

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

"Profesor Fermín Capitán García"



TESIS DOCTORAL

**COMPORTAMIENTO Y EVOLUCIÓN QUÍMICA DE
FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE CUIDADO
PERSONAL EN COMPOST PROCEDENTE DE LODO
EDAR Y EN SUELO AGRÍCOLA ENMENDADO**

Antonio Luque Muñoz

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Antonio Luque Muñoz
ISBN: 978-84-9163-594-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48599>

**COMPORTAMIENTO Y EVOLUCIÓN QUÍMICA DE FÁRMACOS Y
PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL EN COMPOST
PROCEDENTE DE LODO EDAR Y EN SUELO AGRÍCOLA
ENMENDADO**

por

Antonio Luque Muñoz

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

"Profesor Fermín Capitán García"

UNIVERSIDAD DE GRANADA

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

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

VISADA en Granada a 15 de junio
de 2017

Fdo.- Dr. José Luís Vílchez Quero
Catedrático del Departamento de Química
Analítica de la Universidad de Granada

Antonio Luque Muñoz
Licenciado en Química

El doctorando Antonio Luque Muñoz y los directores de la Tesis Alberto Zafra Gómez y José Luís Vílchez Quero,

Garantizamos, al firmar esta Memoria de Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores 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 15 de junio de 2017

Fdo.- Alberto Zafra Gómez
Director de la Tesis

Fdo.- Antonio Luque Muñoz
Doctorando

Fdo.- José Luís Vílchez Quero
Director de la Tesis

ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	1
OBJETIVOS DE LA TESIS	7
INTRODUCCIÓN	11
1. CONTAMINANTES EMERGENTES	13
2. FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL EN EL MEDIO AMBIENTE	15
2.1. Fuentes de contaminación y destino	17
2.2. Riesgo ambiental de los PPCPs.....	20
2.2.1. <i>Persistencia</i>	20
2.2.2. <i>Bioacumulación</i>	21
2.2.3. <i>Toxicidad</i>	22
3. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES. GENERACIÓN DE LODOS	24
3.1. Descripción y funcionamiento de una EDAR	25
3.1.1. <i>Línea de agua</i>	27
3.1.2. <i>Línea de lodos</i>	33
3.2. Gestión de lodos municipales.....	34
4. COMPOSTAJE DE LODOS DE DEPURADORA	36
4.1. Métodos de compostaje	36
4.2. Fases del proceso de compostaje	37
4.1.1. <i>Fase de descomposición</i>	37
4.1.2. <i>Fase de maduración</i>	38
4.3. Factores que afectan al compostaje.....	40
4.4. Ventajas e inconvenientes del compostaje.....	41

5. APLICACIÓN DE COMPOST AL SUELO. ENMENDADO DE SUELOS	43
5.1. Lixiviación de PPCPs.....	44
5.2. Acumulación de los PPCPs en cultivos agrícolas.....	44
5.3. Resistencia de la microbiota del suelo a los antibióticos	45
6. CONTAMINANTES ESTUDIADOS	46
6.1. Fármacos.....	46
6.1.1. <i>Reguladores lipídicos</i>	47
6.1.2. <i>Antiinflamatorios no esteroideos</i>	49
6.1.3. <i>Antihipertensivos</i>	50
6.2. Disruptores endocrinos	51
6.2.1. <i>Parabenos</i>	52
6.2.2. <i>Benzofenonas</i>	54
7. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	56
7.1. Elección de la técnica instrumental.....	56
7.2. Principios básicos de la espectrometría ESI-QqQ	59
8. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS	64
8.1. Fundamento de la técnica	64
8.2. Equipo para extracción por ultrasonidos.....	67
CAPÍTULO I. MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. PATRONES, REACTIVOS Y DISOLVENTES	73
1.1. Patrones	73
1.2. Reactivos.....	74

1.3. Disolventes	75
2. MATERIAL DE LABORATORIO	76
3. INSTRUMENTACIÓN	78
4. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	80
5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS ANALÍTICOS ...	81
5.1. Optimización de los métodos analíticos	81
5.1.1. <i>Diseño de experimentos</i>	82
5.1.2. <i>Optimización de múltiples respuestas</i>	88
5.2. Calibración del método analítico	90
5.2.1. <i>Modelo de calibración</i>	90
5.2.2. <i>Idoneidad del modelo de calibración</i>	91
5.2.3. <i>Rechazo de valores aberrantes o atípicos y puntos influyentes</i>	93
5.3. Evaluación del efecto matriz	93
5.4. Parámetros de validación del método analítico	95
5.4.1. <i>Exactitud</i>	96
5.4.2. <i>Límites de detección y cuantificación</i>	97
5.4.3. <i>Otros parámetros de calidad</i>	98
5.4.4. <i>Incertidumbre estándar y robustez</i>	100
 CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DE PPCPs EN COMPOST Y SUELO AGRÍCOLA	 103
1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO ASISTIDA POR SALES	105
2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM DE LOS PPCPs ESTUDIADOS	108
3. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO	111

3.1. Elección de la fase estacionaria.....	111
3.2. Composición de la fase móvil y optimización del gradiente	112
4. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PPCPs EN COMPOST PROCEDENTE DE LODOS EDAR	116
4.1. Toma y almacenamiento de las muestras.....	116
4.2. Optimización del proceso de extracción	116
4.2.1. Selección del disolvente de extracción	117
4.2.2. Selección de variables para UAE. Diseño Plackett- Burman	119
4.2.3. Optimización de la extracción UAE	121
4.2.4. Limpieza asistida por sales, SALLE	126
4.2.5. Evaluación de la limpieza mediante fase sólida dispersiva, dSPE	128
4.2.6. Volumen y composición de la disolución de reconstitución.....	129
4.2.7. Procedimiento final de extracción.....	131
4.3. Calibración y validación del método analítico	132
4.3.1. Modelo de calibración	132
4.3.2. Validación e incertidumbre del método analítico	133
4.4. Aplicación del método analítico	141
4.5. Comparación de los resultados con los previamente publicados	145
5. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS EN MUESTRAS DE SUELO AGRÍCOLA	148
5.1. Toma y almacenamiento de muestras	148
5.2. Optimización del proceso de extracción	148
5.2.1. Selección del disolvente de extracción	149
5.2.2. Selección de variables para UAE. Diseño Plackett- Burman	150
5.2.3. Optimización de la extracción UAE.....	152

5.2.4. Optimización de múltiples respuestas	154
5.2.5. Limpieza asistida por sales, SALLE	155
5.2.6. Evaluación de la limpieza mediante fase sólida dispersiva, dSPE	156
5.2.7. Volumen y composición de la disolución de reconstitución	157
5.2.8. Procedimiento final de extracción	159
5.3. Calibración y validación del método analítico	160
5.3.1. Modelo de calibración	160
5.3.2. Validación del método analítico	161
5.4. Aplicación del método analítico	166
CAPÍTULO III. ESTUDIO DE CAMPO	169
1. LA VEGA DE GRANADA	171
1.1. Antecedentes	171
1.2. Contaminación del acuífero y la Vega de Granada	173
1.3. Caracterización del suelo y agua empleados	174
2. EXPERIMENTO DE CAMPO	178
2.1. Descripción de las parcelas experimentales	178
2.2. Tratamiento y toma de muestra	179
2.3. Pre-tratamiento de muestra	182
2.4. Análisis	183
2.4.1. Optimización de la separación y detección por UHPLC-QDA	184
2.4.2. Calibración	186
3. RESULTADOS	188
3.1. Desaparición de los compuestos en la parcela 1	189
3.2. Desaparición de los compuestos en la parcela 2	193
3.3. Desaparición de los compuestos en la parcela 3	197

3.4. Desaparición de los compuestos en la parcela 4.....	200
3.5. Análisis de los datos.....	204
CAPÍTULO IV. ESTUDIO DE ADSORCIÓN.....	207
1. ADSORCIÓN.....	209
1.1. Descripción y fundamentos	209
1.2. Factores influyentes en la adsorción líquida.....	210
1.2.1. Características físico-químicas del adsorbato	210
1.2.2. Naturaleza del adsorbente.....	211
1.2.3. Condiciones del medio	212
1.3. Mecanismo general de la adsorción	213
1.4. Modelos cinéticos de adsorción	214
1.4.1. Modelo de pseudo-primer orden	214
1.4.2. Modelo de pseudo-segundo orden.....	215
1.4.3. Modelo de Elovich	215
1.4.4. Modelo de Weber-Morris.....	216
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	217
3. RESULTADOS	219
CONCLUSIONES.....	229
ANEXO. PUBLICACIÓN RELEVANTE.....	237

A mi familia

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han hecho posible, de alguna u otra manera, el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores el Dr. D. Alberto Zafra Gómez y el Dr. D. José Luis Vílchez Quero por sus consejos y recomendaciones, por su interés, preocupación y esfuerzo, así como por haberme acogido en su grupo de trabajo. Con ellos he aprendido, crecido y evolucionado profesionalmente. Gracias Alberto por tus palabras de aliento y ánimo, en especial, en la recta final de la tesis.

A los profesores el Dr. D. Alberto Navalón Montón y el Dr. D. Óscar Ballesteros García, agradecerles que me hayan ofrecido su ayuda siempre que la he necesitado.

A mi compañera de laboratorio, Noemí Dorival, que no solo me ha enseñado mucho sino que también he podido contar con su ayuda profesional en todo momento. Agradecerle de igual modo, que me guiara al comienzo de la tesis y el apoyo ofrecido en el día a día.

Darles las gracias a Bartolomé Oliver y Samuel Cantarero las horas y dedicación prestada en las tareas de campo realizadas en la Huerta de Santa María.

A Ludovica Cea por su ayuda en la realización de algunos experimentos. También de forma muy especial a Carlos Labajo y Fernando Vela, compañeros de laboratorio, de los que también he aprendido mucho. A todos ellos, junto al resto de compañeros, Rocío Rodríguez, Laura Martín, Patricia Cobos, Alejandra García, Julio Benítez y Mariate, muchas gracias por compartir y amenizar tantas horas en el laboratorio.

Agradecerle a mis padres, hermana y pareja su apoyo constante, comprensión y animarme cada día en este periodo de mi vida. Agradecer también la preocupación e interés del resto de mi familia y amigos, en especial a mis tías, Puri y Pepa, por confiar en mí y ayudarme en los momentos más difíciles.

Resumen

La sociedad moderna depende en gran extensión de sustancias químicas empleadas en múltiples actividades de su vida cotidiana. Actualmente, sin embargo, constituyen una gran preocupación por su uso masivo y descontrolado, por lo que han sido denominados como "contaminantes emergentes", para los cuales no hay aún una legislación clara y específica, especialmente en relación a sus concentraciones presentes en el medio ambiente. Dentro de este grupo se incluyen una vasta variedad de productos farmacéuticos, antimicrobianos, así como también a compuestos con actividad como disruptores endocrinos.

Hasta hace poco, estas sustancias no eran tomadas muy en consideración como contaminantes potenciales, ya que se encuentran en el medio ambiente en muy pequeñas concentraciones (ng o $\mu\text{g L}^{-1}$), por lo que son considerados como microcontaminantes; sin embargo, actualmente se tienen evidencias de que aún a estos niveles, pueden causar daños serios e irreversibles en el ser humano y los ecosistemas en general, pudiéndose extender a su progenie, específicamente para el caso de los disruptores endocrinos.

Estos compuestos pueden tener como destino final a las aguas residuales urbanas e industriales, pudiendo ser degradados y eliminados durante el tratamiento en las EDAR. Sin embargo, está demostrado que los procedimientos de depuración no son completamente efectivos. De hecho, muchas de estas sustancias presentan propiedades fisicoquímicas que favorecen y promueven su adsorción a los fangos de desecho, presentándose en concentraciones que van desde ng Kg^{-1} hasta el tanto por ciento. Así, una importante cantidad de estos contaminantes permanece en el medio ambiente, siendo éste su punto de partida para su ingreso en los ecosistemas terrestres, porque los fangos de desecho tratados o bajo la forma de compost, se utilizan como fertilizantes de suelos agrícolas, con objeto de reciclar nutrientes, enriquecer los suelos e incrementar la fertilidad. En la actualidad se piensa, aunque no se cuenta aún con evidencia suficiente, que la presencia de estas sustancias en este tipo de ambientes puede representar un riesgo para la salud humana y de los

ecosistemas, ya que al encontrarse adsorbidos se reduce su biodisponibilidad para los microorganismos del suelo, convirtiéndose en persistentes, presentando además la propiedad de ser bioacumulables y tóxicos, así como de tener la posibilidad de ser transferidos a las cosechas, con lo que ingresarían finalmente a la cadena alimenticia, diseminándose a los seres vivos a todos los niveles.

A menudo, los lodos son sometidos a procesos de compostaje, tratamientos de bajo costo que presentan numerosas ventajas como la desinfección de los fangos, eliminación comprobada de algunos contaminantes conocidos por vía microbiana, así como la disposición de un sustrato rico en materia orgánica y nutrientes para el enmendado de suelos. Aunque desde un punto de vista ambiental se trata de procesos más favorables en comparación a otros como la incineración o los vertederos, se conoce muy poco sobre la capacidad que tiene el compostaje para la eliminación definitiva de contaminantes, además, tampoco se conocen qué parámetros o factores de este proceso favorecen la degradación de estas sustancias. No se conoce el riesgo real al que estamos expuestos frente a la transferencia de estas sustancias a otros compartimientos ambientales, como las aguas subterráneas, su permanencia en el suelo o su paso a la cadena trófica a través de las cosechas.

Considerando que la mejor alternativa ambiental para la eliminación de los lodos de desecho es su reciclado y uso en agricultura, y que hay evidencia de que el compostaje es crucial para la reducción de las concentraciones de contaminantes orgánicos, este tratamiento toma un peso importante dentro del proceso de eliminación de los lodos de depuradora. Sin embargo, existen muchos aspectos que requieren especial atención. En primer lugar, no se conoce con exactitud la cantidad y concentración de contaminantes en los lodos, así como su variabilidad espacial y temporal, ya sea, antes, durante o después del proceso de compostaje. En segundo lugar, se desconocen cuáles son las condiciones de operación óptimas para su eliminación durante el proceso y en los suelos agrícolas una vez enmendados con estos materiales. En tercer lugar, se desconoce la importancia de los mecanismos por los que son eliminados de forma definitiva, o las rutas posibles de reingreso y/o permanencia en el medio ambiente, y mucho menos los factores que promueven y estimulan los procesos

biológicos a nivel del suelo, que son los que al fin y al cabo aseguran la eliminación definitiva de estas sustancias.

Este campo de investigación es de suma importancia, y es por este motivo que se ha emprendido este trabajo de tesis doctoral, ya que el conocimiento de la calidad del compost en relación a los fármacos, productos de cuidado personal y disruptores endocrinos traerá en un futuro cercano una legislación apropiada hasta ahora inexistente, considerando el grado de peligrosidad que constituyen estas sustancias en el medio ambiente.

La investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral se ha iniciado con la puesta a punto, validación y aplicación de métodos analíticos de buenas características para la determinación de estos microcontaminantes emergentes en compost procedente de lodo EDAR y en suelo agrícola. Los contaminantes analitos seleccionados se incluyen dentro del grupo general de los fármacos y productos de cuidado personal (PPCPs). Entre los fármacos, se incluyen representantes de diferentes familias como analgésicos, antiinflamatorios y reguladores lipídicos; y entre los compuestos presentes en los productos de cuidado personal se incluyen los parabenos y las benzofenonas.

Así, se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación de PPCPs en compost procedente de lodo de depuradora y otro para la determinación de fármacos en suelo agrícola procedente de una parcela de la Vega de Granada. En ambos casos la técnica de extracción empleada en la etapa de tratamiento de muestra ha sido la extracción mediante ultrasonidos (UAE), seguida de un proceso de limpieza asistido con sales (NaCl y MgSO₄) en el caso del compost y de una limpieza del extracto con adsorbentes dispersivos (florisil) en el caso del suelo. En esta etapa del proceso analítico se ha recurrido a una estrategia de optimización multivariante (diseño de experimentos) con el objeto de mejorar las características analíticas de los métodos propuestos.

En ambos casos, la técnica analítica empleada para el análisis de los extractos obtenidos a partir de las muestras ha sido la cromatografía de líquidos de ultra

alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS).

Los métodos han sido validados siguiendo guías internacionales de validación con excelentes resultados en términos de exactitud (veracidad y precisión), sensibilidad (límites de detección y cuantificación), robustez, linealidad y selectividad; permitiendo su aplicación a muestras reales. Los métodos analíticos desarrollados ofrecen una importante innovación científica, ya que en la actualidad son muy pocos los métodos publicados sobre el estudio de estos contaminantes en las dos matrices seleccionadas, suelo agrícola y compost procedente de lodos EDAR.

Además, la aplicación de los métodos a matrices reales ha demostrado, sobre todo en el caso del compost procedente de lodos EDAR, un importante riesgo en el uso de estos materiales para el enmendado de suelos de labor, ya que la práctica totalidad de los analitos estudiados aparecieron en los compost comerciales analizados.

Por otro lado, se ha llevado a cabo un estudio de campo en un determinado ambiente natural, donde los contaminantes pueden ser aportados por diferentes vías. Se ha estudiado el comportamiento ambiental de 6 fármacos en suelos agrícolas de la Vega de Granada: DIC, FLU, KET, IRB, BEZ y GEM. Una vez adicionados en superficie se determinó la concentración de los compuestos haciendo un muestreo a diferentes profundidades en el suelo, y a partir de estos valores se demostró que todos los compuestos en las diferentes condiciones, tenían un comportamiento similar ajustando sus cinéticas de desaparición a una ecuación exponencial de primer orden, $C = C_0 \cdot e^{-kt}$. A partir de esta ecuación se pudo determinar el tiempo de vida medio para cada fármaco, así como la constante cinética (k).

Los resultados más relevantes de este estudio desde un punto de vista medioambiental se obtuvieron en las parcelas en presencia y ausencia de compost a las que se les había añadido además una mezcla de tensioactivos. Se encontraron grandes diferencias en el comportamiento de los analitos entre

ambas subparcelas con una mayor desaparición de los compuestos en la parcela no compostada, sobre todo durante los primeros días. Dado que la única diferencia entre ambas parcelas era el enmedado de la primera con compost procedente de lodo EDAR, es evidente que este comportamiento es una consecuencia directa de la adición del compost al suelo. Al aportar una gran cantidad de materia orgánica se favorece la retención, principalmente por adsorción de los analitos por la presencia de compuestos químicos orgánicos, como los ácidos húmicos, que favorecen dicha adsorción. Desde un punto de vista medioambiental, se concluyó que:

- ✓ Al enmendar el suelo, los contaminantes quedan retenidos al mismo provocando que no lixivien hacia las aguas subterráneas y evitando así la contaminación del acuífero y por extensión, evitando la difusión de los contaminantes a través de las aguas subterráneas.
- ✓ Al retenerse en mayor proporción los compuestos en el suelo, aunque con ello se aumente la posibilidad de biodegradación y eliminación definitiva de los contaminantes, por la mayor biodisponibilidad para los microorganismos; también se aumenta de forma exponencial el riesgo de asimilación de los mismos por parte de las plantas y árboles cultivados en estos suelos enmendados. Este hecho aumenta notablemente el riesgo de paso de los fármacos y otros contaminantes químicos a la cadena trófica.

