	86.6	99.89
	Nitrifying + Inhibitor (ATU)	$5.0 \cdot 10^{-3}$	138.6	99.02
OFL	Aerobic	$3.0 \cdot 10^{-3}$	231.0	99.68
	Nitrifying	$6.1 \cdot 10^{-3}$	113.6	99.79
	Nitrifying + Inhibitor (ATU)	$1.8 \cdot 10^{-3}$	385.1	98.73
MOX	Aerobic	$6.8 \cdot 10^{-3}$	101.9	98.89
	Nitrifying	$8.2 \cdot 10^{-3}$	84.5	98.29
	Nitrifying + Inhibitor (ATU)	$4.8 \cdot 10^{-3}$	144.4	98.96
PIR	Aerobic	$2.1 \cdot 10^{-3}$	330.1	98.61
	Nitrifying	$7.0 \cdot 10^{-3}$	99.0	99.13
	Nitrifying + Inhibitor (ATU)	$1.8 \cdot 10^{-3}$	385.1	99.87

^(a) From linear form equation (Eq. 3)

It was also observed that degradation efficiency increased significantly under nitrifying conditions (36.2–60.0%) supported also by the higher degradation constants, reducing half-life from 95.0–330.1 h (aerobic sludge) to 84.5–117.5 h (NAS). These results demonstrate that NAS provide conditions that stimulate quinolone degradation in batch reactors. This may be caused by the diversity of nitrifying bacteria and a variety of non-specific mono- and dioxygenase enzymes associated with both heterotrophic and autotrophic microorganisms. Recent studies also found that ammonia monooxygenase (AMO) played an important role in the conversion of

remarkably many substrates including hydrocarbons, pharmaceuticals, personal care products (Chang et al., 2002; Batt et al., 2006; Han Tran et al., 2009; Suarez et al., 2010; Falås et al., 2012) and EDCs (Shi et al., 2004; Young Kim et al., 2007; Zhou and Oleszkiewicz, 2010). These results suggest that the removal efficiency of pharmaceuticals in biological wastewater treatment does not only depend on the chemical characteristics of the target compounds, but also relies on the microbial species that are present in sludge. Under these conditions, CIP and MOX were again the most biodegraded. As well, nitrifying conditions increased significantly the biodegradation rate of PIR (k increased from $2.1 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ to $7.0 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$), yielding a biodegradation removal from 14.9% to 39.4%. This is evidence of differences in degradation pathways in aerobic and nitrifying processes, being target antibiotics better removed under nitrifying conditions.

The high biodegradation activity, together with the low sorption potential under nitrifying conditions, creates favorable conditions for improving the removal of target antibiotics from waters, since sorbed antibiotics become non bioavailable for degradation (Golet et al., 2003).

When allylthiourea was added, nitrification was negligible (Fig. 2c), this came accompanied by a reduction in biodegradation removal to 10.5–29.3% (Fig. 4b), and consequently by a significant increase in half-life (138.6–385.1 h). These differences can be interpreted as being due to biodegradation by nitrification. The remaining biodegradation ability in sludge could be due to the activity of heterotrophs, which are also known to function as nitrifying microorganisms (Khin and Annachatre, 2004). Heterotrophs can use organic compounds synthesized by autotrophs in NAS, or they can use compounds released from yeast extract in the enriched medium or methanol that was added with the spiking antibiotics solution as carbon source that promotes the growth of heterotrophs present in NAS

(Han Tran et al., 2009). However, this experiment proved that degradation of quinolones in the enriched NAS was mainly dependent on the activity of nitrifying microorganisms in comparison with heterotrophic microorganisms.

On the other hand, the important biological degradation observed in aerobic sludge is also evidence that there are other heterotrophic bacterial populations that do not grow in NAS but that greatly contribute to biodegrade antibiotics in aerobic conditions. Consequently, the observed differences in the removal rates of the target antibiotics primarily were caused by differences in bacterial communities.

It is unclear whether the microorganisms responsible for biological degradation have to adapt to the micropollutant load or if degradation occurs via constitutively expressed enzymes. The ability to degrade them could depend on regular exposure to pharmaceuticals or adaptation processes, considering many of these antibiotics are continually found in wastewaters, and bacteria would have the required time for expressing specific enzymes (Young Kim et al., 2007; Abegglen et al., 2009). Another feasible alternative is co-metabolism. Although published reports on the co-metabolism of pharmaceuticals are currently limited, it has been reported that this process may be important in their degradation because AMO has a relatively wide spectrum for substrate degradation (Han Tran et al., 2009).

Finally, the anoxic reactor was very efficient in the removal of nitrate as nitrogen gas, reaching >84% after 100 h of the experiment (Fig. 2d). It was observed that degradation of quinolones under anoxic conditions was negligible, because <5% was removed by biodegradation. This was supported by studies that confirm the lower removal efficiency, although there are few cases of PPCP biodegradation removal under anoxic

conditions (Abegglen et al., 2009; Hashimoto and Murakami, 2009; Suarez et al., 2010).

4. Conclusions

The removal of quinolones in WWTPs constitutes a real challenge because most studies have confirmed that conventional treatments are not sufficiently efficient to completely remove them from waters. There is limited information about their behavior under other redox conditions different from typical aerobic treatments.

The removal process of most commonly found quinolones in wastewaters under different redox conditions (aerobic, nitrifying and anoxic) was studied in laboratory-scale reactors, using mixed liquor from a MBR pilot plant. Under all studied conditions, neither aerobic nor nitrifying biological activities were negatively affected by the presence of antibiotics at the studied concentrations. All processes were characterized by fast sorption on sludge as the main removal pathway, which was supported by a positive correlation between sorption removal efficiency and the corresponding K_d . Biological transformation started within 24–48 hours, which followed first-order kinetics.

Sorption and biodegradation processes depended strongly on the redox conditions. In comparison with aerobic processes, a reduced sorption potential and negligible biodegradation rates under anoxic conditions were shown. It was also found that enrichment culture of nitrifying bacteria offer important advantages over aerobic sludge for the removal of the studied quinolones, because it was observed higher removal efficiency by biodegradation, as well as a diminished sorption capacity. Working under

conditions of high SRT, typical in MBR, that stimulates growth of nitrifying bacteria, could favour biodegradation processes under nitrifying conditions.

The addition of allylthiourea, an ammonia monooxygenase inhibitor, inhibited the nitrification completely and reduced significantly the removal of the target antibiotics. The residual biodegradation in presence of allylthiourea may be due to the activity of heterotrophs in the enrichment culture of nitrifying bacteria.

This study established that the removal of the selected antibiotics depended significantly on the bacteria composition of the sludge. Results suggest that the removal efficiency of quinolones can be enhanced by nitrification. This study lays the foundations for the development of efficient processes that might improve the removal of quinolones.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (Project No. CTQ2011-24210). The authors are grateful to the Spanish Ministry of Foreign Affairs (Agency for International Cooperation) for the fellowship granted to N. Dorival-García and to the company Air Liquide España for its valuable contribution to this study.

References

- Abegglen, C., Joss, A., McArdell, C.S., Fink, G., Schlüsener, M.P., Ternes, T.A., Siegrist, H., 2009. The fate of selected micropollutants in a single-house MBR, *Water Res.* 43, 2036–2046.
- Al-Ahmad, A., Daschner, F.D., Kümmerer, K., 1999. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 158–163.