Finalmente, con el objetivo de modelizar el comportamiento en cuanto a la adsorción de los 6 fármacos en el suelo agrícola, se desarrolló un estudio de laboratorio en batch.

De los modelos ensayados, se concluyó que en todos los casos, el modelo de pseudo-primer orden con dos etapas es el que mejor explica la cinética de adsorción; seguido del modelo de Weber-Morris, que se puede aceptar en todos los casos excepto para GEM. Estas dos cinéticas, ponen de manifiesto que la adsorción de estos compuestos en el suelo se rige por fenómenos de difusión, tanto externa como intraparticular.

A partir del modelo de pseudo-primer orden de dos etapas se calculó el tiempo de equilibrio para los fármacos estudiados, siendo éste de aproximadamente de 8 días (200 h). Se calcularon además los porcentajes totales que se retienen bajo las condiciones ensayadas en el tiempo de equilibrio: 32%, 61%, 21%, 39%, 29% y 29% para DIC, FLU, KET, IRB, BEZ y GEM, respectivamente.

*ACRÓNIMOS Y
ABREVIATURAS*

4-OHBP	4-Hidroxibenzofenona
ACN	Acetonitrilo
AcEt	Acetato de etilo
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
ANOVA	Análisis de la varianza
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
ARA-II	Antagonistas de los receptores de la angiotensina II
ASE	Extracción asistida por disolventes acelerados
BEN	Ácido 2-((2-clorobenzoil)amino) benzoico
BEZ	Bezafibrato
BP1	Benzofenona 1
BP3	Benzofenona 3
BP6	Benzofenona 6
BP8	Benzofenona 8
BPB	Butilparabeno
CID	Disociación inducida por colisión
COPs	Contaminantes prioritarios y persistentes
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CREDO	Cluster for Research on Endocrine Disruption
CRMs	Materiales de referencia certificado
C/N	Relación carbono/nitrógeno
C/P	Relación carbono/fósforo
DE	Desviación estándar
DCC	Diseño de compuesto central
DDD	Dosis diaria definida
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DER	Desviación estándar relativa
DIC	Diclofenaco
DHD	Dosis diaria definida por 1000 habitantes y días
DoE	Diseño de experimentos

DT	Tiempo de disipación
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
EE2	Etinilestradiol
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EPB	Etilparabeno
EPB-D5	Etilparabeno deuterado
ESI	Ionización electrospray
FDA	US Food and Drug Administration
FEN	Fenofibrato
FLU	Ácido flufenámico
FTICR	Resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier
GEM	Gemfibrozil
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
IRB	Irbesartan
KET	Ketoprofeno
KET-D3	Ketoprofeno deuterado
LIT	Trampa de iones lineal
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MAE	Extracción asistida por microondas
MALDI	Ionización con láser asistida por la matriz
MEF	Ácido mefenámico
MeOH	Metanol
MET	Ácido 2-(4-cloro-3-metil-phenoxy)-2-metil-propiónico
MPB	Metilparabeno
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
m/z	Relación masa/carga
NAP	Naproxeno
NSAIDs	Antiinflamatorios no esteroideos
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OCI	Compuestos orgánicos organoclorados

PCBs	Bifenilos policlorados
PCPs	Productos de cuidado personal
PPARs	Receptores activados por proliferados de peroxisomas
PPB	Propilparabeno
PPCPs	Fármacos y productos de cuidado personal
PVCF	Fluoruro de polivinilideno
QDA	Detector de masas de cuadrupolo simple
QIT	Trampa de iones cuadrupolar
QqQ	Triple cuadrupolo
QTOF	Cuadrupolo-tiempo de vuelo
RAS	Sistema renina-angiotensina
RDL	Rango dinámico lineal
REACH	Registro, Evaluación y Autorización de Productos Químicos
SALLE	Extracción líquido-líquido asistida por sales
SIR	Modo de iones seleccionados en espectrometría de masas
TOF	Tiempo de vuelo
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución
VIM	Vocabulario Internacional de Metrología

*OBJETIVOS
DE LA TESIS*

Con esta Tesis Doctoral se ha pretendido demostrar la necesidad de disponer de nuevas metodologías analíticas para la protección del medio ambiente y la salud humana de acuerdo a las actuales exigencias establecidas por la Unión Europea. Aplicando los últimos avances en el campo de la química analítica, es posible dar respuesta a dichas exigencias de manera eficaz, práctica y sostenible.

Los nuevos métodos desarrollados y validados serán de gran utilidad y podrán aplicarse en la mejora de la protección del medio ambiente y por extensión de los seres vivos que lo habitan.

Así, el objetivo principal de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de metodologías analíticas aplicables para la determinación de contaminantes emergentes seleccionados (fármacos y productos de cuidado personal) en matrices de carácter medioambiental. Los métodos han sido validados según las guías internacionales aplicables.

La puesta a punto de estas metodologías analíticas permitirá iniciar trabajos de seguimiento químico de los compuestos en distintas matrices medioambientales, como compost procedente de lodo de depuradora y suelo agrícola natural y enmendado con dicho lodo.

Los principales objetivos del presente trabajo de investigación por tanto han sido:

1. Desarrollar metodología analítica de buenas características para la detección y cuantificación de los compuestos objeto de estudio (fármacos y productos de cuidado personal) en suelos agrícolas y lodo de EDAR compostado, mediante el empleo de técnicas analíticas punteras como UHPLC-MS/MS. Actualmente, son muy pocos los métodos publicados para la determinación de analitos seleccionados en dichas matrices y es de gran importancia la puesta a punto de nuevas metodologías.

2. Validar y demostrar la eficacia para el fin propuesto de los métodos analíticos y de los procedimientos desarrollados a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

3. Estudiar el comportamiento medioambiental de los contaminantes seleccionados en suelo agrícola de una parcela situada en la Vega de Granada. Se ha estudiado suelo sin enmendar y enmendado con compost procedente de lodos EDAR. Estudio de desaparición de los contaminantes seleccionados en campo de labor.

4. Estudiar la adsorción de fármacos seleccionados en suelos agrícolas en el laboratorio. Modelización de su comportamiento.

INTRODUCCIÓN

1. CONTAMINANTES EMERGENTES

La historia de la humanidad pone de relieve que la actividad humana, principalmente aquella destinada a la producción y fabricación de materiales y compuestos a nivel industrial, es actualmente la principal causa de contaminación del medio ambiente, a escala global. Dicha actividad genera compuestos que sin pretenderlo acaban acumulándose en los diversos ecosistemas. Es lo que denominamos contaminantes. Probablemente, el plomo sea el contaminante global más antiguo. Su explotación por los antiguos griegos y romanos ya se encontraba en una escala lo suficientemente grande como para ser registrada en los bancos de hielo polar de aquella época¹. A raíz sobre todo de trabajos epidemiológicos que observaron efectos perjudiciales significativos a nivel cada vez más bajo ($\mu\text{g/L}$), el interés en determinar la presencia de plomo en el agua de consumo ha ido aumentando desde la década de los 70. A pesar de los esfuerzos de los organismos reguladores para limitar el uso y exposición al plomo, este contaminante sigue estando presente en el medio ambiente, en matrices incluso insospechadas como el propóleo de las colmenas de abejas².

Pero en las últimas décadas, son innumerables los compuestos que se detectan en suelos de cualquier naturaleza; organismos terrestres y marinos, incluido el ser humano; aguas naturales; etc. Además, los efectos sobre la salud de las personas y el resto de seres vivos, que supone la presencia de estos contaminantes en el medio natural son desconocidos o en el mejor de los casos escasos. Esta falta de información impide que exista una regulación clara y específica. A este tipo de compuestos se les denomina contaminantes emergentes.

Por lo general, para que una sustancia sea considerada como un contaminante emergente debe cumplir alguno de los siguientes supuestos:

¹ Hong, S.; Candelone, J.P.; Patterson, C.C.; Boutron, C.F. Greenland Ice Evidence of Hemispheric Lead Pollution Two Millennia Ago by Greek and Roman Civilizations. *Science*, 1994, 265, 1841.

² Gonzalez-Martin, M.I.; Escuredo, O.; Revilla, I.; Vivar-Quintana, A.M.; Coello, M.C.; Riocerezo, C.P.; Moncada, G.W. Determination of the Mineral Composition and Toxic Element Contents of Propolis by Near Infrared Spectroscopy. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2015, 15, 27854-27868.

- ✓ Sea una amenaza real o percibida como tal para la salud humana, la seguridad pública o el medio ambiente.
- ✓ No exista ninguna norma o guía sanitaria sobre el compuesto.
- ✓ La información toxicológica disponible sea limitada o insuficiente, o bien dicha información deba ser revaluada.
- ✓ El compuesto suponga un nuevo contaminante, nunca detectado en el medio ambiente hasta ese momento.

La lista de contaminantes emergentes engloba a un innumerable número de sustancias. Aunque algunos de ellos, como los PCBs (bifenilos policlorados), disponen desde hace más de una década de una fuerte regulación y control con vistas a minimizar la generación de estos residuos y controlar su almacenamiento, transporte, tratamiento, reutilización, reciclaje, valorización y su eliminación final. Para el resto, estas medidas no existen y tan solo está controlado su producción y sus usos permitidos; todo ello se puede consultar en el reglamento REACH³. Casi cualquier producto químico que aparece en el portal REACH es susceptible de encontrarlo en el medio natural.

³ European Chemicals Agency: <https://echa.europa.eu/es/regulations/reach>

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

La sociedad moderna utiliza productos para una amplia variedad de usos sanitarios y de higiene personal, incluyendo la prevención y la lucha contra la enfermedad, aliviar los síntomas de enfermedades y lesiones, la comodidad personal, el aseo y los fines cosméticos. Estos productos, que se pueden encontrar en cualquier farmacia y/o supermercados tienen el potencial para entrar en el medio ambiente a través de las aguas residuales domésticas y otras fuentes, como ya se ha mencionado.

La lista de fármacos es muy amplia e incluye medicamentos con y sin receta médica tanto para uso humano como veterinario. La Organización Mundial de la Salud (OMS) realiza periódicamente una lista de fármacos esenciales⁴ entre los que se pueden encontrar:

- ✓ Anestésicos.
- ✓ Analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios no esteroideos.
- ✓ Antialérgicos.
- ✓ Anticonvulsivos y antiepilépticos.
- ✓ Antibióticos.
- ✓ Medicamentos cardiovasculares como antiarrítmicos y antihipertensores.
- ✓ Reguladores lipídicos.
- ✓ Medicamentos gastrointestinales.

⁴ Organización Mundial de la Salud. WHO Model List of Essential Medicines (19th list), 2015: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2015_FINAL_amended_NOV2015.pdf?ua=1

- ✓ Desinfectantes y antisépticos.
- ✓ Anticonceptivos y hormonas.
- ✓ Medicamentos psicoterapéuticos.

Dentro de cada categoría, el número de principios activos es amplísimo. Para hacerse una idea, más de 15.000 medicamentos están autorizados por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), lo que supone unos 4.000 principios activos.

Por otro lado, el reglamento de la Comisión Europea 1223/2009 define los productos cosméticos y de cuidado personal como *"toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales"*.

Como bien es sabido, el catálogo de productos cosméticos y de cuidado personal (PCPs) es enorme y muy accesible. Por lo general, se trata de mezclas de sustancias, algunas de ellas de origen natural. La mayor parte de estas sustancias son potencialmente contaminantes emergentes, incluso algunas de ellas, como los agentes conservantes, filtros solares, fragancias y repelentes de insectos⁵, ya han sido definidas y demostradas como tales.

A los fármacos y algunos compuestos presentes en los productos cosméticos y de cuidado personal, se les consideran contaminantes emergentes. Coloquialmente se les denomina PPCPs, por su siglas en inglés (**P**harmaceuticals and **P**ersonal **C**are **P**roducts). Los compuestos que estudiaremos en esta Tesis Doctoral pertenecen a dicho grupo.

⁵ Hong, S.; Candelone, J.P.; Patterson, C.C.; Boutron, C.F. Greenland Ice Evidence of Hemispheric Lead Pollution Two Millennia Ago by Greek and Roman Civilizations. *Science*, 1994, 265, 1841.

Los PPCPs han estado presentes en el medio ambiente desde que comenzó su producción industrial y su aplicación masiva a comienzos del siglo XX. Es desde hace unas décadas, gracias al desarrollo de los métodos analíticos cada vez más sensibles, que permitió detectar su presencia en concentraciones residuales en agua, suelo, sedimentos y biosólidos⁶.

Hay varias preguntas importantes que deben ser resueltas con respecto a la presencia de PPCPs en el ambiente:

- ✓ Evaluación de los orígenes de los PPCPs con respecto a los aspectos específicos de la zona/comunidad que los utilizan y desarrollo de nuevas tecnologías efectivas para prevenir su liberación al medio ambiente.
- ✓ Estudiar el destino de los PPCP persistentes y de mayor impacto ambiental.
- ✓ Estudiar los efectos tanto a largo como a corto plazo en la salud de los seres vivos expuestos a un "cocktel" de PPCPs a concentraciones muy bajas (ng/L a mg/L) de los compuestos individuales.

2.1. Fuentes de contaminación y destino

La primera pregunta que se debe plantear es cómo llegan estos contaminantes al medio ambiente. La respuesta es bien sencilla y tiene su origen en el ciclo del agua. En alguna parte de este ciclo, en el cual confluyen distintos compartimentos ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua, o dicho de otra forma, la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo (ver Figura 1), las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales, y las de origen agrícola o ganadero. La prevalencia de una u otra depende en gran medida del tipo de contaminación de

⁶ US EPA. Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. 1997. Visitado 26/05/2017. <http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/1694.pdf>

que se trate y del nivel de depuración o atenuación natural (si existe) que experimentan.

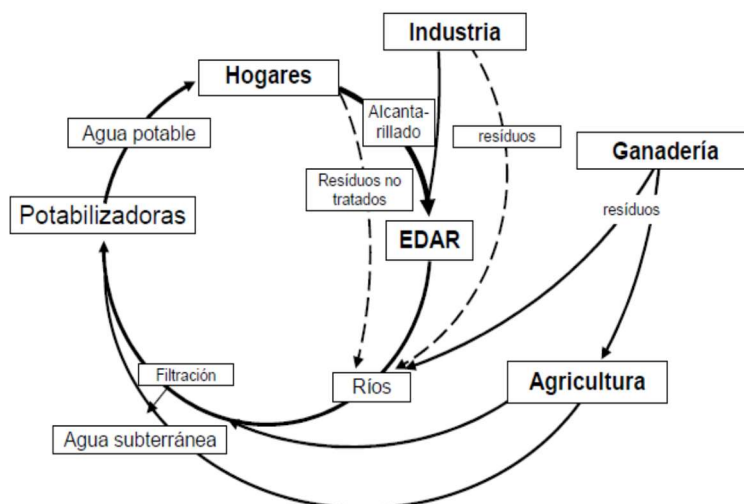


Figura 1. Interacción del ciclo del agua con los residuos.

(Fuente: [http://bases.cortesaragon.es/bases/NdocumenVIII.nsf/e04aef3c1a99d7c3c12576d2002e551b/c4da3fc84fb25b1ac125792d003a19c2/\\$FILE/docfundacion.pdf](http://bases.cortesaragon.es/bases/NdocumenVIII.nsf/e04aef3c1a99d7c3c12576d2002e551b/c4da3fc84fb25b1ac125792d003a19c2/$FILE/docfundacion.pdf)) Visitado 26/05/2017

Claramente, el origen de la contaminación por las sustancias químicas que aparecen en los productos de cuidado personal es el uso doméstico. Acciones tan cotidianas como ducharse, emiten al alcantarillado de los núcleos urbanos gran cantidad de PPCPs. Incluso, nos encontramos con acumulación de filtros UV solares, presentes en las cremas de protección solar, en aguas ambientales⁷ o en peces de río⁸. Esto se debe, entre otras causas⁷, a la descarga de aguas de recreo tales como piscinas. No es de extrañar encontrar estos compuestos en el medio ambiente dada la creciente concienciación sobre protegerse del sol, lo que ha originado la fabricación de cosméticos con factores de protección solar cada vez más altos lo que significa una alta concentración de filtros solares en los productos.

⁷ Cuderman, P.; Heath, E. Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 1343-1350.

⁸ Gago-Ferrero, P.; Diaz-Cruz, M.S.; Barcelo, D. UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *The Science of the total environment*, 2015, 518-519, 518-525.

En el caso de los fármacos, el alto consumo de medicamentos unido a la excreción de los principios activos intactos (la tasa de excreción varía en un amplio rango, del 10 a 90%), es la principal razón de encontrarlos en las aguas residuales domésticas. Otras fuentes, no menos desdeñables, son la liberación de principios activos por los fabricantes⁹ y las aguas residuales procedentes de hospitales¹⁰. 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 utilizar¹¹.

Afortunadamente, la legislación española y europea¹² obliga a tratar las aguas residuales en lugares llamados Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs). El problema es que en las EDARs no se consiguen eliminar el 100% de los PPCPs¹³, por lo que de forma eventual, llegarán a ríos, acuíferos, mares y plantas de tratamiento de agua potable que tampoco están diseñadas para eliminar estas sustancias.

Otra fuente de contaminación localizada en algunas zonas de costa es el vertido al mar de aguas residuales a través de emisarios submarinos. Se trata de un conducto mediante el cual se bombea agua residual, después de un mínimo tratamiento, para conducirla a una cierta distancia de la costa y a gran profundidad. Con esto se consigue eliminar las bacterias fecales ya que presentan altas tasas de mortalidad en el medio marino debido principalmente a la incidencia de la luz, especialmente la frecuencia ultravioleta, y a la alta

⁹ Caldwell, D.J. Sources of pharmaceutical residues in the environment and their control. In: Issues in environmental science and technology. Pharmaceuticals in the environment. Hester, R.E., Harrison, R.M. (Eds.) *The Royal Society of Chemistry*, UK, 2016, pp. 92-119.

¹⁰ Gómez, M.J.; Petrović, M.; Fernández-Alba, A.R.; 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.

¹¹ 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.

¹² The Council of the European Communities. Council Directive concerning urban waste water treatment (91/271/EEC), 1991. Visitada 26/05/2017: <http://ec.europa.eu/environment/water/water-urbanwaste/directiv.html>.

¹³ Ternes, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 1998, 32, 3245-3260.

salinidad. Pero los contaminantes emergentes como los PPCPs, apenas se ven alterados por lo que llegan al mar donde es imposible su eliminación.

Los efluentes de las EDARs no son los únicos causantes de la contaminación ambiental. Los fangos de desecho que se obtienen de las EDARs también presentan adsorbidos contaminantes orgánicos, incluyendo los PPCPs¹⁴. Estos fangos o lodos son tratados, por digestión o compostaje, para aplicarlos en suelos agrícolas o de recreo en forma de compost u otro tipo de biosólidos a modo de fertilizantes y abonos. Al tratamiento que da lugar al compost se denomina compostaje. Más adelante se explicará en mayor detalle este proceso. El problema estriba en que dicho tratamiento a veces no es efectivo para la eliminación de los PPCPs, por tanto, los contaminantes orgánicos que quedan adsorbidos a los biosólidos son introducidos al suelo, pudiendo experimentar fenómenos de lixiviación por el riego o la lluvia, incrementando la concentración de los contaminantes que no se hayan degradado, en las aguas subterráneas¹⁵. También se ha demostrado que los contaminantes pueden transferirse del suelo enmendado con este compost contaminado a los cultivos agrícolas¹⁶.