- APHA, 2001. Standard methods for the examination of water and wastewater, in: Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. (eds), 20th edn. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Batt, A.L., Kim, S., Aga, D.S., 2006. Enhanced biodegradation of iopromide and trimethoprim in nitrifying activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7367–7373.
- Batt, A.L., Kim, S., Aga, D.S., 2007. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere* 68, 428–435.
- Chang, S.W., Hyman, M.R., Williamson, K.J., 2002. Cooxidation of naphthalene and other polycyclic aromatic hydrocarbons by the nitrifying bacterium, *Nitrosomonas europaea*. *Biodegradation* 13, 373–381.
- Conkle, J.L., Lattao, C., White, J.R., Cook, R.L., 2010. Competitive sorption and desorption behavior for three fluoroquinolone antibiotics in a wastewater treatment wetland soil. *Chemosphere* 80, 1353–1359.
- Delle Site A., 2001. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants, a review. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 30, 187–439.
- Drillia, P., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 2005. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere* 60, 1034–1044.
- Dokianakis, S., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2004. On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation. *Water Sci. Technol.* 50, 341–346.
- Falås, P., Andersen, H.R., Ledin A., Jansen J.C., 2012. Impact of solid retention time and nitrification capacity on the ability of activated sludge to remove pharmaceuticals. *Environ. Technol.* 33, 865–872.
- Giger, W., Alder, A.C., Golet, E.M., Kohler, H.E., McArdell, C.S., Molnar, E., Siegrist, H., Suter, M. J.F., 2003. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia* 57 485–491.

- Golet, E.M., Alder, A.C., Giger W., 2002a. Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3645–3651.
- Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C., Giger, W., 2002b. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated. *Anal. Chem.* 74, 5455–5462.
- Golet, E.M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A.C., Giger, W., 2003. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3243–3249.
- Halling-Sorensen, B., Holten Lützhøft, H., Andersen, H.R., Ingerslev, F., 2000. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 53–58.
- Han Tran, N., Urase, T., Kusakabe, O., 2009. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *J. Hazard. Mater.* 171, 1051–1057.
- Hashimoto, T., Murakami, T., 2009. Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments. *Water Res.* 43, 573–582.
- Hartmann, A., Golet, E.M., Gartiser, S., Alder, A.C., Koller, T., Widmer, R.M., 1999. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 115–119.
- Holten Lützhøft, H.C., Vaes, W.H.J., Freidig, A.P., Halling-Sorensen, B., Hermens, J.L.M., 2000. Influence of pH and other modifying factors on the distribution behavior of 4-quinolones to solid phases and humic acids studied by “negligible-depletion” SPME-HPLC. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4989–4994.

- Hu, J., Wang, W., Zhu, Z., Chang, H., Pan, F., Lin, B., 2007. Quantitative structure-activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4806–4812.
- Jia, A., Wan, Y., Xiao, Y., Hu, J., 2012. Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* 46, 387–94.
- Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P.R., Siegrist, H., 2004. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3047–3055.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* 43, 363–380.
- Kim, S., Aga, D.S., 2007. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J. Toxicol. Environ. Health* 10, 559–573.
- Khin, T., Annachhatre, A.P., 2004. Novel microbial nitrogen removal processes, *Biotechnol. Adv.* 22, 519–532.
- Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V., 2000. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40, 701–710.
- Lee, L.S., Carmosini, N., Sassman, S.A., Dion, H.M., Sepulveda, M.S., 2007. Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality, *Advan. Agron.* 93, 1–68.
- Li, B., Zhang, T., 2010. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3468–3473.
- Li, B., Zhang T., Xu, Z., Ping Fang, H.H., 2009. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 645, 64–72.

- McIlvaine, T.C., 1921. A Buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49, 183–186.
- Plosz, B.G., Jobbagy, A., Grady, Jr. C.P.L., 2003. Factors influencing deterioration of denitrification by oxygen entering an anoxic reactor through the surface. *Water Res.* 37, 853–863.
- Renew, J.E., Huang, C.H., 2004. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1042, 113–121.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* 44, 578–588.
- Schmidt, S., Winter, J., Gallert, C., 2012. Long-Term effects of antibiotics on the elimination of chemical oxygen demand, nitrification, and viable bacteria in laboratory-scale wastewater treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 354–364.
- Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F., 2010. Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Res.* 44, 3214–3224.
- Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., Hosomi, M., 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Res.* 38, 2322–2329.
- Ternes, T.A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H., Joss A., 2004. A rapid method to measure the solid – water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res.* 38, 4075–4084.
- Tolls, J., 2001. Critical Review sorption of veterinary pharmaceuticals in soils. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3397–3406.

- Young Kim, J., Ryu, K., Jung Kim, E., Seok Choe, W., Cheol Cha, G., Yoo, I.K., 2007. Degradation of bisphenol A and nonylphenol by nitrifying activated sludge. *Process Biochem.* 42, 1470–1474.
- Vasudevan, D., Bruland, G.L., Torrance, B.S., Upchurch, V.G., Mackay, A.A., 2009. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma* 151, 68–76.
- Wang, X., Grady, Jr. C.P.L., 1994. Comparison of biosorption isotherms for di-*n*-butyl phthalate by live and dead bacteria. *Water Res.* 28, 1247–1251.
- Zhou, X., Oleszkiewicz, J.A., 2010. Biodegradation of oestrogens in nitrifying activated sludge. *Environ. Technol.* 31, 1263–1269.

CAPÍTULO V

Conclusiones / Conclusions

Como resultado de la investigación realizada en la presente Tesis Doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- I. Se han desarrollado y validado varios métodos analíticos para la determinación de los contaminantes seleccionados a niveles de traza en aguas residuales y fangos de desecho. Los métodos propuestos ofrecen mejoras importantes e innovaciones en relación a métodos ya existentes, porque sólo pocos estudios han considerado la determinación de ambos grupos de contaminantes, especialmente en matrices sólidas, y no existen estudios de determinación simultánea en un rango tan amplio de estos compuestos.
- II. Los métodos son aplicables a la realización de investigación exhaustiva sobre la presencia y comportamiento de los contaminantes, así como de los mecanismos más importantes en la eliminación de estas sustancias durante el tratamiento de aguas residuales. También son aplicables a otros compartimientos ambientales, como por ejemplo, los efluentes de aguas residuales de hospitales, las aguas superficiales y subterráneas, los fangos activados y los fangos de desecho tratados.
- III. Se han desarrollado especialmente los procedimientos de tratamiento de la muestra. Las matrices estudiadas se caracterizan por ser complejas, de modo que el análisis de contaminantes orgánicos en general genera numerosos inconvenientes experimentales, por lo que la etapa de preparación de muestra representa un reto real debido a las bajas recuperaciones de los analitos durante la extracción y los fuertes efectos de supresión de la señal. Estos problemas no son habitualmente resueltos de manera efectiva por los pasos tradicionales de limpieza de la muestra. La determinación de los principales parámetros que más

influyen en la extracción selectiva de los analitos, evitando la co-extracción de los componentes de la matriz ha sido básica para lograr un tratamiento de muestra efectivo y extracción cuantitativa. Esta nueva aproximación a este problema analítico ha permitido obtener métodos con buenas características analíticas, elevada exactitud, robustez, selectividad, amplios rangos dinámicos lineales, y tiempos de análisis más cortos y con la consiguiente reducción de costes. Los límites de detección y cuantificación obtenidos superaron a los de otros métodos, pero quizás la mayor contribución fue el evitar procedimientos de limpieza innecesarios sin la pérdida significativa de sensibilidad, a pesar de la existencia de un importante efecto matriz.

- IV. Los métodos propuestos para ambos tipos de microcontaminantes en fangos de desecho contribuyen a llenar un vacío de información existente sobre las ventajas y desventajas de las técnicas de extracción disponibles (USE, MAE y PLE) —los cuales no están restringidos solamente a puntos de vista analíticos—, ya que no existen estudios comparativos rigurosos para la determinación analítica de los compuestos seleccionados. Cada método fue optimizado con el objeto de lograr las mejores características analíticas, y aunque las tres técnicas de extracción evaluadas son adecuadas, proporcionando una determinación exacta y precisa de compuestos, estos estudios también ofrecen varios criterios para la selección de una técnica de extracción, de acuerdo no solamente a factores analíticos sino también a otros aspectos como los costes.
- V. Se ha empleado una planta piloto MBR automatizada, operada con agua residual real, para llevar a cabo estudios comparativos de la eliminación de bisfenol A bajo diferentes condiciones de aireación: usando aire y oxígeno puro como fuente de oxigenación en el biorreactor. La aplicación de oxígeno puro ofrece un incremento en

la eliminación de la materia orgánica en aproximadamente un 15%, la producción de fangos ha sido reducida en alrededor del 20%, 97% para los sólidos suspendidos, resultando en una mejora de tres veces en la eficiencia de transferencia de oxígeno. Para la eliminación de bisfenol A, la inyección de oxígeno puro mejoró significativamente su velocidad de biodegradación en las aguas, que resultó ser la principal vía de eliminación. El uso de esta tecnología demostró ser más efectiva y una garantía para una eliminación permanente de bisfenol A del medio ambiente, porque se observó que la aplicación de oxígeno puro estimuló la desorción de bisfenol A del fango, el cual fue posteriormente biodegradado. Aunque se requieren más estudios para explicar completamente los mecanismos involucrados en estos fenómenos, se presume que una de las consecuencias más importantes del uso de oxígeno puro es la estimulación de la actividad de los microorganismos, lo cual ha sido controlado en todo momento mediante la medida de las actividades enzimáticas. En algunos casos, se observó un incremento en la actividad enzimática de casi un 100%, y algunas de estas enzimas fueron consideradas como indicadoras del metabolismo bacteriano. Esta alternativa también evita el uso de tratamientos terciarios que introducen agentes oxidantes o sustancias que pueden generar contaminación secundaria.

- VI. Se ha evaluado, a escala de laboratorio, el uso de la tecnología MBR como alternativa frente a la convencional para la eliminación de antibióticos de la familia de las quinolonas. Se ha observado que la adsorción a los fangos es la ruta principal de eliminación durante el tratamiento de aguas residuales, seguido de la biodegradación según una cinética de primer orden. La disminución en los MLSS o el incremento en la temperatura reduce la capacidad de adsorción de las quinolonas en el fango. La eficiencia de eliminación por adsorción estuvo siempre

correlacionada con la constante K_d . La velocidad de biodegradación de los compuestos seleccionados aumenta con el incremento en los MLSS y la temperatura. En base a estos resultados, se puede concluir que las mayores eficiencias de eliminación en los sistemas MBR están garantizadas por el trabajo a valores altos de MLSS, posibles solamente en MBRs. Esto puede compensar el impacto negativo causado por variables que no se pueden controlar como las bajas temperaturas. Además, la eliminación de compuestos orgánicos fácilmente biodegradables es esencial para conseguir mayores tasas de biodegradación.

- VII. Bajo las condiciones de los biorreactores a escala de laboratorio, la eliminación de quinolonas también es fuertemente influenciada por las condiciones redox (aeróbicas, nitrificantes y anóxicas). Se han observado un potencial de adsorción reducido y tasas de biodegradación insignificantes bajo condiciones anóxicas. La eficiencia en la eliminación se incrementa por nitrificación, observándose una mayor biodegradación a esas condiciones, así como una menor capacidad de adsorción. Los resultados sugieren que la eficiencia de eliminación de los antibióticos seleccionados también depende de las poblaciones microbianas que viven en el fango. Por lo tanto, MBR ofrece ventajas importantes en la biodegradación de quinolonas, ya que el crecimiento de nitrificantes es estimulado a SRT elevados, típicos de los MBRs.
- VIII. Estos estudios en MBR a escala piloto y de laboratorio sientan las bases para el desarrollo de procesos eficientes que mejoren la eliminación de ambas clases importantes de microcontaminantes de las aguas por biodegradación, a través de la selección adecuada de las condiciones y el control de las variables del proceso. Esto constituye un primer paso hacia el objetivo final de eliminar estos antibióticos del medio ambiente. La investigación futura se debe

centrar en establecer las posibilidades de eliminación de los contaminantes adsorbidos en el fango, así como este tipo de estudios deberían ampliarse a otras clases de contaminantes emergentes, especialmente a aquellos que son considerados hasta ahora como sustancias químicas persistentes.

As a result of the research conducted in the present Doctoral Thesis, the following conclusions may be drawn:

- I. Selective and reliable validated analytical methods were developed for the trace determination of the target micropollutants in wastewater and sewage sludge. The methods proposed here represent a significant improvement and an innovation in comparison with the existing ones, because few studies have focused on the determination of both groups of compounds, especially in solid matrices. In addition, there are no studies on the simultaneous determination of such wide range of compounds.
- II. These methods are well suited to comprehensively investigate the occurrence and behavior of the selected contaminants and the mechanisms that best contribute to the removal of these substances in wastewater treatment plants and in other environmental compartments (*e.g.* hospital wastewater effluents, surface and ground waters, activated sludge and treated sewage sludge), where these methods can be implemented with some modifications.
- III. A particular emphasis was placed on sample treatment. The studied matrices are characterized by their complexity and, generally, the analysis of organic compounds raises several problems. For these reasons, the preparation of the samples represents a real challenge due to the low recoveries of the analytes during the extraction process and the strong MS signal suppression effects, which usually are not effectively reduced by typical clean-up steps. The identification of the most influential parameters that affect the selective extraction of the analytes avoiding the co-extraction of matrix components was crucial for

achieving an effective sample treatment and quantitative extraction. This new approach provided methods with good analytical characteristics including high accuracy, robustness, selectivity, wide dynamic linear ranges, as well as shorter analysis times and a reduction in costs. The limits of detection and quantification obtained have exceeded other methods, but perhaps the major improvement was to avoid unnecessary clean-up procedures without significantly significant loss of sensitivity, despite the existence of matrix effects to a high degree.

- IV. The proposed methods for both groups of micropollutants in sewage sludge contribute to *fill* the lack of *information* on the advantages and drawbacks of the available extraction techniques (USE, MAE and PLE), since no in-depth comparative studies have been performed on analytical performance for the determination of the target compounds. Each method was optimized in order to achieve the best analytical characteristics, and although the three evaluated extraction techniques are valid, offering accurate and precise determination of compounds, these studies also showed several criteria that may help to select an extraction technique based not only on analytical factors but also on cost-related factors.
- V. A fully automated MBR pilot plant operated with urban wastewater from was used for the comparative studies on bisphenol A removal under different aeration conditions (using air and pure oxygen for oxygenation in the bioreactor). The application of pure oxygen resulted in an increased removal of organic matter and nitrogen of about 15%, sludge production was reduced in about 20%, 97% for suspended solids, resulting in a threefold improvement in the efficiency in oxygen transference. For BPA removal, pure oxygen injection significantly improved the biodegradation rate, the

primary removal pathway, in waters. The use of MBR technology proved to be more effective and a guarantee of the permanent removal of BPA from the environment, because it was also observed that pure oxygen application stimulated desorption of BPA from sludge, improving subsequent biodegradation. Even though we assume that further research is required to completely explain the mechanisms involved under these working conditions, we presume that one of the most important consequences of the use of pure oxygen is the stimulation of the activity of microorganisms, which was measured using enzymatic activity assays. In some cases, an increase in the enzymatic activity of almost 100% was observed, and some of these enzymes were considered as indicators of bacterial metabolism. This alternative also avoids the use of tertiary treatments that would introduce oxidant agents or substances that may generate secondary pollution.