2.2. Riesgo ambiental de los PPCPs

Hay evidencia de que ciertos PPCPs pueden afectar negativamente a la vida acuática y terrestre en base a tres factores: la persistencia y baja degradación, la bioacumulación en los organismos y la toxicidad de los contaminantes.

2.2.1. Persistencia

La incapacidad para la eliminación completa de los PPCPs en las plantas de tratamiento de residuos supone un riesgo potencial para los seres vivos y la salud pública. Además, no todos los PPCPs son persistentes, pero debido al uso

¹⁴ Caliman, F.A.; Gavrilescu, M. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 2009, 37, 277-303.

¹⁵ 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.

¹⁶ Schmidt, W.; Redshaw, C.H. Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 112, 212-222.

continuado de los mismos son considerados "pseudo-persistentes". Un estudio clasificó 10 fármacos y metabolitos en compuestos como bajo, moderado y alto grado de persistencia de acuerdo con su tiempo de disipación (DT50) en muestras de agua/sedimentos. Paracetamol, ibuprofeno, 2-hydroxibuprofeno y CBZ-diol (10,11-dihidro-10,11-trans-dihidroxi-carbamazepina) se clasificaron como poco persistentes (DT50 = 3.1-7 días), oxazepam, iopromida e ivermectina se consideraron moderadamente persistentes (DT50 = 15-54 días) mientras que el ácido clofíbrico, diazepam y carbamazepina fueron calificados como altamente persistentes (DT50 = 119-328 días)¹⁷.

2.2.2. Bioacumulación

Estudios han detectado PPCPs, en organismos acuáticos, en cantidades superiores a las concentraciones del medio natural. Así, el diclofenaco se ha detectado en la trucha marrón (*Salmo trutta f. fario*)¹⁸ y mejillones¹⁹; en peces de ríos de los Estados Unidos, antidepressivos y antiepilépticos²⁰; y benzofenonas en peces de ríos españoles⁸. La fauna terrestre también puede estar expuesta a los PPCPs. Algunos estudios muestran que el uso excesivo de diclofenaco en el ganado y la eliminación ineficiente del ganado muerto resultó en la muerte de buitres en Pakistán que se alimentan de cadáveres de animales muertos tratados con este fármaco²¹. Sorprendentemente, el diclofenaco fue aprobado para uso veterinario en España en 2013²². Además, se han detectado parabenos y sus metabolitos en osos negros y en algunas aves como las águilas calvas y los

¹⁷ Löffler, D.; Römbke, J.; Meller, M.; Ternes, T.A. Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39, 5209-5218.

¹⁸ Hoeger, B.; Köllner, B.; Dietrich, D.R.; Hitzfeld, B. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*, 2005, 75, 53-64.

¹⁹ Ericson, H.; Thorsen, G.; Kumblad, L. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 2010, 99, 223-231.

²⁰ Ramirez, A.J.; Brain, R.A.; Usenko, S.; Mottaleb, M.A.; O'Donnell, J.G.; Stahl, L.L.; Wathen, J.B.; Snyder, B.D.; Pitt, J.L.; Perez-Hurtado, P.; Dobbins, L.L.; Brooks, B.W.; Chambliss, C.K. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environmental toxicology and chemistry*, 2009, 28, 2587-2597.

²¹ Oaks, J. L.; Gilbert, M.; Virani, M.Z.; Watson, R.T.; Meteyer, C.U.; Rideout, B.A.; Shivaprasad, H. L.; Ahmed, S.; Iqbal Chaudhry, M.J.; Arshad, M.; Mahmood, S.; Ali, A.; Ahmed Khan, A. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 2004, 427, 630-633.

²² Margalida, A.; Bogliani, G.; Bowden, C.G.R.; Donázar, J.A.; Genero, F.; Gilbert, M.; Karesh, W.B.; Kock, R.; Lubroth, J.; Manteca, X.; Naidoo, V.; Neimanis, A.; Sánchez-Zapata, J.A.; Taggart, M. A.; Vaarten, J.; Yon, L.; Kuiken, T.; Green, R.E. One Health approach to use of veterinary pharmaceuticals. *Scienceexpress*, 2014, 1-5.

albatros²³. Por otro lado, se han realizado estudios de laboratorio, para determinar el grado de bioacumulación en seres vivos, especialmente acuáticos. La exposición durante 14 días de los peces de colores (*Carassius auratus*) a una disolución de gemfibrozil (un regulador lipídico) de concentración equivalente a la encontrada en el medio ambiente, dio lugar a un factor de biocentración plasmática de 113, un valor muy alto²⁴. Otro estudio²⁵, reveló bioacumulación de la carbamazepina, un fármaco antiepiléptico, por las algas *Subcapitata Pseudokirchneriella* y el crustáceo *Thamnocephalus platyurus* con factores de bioacumulación de 2.2 y 12.6, respectivamente. Pero no solo se han publicado estudios de bioacumulación de fármacos, también los hay sobre conservantes de productos de cuidado personal, concretamente los parabenos. Un estudio estima que el factor de bioconcentración (FBC) es de 6.4 y 16 para el metil- y el etilparabeno, respectivamente, en los organismos acuáticos. Para el propilparabeno este factor es mayor, 44, mientras que para el butilparabeno llega hasta 110²⁶.

2.2.3. Toxicidad

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 humanos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) los define como "*sustancia o mezcla exógena que altera la función(es) del sistema endocrino y en consecuencia causa efectos adversos para la salud en un organismo, su progenie o sub-población*".

Este grupo de compuestos incluye familias muy diversas como los estrógenos sintéticos usados como anticonceptivos (EE2 y 17 α -etinilestradiol), fitoestrógenos (isoflavonoides) y compuestos de síntesis industrial (bisfenol A,

²³ Xue, J.; Kannan, K. Accumulation profiles of parabens and their metabolites in fish, black bear, and birds, including bald eagles and albatrosses. *Environment international*, 2016, 94, 546-553.

²⁴ Mimeault, C.; Woodhouse, A.J.; Miao, X.S.; Metcalfe, C.D.; Moon, T.W.; Trudeau, V.L. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, 2005, 73, 44-54.

²⁵ Vernouillet, G.; Eullaffroy, P.; Lajeunesse, A.; Blaise, C.; Gagné, F.; Juneau, P. Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere*, 2010, 80, 1062-1068.

²⁶ Danish Ministry of the Environment-Environmental Protection Agency. Survey of parabens, 2013: <http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2013/04/978-87-93026-02-5.pdf>

nonilfenol y octilfenol). Recientemente se han incluido algunos fármacos (e.g. naproxeno, metoprolol y clofibrato) como potenciales EDCs²⁷. La incidencia de enfermedades relacionadas con el sistema endocrino de los individuos ha aumentado considerablemente, 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.

Además, la toxicidad derivada de mezclas complejas de PPCPs a bajas concentraciones puede conducir a interacciones sinérgicas; significa que mientras los PPCPs de forma individual y a bajas concentraciones, no provocan efectos tóxicos significativos, las mezclas de éstos pueden ejercer una considerable ecotoxicidad. Esto se demostró²⁸ para el fármaco antiepiléptico, carbamazepina, y el regulador lipídico, ácido clofíbrico, que exhibieron efectos nocivos mucho más importantes para la *Daphnia magna* (denominada comúnmente como pulga de agua) actuando conjuntamente que de forma individual y a la misma concentración.

Otra preocupación importante relacionada con la presencia de PPCPs en el medio ambiente es la posible creación de cepas resistentes a los antibióticos en las poblaciones de bacterias naturales²⁹. El abuso de antibióticos en medicina y cría de animales es la causa principal para la aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos, por lo que se ha convertido en una amenaza para la prevención y el tratamiento eficaz de diversas enfermedades infecciosas³⁰.

²⁷ Caliman, F.A.; Gavrilescu, M. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 2009, 37, 277-303.

²⁸ Cleuvers, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 2003, 142, 185-194.

²⁹ Schwartz, T.; Köhnen, W.; Jansen, B.; Obst, U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43, 325-335.

³⁰ World Health Organisation. Antibiotic Resistance: Multi-Country Public Awareness Survey. W.H. Organisation (Ed.), 2015: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s22245en/s22245en.pdf>

3. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES. GENERACIÓN DE LODOS

Cuando un producto de desecho se incorpora al agua, ésta recibe el nombre de agua residual. El problema se genera cuando estas aguas contaminadas son vertidas directamente a los cauces naturales de agua (ríos, lagos, etc.) sin ningún tratamiento previo, contaminándolos de una forma notable. Esto ejerce sobre los cauces receptores toda una serie de efectos negativos, de entre los que destacan:

- ✓ Aparición de fangos y flotantes. La fracción sedimentable de los sólidos en suspensión origina sedimentos en el fondo de los cauces mientras que la fracción no sedimentable da lugar a la acumulación de grandes cantidades de sólidos en la superficie y/o en las orillas de los cauces receptores formando capas de flotantes. Los depósitos de fangos y flotantes no sólo provocan un desagradable impacto visual, sino que, debido al carácter reductor de la materia orgánica, se puede llegar a provocar el agotamiento del oxígeno disuelto presente en las aguas y originar el desprendimiento de malos olores.
- ✓ Agotamiento del contenido de oxígeno presente en las aguas. Los componentes de las aguas residuales fácilmente oxidables comenzarán a ser degradados vía aerobia por la flora bacteriana de las aguas del cauce, con el consiguiente consumo de parte del oxígeno disuelto. Si este consumo es excesivo, el contenido en oxígeno disuelto descenderá por debajo de los valores mínimos necesarios para el desarrollo de la vida acuática. Consumido el oxígeno disponible, los procesos de degradación vía anaerobia generarán olores desagradables, al liberarse gases causantes de dichos olores.
- ✓ Aportes excesivos de nutrientes. Las aguas residuales contienen nutrientes (N y P principalmente) causantes del crecimiento descontrolado de algas y otras plantas en los cauces receptores. Este

fenómeno se denomina eutrofización³¹. Este crecimiento excesivo de biomasa puede llegar a impedir el empleo de estas aguas para usos domésticos e industriales.

- ✓ Daños a la salud pública. Pueden fomentar la propagación de organismos patógenos para el ser humano (virus, bacterias, protozoos y helmintos). Entre las enfermedades que pueden propagarse a través de las aguas contaminadas por los vertidos de aguas residuales urbanas, destacan: el tifus, el cólera, la disentería y la hepatitis A.

Es por tanto necesario introducir en el ciclo del agua procesos de depuración para que las sociedades continúen avanzando y mejorando, sin agotar los recursos naturales existentes; para ello se ha promulgado la *Teoría del Desarrollo Sostenible*, basada en la necesidad de reciclaje, reutilización, la búsqueda de energías alternativas, etc.

En la actualidad, son numerosas las Estaciones Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) distribuidas a lo largo del mundo para conseguir la depuración de las aguas contaminadas.

3.1. Descripción y funcionamiento de una EDAR

En esta sección se exponen los fundamentos básicos del tratamiento de las aguas residuales urbanas. Las de origen industrial quedan fuera del alcance de esta Tesis Doctoral, dependiendo su tratamiento del tipo de industria. El procedimiento para el tratamiento de las aguas residuales urbanas consta de tres elementos principales:

- ✓ Recogida y conducción de las aguas residuales hasta la EDAR.
- ✓ Tratamiento propiamente dicho de las aguas residuales en la EDAR.

³¹ Jarvie, H.P.; Neal, C.; Withers, P.J.A. Sewage-effluent phosphorus: A greater risk to river eutrophication than agricultural phosphorus? *Science of The Total Environment*, 2006, 360, 246-253.

- ✓ Evacuación de los productos resultantes del tratamiento: efluentes y lodos.

En las EDARs se realizan operaciones físicas, biológicas y químicas, que persiguen eliminar la mayor cantidad posible de contaminantes antes de su vertido, de forma que los niveles de contaminación que queden en los efluentes tratados cumplan los límites legales existentes y puedan ser asimilados de forma natural por los cauces receptores. Incluso, un pequeño porcentaje de estos efluentes se aplican al terreno, al considerar que el suelo supone por sí mismo un elemento depurador³².

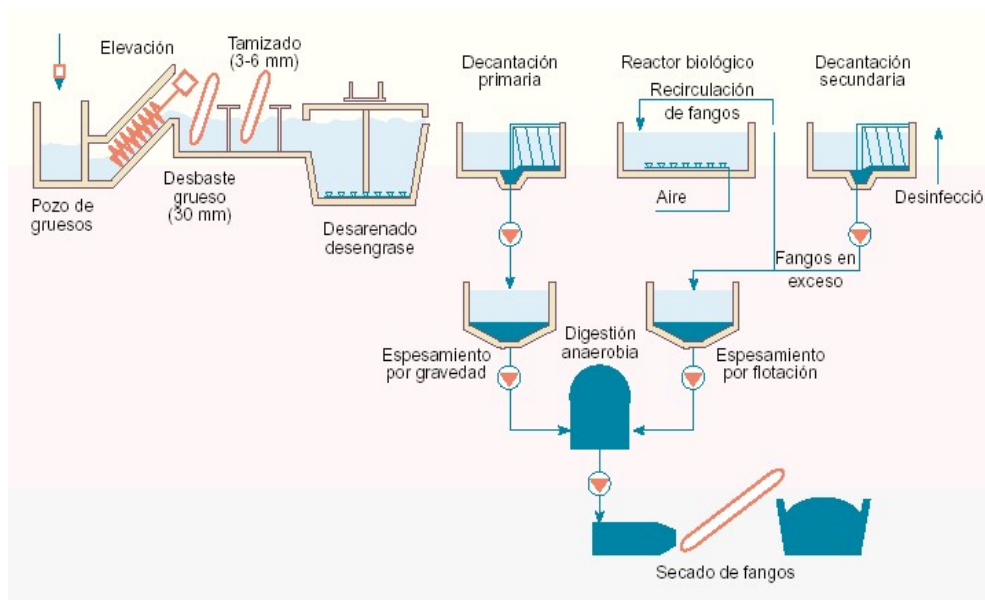


Figura 2. Esquema de las líneas principales de trabajo en las EDARs. Pretratamiento, tratamiento primario y biológico secundario convencional en la línea de agua. (Fuente: Doménech, J. *Depuración y potabilización del agua*. Offarm, 2003, 22, 110-116)

En las depuradoras convencionales, como la esquematizada en la Figura 2, se distinguen dos líneas de tratamiento: la línea de agua y la de lodos. Algunas depuradoras también tienen una línea de gas, donde se produce biogás que sirve como fuente de energía para procesos que ocurren en la propia EDAR, logrando autoabastecerse y conseguir un ahorro energético.

³² <http://hispagua.cedex.es/documentacion/documento/32891>.

3.1.1. Línea de agua

En la Figura 3 se muestra los tratamientos y objetivos que se llevan a cabo en esta línea.

PRETRATAMIENTO	TRATAMIENTO PRIMARIO	TRATAMIENTO SECUNDARIO	TRATAMIENTO TERCIARIO
<p>Objetivo</p> <p>Eliminación de objetos gruesos, arenas y grasas</p>	<p>Objetivo</p> <p>Eliminación de materia sedimentable y flotante</p>	<p>Objetivo</p> <p>Eliminación de materia orgánica disuelta o coloidal</p>	<p>Objetivo</p> <p>Eliminación de sólidos en suspensión, materia orgánica residual, nutrientes y patógenos</p>
<p>Operaciones básicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Desbaste - Tamizado - Desarenado - Desengrasado 	<p>Operaciones básicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Decantación primaria - Tratamientos físico-químicos (coagulación-floculación) 	<p>Procesos básicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Degradación bacteriana - Decantación secundaria 	<p>Procesos básicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Floculación - Filtración - Eliminación de N y P - Desinfección
<p>Procesos físicos</p>	<p>Procesos físicos y químicos</p>	<p>Procesos biológicos</p>	<p>Procesos físicos, químicos y biológicos</p>

Figura 3. Tratamientos y objetivos de la línea de agua (Fuente: <http://hispagua.cedex.es/documentacion/documento/32891>) Visitada 25/05/2017

a) Pretratamiento

En primer lugar, las aguas residuales han de someterse a un pretratamiento, a través de operaciones físicas y mecánicas, que tienen por objetivo separar del agua residual la mayor cantidad posible de materiales y objetos, que pueden dar lugar a problemas en las etapas posteriores del tratamiento e incluso dañar las plantas.

Dentro del pretratamiento se incluyen las operaciones de separación de grandes sólidos, desbaste, tamizado y desarenado-desengrasado.

- ✓ Separación de grandes sólidos. Se realizan a través de pozos de gruesos como el representado en la Figura 4.

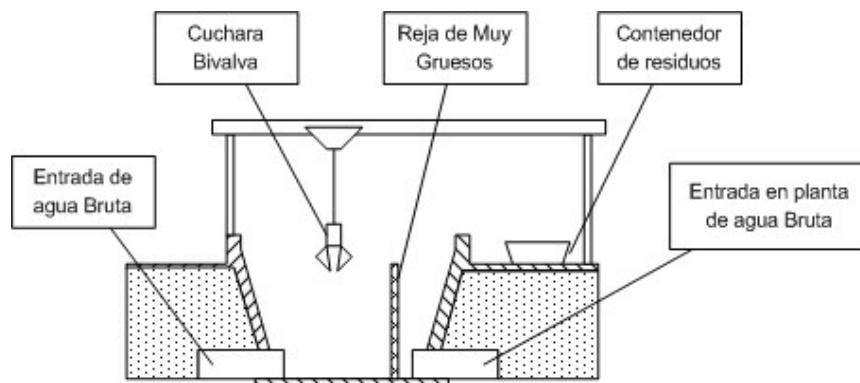


Figura 4. Pozo de gruesos de una EDAR (Fuente: https://es.wikibooks.org/wiki/Ingenier%C3%ADa_de_aguas_residuales/Pretratamiento)
Visitada 29/05/2017

- ✓ Desbaste. Eliminación de sólidos de pequeño y mediano tamaño (trozos de madera, trapos, raíces, etc.) que de otro modo podrían deteriorar o bloquear los equipos mecánicos y obstruir el paso de la corriente de agua. Para ello se suelen utilizar rejas. Las autoridades públicas cifran en grandes cantidades de dinero, las reparaciones en las EDARs debido a la presencia de papel, toallitas, compresas y otros objetos.
- ✓ Tamizado. Reducción de sólidos en suspensión en las aguas residuales mediante su filtración a través de tamices.
- ✓ Desarenado. Eliminación de la materia pesada de tamaño milimétrico para evitar que sedimenten en canales y conductos y proteger a las bombas y otros elementos de la abrasión.
- ✓ Desengrasado. Eliminación de grasas y materias flotantes más ligeras que el agua. Se distinguen dos tipos: los estáticos y los aireados. Por norma general, en las plantas de tamaño medio-grande, esta operación junto con la de desarenado se realizan conjuntamente en sistemas aireados.

b) Tratamiento primario

El objetivo de esta etapa es la eliminación de sólidos en suspensión, consiguiéndose además una cierta reducción de la contaminación biodegradable,

dado que una parte de los sólidos que se eliminan está constituida por materia orgánica. Los tratamientos primarios más habituales son la decantación primaria y los tratamientos fisicoquímicos.