- VI. The feasibility of the MBR technology for the removal of quinolone derivatives was evaluated in laboratory-scale membrane bioreactors. It was confirmed that sorption to sludge was the main removal pathway during wastewater treatment with subsequent biodegradation, which followed first-order kinetics. Decreasing MLSS concentration or increasing temperature decreased the sorption of the derivatives to the sludge. Removal efficiency by sorption was found to be positively correlated with the corresponding K_d . The biodegradation rates of the target compounds increased with the increase of MLSS and temperature. Based on these results, it can be concluded that the highest removal efficiencies in aerobic MBR sludge-treatment systems are guaranteed by working under high MLSS concentrations, which may compensate the adverse impact caused by uncontrollable variables such as low temperatures. In addition, the removal of

easily biodegradable organic compounds is essential in order to achieve high degradation rates of quinolones.

VII. Under laboratory-scale membrane bioreactors conditions, quinolone removal was also strongly influenced by the redox conditions (aerobic, nitrifying and anoxic). A reduced sorption potential and negligible biodegradation rates under anoxic conditions were observed. The removal efficiency can be enhanced by nitrification because this resulted in higher biodegradation rates and a diminished sorption capacity. The results suggest that the removal efficiency of the target antibiotics also depends on the microbial populations that are present in sludge. Therefore, MBR offers important advantages on quinolone biodegradation, because the growth of nitrifying bacteria is stimulated by high SRT, characteristic of MBRs.

VIII. The MBR pilot plant and laboratory studies lay the foundations for the development of efficient processes that will improve the removal by biodegradation of both groups of micropollutants from water, through the correct selection of conditions and control of process variables. This provides the basis for the ultimate goal of removing these chemicals from the environment. Further research should address the possibilities of removing sorbed contaminants from sludge. In addition, this type of extended to other types of emergent contaminants, especially those considered as persistent chemicals.

ANEXO

Publicaciones



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Microchemical Journal

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

Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez*, S. Cantarero, A. Navalón, J.L. Vílchez

Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2012

Received in revised form 13 August 2012

Accepted 4 September 2012

Available online xxx

Keywords:

Antibiotics

Quinolones

UPLC–MS/MS

Wastewaters

Solid-phase extraction

Matrix effect

ABSTRACT

A simple, rapid, sensitive, accurate and reliable multiresidue method based on ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) is developed and validated for the simultaneous determination of 13 quinolone derivatives in urban wastewaters. The main parameters influencing the preliminary sample treatment and selective solid-phase extraction procedure have been analyzed in order to optimize a suitable procedure for extraction of amphoteric and acidic quinolones in one single step. Matrix components of wastewater samples were significantly reduced and even eliminated. The mass spectrometric conditions in positive electrospray ionization (ESI) mode were individually optimized for each analyte to obtain maximum sensitivity in the Selected Reaction Monitoring (SRM) mode. Selection of two specific fragmentation reactions for each compound allowed simultaneous quantification and identification in one run, ensuring a high specificity of the method. The analytes were separated in less than 10 min. Marbofloxacin and cincophen were used as surrogates for amphoteric and acid quinolones, respectively. The limits of detection ranged from 0.02 to 0.04 ng mL⁻¹ and limits of quantification from 0.07 to 0.15 ng mL⁻¹, while inter- and intra-day variabilities were <4%. Due to the absence of certified materials, the method was validated using matrix-matched calibration and a recovery assay with spiked samples. Recovery rates ranged from 98.5% to 103.9%. The method was satisfactorily applied for the determination of these antibiotics in wastewater samples collected from different wastewater treatment plants from the province of Granada (Spain). In addition, the method will be applied in further studies of the occurrence and fate of these commonly used antibiotics in sewage treatment plants and in aquatic environments.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, research in the field of the environmental pollution has expanded beyond classical contaminants—pesticides, biocides, PHA, PCBs or dioxins—to personal care products and pharmaceuticals [1]. Since pharmaceuticals are used to be biologically active and stimulate a physiological response even at low concentrations, there is a growing concern regarding the use of these substances, which are starting to be considered as “emerging contaminants” when they are released to the environment [2]. More than 5000 drugs are used and antibiotics and their degradation metabolites are among the most commonly used compounds. Resistance to antibiotics and other anti-infective agents constitutes a major threat to public health and ought to be recognized as such more widely than it is at present. Some studies have detected many antibiotic-resistant bacteria in drinking water supplies. Moreover, wildlife could be severely affected by the

presence of antibiotics in the environment, even at trace concentrations. Therefore, the EU recommends the prudent use of antimicrobial agents in medicine [3,4]. One of the most important groups of antibiotics is quinolones and fluoroquinolones. They are widely used worldwide in both human and veterinary medicine at therapeutic levels, and at sub-therapeutic levels to promote animal growth. They are used in the treatment of a wide variety of bacterial infections and they are being increasingly used as antibiotics with broad-spectrum activity, including activity against gram-negative organisms as well as some gram-positive bacteria [5]. Ciprofloxacin is perhaps the most popular, and one of the most frequently prescribed medications in the world [6]. This antibiotic is especially interesting because it is used therapeutically in many critical applications such as the treatment of anthrax infections, and it is a primary degradation product of enrofloxacin, which is used in aquaculture and agriculture [7].

After their therapeutic administration, these compounds are only partially metabolized and are excreted unchanged in the urine and feces [8,9]. They are then released into influents to municipal wastewater treatment plants (WWTPs) as parent compounds or bioactive metabolites [10,11]. Wastewaters become one of the main routes for the introduction of compounds into the environment [12]. Unfortunately,

* Corresponding author. Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

- [38] D.A. Volmer, B. Mansoori, S.J. Locke, Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4143–4155.
- [39] J. Hu, W. Wang, Z. Zhu, H. Chang, F. Pan, B. Lin, Quantitative structure–activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 4806–4812.
- [40] B. Li, T. Zhang, Z. Xu, H.H. Ping Fang, Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 645 (2009) 64–72.
- [41] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 132–145.
- [42] E.M. Golet, A.C. Alder, W. Giger, Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3645–3651.
- [43] A. Cappiello, G. Famigliani, P. Palma, E. Pierini, V. Termopoli, H. Trufelli, Overcoming matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9343–9348.
- [44] A.P. Bruins, Mechanistic aspects of electrospray ionization, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345–357.
- [45] H.C. Holten Lutzhoft, W.H.J. Vaes, A.P. Freidig, B. Halling-Sorensen, J.L.M. Hermens, Influence of pH and other modifying factors on the distribution behavior of 4-quinolones to solid phases and humic acids studied by “Negligible-Depletion” SPME-HPLC, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 4989–4994.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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

Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques

N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez*, A. Navalón, J.L. Vílchez

Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2012

Received in revised form 22 June 2012

Accepted 25 June 2012

Available online 2 July 2012

Keywords:

Bisphenol A

LC–MS/MS

Sewage sludge

Ultrasound-assisted extraction

Microwave-assisted extraction

Pressurized liquid extraction

ABSTRACT

This paper presents a comparison of three extraction techniques—ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction and pressurized liquid extraction—in order to evaluate their efficiency in the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Extraction parameters for each technique were accurately optimized to achieve the highest recoveries. The selected compounds were detected and quantified using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), operating in negative atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The analytes were separated in less than 6 min. BPA- d_{16} was used as internal standard. Three selective, sensitive, robust and accurate analytical methods were developed. The limits of detection (LODs) of the methods ranged from 2 to 9 ng g⁻¹ and the limits of quantification (LOQs) from 8 to 26 ng g⁻¹, while inter- and intra-day variability was under 6% in all cases. Given the absence of certified reference materials (CRMs), the methods were validated separately by using matrix-matched calibration and recovery assays with spiked samples. Recovery rates ranged from 97.7% to 103.1%. The sewage sludge samples used for experiments were collected from two different wastewater treatments plants (WWTPs) located in the province of Granada (South-East Spain). The statistical comparison of the methods demonstrated no statistically significant differences between the extraction techniques for the determination of BPA and chlorinated derivatives in sludge samples.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are a group of natural and synthetic chemicals that may interfere with the normal function of the endocrine system in animals and humans [1]. EDCs can either mimic or inhibit the action of natural hormones, leading to adverse reproductive and developmental effects. In men, exposure to EDCs is associated with problems in reproductive capacity and testicular or prostate cancer [2]. In women, abnormal endocrine function may be associated with increased risk for endometriosis, reproductive and endocrine-related cancers, or impaired oocyte competence, ovarian function or menstrual cycling [3]. Effects of early life exposure to EDCs remain unclear, but it has been suggested that fetal or childhood exposure may lead to abnormal sex differentiation, abnormal neurological and reproductive development, and to risk of reproductive problems or cancer later in life [4].

A wide variety of chemicals have been shown to have estrogenic activity [5]; however, most EDCs are synthetic compounds, some of which are designed to act as estrogens (e.g., oral

contraceptives). Many are designed for other purposes and accidentally have estrogenic activity (plasticizers and surfactants), or are components of pharmaceuticals and personal care products (parabens or UV-filters) [6].

BPA is probably the most widely used synthetic chemical in the world. It is a monomer used in the manufacturing of polycarbonate plastic and polystyrene resins as well as in dental sealants. BPA is also used as an additive in other types of plastic (PVC and PET), used in mineral water bottles [7]. It is one of the most highly produced chemicals in the world, with an annual production of more than 3 million tonnes [8]. Depolymerization of these products results in BPA and its derivatives, which may leach into canned foods, infant formula from plastic baby bottles, and can be found in the saliva of patients treated with dental sealants and in fresh food at microgram to milligram per kilogram level. Evidence exists suggesting that food intake is the primary source of human exposure to BPA [9]. Concentrations of BPA in the range of 0.1–10 ng mL⁻¹ have been detected in human fluids, fat, placenta and fetal tissues [10]. Studies conducted over the past 20 years show that BPA is not only a ubiquitous pollutant in the human body but also a powerful developmental toxin at very low doses. Many studies have documented the adverse effects of BPA on human health including structural and neurochemical changes in the brain, associated with behavioral changes, fertility problems,

* Corresponding author. Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

- [26] M. Barriada-Pereira, M.J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández, *Talanta* 71 (2007) 1345.
- [27] M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4560.
- [28] Y. Yu, Q. Huang, J. Cui, K. Zhang, C. Tang, X. Peng, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 891.
- [29] S. Chu, G.D. Haffner, R.J. Letcher, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 25.
- [30] J.L. Vilchez, M. del Olmo, A. González-Casado, A. Navalón, Spanish Patent 2,190,852 (2005).
- [31] T.C. McIlvaine, *J. Biol. Chem.* 49 (1921) 183.
- [32] A. Zafra-Gómez, O. Ballesteros, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Microchem. J.* 88 (2008) 87.
- [33] T.C.R. Santos, J.C. Rocha, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 3.
- [34] J. Zhao, Y. Li, C. Zhang, Q. Zeng, Q. Zhou, *J. Hazard. Mater.* 155 (2008) 305.
- [35] M. Clara, B. Strenn, E. Saracevic, N. Kreuzinger, *Chemosphere* 56 (2004) 843.
- [36] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 224.
- [37] R.L. Plackett, J.P. Burman, *Biometrika* 33 (1946) 305.
- [38] S.L.C. Ferreira, W.N.L. dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta* 63 (2004) 1061.
- [39] J.L. Luque-García, M.D. Luque De Castro, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 41.
- [40] A. Zafra, M. Del Olmo, B. Suárez, E. Hontoria, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Water Res.* 37 (2003) 735.
- [41] A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta* 80 (2009) 363.
- [42] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed., Pearson Education Limited, Essex, 2005.



Improved sample treatment for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry

N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez*, A. Navalón, J.L. Vilchez

Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 May 2012

Received in revised form

23 August 2012

Accepted 27 August 2012

Available online 6 September 2012

Keywords:

Endocrine disrupting chemicals

Bisphenol A

LC–MS/MS

Sewage sludge

Pressurized liquid extraction

Matrix effect

ABSTRACT

A selective, sensitive, robust and accurate method for the determination of bisphenol A (BPA) and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) is presented. Prior to instrumental analysis, an extraction procedure using pressurized liquid extraction (PLE) was carried out in order to obtain the highest recoveries and improve sensitivity. After LC separation, the MS conditions, in negative atmospheric pressurized chemical ionization (APCI) mode, were individually optimized for each analyte to obtain maximum sensitivity in the selected reaction monitoring (SRM) mode. The use of two reactions for each compound allowed simultaneous quantification and identification in one run. The analytes were separated in less than 6 min. BPA- d_{16} was used as internal standard. The limits of detection of the method ranged from 4 to 8 ng g⁻¹ and the limits of quantification from 14 to 26 ng g⁻¹, while inter- and intra-day variability was under 6% in all cases. Due to the absence of certified materials, the method was validated using matrix-matched calibration and a recovery assay with spiked samples. Recovery rates ranged from 97.7% to 100.6%. The method was satisfactorily applied for the determination BPA and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples collected from wastewater treatment plants (WWTPs) located in the province of Granada (Spain). The sludge samples came from a conventional activated sludge (AS) plant and from a membrane bioreactor (MBR) pilot plant.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The impact on human health and environment of endocrine disrupting chemicals (EDCs), even at ng L⁻¹ levels, is increasingly becoming an important focus for scientific research [1]. EDCs encompass a wide variety of synthetic and natural chemicals that have the ability to mimic hormones and might, therefore, interfere or disrupt normal hormonal functions [2]. Exposure to EDCs has become a highly controversial public health issue. Although sexual differentiation has been the major endpoint for the toxicological assessment of EDCs, concern with these substances also stems from their potential to affect reproductive, metabolic, immune and development functions, growth, behaviour and memory [3]. Effects of EDCs are associated with reduced fertility, congenital malformations of the reproductive tract, and increased incidence of cancer in estrogen-responsive tissues [4]. Recent studies are focused on anthropogenic EDCs, such as synthetic hormones used as contraceptives, a variety of pharmaceuticals

and personal care products, as well as large amounts of industrial chemicals, with bisphenol A (BPA), PCBs, dioxins, pesticides, phthalates, alkylphenols and alkylphenol ethoxylates being of special importance [5].