- ✓ Decantación primaria. Su objetivo es la eliminación de la mayor parte posible (entre el 40% y 60%)³³ de los sólidos sedimentables, bajo la acción exclusiva de la gravedad. La retirada de estos sólidos es muy importante ya que, en caso contrario, originarían fuertes demandas de oxígeno en el resto de las etapas de tratamiento de la estación.
- ✓ Tratamientos fisicoquímicos. La reducción de los sólidos en suspensión se consigue mediante la adición de reactivos químicos. De esta forma se consigue eliminar incluso, sólidos coloidales, al incrementarse el tamaño y densidad de los mismos mediante procesos de coagulación-floculación.

c) *Tratamiento secundario*

El Real Decreto-Ley 11/95 define el tratamiento secundario como “*el tratamiento de aguas residuales urbanas mediante un proceso que incluya un tratamiento biológico con sedimentación secundaria u otro proceso*” en el que se consiga la degradación de la materia orgánica y la coagulación y eliminación de los sólidos coloidales no sedimentables. Además, se consigue la disminución de los microorganismos patógenos y fecales. Otro de los objetivos del tratamiento secundario es transformar el nitrógeno orgánico y amoniacal en nitrato. Este proceso se denomina nitrificación.

Los procesos biológicos aeróbicos son, por lo general, más eficientes que los anaeróbicos, y por tanto los más usados. Básicamente, existen varios tipos de tratamientos aeróbicos entre los que destacan los fangos activados, biorreactores de membrana (MBR) y lechos bacterianos. A continuación se describirá brevemente cada uno de ellos.

³³ Cheremisinoff, N.P. Handbook of water and wastewater technologies. *Butterworth-Heinemann*, Boston, 2002, 645-654.

- ✓ Tratamiento de fangos activados. Es el tratamiento más común y ampliamente utilizado. El objetivo es mantener un cultivo biológico formado por varios microorganismos en el agua residual a tratar. Los microorganismos proceden de un fango biológico. Los microorganismos en presencia de oxígeno crecen y se reproducen usando el material orgánico. En el proceso se forman partículas fácilmente decantables denominadas flóculos y que en su conjunto constituyen el fango activado o biológico. Este proceso requiere de dos tanques separados (ver Figura 2). El primero, llamado tanque de aireación o reactor biológico, está continuamente aireado es donde se produce las reacciones de degradación (oxidación) y nitrificación. A continuación, después de un tiempo prudencial, la mezcla pasa al decantador secundario. Aquí, el agua con fangos se deja reposar de modo que sedimentan los fangos floculados y de esta forma separarlos de la fase líquida. Parte de los fangos floculados son recirculados al reactor biológico para mantener en el mismo una concentración constante de microorganismos. El exceso del fango se evacua para el tratamiento de los mismos.

- ✓ Biorreactor de membrana (MBR). Se considera como una combinación de dos procesos básicos (degradación biológica y separación por membrana) en un único proceso en el que los sólidos en suspensión y microorganismos se separan del agua tratada mediante un sistema de filtración por membrana^{34,35}. En la Figura 5 se muestra un sistema de filtración del reactor. Esta tecnología, relativamente reciente, ha sido instalada en varias plantas a escala real aunque la mayor parte del esfuerzo se centra en estudios de plantas piloto. Los MBRs son, por lo general, más eficientes en la eliminación de compuestos orgánicos como los PPCPs que el tratamiento convencional³⁶⁻³⁸ aunque son muchos aún

³⁴ Judd, S. The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26, 109-116.

³⁵ Melin, T.; Jefferson, B.; Bixio, D.; Thoeye, C.; De Wilde, W.; De Koning, J.; van der Graaf, J.; Wintgens, T. Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. *Desalination*, 2006, 187, 271-282.

³⁶ Clara, M.; Strenn, B.; Gans, O.; Martinez, E.; Kreuzinger, N.; Kroiss, H. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*, 2005, 39, 4797-4807.

los compuestos que requieren ser estudiados para llegar a esta conclusión. Algunos PPCPs persistentes como la carbamazepina, el trimetoprim o el propanolol se siguen encontrando en efluentes y lodos tratados con este sistema³⁹.



Figura 5. Sistema de filtrado de un biorreactor de membrana. (Fuente: <http://www.water-technology.net/projects/kamLoops/kamLoops2.html>) Visitada 29/05/2017

- ✓ Lecho bacteriano (ver Figura 6). El agua residual, confinada en un tanque, se vierte uniformemente por la parte superior de un lecho formado por materiales naturales (cantos rodados, plásticos, escoria de minas, etc.). En la parte inferior del lecho se sitúa el sistema de drenaje, para que salga el agua tratada, y el sistema de entrada de aire, para la ventilación natural o forzada. Este sistema es el más barato y antiguo pero también el menos eficiente.

³⁷ Radjenović, J.; Petrović, M.; Barceló, D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*, 2009, 43, 831-841.

³⁸ Trinh, T.; van den Akker, B.; Stuetz, R.M.; Coleman, H.M.; Le-Clech, P.; Khan, S.J. Removal of trace organic chemical contaminants by a membrane bioreactor. *Water Science and Technology*, 2012, 66, 1856.

³⁹ Kim, M.; Guerra, P.; Shah, A.; Parsa, M.; Alaei, M.; Smyth, S.A. Removal of pharmaceuticals and personal care products in a membrane bioreactor wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, 2014, 69, 2221.



Figura 6. Lecho bacteriano.

(Fuente: <http://www.lineae.com.ar/productos.php?id=5>) Visitada 29/05/2017

d) Tratamiento terciario o avanzado

Suelen consistir en procesos químicos o físicos y son la etapa final del proceso de depuración de aguas residuales. La calidad final del efluente dependerá en gran medida de este tratamiento. La cloración es sin ninguna duda el método de desinfección de aguas residuales más usado y barato pero sus desventajas como la generación de compuestos orgánicos clorados, sustancias muy nocivas para los organismos vivos⁴⁰, originó la investigación sobre tratamientos alternativos más respetuosos con el medio ambiente y eficaces. Cabe destacar el uso de carbón activado, la ósmosis inversa⁴¹, la ozonización⁴², la radiación UV⁴³ y los procesos de oxidación avanzada⁴⁴.

⁴⁰ McGeehin, M.A.; Reif, J.S.; Becher, J.C.; Mangione, E.J. Case-control study of bladder cancer and water disinfection methods in Colorado. *American journal of epidemiology*, 1993, 138, 492-501.

⁴¹ Dialynas, E.; Diamadopoulos, E. Integration of a membrane bioreactor coupled with reverse osmosis for advanced treatment of municipal wastewater. *Desalination*, 2009, 238, 302-311.

⁴² Ikehata, K.; El-Din, M.G.; Snyder, S.A. Ozonation and Advanced Oxidation Treatment of Emerging Organic Pollutants in Water and Wastewater. *Ozone: Science & Engineering*, 2008, 30, 21-26.

⁴³ Koivunen, J.; Heinonen-Tanski, H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Research*, 2005, 39, 1519-1526.

⁴⁴ Oturan, M.A.; Aaron, J.J. Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications. A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2014, 44, 2577-2641.

También se ha desarrollado la creación de pantanos artificiales⁴⁵ o humedales como una alternativa barata y eficaz cuando por costes económicos no es posible usar los otros métodos. El mayor inconveniente es que requiere extensas áreas y la ubicación del pantano artificial no puede suponer un riesgo para el ecosistema circundante.

3.1.2. Línea de lodos

El lodo derivado del proceso de tratamiento de aguas residuales es normalmente líquido o líquido-semisólido; la concentración que contiene de sólidos varía entre 0.25-12%. Esta variación se debe a los diferentes métodos de tratamiento de efluentes.

Los lodos se generan en los procesos de tratamiento de aguas residuales primario, secundario y avanzado. Para que puedan usarse en diferentes aplicaciones, los lodos municipales tienen que ser tratados para eliminar las bacterias, virus y contaminantes orgánicos legislados. Un proceso típico se resume como sigue⁴⁶.

- ✓ Tratamiento preliminar: cribado, trituración.
- ✓ Engrosamiento/espesamiento primario: gravedad, flotación, centrifugado.
- ✓ Estabilización: digestión anaerobia, digestión aeróbica, adición de cal.
- ✓ Engrosamiento secundario: gravedad, flotación, drenaje, centrifugación.
- ✓ Acondicionado: adición de floculantes.
- ✓ Deshidratación: prensado, procesos térmicos, lechos de secado.

⁴⁵ Reitholtz, M.; Näslund, M.; Stråe, D.; Borg, H.; Grabic, R.; Fick, J. An evaluation of free water surface wetlands as tertiary sewage water treatment of micro-pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2012, 78, 63-71.

⁴⁶ Metcalf, Eddy (Eds.), *Wastewater engineering—treatment, disposal and reuse* (3rd ed), McGraw Hill, New York, USA, 1991.

- ✓ Tratamiento final: compostaje, secado, incineración, oxidación húmeda.

La Figura 7 recoge los objetivos de todas estas etapas (excepto la última).

ESPESAMIENTO	ESTABILIZACIÓN	ACONDICIONAMIENTO	DESHIDRATACIÓN
Objetivo Incrementar la concentración de sólidos	Objetivo Reducir la fracción biodegradable de los lodos	Objetivo Mejorar las características del lodo para facilitar su deshidratación	Objetivo Reducir el contenido en agua
Operaciones básicas - Espesado por gravedad - Espesado por flotación - Centrifugación	Procesos básicos - Estabilización aerobia - Estabilización anaerobia - Estabilización química	Procesos básicos - Adición de floculantes	Operaciones básicas - Secado mecánico - Secado térmico - Eras de secado
Procesos físicos	Procesos físicos, químicos y biológicos	Procesos biológicos	Procesos físicos

Figura 7. Tratamientos y objetivos de la línea de lodos
 (Fuente: <http://hispagua.cedex.es/documentacion/documento/32891>)
 Visitada 29/05/2017

En cuanto al tratamiento final, se puede llevar a cabo en instalaciones independientes a las EDARs. Según el tipo de tratamiento final que reciban los lodos, estos se destinarán a una aplicación u otra como se verá a continuación.

3.2. Gestión de lodos municipales

Antes de 1998, los lodos municipales, en su mayor parte, eran desechados al mar. Desde ese año, la legislación europea (Urban Waste Water Treatment Directive) prohibió esta práctica⁴⁷, con el fin de proteger el medio marino. Desde entonces, los tratamientos más comunes para gestionar este residuo son:

- ✓ Aplicarlos en suelos agrícolas.
- ✓ Incinerarlos.

⁴⁷ Fytily, D.; Zabanitoyou, A. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2008, 12, 116-140.

- ✓ Depositarlos en vertederos.

En 2008, el 37% de los lodos producidos en Europa se utilizaban en la agricultura, el 11% eran incinerados, el 40% se depositaban en vertederos y el 12% restante se utilizaba en algunas otras áreas tales como la silvicultura y recuperación de tierras⁴⁷. En las dos últimas décadas, han surgido otras tendencias en la gestión de los lodos, como la combustión, la oxidación húmeda, la pirólisis, la gasificación y la co-combustión con otros materiales, todo ello con objetivo de usarlos como una fuente de energía⁴⁸.

Pero sin duda, actualmente como así lo demuestran los datos del Ministerio de Agricultura y Pesca⁴⁹, el principal destino final de los lodos en España es su utilización en la agricultura (aproximadamente el 80% de los generados). Se ha logrado reducir en gran medida el depósito en vertedero, la práctica más contaminante de todas (aproximadamente el 8% actualmente). Por su parte, la incineración ha aumentado hasta el 4%. Este vuelco en las estadísticas con respecto a la década anterior, se debe principalmente a la *Ley 22/2011 sobre residuos y suelos contaminados*. Esta ley obliga a que la gestión de los lodos debe realizarse respetando los principios de la política de residuos relativos a la protección del medio ambiente y la salud humana y aplicando la jerarquía en las opciones de gestión, priorizando la prevención sobre el reciclado, valorización energética y quedando en último lugar el depósito en vertederos.

⁴⁸ Rulkens, W. Sewage Sludge as a Biomass Resource for the Production of Energy: Overview and Assessment of the Various Options. *Energy & Fuels*, 2008, 22, 9-15.

⁴⁹ Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Lodos de depuración de aguas residuales. <http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora>

4. COMPOSTAJE DE LODOS DE DEPURADORA

La composición cuantitativa y cualitativa de los lodos de depuradora es muy compleja. Es rica en materia orgánica, nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio, azufre y otros elementos necesarios para las plantas y microbiota del suelo. Por lo tanto, se caracteriza por el gran valor como fertilizante para el suelo. Pero también contienen compuestos tóxicos (metales pesados, plaguicidas, compuestos orgánicos persistentes, etc.) y organismos patógenos (bacterias, huevos de parásitos).

Para que los lodos puedan ser utilizados en el sector agrario deben cumplir el Real Decreto 1310/1990. Este decreto obliga a tratar los lodos "*por vía biológica, química o térmica, mediante almacenamiento a largo plazo o por cualquier otro procedimiento apropiado*" antes de aplicarlo en el suelo agrícola. Algunas EDARs, someten el material obtenido a procesos de secado con calor, generando un material con un 95 % de sólidos que es usado como fertilizante. Pero el tratamiento más común y el más respetuoso con el medio ambiente es el compostaje, cuyo proceso y beneficios se estudiarán a continuación.

4.1. Métodos de compostaje

El compostaje es un proceso complicado dirigido principalmente a la eliminación de organismos patógenos y estabilización de la materia orgánica. Para alcanzar estos objetivos, el lodo debe mezclarse con materiales estructurales en una proporción adecuada de tal forma que la relación C/N en la mezcla sea próxima a 30⁵⁰. Además, consiste en un proceso de digestión aeróbica por lo que se requiere de aire y/u oxígeno para que se produzca.

En la práctica, los materiales estructurales más utilizados contienen un alto contenido de celulosa como por ejemplo virutas de madera, serrín, paja y rastrojos derivados de podas, etc. Los materiales sólidos de desechos

⁵⁰ Kosobucki, P. Sewage sludge composting. Polish Journal of Environmental Studies, 2000, 9(4), 243-248.

municipales y, por ejemplo, las virutas de neumáticos, también se usan en el compostaje.

El proceso se puede realizar de varias formas⁵⁰:

- ✓ Método de pila. Consiste en amontonar en pilas la mezcla del material estructural con el lodo y voltear periódicamente estas pilas para airearlas. Es el más común y barato. El problema de estos métodos es que requieren grandes extensiones de terreno.
- ✓ Método de pila con aireación. Similar, al método anterior, con la salvedad que el montón está dispuesto sobre una capa porosa, por la cual se inyecta aire periódicamente.
- ✓ Métodos en sistemas cerrados a través de reactores. La fermentación aeróbica se realiza en un contenedor cerrado al que se introduce aire por lo que el proceso se controla mejor. Estos sistemas son más modernos y tienen la ventaja de su rapidez y limpieza pero como es de imaginar, su coste es muy elevado.

4.2. Fases del proceso de compostaje

En todo proceso de compostaje se pueden diferenciar por lo menos dos fases: la fase de descomposición y la fase de maduración⁵¹. Un esquema general del proceso se muestra en la Figura 8.

4.2.1. Fase de descomposición

La descomposición es un proceso de simplificación de moléculas complejas a moléculas orgánicas e inorgánicas más sencillas. Es un proceso exotérmico debido principalmente a la actividad biológica. La etapa de descomposición se

⁵¹ Soliva, M. Compostatge i gestió de residuos orgànics. Compostatge i gestió de residuos orgànics. *Diputació de Barcelona*, 2001.

compone de dos fases, una fase mesófila con temperaturas hasta los 45°C, y una fase termófila con temperaturas que pueden llegar a los 70°C.

Al principio del proceso, se desarrollan las familias de microorganismos mesófilos, que inician la descomposición de las moléculas más fácilmente degradables. Debido a esta actividad se libera calor poco a poco, lo que se traduce en un incremento paulatino de la temperatura. Además esta etapa también se caracteriza por una disminución del pH (hasta cerca de 4.0 o 4.5). Al avanzar el proceso y variar las condiciones empiezan a aparecer los microorganismos termófilos, a la vez que van disminuyendo los mesófilos. Las sustancias fácilmente degradables como los azúcares, las grasas, el almidón y las proteínas, son consumidas a gran velocidad. Como consecuencia de la degradación de las proteínas que pasan a péptidos, aminoácidos y amoníaco, progresivamente, la mezcla se va alcalinizando. En función de las condiciones de temperatura, humedad y pH, el amoníaco estará en equilibrio con el ion amonio. Para evitar posibles pérdidas de amoníaco, favorecidas por los volteos y las elevadas temperaturas que se alcanzan, conviene sobre todo en esta fase, controlar las condiciones del proceso.

Esta fase es muy importante, ya que al alcanzarse temperaturas tan elevadas, se consigue uno de los objetivos principales del compostaje: eliminar los microorganismos patógenos y las semillas de malas hierbas, con lo que se asegura la higienización del producto final. Es por eso por lo que esta fase también se le denomina fase de higienización.

La descomposición, a escala industrial, puede durar desde semanas hasta meses en función del tipo de residuo tratado y de las características del sistema aplicado. Es importante llevar a cabo esta fase en las condiciones adecuadas, ya que condiciona la fase de maduración, e influye en la calidad del producto final.

4.2.2. Fase de maduración

Está constituida por dos etapas: una fase de enfriamiento, con temperaturas que van desde los 40°C a temperatura ambiente, y una fase de estabilización,

que se desarrolla a temperatura ambiente y que se caracteriza por una baja actividad microbiana y por la aparición de organismos superiores. En la fase de enfriamiento, también llamada mesófila II una vez agotadas las fuentes de carbono y, en especial el nitrógeno en el material en compostaje, la temperatura desciende nuevamente hasta los 40-45°C. Además, continúa la degradación de polímeros como la celulosa, y aparecen algunos hongos visibles a simple vista. Al bajar de 40°C, los organismos mesófilos reinician su actividad y el pH del medio desciende levemente, aunque en general el pH se mantiene ligeramente alcalino. En la fase de estabilización que puede durar meses y que se realiza a temperatura ambiente, se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización para la formación de ácidos húmicos y fúlvicos⁵². El color del producto final debe ser negro o marrón oscuro y su olor a tierra de bosque, y además ya no se deben reconocer los residuos iniciales.