In recent years, most attention has focused on exposure to BPA, a widely used industrial plasticizer with known estrogenic properties. Over 2.000 million tons/year of BPA are used in the manufacture of epoxy resins and polycarbonate plastics, which are, in turn, used in a wide variety of domestic products [6]. BPA is present in dental fillings, plastic food and water containers, baby bottles, food wrap, as well as in the lining of beverage and food cans, presenting a large number of routes for human exposure. Numerous studies have confirmed leaching of BPA from food containers, and detectable levels of BPA have been found in a wide range of packaged foods [7] being oral exposure the primary source of human exposure to BPA [8]. BPA also accounts for most estrogenic activity that leaches from landfills into the surrounding ecosystem; effluent from industrial activity, including treatment of leachate, may serve as an additional route of human exposure, particularly if it finds its way into aquatic species [9]. Wastewater containing BPA is also a source of contamination of aquatic environments from where BPA could reach ground

* Corresponding author. Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

- [32] T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *Talanta* 85 (2011) 1825–1834.
- [33] M. Fountoulakis, P. Drillia, C. Pakou, A. Kampioti, K. Stamatelatu, G. Lyberatos, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 45–51.
- [34] S. Chu, G.D. Haffner, R.J. Letcher, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 25–32.
- [35] M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4560–4567.
- [36] Y. Yu, Q. Huang, J. Cui, K. Zhang, C. Tang, X. Peng, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 891.
- [37] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2513–2522.
- [38] J.L. Vilchez, M. del Olmo, A. González-Casado, A. Navalón, Spanish Patent ES 2 190 852 A1 (2005).
- [39] T.C. McIlvaine, *J. Biol. Chem.* 49 (1921) 183–186.
- [40] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galcerán, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 4039–4048.
- [41] A. Zafra-Gómez, O. Ballesteros, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Microchem. J.* 88 (2008) 87–94.
- [42] T.C.R. Santos, J.C. Rocha, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 3–12.
- [43] C.A. Staples, P.B. Dom, G.M. Klecka, S.T. O'Block, L.R. Harris, *Chemosphere* 36 (1998) 2149–2173.
- [44] S. Stangroom, C. Collins, J. Lester, *Environ. Technol.* 21 (2000) 865–882.
- [45] E. Lindblom, K. Press-Kristensen, P.A. Vanrolleghem, P.S. Mikkelsen, M. Henze, *Water Res.* 43 (2009) 3169–3176.
- [46] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5619–5625.
- [47] B.J. Vanderford, R.A. Pearson, D.J. Rexing, S.A. Snyder, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6265–6274.
- [48] X. Zhao, C.D. Metcalfe, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2010–2017.

Manuscript Number: TAL-D-12-02729

Title: Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Comparison of the efficiency of three extraction techniques

Article Type: Full Length Article

Keywords: Antibiotics; Quinolones; LC-MS/MS; Sewage sludge analysis; Extraction techniques; Matrix effect

Corresponding Author: Dr Alberto Zafra-Gomez, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Granada / Faculty of Sciences

First Author: Noemi Dorival-García, Ph.D. Student

Order of Authors: Noemi Dorival-García, Ph.D. Student; Alberto Zafra-Gomez, PhD; Francisco Javier Camino-Sánchez, Ph.D.; Alberto Navalon, Ph.D.; Jose Luís Vílchez, Ph.D.

Abstract: This work presents a comparison of three extraction techniques—ultrasound-assisted extraction (USE), microwave-assisted extraction (MAE) and pressurised liquid extraction (PLE)—and evaluates their efficiency in the determination of quinolone antibiotics in sewage sludge samples. Extraction parameters for each technique were optimized using design of experiments, and the compounds were detected and quantified using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), operating in positive electrospray ionization (ESI) mode. The use of two selected reaction monitoring transitions for each compound allowed simultaneous quantification and identification in one run. Analytes were separated in less than 10 min. Marbofloxacin and cincophen were used as surrogates for amphoteric and acid quinolones, respectively. The limits of detection (LODs) were between 2 and 5 ng g⁻¹, and the limits of quantification (LOQs) were between 4 to 18 ng g⁻¹ for the various analytes. The inter- and intra-day variability was < 7%. Due to the absence of certified reference materials (CRMs), the method was validated using matrix-matched calibration and a recovery assay with spiked samples. Recovery rates were between 97.9% and 104.8%. Statistical comparison demonstrated no significant differences between the three extraction techniques. The methods were successfully applied for the determination of quinolones in sewage sludge samples collected from different wastewater treatments plants (WWTPs) located in the province of Granada (Spain). The analytical methods developed here may be useful for the development of more in-depth studies on the occurrence and fate of these commonly used pharmaceuticals in WWTPs and in the environment.

1 **Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge**
2 **samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry:**
3 **Comparison of the efficiency of three extraction techniques**
4

5 N. Dorival–García, A. Zafra–Gómez*, F.J. Camino–Sánchez, A. Navalón, J.L. Vílchez

6
7 *Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry,*
8 *Campus of Fuentenueva, University of Granada, E–18071 Granada, Spain*
9

10 **ABSTRACT**

11 This work presents a comparison of three extraction techniques—ultrasound–assisted
12 extraction (USE), microwave–assisted extraction (MAE) and pressurised liquid extraction
13 (PLE)—and evaluates their efficiency in the determination of quinolone antibiotics in sewage
14 sludge samples. Extraction parameters for each technique were optimized using design of
15 experiments, and the compounds were detected and quantified using liquid chromatography–
16 tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), operating in positive electrospray ionization (ESI)
17 mode. The use of two selected reaction monitoring transitions for each compound allowed
18 simultaneous quantification and identification in one run. Analytes were separated in less than
19 10 min. Marbofloxacin and cincophen were used as surrogates for amphoteric and acid
20 quinolones, respectively. The limits of detection (LODs) were between 2 and 5 ng g⁻¹, and the
21 limits of quantification (LOQs) were between 4 to 18 ng g⁻¹ for the various analytes. The
22 inter– and intra–day variability was < 7%. Due to the absence of certified reference materials
23 (CRMs), the method was validated using matrix–matched calibration and a recovery assay
24 with spiked samples. Recovery rates were between 97.9% and 104.8%. Statistical comparison
25 demonstrated no significant differences between the three extraction techniques. The methods
26 were successfully applied for the determination of quinolones in sewage sludge samples
27 collected from different wastewater treatments plants (WWTPs) located in the province of
28 Granada (Spain). The analytical methods developed here may be useful for the development
29 of more in–depth studies on the occurrence and fate of these commonly used pharmaceuticals
30 in WWTPs and in the environment.

31
32 *Keywords:* Antibiotics; Quinolones; LC–MS/MS; Sewage sludge analysis; Extraction
33 techniques; Matrix effect.
34

35
36 * Corresponding author: Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
37 *E–mail address:* azafra@ugr.es (A. Zafra–Gómez).
38

International Journal of Environmental Science and Technology

Effect of the injection of pure oxygen into a membrane bioreactor on the elimination of bisphenol A