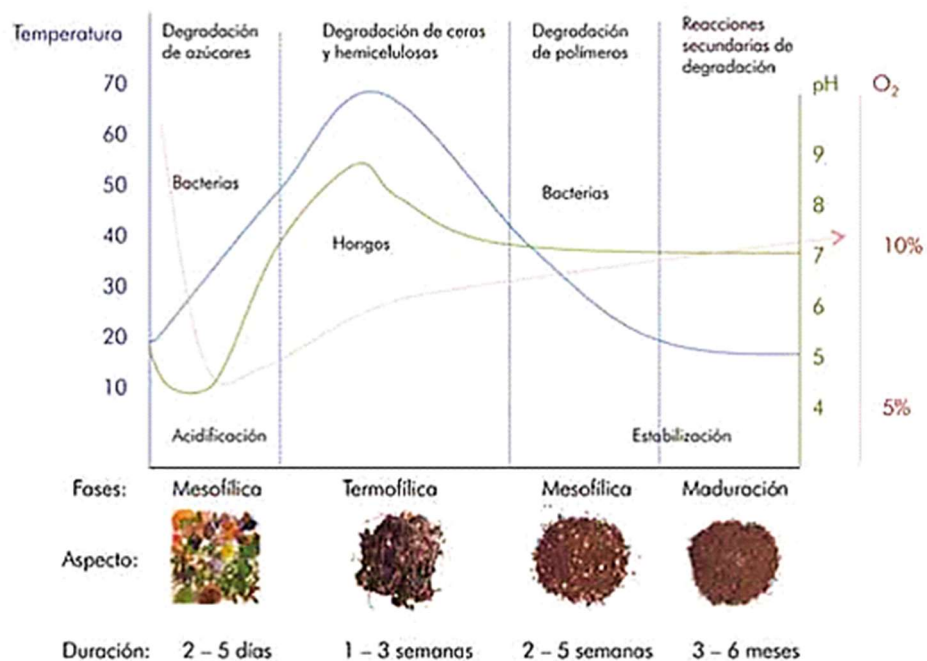


Figura 8. Etapas esquematizadas del proceso de compostaje
(Fuente: <http://www.fao.org/docrep/019/i3388s/i3388s.pdf>) Visitado 29/05/2017

⁵² Amir, S.; Jouraiphy, A.; Meddich, A.; El Gharous, M.; Winterton, P.; Hafidi, M. Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177, 524-529.

Para llevar a cabo la maduración del compost en las plantas de compostaje no existen diferentes metodologías como en el caso de la etapa de descomposición: la maduración suele llevarse a cabo en pilas o altiplanos. Tampoco requiere de un sistema de aireación, ni una elevada frecuencia de volteo, ya que la actividad biológica es mucho más reducida y los requerimientos de oxígeno son muy inferiores a los de la etapa de descomposición. Esto implica que las pilas de maduración suelen ser de mayores dimensiones que las de descomposición. Además, los requerimientos de espacio también son menores debido a la reducción en peso y volumen respecto a la etapa de descomposición.

4.3. Factores que afectan al compostaje

Las variables más importantes que afectan a los sistemas de compostaje pueden ser clasificados en dos tipos de parámetros en los que hay que establecer un control⁵³:

- ✓ Parámetros de seguimiento. Aquellos que han de ser medidos durante todo el proceso debido a que sus valores deben encontrarse en los intervalos considerados correctos para cada fase del proceso. Destacan la temperatura humedad, pH, aireación y espacio de aire libre.
- ✓ Parámetros relativos a la naturaleza del sustrato. Aquellos que han de ser medidos y adecuados a sus valores correctos fundamentalmente al inicio del proceso. Los parámetros más destacados son: tamaño de partícula, relaciones C/N y C/P, nutrientes, materia orgánica y conductividad eléctrica.

Los valores o intervalos óptimos están influenciados por las condiciones ambientales, el tipo de residuo a tratar, el sistema de compostaje elegido y la etapa del proceso de compostaje. En la Tabla 1 se recogen algunos parámetros de los mencionados junto con sus intervalos.

⁵³ <http://digital.csic.es/bitstream/10261/20837/3/Factores%20que%20afectan%20al%20proceso%20de%20compostaje.pdf> (Visited 29/05/2017)

Tabla 1. Rango y factores durante el proceso de compostaje (Fuente: <http://www.fao.org/docrep/019/i3388s/i3388s.pdf>) Visitada 16/06/2017

Parámetro	Rango ideal al comienzo	Rango ideal durante la fase termófila	Rango ideal de compost maduro
C:N	25:1 – 35:1	15:1 – 20:1	10:1 – 15:1
Humedad	50 – 60%	45 – 55%	30 – 40%
Concentración O ₂	~10%	~10%	~10%
Partícula	<25 cm	~15 cm	<1.6 cm
pH	6.5 – 8.0	6.0 – 8.5	6.5 – 8.5
Temperatura	45 – 60°C	45°C – Ambiente	Ambiente
Densidad	250-400 kg/m ³	<700 kg/m ³	<700 kg/m ³
Materia orgánica (Base seca)	50 – 70%	>20%	>20%
Nitrógeno total (Base seca)	2.5 – 3.0%	1 – 2%	~1%

4.4. Ventajas e inconvenientes del compostaje

Las principales ventajas del compostaje se centran en la revalorización de un residuo muy contaminante como son los lodos de depuradora. Se trata por tanto de un producto comercializable. Además su uso en la agricultura, supone un ahorro económico en abonos químicos y de forma general, aumenta el rendimiento de los cultivos^{54,55}.

Pero también presenta algunas desventajas como el gran requerimiento de espacio para su producción, el alto coste inicial de las instalaciones, y sobre

⁵⁴ Tomócsik, A.; Makádi, M.; Orosz, V.; Aranyos, T.; Demeter, I.; Mészáros, J.; Füleky, G. Effect of Sewage Sludge Compost Treatment on Crop Yield. *Agrofor*, 2016, 1.

⁵⁵ Özyazici, M.A. Effects of sewage sludge on the yield of plants in the rotation system of wheat-white head cabbage-tomato. *Eurasian Journal of Soil Science*, 2013, 2, 35-44.

todo, la presencia de contaminantes ambientales como los metales pesados y compuestos orgánicos⁵⁶ que no han sido degradados.

En la lista de compuestos orgánicos aparecen los contaminantes emergentes, incluidos los PPCPs. A pesar de los avances científicos sobre los efectos adversos en los ecosistemas y la salud humana producidos por los PPCPs, no existe una regulación europea sobre la vigilancia y límites máximos permitidos de estas sustancias en compost y el resto de biosólidos. En cambio, esto sí que ocurre para los metales pesados y los contaminantes prioritarios y persistentes (COPs) como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)⁵⁷.

A pesar del apoyo internacional para el reciclado de lodos y su uso en suelos agrícolas, la aceptación de esta práctica en diferentes naciones europeas ha creado un gran recelo, y han rehusado aceptar estas prácticas en base a que la UE aún no ha regulado los contaminantes emergentes.

Esta problemática muestra la necesidad de investigación científica, a nivel químico, biológico, microbiológico, toxicológico y ecológico, con objeto de completar la información ya existente en relación a los contaminantes emergentes, incluyendo los PPCPs.

⁵⁶ Kinney, C.A.; Furlong, E.T.; Zaugg, S.D.; Burkhardt, M.R.; Werner, S.L.; Cahill, J.D.; Jorgensen, G.R. Survey of Organic Wastewater Contaminants in Biosolids Destined for Land Application. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40, 7207-7215.

⁵⁷ http://www.bpeninsular.com/Idi/docs_refertil/20130902%20BGU%20present%20RFertil%20RG.pdf (Visitado 29/05/2017)

5. APLICACIÓN DE COMPOST AL SUELO. ENMENDADO DE SUELOS

El compost es un material orgánico rico en nutrientes con un contenido de materia orgánica de hasta el 40%. Por tanto, es perfecto para mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, especialmente cuando está degradado o alterado. Algunas de estas propiedades son la densidad aparente, la porosidad, la capacidad de intercambio de agua y catiónico, la aireación y el drenaje, la erosión y las comunidades microbianas⁵⁸.

Hay estudios que demuestran que la aplicación de biosólidos compostados genera beneficios similares e incluso mayores que los fertilizantes inorgánicos⁵⁹, especialmente cuando se aplican durante varios años⁶⁰. Sin embargo, su uso también ha planteado recientemente dudas derivadas de la presencia en estos materiales de contaminantes como los PPCPs y que deben ser investigados en mayor profundidad. De este modo, se debe tener en cuenta a la hora del uso agrícola de estos compost los procesos de:

- ✓ Lixiviación de contaminantes a las aguas subterráneas.
- ✓ Adsorción de los contaminantes por plantas y organismos.
- ✓ Resistencia a antibióticos de la microbiota del suelo.

Problemas más conocidos, aunque no por eso menos importantes, como la presencia de metales pesados^{61,62}, no se detallarán en esta Memoria de Tesis.

⁵⁸ Stoffella, P.J.; Ozores-Hampton, M.; Roe, N.E.; Li, Y.C.; Obreza, T.A. Compost utilization in vegetable crop production systems. *Acta Horticulturae*, 2003, 607, 125-128.

⁵⁹ Jaber, F.H.; Shukla, S.; Stoffella, P.J.; Obreza, T.A.; Hanlon, E.A. Impact of organic amendments on groundwater nitrogen concentrations for sandy and calcareous soils. *Compost Science and Utilization*, 2005, 13, 194-202.

⁶⁰ Sullivan, D.M.; Fransen, S.C.; Cogger, C.G.; Bary, A.I. Biosolids and dairy manure as nitrogen sources for prairiegrass on a poorly drained soil. *Journal of Production Agriculture*, 1997, 10, 589-596.

⁶¹ Planquart, P.; Bonin, G.; Prone, A.; Massiani, C. Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts: application to low metal loadings. *Science of The Total Environment*, 1999, 241, 161-179.

⁶² Sims, J.T.; Kline, J.S. Chemical Fractionation and Plant Uptake of Heavy Metals in Soils Amended with Co-Composted Sewage Sludge. *Journal of Environmental Quality*, 1991, 20, 387-395.

5.1. Lixiviación de PPCPs

La lixiviación es un proceso de transporte a lo largo del perfil del suelo debido a la influencia de agua. El destino final de los compuestos lixiviados y que no han sido transformados durante su recorrido vertical por el suelo, son las aguas subterráneas. Hay algunos estudios que evalúan el grado de lixiviación de los PPCPs cuando las tierras son irrigadas por efluentes de aguas residuales. Estas investigaciones evidencian que algunos PPCPs son más susceptibles a lixiviar que otros, y por lo tanto merecen más atención de la investigación. Así, un estudio científico realizado en China⁶³, demostró que el ibuprofeno, el ácido clofíbrico, el diclofenaco y el naproxeno son propensos a lixiviar mientras que otros como el bisfenol A, 4-n-nonifenol o la estrona presentan un bajo potencial de lixiviación. En otro trabajo científico⁶⁴, donde se estudian catorce compuestos, se encontró que cinco de ellos (carbamazepina, sulfametoxazol, meprobamato, trimetropin y primidona) lixivaban a profundidades de 90 cm tras una semana.

5.2. Acumulación de los PPCPs en cultivos agrícolas

Actualmente, es una de las mayores preocupaciones en este campo de investigación. Los esfuerzos de las últimas décadas sobre análisis de compuestos orgánicos en alimentos procedentes de la agricultura se han centrado en los pesticidas y herbicidas. La preocupación pública por saber qué “comemos” y los posibles riesgos potenciales para la salud de los seres humanos ha llevado a estudiar en esta última década la absorción de las plantas y vegetales de PPCPs⁶⁵.

Por ejemplo, un experimento realizado en invernaderos mostró que la lechuga y la espinaca eran capaces de asimilar PPCPs como la fluoxetina, el diazepam, el meprobamato, la carbamazepina o el gemfibrozil, entre otros,

⁶³ Chen, W.; Xu, J.; Lu, S.; Jiao, W.; Wu, L.; Chang, A.C. Fates and transport of PPCPs in soil receiving reclaimed water irrigation. *Chemosphere*, 2013, 93, 2621-2630.

⁶⁴ Bondarenko, S.; Gan, J.; Ernst, F.; Green, R.; Baird, J.; McCullough, M. Leaching of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Turfgrass Soils during Recycled Water Irrigation. *Journal of Environmental Quality*, 2012, 41, 1268-1274.

⁶⁵ Wu, X.; Dodgen, L.K.; Conkle, J.L.; Gan, J. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: a review. *Science of The Total Environment*, 2015, 536, 655-666.

cuando se exponen a concentraciones medioambientalmente relevantes (500 ng/L) de los contaminantes⁶⁶. En otros estudios, se ha detectado la presencia de carbamazepina, salbutamol y difenhidramina en cultivos agrícolas después de que los suelos fueran tratados con compost procedente de lodo de depuradora^{67,68}. También en tomates irrigados con aguas residuales tratadas se ha detectado PPCPs⁶⁹.

5.3. Resistencia de la microbiota del suelo a los antibióticos

Como ocurre con la presencia de PPCPs en alimentos agrícolas, la resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos presentes en el suelo es una preocupación creciente. A este fenómeno se le denomina de forma general "soil resistome". Si realizamos en Scopus una búsqueda de este término nos aparecen únicamente 60 entradas, 18 ($\approx 25\%$ del total) de ellas en el pasado año 2016. Estos datos evidencian la poca investigación sobre esta temática, pero a su vez el reciente interés que ha suscitado. La mayor parte de los estudios que hay al respecto han evaluado terrenos irrigados con aguas residuales tratadas pero dado que también encontramos antibióticos en biosólidos y compost, la preocupación también se puede extender en un futuro sobre estas matrices⁷⁰. Existe por lo tanto una necesidad crítica en torno a la investigación sobre la ecología de resistencia a los antibióticos de modo que podamos identificar los tipos de resistencia que son ecológicamente relevantes, particularmente en sistemas de producción agrícola⁷¹⁻⁷³.

⁶⁶ Wu, X.; Conkle, J.L.; Gan, J. Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1254, 78-86.

⁶⁷ Holling, C.S.; Bailey, J.L.; Vanden Heuvel, B.; Kinney, C.A. Uptake of human pharmaceuticals and personal care products by cabbage (*Brassica campestris*) from fortified and biosolids-amended soils. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14, 3029-3036.

⁶⁸ Wu, C.; Spongberg, A.L.; Witter, J.D.; Sridhar, B.B.M. Transfer of wastewater associated pharmaceuticals and personal care products to crop plants from biosolids treated soil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2012, 85, 104-109.

⁶⁹ Christou, A.; Karaolia, P.; Hapeshi, E.; Michael, C.; Fatta-Kassinos, D. Long-term wastewater irrigation of vegetables in real agricultural systems: Concentration of pharmaceuticals in soil, uptake and bioaccumulation in tomato fruits and human health risk assessment. *Water Research*, 2017, 109, 24-34.

⁷⁰ Rahube, T.O.; Marti, R.; Scott, A.; Tien, Y.C.; Murray, R.; Sabourin, L.; Duenk, P.; Lapen, D.R.; Topp, E. Persistence of antibiotic resistance and plasmid-associated genes in soil following application of sewage sludge and abundance on vegetables at harvest. *Canadian Journal of Microbiology*, 2016, 62, 600-607.

⁷¹ Cytryn, E. The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 63, 18-23.

6. CONTAMINANTES ESTUDIADOS

Los compuestos seleccionados pertenecen a distintos grupos de fármacos (reguladores lipídicos, antiinflamatorios no esteroideos y un antihipertensivo) y a disruptores endocrinos muy extendidos en los productos de cuidado personal y cosméticos (parabenos y benzofenonas).

6.1. Fármacos

De entre todos los grupos de fármacos, los antibióticos son probablemente los más analizados a nivel medioambiental, por lo que no se seleccionó ninguno para su estudio. En su lugar, se optó por seleccionar principios activos de uso casi abusivo que no requieren de prescripción médica como los antiinflamatorios no esteroideos y otros relacionados con el tratamiento de enfermedades muy extendidas entre la población de los países más desarrollados como la obesidad. En referencia a esta última razón, se eligieron tres reguladores lipídicos y un antihipertensivo, el irbesartan. En la Figura 9 se recogen datos de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) sobre el consumo en Europa de estos grupos de fármacos. El irbesartan, como se verá más adelante pertenece al subgrupo de los antihipertensivos denominado agentes del sistema renina-angiotensina (RAS).

⁷² Gatica, J.; Cytryn, E. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20, 3529-3538.

⁷³ Han, X.M.; Hu, H.W.; Shi, X.Z.; Wang, J.T.; Han, L.L.; Chen, D.; He, J.Z. Impacts of reclaimed water irrigation on soil antibiotic resistome in urban parks of Victoria, Australia. *Environmental Pollution*, 2016, 211, 48-57.

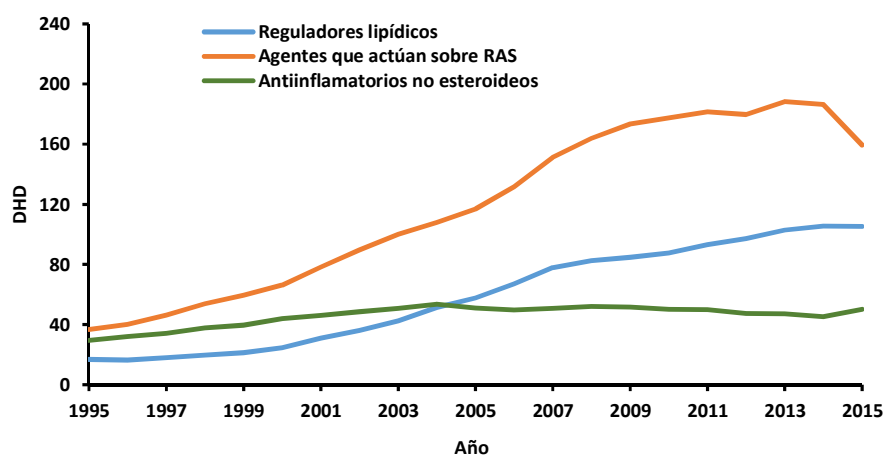


Figura 9. Consumo europeo de los últimos 20 años expresado en DHD para los grupos de fármacos estudiados.

(Fuente: http://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC#)

La unidad de medida para estimar el consumo, *DHD*, corresponde a la dosis diaria definida (*DDD*) por 1000 habitantes y día⁷⁴. El consumo de los reguladores lipídicos y agentes del sistema renina-angiotensina no ha dejado de subir desde la década de los 90, superando incluso al otro grupo objeto de estudio. Estos datos van en consonancia con el aumento de la obesidad⁷⁵.

6.1.1. Reguladores lipídicos

Como su nombre indica, ayudan a regular los niveles elevados de lípidos en sangre. Se subdivide en dos grandes grupos: las estatinas y los fibratos; los primeros regulan el colesterol, mientras que los segundos actúa sobre los ácidos grasos libres, diglicéridos y triglicéridos. En esta Tesis se estudiaron tres fibratos, gemfibrozil, bezafibrato y fenofibrato. Se trata de compuestos anfifílicos de ácidos carboxílicos o sus derivados. Una molécula anfifílica tiene una parte hidrofílica (en este caso el derivado del ácido carboxílico) y otra hidrofóbica. La estructura de los fibratos seleccionados se muestra en la Figura 10.

⁷⁴ <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/metodologia.htm>

⁷⁵ Sandoya, E.; Schwedt, E.; Moreira, V.; Schettini, C.; Bianchi, M.; Senra, H. Obesidad en adultos: prevalencia y evolución. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 2007, 22, 130-138.

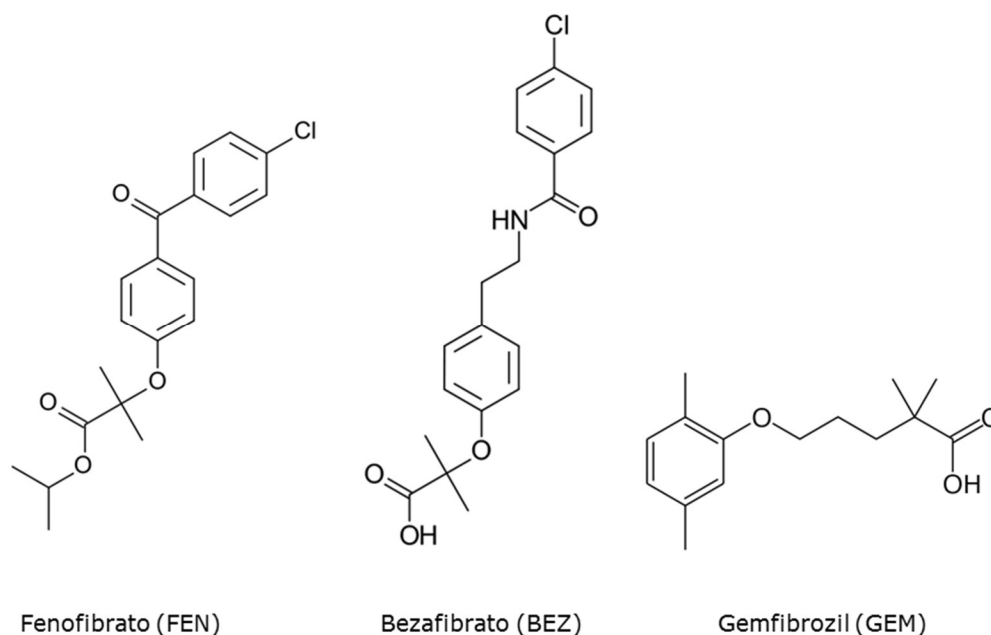


Figura 10. Estructura de los fibratos analizados

De los tres, el único que no es un ácido carboxílico, y por tanto no presenta carácter ácido base es el fenofibrato. Algunas de las propiedades físico-químicas más destacadas se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Estructura de los fibratos analizados.

Propiedad	GEM	BEZ	FEN
Solubilidad en agua (mg/L)	27.8	1.55	0.42
pK _a	4.7*	3.3*	--
Log P	3.4	6.0	5.3

(*) Valores teóricos

Actúan activando los receptores intracelulares que modulan el metabolismo de las grasas y la diferenciación del tejido adiposo, llamados receptores activados por proliferados de peroxisomas (PPARs).

6.1.2. Antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos, NSAIDs por las siglas en inglés (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs) pertenecen al grupo de los analgésicos. Son uno de los grupos de fármacos más conocidos y utilizados para aliviar el dolor, reducir la inflamación y tratar la fiebre. Son un grupo variado y químicamente heterogéneo. Se pueden clasificar según la acción inhibitoria sobre las enzimas ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2): inhibidores de la COX no selectivos e inhibidores selectivos de la COX-2. Todos los NSAIDs seleccionados fueron inhibidores no selectivos (ver Figura 11) que a su vez se clasifican en varios subgrupos. En la Tabla 3 se muestran algunas propiedades físico-químicas de estos compuestos.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas de los NSAIDs seleccionados.

Propiedad	KET	NAP	MEF	FLU	DIC
Solubilidad en agua (mg/L)	51	15.9	20	9.09	2.37
pKa	4.5	4.2	4.2	3.7*	4.2
Log P	3.12	3.18	5.12	5.25	4.51

(*) Valores teóricos

- ✓ Ketoprofeno y naproxeno son derivados del ácido propiónico.
- ✓ Ácido flufenámico y ácido mefenámico son fenamatos derivados del ácido antranílico.
- ✓ El diclofenaco es un derivado del ácido acético.

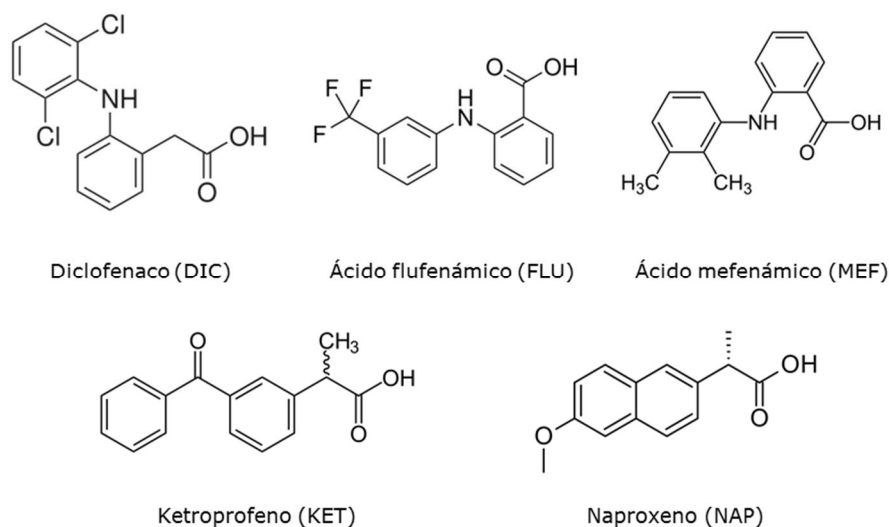
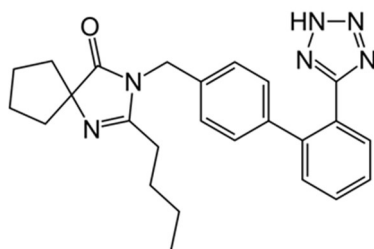


Figura 11. Estructura química de los NSAIDs estudiados

6.1.3. Antihipertensivos

Este grupo de fármacos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción en: diuréticos, betabloqueantes, bloqueadores de los canales de calcio y agentes que actúan sobre el sistema renina-angiotensina (System Renin-Angiotension, RAS). Este último grupo se subdivide en dos, uno de ellos los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II). Pues bien, el fármaco estudiado, irbesartan, corresponde a este subgrupo. La estructura del compuesto se muestra en la Figura 12.



Irbesartan (IRB)

Figura 12. Estructura química del irbesartan

Este fármaco impide que los vasos sanguíneos se estrechen, lo que disminuye la presión arterial y mejora el flujo sanguíneo. También se usa para el tratamiento de los riñones a consecuencia de la diabetes tipo 2. Es prácticamente insoluble en agua ($5.9 \cdot 10^{-2}$ mg/L), no así en disolventes orgánicos. El log P es igual a 6 y el pK_a varía en torno a 4.2.

6.2. Disruptores endocrinos

En 1996, se publicó el Informe Weybridge⁷⁶ que debe su nombre a la ciudad donde se realizaron las jornadas europeas "European Workshop: On the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife". Este informe concluyó la necesidad de conocer qué sustancias podían tener actividad y qué tipo de precauciones se debían tomar para reducir o eliminar la exposición a ellas.

Hasta ese momento, se desconocía que muchos de los compuestos químicos que usamos diariamente tenían potencial como disruptor endocrino químico, por lo que en 1999, la Comisión Europea acordó profundizar en el conocimiento acerca de estos compuestos. Con este propósito se creó en 2001 el "Cluster for Research on Endocrine Disruption" (CREDO)⁷⁷. Además también publicó una lista de sustancias prioritarias para su posterior evaluación en relación a su papel como EDCs (COM, 1999)⁷⁸. Esta lista que contenía 553 sustancias fue concluida un año después, algunas de ellas ya habían sido probadas en organismos intactos, concretamente 66, mientras que 52 presentaban potencialidad como disruptores endocrinos en ensayos in vitro^{79,80}.

⁷⁶ 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, 1-125.*

⁷⁷ Kortenkamp, A. Introduction: Endocrine Disruptors—Exposure Assessment, Novel End Points, and Low-Dose and Mixture Effects. *Environmental Health Perspectives, 2007, 115, 7-7.*

⁷⁸ 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.*

⁷⁹ COM. 262 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. Bruxelles, 2001, 1-55.*

⁸⁰ 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, 26-29.*

Los efectos de los disruptores endocrinos sobre los organismos tanto superiores como inferiores son múltiples y se han reportado multitud de trabajos en mamíferos, peces, reptiles, aves e incluso plantas⁸¹.

6.2.1. Parabenos

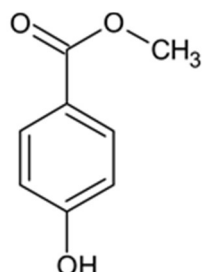
Los parabenos son ésteres derivados del ácido p-hidroxibenzoico. Tienen actividad frente a hongos, levaduras y algunos microorganismos Gram (+) y Gram (-). Esto unido a su gran estabilidad térmica, los convierte en excelentes agentes antimicrobianos para productos de la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

- ✓ Alimentos. Presentes sobre todo en alimentos muy procesados como salsas, bebidas refrescantes y productos lácteos. Los dos más usados son el metilparabeno (MPB) y etilparabeno (EPB). El reglamento CE 1130/2011 establece un máximo de 2 mg/kg en alimentos sólidos y 1 mg/L en bebidas para estos dos compuestos y sus sales sódicas.
- ✓ Cosméticos y productos de higiene personal. El reglamento CE 358/2014 referente a los conservantes permitidos en los productos cosméticos establece que el MBP y EPB son seguros a las concentraciones autorizadas (0.4% de cada parabeno sin que la suma total exceda el 0.8% en peso); el propilparabeno y butilparabeno no son aptos para los menores de tres años y el isopropilparabeno, isobutilparabeno, fenilparabeno, bencilparabeno y el pentilparabeno están prohibidos en formulaciones cosméticas.
- ✓ Medicamentos. Se incorporan en supositorios, píldoras, anestésicos, colirios, jarabes e inyecciones en concentraciones inferiores al 1%.

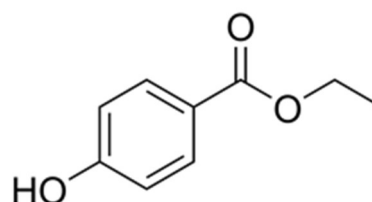
De estas tres fuentes, la principal, son los cosméticos⁸², razón por la cual se seleccionaron para su análisis aquellos permitidos en dichos productos. La Figura

⁸¹ Fox, J.E. Non-traditional targets of endocrine disrupting chemicals: the roots of hormone signaling. *Integrative and comparative biology*, 2005, 45, 179-188.

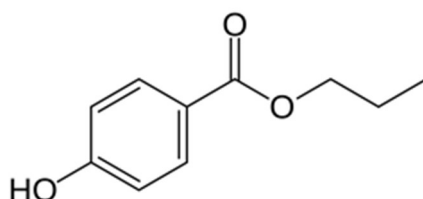
13 muestra las estructuras de los compuestos de esta familia más empleados a nivel industrial en esta aplicación.



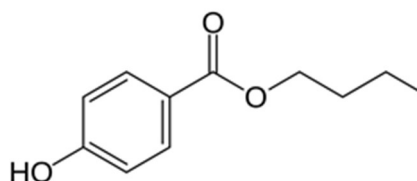
Metilparabeno (MPB)



Etilparabeno (EPB)



Propilparabeno (PPB)



Butilparabeno (BPB)

Figura 13. Estructura química de los parabenos analizados

Asimismo, en la Tabla 4 se resumen algunas de sus propiedades físico-químicas.

Tabla 4. Propiedades físico-químicas de los parabenos estudiados.

Propiedad	MPB	EPB	PPB	BPB
Solubilidad en agua (g/L)	2.5	0.88	0.5	0.2
pKa	8.3*	8.3*	8.2*	8.2*
Log P	1.96	2.47	3.04	3.57

(*) Valores teóricos

⁸² Soni, M.G.; Carabin, I.G.; Burdock, G.A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43, 985-1015.

6.2.2. Benzofenonas

Este grupo son derivados de la difenilcetona o benzofenona (BP). Se generan añadiendo a la benzofenona distintos grupos funcionales (hidroxilos, metoxi, metilos, sulfonilos y octiloxo) en una o varias posiciones. En esta Tesis Doctoral se han seleccionado como analitos los siguientes compuestos:

- ✓ Benzofenona 1 (BP1; 2,4-dihidroxibenzofenona).
- ✓ Benzofenona 3 (BP3; 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona/oxibenzona).
- ✓ Benzofenona 6 (BP6; 2,2'-dihidroxi-4,4'-dimethoxybenzophenone).
- ✓ Benzofenona 8 (BP8; 2,2'-dihidroxi-4-methoxibenzofenona/dioxibenzona)
- ✓ 4-hidroxibenzofenona (4-OH-BP).

En la Tabla 5 se muestran sus propiedades físico-químicas y en la Figura 14 se muestran las estructuras correspondientes.

Tabla 5. Propiedades físico-químicas de las benzofenonas estudiadas.

Propiedad	BP1*	BP3	BP6*	BP8*	4-OH-BP
Solubilidad en agua (mg/L)	400	69	70	100	300
pK _a	7.7	7.6*	6.8	7.1	8.1
Log P	3.0	3.8	3.9	3.8	3.1

(*) Propiedades y valores teóricos

Gracias al alto grado de aromaticidad de estos compuestos, son muy eficaces en la absorción de la radiación ultravioleta ($\lambda = 280-400$ nm), por lo que sus aplicaciones están estrechamente relacionadas con la luz:

- ✓ Reactivos químicos. Son utilizadas como reactivos o intermedios en reacciones vía fotoquímica. En este sentido hay que destacar su uso como fotoiniciadores en reacciones de polimerización⁸³.
- ✓ Filtros solares en cosméticos. Representan sin ninguna duda el principal uso de estos compuestos. Al igual que los parabenos, su uso en cosméticos está regulado por el reglamento CE 1223/2009. Para la BP3, probablemente la más destacada para este uso, la concentración máxima en el preparado es del 10% en peso.
- ✓ Aditivos. Se adicionan a materiales tales como polímeros, tintas⁸⁴ y barnices⁸⁵ cuyo uso suponga una alta exposición solar.

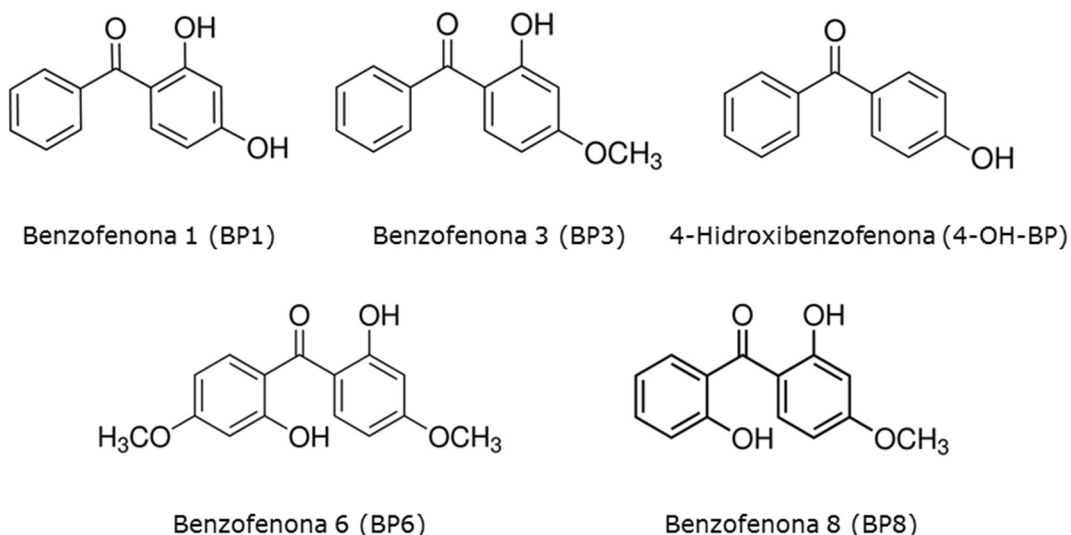


Figura 14. Estructura de las benzofenonas estudiadas

⁸³ Tang, Y.; Zhang, Y.; Yang, J.; Nie, J. Synthesis and characteristics of photopolymerized benzophenone. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 2017, 55, 313-320.

⁸⁴ Milczarek, J.M.; Zięba-Palus, J. Examination of spray paints on plasters by the use of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry for forensic purposes. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2009, 86, 252-259.

⁸⁵ Kiguchi, M.; Evans, P.D. Photostabilisation of wood surfaces using a grafted benzophenone UV absorber. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 61, 33-45.

7. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

7.1. Elección de la técnica instrumental

Uno de los aspectos más importantes a la hora de poner a punto un método de análisis, es la selección de la técnica instrumental. Para ello, hay que considerar varios aspectos como el estado físico y complejidad de la muestra y el nivel de concentración y características fisicoquímicas de los analitos.

La alta complejidad de las muestras estudiadas en la presente Tesis Doctoral, en las que aparecen un gran número de sustancias y compuestos de naturaleza variada, obliga a recurrir a técnicas de separación, como la cromatografía. Por otro lado, el nivel de concentración esperado de los analitos en dichas muestras es del orden de los ng/g. Este nivel, denominado traza, es realmente bajo y requiere de técnicas muy sensibles para la detección de los analitos y que a su vez sean muy selectivas, como es el caso del acoplamiento con la espectrometría de masas.

Las dos opciones planteadas para el análisis de los compuestos de interés fueron la cromatografía de gases y la de líquidos, acopladas en ambos casos a la espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS y LC-MS/MS, respectivamente). El principal inconveniente para la cromatografía de gases es la baja volatilidad de algunos de los analitos objetos de estudio, lo que obliga a introducir reacciones de derivación en el proceso, introduciendo una etapa adicional en el análisis. Por lo tanto, se optó por el uso de la cromatografía de líquidos.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que puede proporcionar información cualitativa (estructural) y cuantitativa (determinación del peso molecular y concentración) sobre las moléculas de analito después de su transformación a iones. Al acoplarla a la cromatografía, puede analizarse muestras formadas por multitud de compuestos.

Sin embargo, está limitada, en parte, por los requisitos de preparación de la muestra. En nuestro caso, el uso de la cromatografía líquida implica que estos estén en disolución. Por lo tanto, será necesario realizar una extracción adecuada de los mismos con disolventes. Este aspecto se tratará en profundidad en siguientes capítulos.

Un equipo de espectrometría de masas consta de cuatro módulos fundamentales: fuente de ionización, analizador de masas, detector y procesador de datos. Prestaremos especial atención a la elección de los dos primeros.

La función de la fuente de ionización en un equipo de MS es aplicar energía a la muestra para generar moléculas cargadas positiva o negativamente. En nuestro estudio, la fuente debe poder acoplarse al cromatógrafo de líquidos. Las únicas fuentes con esta característica se denominan API por sus siglas en inglés, Atmospheric Pressure Ionization. Existen cuatro tipos fundamentales:

- ✓ Electrospray (ESI).
- ✓ Ionización química a presión atmosférica (APCI, **A**tmospheric **P**ressure **C**hemical **I**onization).
- ✓ Fotoionización a presión atmosférica (APPI, **A**tmospheric **P**ressure **P**hoto**I**onization).
- ✓ MALDI a presión atmosférica (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption / **I**onization).