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JEST-D-12-00556R1
Full Title:	Effect of the injection of pure oxygen into a membrane bioreactor on the elimination of bisphenol A
Short Title:	Removal of contaminants in wastewaters
Article Type:	Original Paper
Keywords:	Bisphenol A, Liquid chromatography tandem mass spectrometry, Membrane bioreactor, Sewage sludge, Wastewater
Corresponding Author:	Alberto Zafra-Gómez, Ph.D. University of Granada, Spain Granada, SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Granada, Spain
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Noemí Dorival-García, Student
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Noemí Dorival-García, Student Alberto Zafra-Gómez, Ph.D. Bartolomé Oliver-Rodríguez, Student Alberto Navalón-Montón, Ph.D. Jesús González-López, Ph.D. José Luís Vílchez-Quero, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The effect of the injection of pure oxygen instead of air in a membrane bioreactor for the elimination of bisphenol A is investigated. A dynamic experiment was developed in a pilot plant where the aerobic reactor was continuously spiked with 1 mg L ⁻¹ of bisphenol A. Air was injected during 10 days and then pure oxygen was injected for another 10 days. The bisphenol A concentration was determined in aqueous phases and activated sludge using simple and sensitive analytical methods based on different extraction procedures and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. Enzymatic activity was also determined and toxicity tests were performed to discard that the spiked bisphenol A concentration could negatively affect the microorganisms in the bioreactor and, thus, the membrane bioreactor performance. The effluent bisphenol A concentration increased up to 0.26 mg L ⁻¹ after 4 days in the air injection treatment, and up to 0.48 mg L ⁻¹ after only 12 hours in the oxygen injection treatment. In both cases, this was followed by a decrease in concentration despite the continuous spiking of bisphenol A into the bioreactor. In presence of pure oxygen, bisphenol A concentration reached background levels (below the limit of quantification) after 5 days. In contrast, when using air a total of 10 days were required to reach background levels. The injection of pure oxygen instead of air is an important innovation in wastewater treatment, allowing permanent elimination of organic contaminants, avoiding their return to the environment and ensuring the safety of water.
Response to Reviewers:	Reviewer 1. It is indicated in the introduction that wastewater containing BPA is a contamination source of the aquatic environment. Please provide detail data on the detected BPA level in the surface water and WWTP effluents

Effect of the injection of pure oxygen into a membrane bioreactor on the elimination of bisphenol A

Running title: Removal of contaminants in wastewaters

Abstract The effect of the injection of pure oxygen instead of air in a membrane bioreactor for the elimination of bisphenol A is investigated. A dynamic experiment was developed in a pilot plant where the aerobic reactor was continuously spiked with 1 mg L^{-1} of bisphenol A. Air was injected during 10 days and then pure oxygen was injected for another 10 days. The bisphenol A concentration was determined in aqueous phases and activated sludge using simple and sensitive analytical methods based on different extraction procedures and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. Enzymatic activity was also determined and toxicity tests were performed to discard that the spiked bisphenol A concentration could negatively affect the microorganisms in the bioreactor and, thus, the membrane bioreactor performance. The effluent bisphenol A concentration increased up to 0.26 mg L^{-1} after 4 days in the air injection treatment, and up to 0.48 mg L^{-1} after only 12 hours in the oxygen injection treatment. In both cases, this was followed by a decrease in concentration despite the continuous spiking of bisphenol A into the bioreactor. In presence of pure oxygen, bisphenol A concentration reached background levels (below the limit of quantification) after 5 days. In contrast, when using air a total of 10 days were required to reach background levels. The injection of pure oxygen instead of air is an important innovation in wastewater treatment, allowing permanent elimination of organic contaminants, avoiding their return to the environment and ensuring the safety of water.

Keywords Bisphenol A, Liquid chromatography tandem mass spectrometry, Membrane bioreactor, Sewage sludge, Wastewater.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Science of the Total Environment

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

Removal of quinolone antibiotics from wastewaters by sorption and biological degradation in laboratory-scale membrane bioreactors

N. Dorival-García^a, A. Zafra-Gómez^{a,*}, A. Navalón^a, J. González^b, J.L. Vílchez^a

^a Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

^b Research Group of Microbiology and Environmental Technologies, Water Research Institute, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

HIGHLIGHTS

- Sorption and biotransformation as main removal pathways under MBR conditions
- MLSS, T and initial COD are deciding factors in the removal of target antibiotics.
- Sorption potential depends on the type of quinolone – piperazinylic or acid.
- MLSS and T clearly influence the biodegradation kinetics of target antibiotics.
- Operation at high biomass concentrations improves removal of target antibiotics.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2012

Received in revised form 26 September 2012

Accepted 4 October 2012

Available online xxxx

Keywords:

Quinolone antibiotics

Membrane bioreactor technology

Wastewater

Sewage sludge

Biodegradation

Sorption

ABSTRACT

Laboratory-scale batch experiments were developed to investigate the main removal routes for 6 commonly found quinolones (ciprofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin, piperimidic acid, and piromidic acid), in wastewaters from a wastewater treatment plant, at $\mu\text{g L}^{-1}$ levels in an aerobic sludge system from a membrane bioreactor (MBR) pilot plant. It was demonstrated that biotransformation and sorption were the main removal routes for the target antibiotics over other possible pathways, as volatilization or hydrolysis, under the experimental conditions. Mass balances indicated that sorption on sludge played a dominant role in the elimination of antibiotics from waters. The sorption coefficient K_d depended strongly on temperature and on the quinolone type and were higher at lower temperatures and for piperazinylic quinolones. K_d values were between 516 and 3746 L kg^{-1} in the temperature range of 9–38 °C. Higher mixed liquor suspended solids (MLSS) increased quinolone removal efficiency mainly by sorption. Quinolone biodegradation constituted a secondary pathway, and could be described by first-order kinetics with degradation-rate constants ranging from $8.0 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ to $1.4 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ within the same temperature range and MLSS from 7000 to 15,000 mg L^{-1} . Biodegradation depended on the MLSS and temperature, but also on the initial chemical oxygen demand (COD). Higher biodegradation rates were observed at higher MLSS and temperature, as well as at low initial COD. Ciprofloxacin and moxifloxacin registered the highest biodegradation percentages (52.8% and 47.2%, respectively, at 38 °C and 15,000 mg L^{-1} MLSS), which is evidence that, despite the known persistence of this group of antibiotics and removal from waters mainly by sorption, it was possible to improve their removal by biodegradation, with an appropriate selection of conditions and control of process variables, as a preliminary step towards the elimination of these antibiotics from the environment. Further research is needed on the possibilities of removing sorbed antibiotics from sludge.

© 2012 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The increasing public concern about the hazards associated with pharmacologically active compounds (PhACs) in the environment has triggered activities by scientific, industrial, and regulatory bodies to assess the exposure and effects of these chemicals in different environmental compartments (Golet et al., 2002a; Fatta-Kasinos et al.,

2011). Thousands of tons of PhACs are used to treat human and animal diseases. Depending on the nature of the compound, up to 95% of the administered dose is excreted unchanged or as metabolites. Since elimination by conventional wastewater treatment plants (WWTPs) is often incomplete, substantial quantities of these compounds are released into the environment (Gracia-Lor et al., 2012). More than 100 PhACs have already been detected in municipal sewage and surface waters (Ternes et al., 2004a; Verlicchi et al., 2012). Despite that these compounds are detected in low concentrations (ng L^{-1} – $\mu\text{g L}^{-1}$), their adverse effects cannot be dismissed, given that pharmaceuticals cause biological effects at very low doses (Kümmerer, 2009).