El tipo de fuente de ionización utilizado depende de las propiedades de la molécula a analizar, tales como peso molecular, polaridad y volatilidad. MALDI a presión atmosférica está diseñada para detectar iones procedentes de compuestos con gran masa molecular como péptidos y proteínas. Por otro lado, las fuentes APCI y APPI requieren que los analitos sean estables térmicamente y tengan cierta volatilidad ya que los iones se forman en fase gaseosa. Por todo ello, se seleccionó ESI como fuente de ionización.

Los iones provenientes de la fuente de ionización pasan al analizador de masas, que tiene como función separarlos y ordenarlos de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Los analizadores disponibles actualmente son:

- ✓ Sector magnético.
- ✓ Cuadrupolo.
- ✓ Tiempo de vuelo (TOF).
- ✓ Resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FTICR).
- ✓ Trampa de iones lineal (LIT).
- ✓ Trampa de iones cuadrupolar (QIT).
- ✓ Orbitrap.

Además es muy habitual combinar los analizadores entre sí, dando lugar a la espectrometría de masas en tándem, también conocido como MS/MS o de forma general MS^n . Se distinguen dos modalidades de tándem: en el tiempo y en el espacio. A la primera pertenecen de por sí los analizadores FTICR y QIT e implica que cada etapa de la espectrometría de masas se realiza en el mismo analizador y secuencialmente en el tiempo. Por el contrario, en un instrumento en tándem en el espacio, como un triple cuadrupolo (QqQ) o híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF), cada etapa secuencial requiere la adición de otra región de reacción y analizador de masas.

El analizador seleccionado fue el triple cuadrupolo (QqQ) ya que cumple a la perfección con los requerimientos del análisis: compatibilidad con la fuente de ionización, alta sensibilidad capaz de detectar concentraciones de ng/g y gran selectividad que permite diferenciar entre compuestos con el mismo peso molecular y misma relación masa/carga.

7.2. Principios básicos de la espectrometría ESI-QqQ

Utilizando esta fuente de ionización, el flujo procedente del cromatógrafo se hace pasar a través de un capilar metálico que está sometido a un voltaje relativamente bajo, de 1 a 4 kV. Con la ayuda de un gas inerte, normalmente nitrógeno, que transcurre paralelo al capilar, en la punta del capilar se nebuliza el disolvente formando gotitas cargadas positiva o negativamente en donde está el analito. Como consecuencia de la alta temperatura de la cámara de ionización (en torno a 150 °C), el disolvente de las gotitas se va evaporando. Esto implica un aumento de la densidad de carga superficial a medida que disminuye el radio de la gotita. En consecuencia, la carga eléctrica residual sobre las gotitas se transferirá a los analitos mientras la gotita se va haciendo cada vez más pequeña. Este proceso continúa hasta que las moléculas del analito se "liberan del disolvente" y pasan a fase gaseosa, en forma de ion. Por último, se aplica un voltaje en la entrada del analizador de masas llamado cono, que atrae a los iones y los conduce a su interior.

La Figura 15 muestra el esquema básico de lo que ocurre en una fuente de ionización ESI.

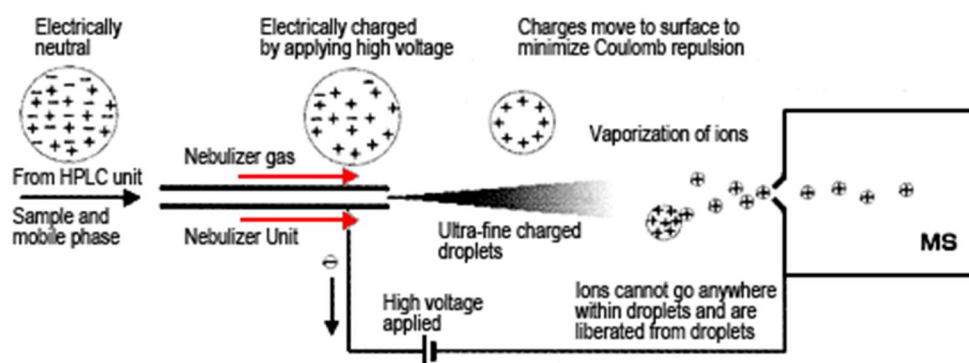


Figura 15. Proceso de ionización en fuente ESI (Fuente: <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/47/47intro.html>)
Visitada 31/05/2017

Este método de ionización es tan suave que 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.

También es bastante común la formación de aductos de $\text{NH}_4^+(\text{M}+18)$, $\text{Na}^+(\text{M}+23)$, y $\text{K}^+(\text{M}+39)$.

Existen dos configuraciones para la disposición de la fuente de ionización con respecto a la entrada del analizador. La primera sería una disposición lineal, es decir, la formación del spray apunta directamente al analizador. Esta configuración está en desuso en los instrumentos actuales en favor de la configuración en Z u ortogonal (ver Figura 16), presente en los espectrómetros de masas utilizados en esta Tesis Doctoral.

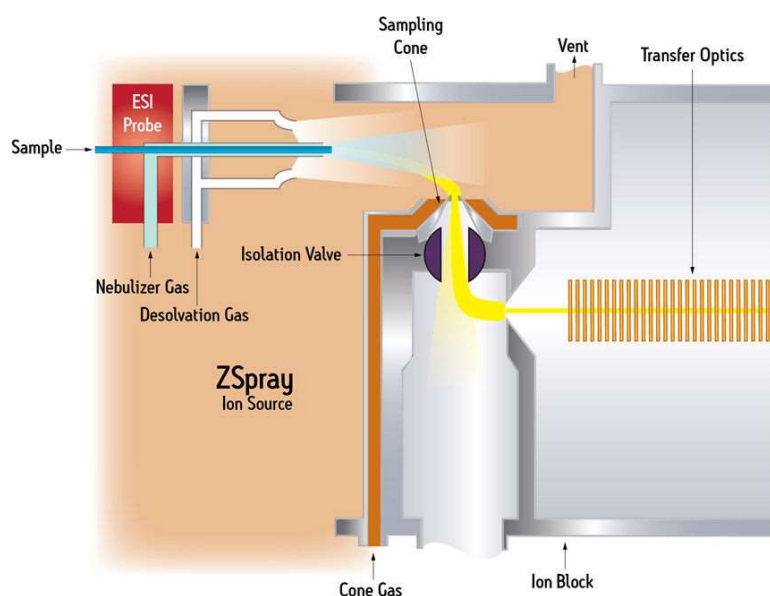


Figura 16. Fuente de ionización ESI con Z-Spray (Fuente: http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/content_blocks/content_block_7.jpg) Visitada 31/05/2017

Por otro lado, en lo referido al analizador de masas de triple cuadrupolo, este se caracteriza por disponer de tres cuadrupolos en línea. El del medio recibe el nombre de celda de colisión. Un cuadrupolo no es más que cuatro barras metálicas dispuestas como en la Figura 17.



Figura 17. Vista de un cuadrupolo
(Fuente: <http://www.monografias.com/trabajos106/absorcion-y-emision-radiacion-electromagnetica/img45.png>) Visitada 31/05/2017

El proceso que tiene lugar en un triple cuadrupolo es el siguiente:

- ✓ En primer lugar se selecciona con el primer cuadrupolo (Q1) y en función de la relación masa/carga, el ion precursor o ion padre que procede de la fuente de ionización.
- ✓ A continuación, el ion (o iones) seleccionado(s) pasan a la celda de colisión (q2). Los iones son fragmentados haciéndolos colisionar con un gas, típicamente argón. Este fenómeno se denomina disociación inducida por colisión (CID, **C**ollision-**I**nduced **D**issociation). Los iones que se generan de la colisión se denominan iones hijos o productos.
- ✓ Por último, en el tercer cuadrupolo (Q3) se separan y aíslan los iones hijo. Cuando salen por Q3, los iones se detectan en un electrón-multiplicador y se registran por el software.

La Figura 18 muestra el interior del analizador Xevo TQS™ utilizado en esta Tesis Doctoral.

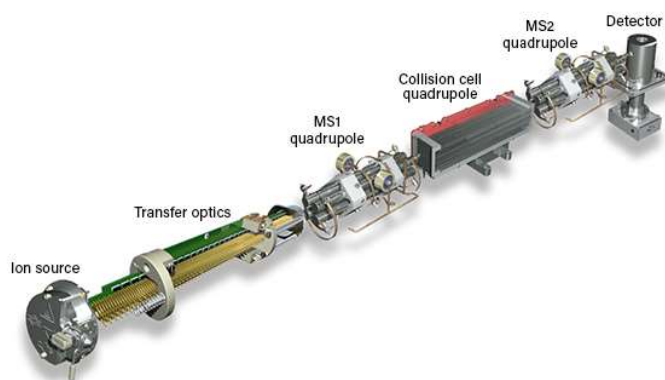


Figura 18. Elementos principales del analizador Xevo TQTM

(Fuente: <http://blog.waters.com/wp-content/uploads/2017/03/triple-quadrupole-1.png>)
Visitado 31/05/2017

El analizador está equipado con un elemento llamado "transfer optics" o guía de iones, una guía por la cual viajan los iones desde la salida de la fuente de ionización hasta la entrada de Q1. El objetivo de esta guía, es enfocar el haz de iones hacia Q1. La peculiaridad del "transfer optics" del Xevo TQTM (ver en Figura 19) es su configuración que permite que el exceso de disolvente y las moléculas no cargadas que hayan podido entrar al analizador, no continúen su recorrido a través de los cuadrupolos. Este diseño fue patentado por Waters y se denomina StepWave⁸⁶.

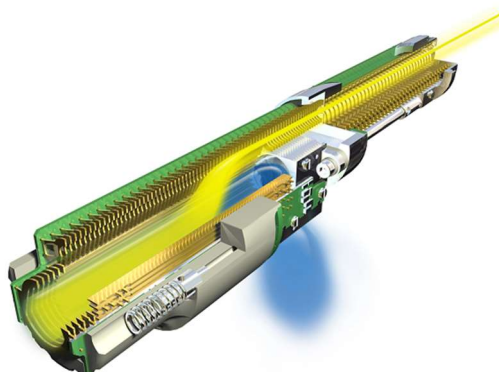


Figura 19. Guía StepWave de Waters. La línea amarilla representa a los iones mientras que la línea azul al disolvente y sobre todo compuestos no ionizados en la fuente.

(Fuente: http://blog.waters.com/wp-content/uploads/2016/05/StepWaveXS_ions-and-neutrals-small.png) Visitado 31/05/2017

⁸⁶ <http://blog.waters.com/pumping-ions-an-exercise-in-engineering-sensitivity-into-the-xevo-tq-xs-mass-spectrometer>

Esta tecnología permite diseñar conos de extracción en las fuentes de ionización con un orificio mucho mayor por lo que la cantidad de iones que entra al analizador se ve aumentada, traduciéndose en una mayor sensibilidad.

La espectrometría de masas QqQ presenta varios modos de trabajo:

- ✓ Product ion scan. En Q1 se selecciona el ion padre de interés y todos los hijos de este se detectan y registran.
- ✓ Precursor ion scan. El objetivo es detectar todos aquellos iones precursores que originan un ion hijo concreto que se fija en Q3.
- ✓ Neutral loss scan. Se realiza un barrido tanto en Q1 como en Q3 pero fijando una diferencia de m/z entre los barridos. En este modo solamente se obtiene respuesta para aquellos iones en el Q1 que sufran una pérdida de masa igual a la diferencia establecida entre los cuadrupolos.
- ✓ Selected reaction monitoring (SRM). Es el modo de trabajo recomendado para análisis cuantitativo de trazas. El Q1 y el Q3 están fijados para fragmentar un único ion precursor y detectar un solo ion hijo. Este modo de trabajo sólo se usa para el análisis de sustancias previamente pre-seleccionadas (*target*), puesto que requiere que los iones precursores y producto sean conocidos. A cada análisis SRM se le conoce como transición, si se analizan varias transiciones simultáneamente, el modo de trabajo se denomina *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

8. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

8.1. Fundamento de la técnica

La técnica de extracción asistida por ultrasonidos es una técnica de extracción instrumental que permite completar un proceso de extracción en pocos minutos con alta reproducibilidad, reduciendo el consumo de disolvente y simplificando la manipulación. Además se usa en otras operaciones como la homogenización, dispersión de suspensiones acuosas o lavado⁸⁷.

La muestra se pone en contacto con el disolvente y se somete a una radiación ultrasónica. La alta eficiencia de la extracción se debe principalmente a sus efectos mecánicos, que favorecen la migración de los compuestos desde la matriz de la muestra al disolvente sin cambios en las propiedades estructurales y moleculares.

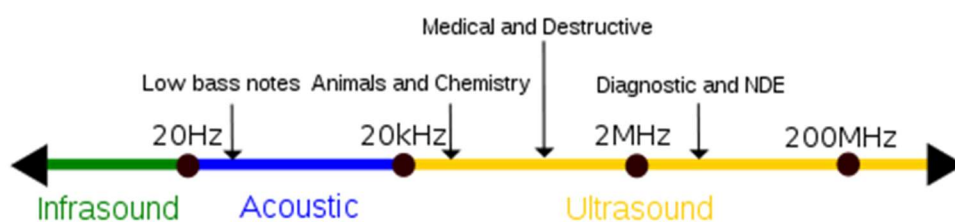


Figura 20. Espectro de frecuencias del sonido.

(Fuente: <https://physics.stackexchange.com/questions/23418/is-there-an-upper-frequency-limit-to-ultrasound>) Visitado 01/06/2017

Las ondas de ultrasonido (Figura 20) tienen una frecuencia mayor que el rango audible de los seres humanos (10-16 kHz)⁸⁸. Su efecto se ejerce a través de fenómenos de cavitación acústica que se refiere a la formación, crecimiento e implosión de burbujas que ocurren durante la propagación de una onda de

⁸⁷ Luque-García, J.L.; Luque de Castro, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003, 22, 41-47.

⁸⁸ Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 34, 540-560.

ultrasonido en un medio líquido⁸⁹. Cuando una onda de ultrasonidos se propaga a través de un líquido se producen ciclos de expansión y compresión. La compresión hace que las moléculas se acerquen y choquen. Durante la fase de expansión, se ejerce una presión negativa, separando las moléculas. La magnitud de la presión negativa depende de la naturaleza y pureza del líquido⁹⁰. A una intensidad suficiente de una onda sonora, durante una fase de expansión las fuerzas de atracción entre las moléculas pueden ser superadas, generando una cavidad en el líquido, o lo que es lo mismo, una burbuja de cavitación. Al proceso de expansión también se le denomina fase de rarefacción que se refiere al proceso de disminución de la densidad de un cuerpo. Es de esperar que en la fase de creación de burbujas, la densidad del líquido disminuya.

Las burbujas son capaces de crecer por coalescencia y/o difusión ya que los gases disueltos en el líquido entrarán en la burbuja en la fase de expansión y no será expulsada hasta el ciclo de compresión.

Cuando el tamaño de estas burbujas alcanza un valor crítico, colapsan durante un ciclo de compresión y se crea un punto caliente transitorio. El colapso de las burbujas de cavitación genera condiciones locales extremas: temperaturas determinadas hasta aproximadamente 5000 K⁹¹ y presiones estimadas alrededor de 50-1000 atm⁹². El proceso se muestra en la Figura 21.

⁸⁹ Kentish, S.; Ashokkumar, M. The Physical and Chemical Effects of Ultrasound. 2011, 1-12.

⁹⁰ Mason, T.J.; Lorimer, J.P.: General Principles. In *Applied Sonochemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003; pp 25-74.

⁹¹ Flint, E.B.; Suslick, K.S. The Temperature of Cavitation. *Science*, 1991, 253, 1397.

⁹² Suslick, K.S.; Price, G.J. Applications of Ultrasound to Materials Chemistry. *Annual Review of Materials Science*, 1999, 29, 295-326.

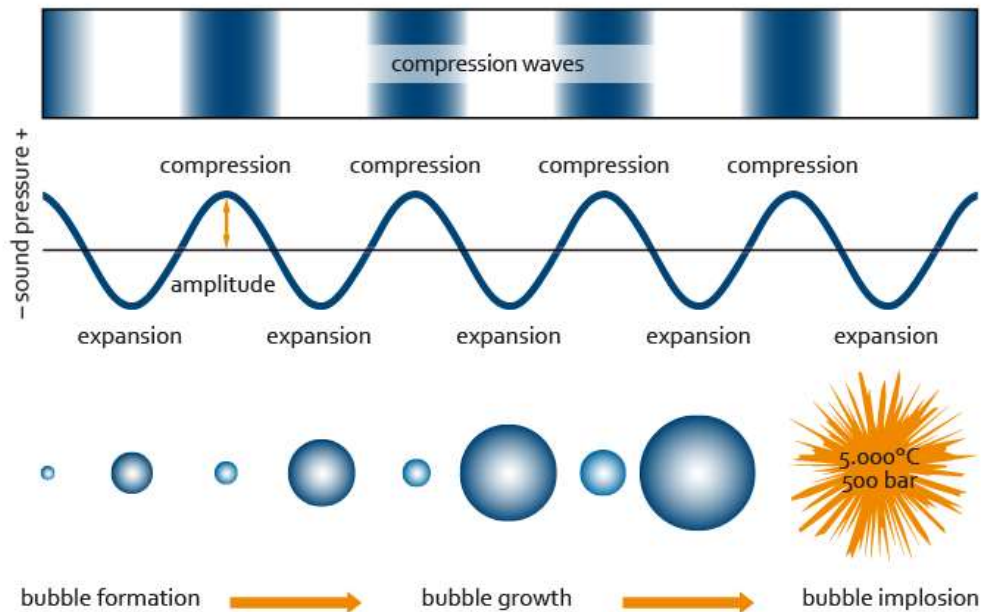


Figura 21. Proceso cíclico de compresión-expansión en un líquido sometido a ultrasonidos. (Fuente: <http://www.ultrawaves.de/technology/ultrasonic-disintegration>) Visitado 01/06/2017

Si las burbujas de cavitación acústica colapsan cerca y sobre la superficie de un material sólido, produce varios fenómenos físicos⁹²:

- ✓ El colapso de la burbuja genera chorros de alta velocidad de líquidos en la superficie y crea daños por ondas de choque.
- ✓ Los choques pueden conducir a la fragmentación localizada del sólido, o lo que es lo mismo, conseguir erosionarlo.
- ✓ El sólido, en nuestro caso la muestra, se va rompiendo en partículas más pequeñas y exponiendo una mayor superficie al disolvente.
- ✓ Este hecho, junto a las altas temperaturas y las altas presiones, provocan el aumento de la solubilidad y la difusividad, favoreciendo la penetración y el transporte. Esto justifica el alto poder extractivo de esta técnica.