* Corresponding author. Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.
E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

- Jia A, Wan Y, Xiao Y, Hu J. Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. *Water Res* 2012;46:387–94.
- Kim S, Aga DS. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J Toxicol Environ Health B* 2007;10:559–73.
- Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment — a review — part I. *Chemosphere* 2009;75:417–34.
- Kümmerer K, Al-Ahmad A, Mersch-Sundermann V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 2000;40:701–10.
- Larsson DGJ, de Pedro C, Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Mater* 2007;148:751–5.
- Le-Clech P. Membrane bioreactors and their uses in wastewater treatments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;88:1253–60.
- Le-Minh N, Khana SJ, Drewes JE, Stuetz RM. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Res* 2010;44:4295–323.
- Li A, Zhang T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environ Sci Technol* 2010;44:3468–73.
- Li F, Yuasa A, Obara A, Mathews AP. Aerobic batch degradation of 17- β -estradiol (E2) by activated sludge: effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures. *Water Res* 2005;39:2065–75.
- Li B, Zhang T, Xu Z, Ping Fang HH. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2009;645:64–72.
- Lindberg RH, Olofsson U, Rendahl P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BAV. Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environ Sci Technol* 2006;40:1042–8.
- Lindberg RH, Björklund K, Rendahl P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BAV. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. *Water Res* 2007;41:613–9.
- Martínez Bueno MJ, Gómez MJ, Herrera S, Hernando MD, Agüera A, Fernández-Alba AR. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. *Environ Pollut* 2012;164:267–73.
- McIlvaine TC. A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* 1921;49:183–6.
- Miège C, Choubert JM, Ribeiro L, Eusébe M, Coquery M. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants — conception of a database and first results. *Environ Pollut* 2009;157:1721–6.
- Monteiro SC, Boxall ABA. Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 2010;202:53–154.
- Nieto A, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environ Toxicol Chem* 2010;29:1484–9.
- Petrovic M, López de Alda MJ, Díaz-Cruz S, Postigo C, Radjenovic J, Gros M, et al. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. *Philos Trans R Soc A* 2009;367:3979–4003.
- Picó Y, Andreu V. Fluoroquinolones in soil — risks and challenges. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:1287–99.
- Renew JE, Huang CH. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004;1042:113–21.
- Reyes-Lara S, Reyes-Mazzoco R. Efecto de las cargas hidráulica y orgánica sobre la remoción másica de un empaque estructurado en un filtro percolador. *Rev Mex Ing Quim* 2009;8:101–9.
- Rosal R, Rodríguez A, Perdigón-Melón JA, Petre A, García-Calvo E, Gómez MJ, et al. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res* 2010;44:578–88.
- Schröder HFr, Tambosi JL, Sena RF, Moreira RFP, José HJ, Pinnekamp J. The removal and degradation of pharmaceutical compounds during membrane bioreactor treatment. *Water Sci Technol* 2012;65:833–9.
- Segura PA, François M, Gagnon C, Sauvè S. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environ Health Perspect* 2009;117:675–84.
- Senta I, Matošić M, Jakopović HK, Terzić S, Čurko J, Mijatović I, et al. Removal of antimicrobials using advanced wastewater treatment. *J Hazard Mater* 2011;192:319–28.
- Tello A, Austin B, Telfer TC. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environ Health Perspect* 2012;120:1100–6.
- Ternes TA, Joss A. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances. The challenge of micropollutants in urban water management. London: IWA Publishing; 2006. p. 243–77. (406–39).
- Ternes TA, Joss A, Siegrist H. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 2004a;38:392A–9A.
- Ternes TA, Herrmann N, Boner M, Knacker T, Siegrist H, Joss A. A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res* 2004b;38:4075–84.
- Tolls J. Critical review sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ Sci Technol* 2001;35:3397–406.
- Urase T, Kikuta T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Res* 2005;39:1289–300.
- Vasudevan D, Bruland GL, Torrance BS, Upchurch VG, Mackay AA. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma* 2009;151:68–76.
- Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment — a review. *Sci Total Environ* 2012;429:123–55.
- Wang X, Grady CPL. Comparison of biosorption isotherms for di-n-butyl phthalate by live and dead bacteria. *Water Res* 1994;28:1247–51.
- Weiss S, Reemtsma T. Membrane bioreactors for municipal wastewater treatment — a viable option to reduce the amount of polar pollutants discharged into surface waters? *Water Res* 2008;42:3837–47.
- Xu W, Zhang G, Li X, Zou S, Li P, Hu Z, et al. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Res* 2007;41:4526–34.
- Zhang Q, Zhao L, Dong Y-H, Huang G-Y. Sorption of norfloxacin onto humic acid extracted from weathered coal. *J Environ Manage* 2012;102:165–72.
- Zhao J, Li Y, Zhang C, Zeng Q, Zhou Q. Sorption and degradation of bisphenol A by aerobic activated sludge. *J Hazard Mater* 2008;155:305–11.
- Zhu D, Pignatello JJ. A concentration-dependent multi-term linear free energy relationship for sorption of organic compounds to soils based on the hexadecane dilute-solution reference state. *Environ Sci Technol* 2005;39:8817–28.
- Zorita S, Mårtensson L, Mathiasson L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Sci Total Environ* 2009;407:2760–70.

Manuscript Number: JEMA-D-12-02043

Title: Removal and degradation characteristics of quinolone antibiotics in laboratory-scale membrane bioreactors under aerobic, nitrifying and anoxic conditions

Article Type: Research Paper

Keywords: Quinolone antibiotics; Redox conditions; Aerobic/anoxic reactors; Nitrifying activated sludge; Biodegradation; Sorption

Corresponding Author: Dr. Alberto Zafra-Gómez, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of Granada, Spain

First Author: Noemí Dorival-García, Ph.D. Student

Order of Authors: Noemí Dorival-García, Ph.D. Student; Alberto Zafra-Gómez, Ph.D.; Alberto Navalón, Ph.D.; Jesús González, Ph.D.; Jose Luis Vilchez, Ph.D.

Removal and degradation characteristics of quinolone antibiotics in laboratory-scale membrane bioreactors under aerobic, nitrifying and anoxic conditions

N. Dorival-García^a, A. Zafra-Gómez^{a*}, A. Navalón^a, J. González^b, J.L. Vílchez^a

^a *Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain.*

^b *Research Group of Microbiology and Environmental Technologies, Water Research Institute, University of Granada, E-18071 Granada, Spain.*

ABSTRACT

This work describes the removal of 6 quinolone antibiotics from wastewaters under different redox conditions (aerobic, nitrifying and anoxic) through batch experiments in laboratory scale bioreactors using mixed liquor from a membrane bioreactor pilot plant (MBR). The main removal pathways for antibiotics from wastewaters involved in each treatment are described. Mass balances indicated that sorption on sludge played a dominating role in the elimination of antibiotics. Sorption potential depended on the redox conditions, being lower in nitrifying (K_d , 414–876 L kg⁻¹) and anoxic (K_d , 471–930 L kg⁻¹) sludge in comparison with aerobic sludge (K_d , 534–1137 L kg⁻¹). K_d was higher for piperazinylic quinolones. Redox conditions also influenced biodegradation, a secondary pathway, which followed first-order kinetics with degradation rates constants ranging from $1.8 \cdot 10^{-3}$ to $8.2 \cdot 10^{-3}$ h⁻¹. Biodegradation rates under anoxic conditions were negligible. The experimental results have also demonstrated much higher removal efficiency by biodegradation (36.2–60.0%) under nitrifying conditions in comparison with aerobic conditions (14.9–43.8%). The addition of allylthiourea, an ammonia monooxygenase inhibitor, inhibited nitrification completely and reduced significantly the biodegradation of target antibiotics (16.5–29.3%). The residual biodegradation in the presence of allylthiourea may be due to the activity of heterotrophs in the enriched nitrifier culture. The removal of the selected antibiotics under the studied redox conditions depended significantly on the bacteria composition of the sludge. These results suggest that despite the known persistence of this group of antibiotics it is possible to enhance their degradation using nitrifying conditions, which at adequate working conditions as high SRT, typical in MBR, become a promising alternative for improving quinolones removal from environment.

Keywords Quinolone antibiotics; Redox conditions; Aerobic/anoxic reactors; Nitrifying activated sludge; Biodegradation; Sorption.

* Corresponding author: Tel.: +34 958 24 33 26; fax: +34 958 24 33 28.

E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).