8.2. Equipo para extracción por ultrasonidos

Existen dos dispositivos comúnmente empleados para la extracción asistida por ultrasonidos, los baños y las sondas. Aunque los baños son los más usados, presentan algunas desventajas, como la falta de uniformidad en la distribución de la energía y la disminución de la potencia en el tiempo. Esto se traduce en una reducción de la repetibilidad y la reproducibilidad. En cambio, los sistemas que emplean sondas al enfocar su energía en una región localizada, presenta ciertas ventajas, por lo que proporciona una cavitación más eficiente.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha utilizado el sistema de sonda mostrado en la Figura 22.

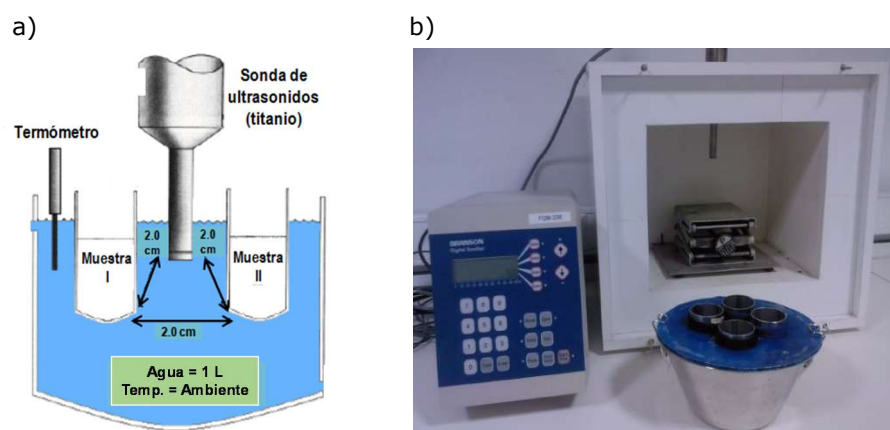


Figura 22. (a) Esquema del proceso de extracción mediante ultrasonidos, (b) equipo de ultrasonido.

Como se puede ver en la figura anterior, la sonda y la mezcla muestra-disolvente (depositada en celdas cilíndricas de acero inoxidable), se introducen en un baño de agua. Con esta modalidad se pueden realizar varias extracciones a la vez ya que la sonda no está en contacto directo con la muestra y el disolvente.

Las variables inherentes más destacadas de esta manera de operar son: cantidad y temperatura del agua del baño; forma y material de la celda de extracción; número de celdas, y la distancia entre la sonda y las celdas. Para

obtener la mejor reproducibilidad posible, estas variables se fijaron al inicio de la Tesis Doctoral, en base a estudios previos⁹³, y todos los análisis se realizaron siempre en las condiciones mostradas en la Figura 22a con cuatro celdas por extracción.

La sonda de ultrasonido se compone de tres elementos. En la Figura 23a, se muestran dichos elementos:

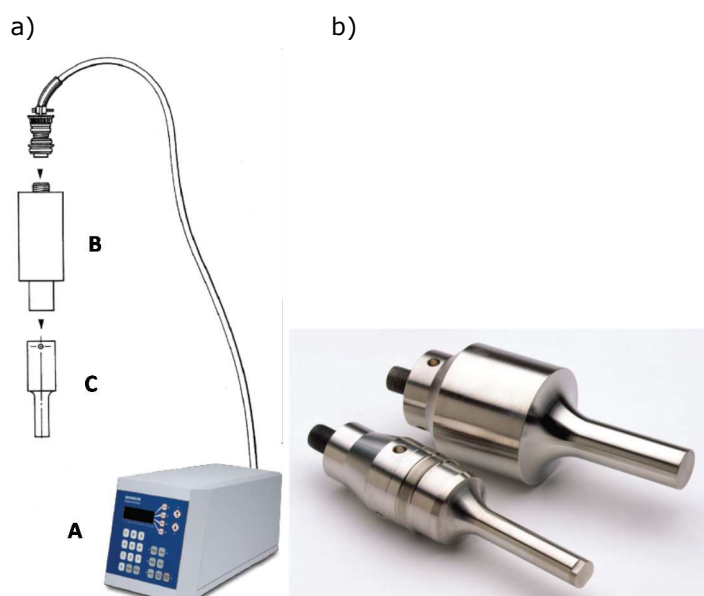


Figura 23. (a) Elementos de la sonda de ultrasonidos usada en la Tesis Doctoral (b) Dos tipos de resonador (Fuente: http://www.emersonindustrial.com/en-US/documentcenter/BransonUltrasonics/Processing/Disruptor_Horns.pdf)

- ✓ Fuente de alimentación (A). Proporciona la energía para producir la onda ultrasónica.
- ✓ Zona B. Convierte la energía eléctrica en una onda. En el caso del equipo usado en esta investigación, es de 20 kHz.

⁹³ Nascentes, C.C.; Korn, M.; Sousa, C.S.; Arruda, M.A.Z. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimization conditions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2001, 12, 57-63.

- ✓ Zona C, sonda propiamente dicha. También llamado resonador. En ella la amplitud de la onda es incrementada en un rango programable y se transmite al medio. Los tipos de sonda, muy variados, y suelen ser diseñados para aplicaciones concretas. La sonda utilizada en los análisis fue la más pequeña de las mostradas en la Figura 23b. Se trata de una sonda que se caracteriza por acabar en una punta desechable y enroscable de titanio.

CAPÍTULO I
Materiales y Métodos

1. PATRONES, REACTIVOS Y DISOLVENTES

1.1. Patrones

Todos los patrones utilizados se muestran en la siguiente Tabla.

Tabla I.1. Listado y características de los patrones analíticos internos.

Nombre	Siglas	CAS	¹ pK _a	% Pureza	Marca
Diclofenaco sódico	DIC	15307-79-6	4.2	≥98	Alfa-Aesar
Ácido mefenámico	MEF	61-68-7	4.2	98	Alfa-Aesar
Ácido flufenámico	FLU	530-78-9	3.7	AS ²	Sigma-Aldrich
Ketoprofeno	KET	22071-15-4	4.5	≥98	Sigma-Aldrich
Naproxeno sódico	NAP	26159-34-2	4.2	98	Alfa-Aesar
Irbesartan	IRB	138402-11-6	4.2	≥98	Cayman Chemical
Bezafibrato	BEZ	41859-67-0	3.3	≥98	Sigma-Aldrich
Fenofibrato	FEN	49562-28-9	---	≥99	Sigma-Aldrich
Gemfibrozil	GEM	25812-30-0	4.7	≥99	Sigma-Aldrich
Metilparabeno	MPB	99-76-3	8.3	99	Alfa-Aesar
Etilparabeno	EPB	120-47-8	8.3	99	Alfa-Aesar
Propilparabeno	PPB	94-13-3	8.2	≥99	Alfa-Aesar
Butilparabeno	BPB	94-26-8	8.2	≥99	Alfa-Aesar
4-Hidroxibenzofenona	4-OH-BP	1137-42-4	8.1	98	Sigma-Aldrich
Benzofenona 1	BP1	131-56-6	7.7	99	Sigma-Aldrich
Benzofenona 3	BP3	131-57-7	7.6	98	Sigma-Aldrich
Benzofenona 6	BP6	131-54-4	6.8	98	Alfa-Aesar
Benzofenona 8	BP8	131-53-3	7.1	98	Sigma-Aldrich
Ácido 2-((2-clorobenzoil)amino)benzoico	BEN	---	---	98	Sigma-Aldrich
Ácido 2-(4-cloro-3-metil-phenoxi)-2-metil-propiónico	MET	62443-89-4	3.2	98	Sigma-Aldrich
Ketoprofeno-D ₃	KET-D ₃	159490-55-8	---	AS	Sigma-Aldrich
Etil-D ₅ -parabeno	EPB-D ₅	126070-21-1	---	98	TRC Toronto

(¹) Obtenidos de la base de datos de SciFinder. (²) Calidad estándar analítico

Los patrones se disolvieron en metanol calidad HPLC excepto el KET-D₃ y EPB-D₅ que se disolvieron en acetonitrilo calidad masas. Los últimos cuatro compuestos fueron los patrones internos y se prepararon a una concentración de 200 µg/mL, al igual que el ácido mefenámico, mientras que el resto se prepararon a 1000 µg/mL.

1.2. Reactivos

- ✓ PSA (Amina Primaria Secundaria) 40-60 µm de Scharlau.
- ✓ Silicagel 63-37 µm de Sigma-Aldrich.
- ✓ Florisil 25-149 µm de Sigma-Aldrich.
- ✓ Óxido de aluminio 100 µm de Sigma-Aldrich.
- ✓ Adsorbente C18 40 µm de J.T. Baker.
- ✓ Sulfato de magnesio anhidro 96% de Panreac.
- ✓ Sulfato de amonio anhidro 99% de Panreac.
- ✓ Cloruro potásico 99% de Panreac.
- ✓ Cloruro sódico 99-100.5% de Panreac.
- ✓ Formaldehído para análisis, 37% de J.T. Baker.
- ✓ Azida sódica para análisis, 99% de Sigma-Aldrich.
- ✓ Cloruro cálcico anhidro, ≥99.9% de Sigma-Aldrich
- ✓ Amoníaco al 25% para LC-MS de Scharlau.

- ✓ Ácido fórmico 98% para LC-MS de Sigma-Aldrich.
- ✓ Ácido acético purísimo para LC-MS de Sigma-Aldrich.

1.3. Disolventes

- ✓ Agua calidad LC-MS de Prolabo.
- ✓ Agua mili-Q, obtenida en el equipo de osmosis inversa Milli RO 12 Plus (MILLIPORE) acoplado con un equipo de purificación Milli Q Plus 185 (MILLIPORE). La conductividad nunca superó el valor de 18 $\mu\text{S}/\text{cm}$.
- ✓ Acetona calidad HPLC de Prolabo.
- ✓ Ácido acético glacial de J.T. Baker.
- ✓ Acetato de etilo calidad HPLC de Prolabo.
- ✓ Acetonitrilo calidad LC-MS de Prolabo.
- ✓ Acetonitrilo calidad ACS de Prolabo.
- ✓ Metanol calidad HPLC de Prolabo.
- ✓ Metanol calidad LC-MS de Prolabo.
- ✓ Metanol calidad ACS de Prolabo.

2. MATERIAL DE LABORATORIO

A continuación se enumera el material de laboratorio usado en el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral.

- ✓ Matraces aforados clase A de diferentes volúmenes.
- ✓ Pipetas graduadas y aforadas clase A de diferentes volúmenes.
- ✓ Probetas graduadas de clase A de diferentes volúmenes.
- ✓ Micropipetas automáticas de diferentes volúmenes (10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL y 1-10 mL).
- ✓ Viales de vidrio para cromatografía de 250 μL y 1.5 mL.
- ✓ Tapones para viales de cromatografía.
- ✓ Viales de vidrio de 30 mL y los tapones correspondientes.
- ✓ Viales eppendorf de 1.5 y 2.0 mL.
- ✓ Frascos de polipropileno de 50 mL.
- ✓ Tubos falcon con faldilla de 50 mL.
- ✓ Botellas de vidrio ámbar de diferentes volúmenes.
- ✓ Botellas de vidrio borosilicato de 250, 500 y 1000 mL.
- ✓ Membranas de filtración 0.22 μm de Nylon y PVCF, empleadas para la filtración de los disolventes cromatográficos y las disoluciones de los estudios de laboratorio de adsorción-desorción.

- ✓ Jeringas de 2 y 5 mL.
- ✓ Agujas de 0.8 x 40 mm.
- ✓ Equipo de filtración *Milipore* provisto de portafiltros analítico de soporte de vidrio sinterizado y matraz kitasato para vacío de 1 L.
- ✓ Pipetas Pasteur de plástico y vidrio, pesasustancias y vasos de precipitado.

La limpieza del material de vidrio en contacto con extractos o muestras se realizó con detergente, enjuague con abundante agua y posterior uso de mezcla crómica. El material de vidrio en contacto con disoluciones preparadas de analitos se lavó únicamente con agua y mezcla crómica. Finalmente, todo el material se enjuagó con abundante agua desionizada.

3. INSTRUMENTACIÓN

Los instrumentos empleados para la realización de la parte experimental de la presente Tesis Doctoral fueron:

- ✓ Cromatógrafo Waters Acquity UPLC™ H-Class acoplado a espectrómetro de masas triple cuadrupolo. Provisto de:
 - Bomba: Quaternary Solvent Manager.
 - Inyector: Sample Manager-FTN.
 - Detector: Xevo TQS™ de Waters equipado con guía iónica StepWave y una fuente de ionización electrospray (ESI) en forma de Z (Z-spray™).
- ✓ Cromatógrafo Waters Acquity UPLC™ H-Class acoplado a espectrómetro de masas de cuadrupolo simple. Provisto de:
 - Bomba: Quaternary Solvent Manager.
 - Inyector: Sample Manager-FTN.
 - Detector: ACQUITY QDa equipado con guía iónica StepWave y una fuente de ionización electrospray (ESI) en forma de Z (Z-spray™).
- ✓ Sonda de ultrasonidos Digital Sonifier S450D (BRANSON) provista de:
 - Convertidor tipo 102.
 - Resonador estándar de 12.7 mm de diámetro.
 - Punta enroscable de 12.7 mm de diámetro.
 - Sonda de temperatura.
 - Frascos de acero inoxidable de 125 mL con forma cilíndrica.

- ✓ Balanzas analíticas Mettler AE 163 y AND GX-400.
- ✓ Equipo multi-paramétrico portátil EUTECH INSTRUMENTS PCD 650 equipado con electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl (KCl 3M) Crison.
- ✓ Baño de ultrasonidos Selecta, modelo Ultrasons-HD.
- ✓ Agitador giratorio J.P. SELECTA con capacidad para hasta 8 frascos.
- ✓ Agitador giratorio SBS modelo AN-2 con capacidad para 10 frascos.
- ✓ Agitador vortex de IKA.
- ✓ Placa agitadora-calefactora HEILDOPH, modelo 2002.
- ✓ Centrífuga Orto Alresa, modelo Digicen 21.
- ✓ Centrífuga Hettich, modelo Universal 32.
- ✓ Estufa de secado de 50 - 300 °C, HEAREUS.
- ✓ Bloque calefactor SBH 200D/3 y concentrador de muestra SBHCONC/1, Stuart®.
- ✓ Tamices metálicos MECÁNICA CIENTÍFICA, de distintas mallas (mallas nº 5; nº 14; nº 30 – ASTM).
- ✓ Barrena toma muestras de suelos, EDELMAN, con diámetro de 7 cm y longitud del bastón de 125 cm.
- ✓ Liofilizador SCANVAC CoolSafe™.

4. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- ✓ Software MassLynx versión 4.1. Programa de gestión y tratamiento de los datos obtenidos con el cromatógrafo Waters Acquity UPLC™ H-Class-Xevo TQS™.
- ✓ Software Empower versión 3. Programa de gestión y tratamiento de los datos obtenidos con el cromatógrafo Waters Acquity UPLC™ H-Class-QDA.
- ✓ Paquete Microsoft® Office version 2013: Word®, Excel® y PowerPoint®.
- ✓ Statgraphics Centurion XVI versión 16.2.04, StatPoint Technologies.
- ✓ Minitab® versión 17.1.0, Minitab SARL.
- ✓ SciDavis version 1.17, software de código abierto.

5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS ANALÍTICOS

5.1. Optimización de los métodos analíticos

En varias etapas del desarrollo de un método analítico como el procesado o extracción de la muestra, y en el caso de los métodos cromatográficos, en la separación y detección; es necesario optimizar un gran número de variables que influyen en los datos analíticos. Tan solo algunas variables del detector Xevo TQS™ se optimizaron de forma automática, para el resto fue necesario recurrir a métodos estadísticos.

La forma más recurrente para optimizar alguna variable en la experimentación química, se basa en el método univariante en el cuál se diseñan varios experimentos en los que solo se modifica una variable en un rango determinado y se fijan el resto. Siempre que las experiencias se hayan hecho como mínimo por duplicado, es posible aplicar el análisis de varianza simple (ANOVA, **AN**alysis **Of** **VA**riance, según terminología inglesa) y mediante el test de fallo de ajuste basado en la F de Snedecor se puede decidir si los diferentes niveles evaluados de la variable en el rango estudiado son estadísticamente distintos entre sí. Si es así, se elige el valor de la variable que origine la respuesta óptima. A continuación, se procede a repetir el procedimiento con la siguiente variable.

Esta metodología presenta algunos inconvenientes como el gran número de experimentos que son necesarios realizar con lo que ello supone (tiempo y dinero), pero sobre todo, no puede detectar la existencia de interacciones entre las variables. Este hecho es muy importante porque, en el caso de que existan, los valores óptimos obtenidos mediante métodos univariantes pueden ser erróneos.

Para solventar este problema y poder evaluar la posible interacción, la alternativa es aplicar métodos multivariantes. En las últimas décadas su uso se ha extendido gracias, en gran medida, al empleo de software que facilita enormemente el diseño de las experiencias y la evaluación de los resultados.

5.1.1. Diseño de experimentos

Los métodos multivariantes abarcan un gran número de metodologías estadísticas y el que se aplica en una optimización es el diseño de experimentos (DoE)⁹⁴ que además de contemplar la posible interacción entre las variables, reduce el número de experiencias y proporciona el mayor conocimiento posible del proceso en estudio. Por otro lado, es capaz de determinar que variables son independientes y significativas sin necesidad de realizar réplicas de las todas las experiencias.

La mayor parte de la optimización de los métodos de extracción se desarrolló usando el diseño de experimentos aunque en algunas etapas también se recurrió al método univariante.

Para abordar correctamente la optimización multivariante primero es necesario seleccionar las variables apropiadas y respuesta(s) a través de diseños de diagnósticos. A continuación, hay que elegir el diseño experimental más adecuado para optimizar las variables seleccionadas. Una vez obtenidos el número de experiencias y las respuestas derivadas de las mismas (por ejemplo, la recuperación del analito), es necesario ajustar el modelo matemático a los datos experimentales y revisar la idoneidad del modelo propuesto. Por último, para obtener los valores óptimos de cada variable es necesario recurrir a una situación de compromiso con todos los analitos.

Para construir un diseño experimental, independientemente del tipo que sea, es necesario crear o buscar en bibliografía, la matriz codificada del diseño. Esta matriz codifica los valores que puede tomar los factores implicados en el diseño. Los valores extremos de los factores siempre se codifican con -1 y 1. Una vez obtenida dicha matriz, solo hay que reemplazar los códigos por los valores adecuados de las variables experimentales que dependerán del rango estudiado de las mismas.

⁹⁴ Miller, J.C.; Miller, J.N. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; 6th ed.; Pearson. Harlow, 2010; pp. 186-188

a) *Selección de variables. Diseños de cribado*

Es muy habitual que en un proceso de extracción, el número de factores o variables sea elevado. Puesto que el número de experimentos que suele requerir un estudio detallado u optimización de un sistema aumenta exponencialmente con el número de factores estudiados, es necesario reducir la lista de variables a un número manejable. Por eso, es crucial identificar aquellas influyentes, es decir, aquellas que al modificarlos afecten significativamente a la respuesta. Para ello se utilizan los diseños de cribado o diagnóstico, entre los que destacan los diseños factoriales fraccionados de dos niveles y dentro de ellos, uno de los más importantes y el usado en esta memoria, el diseño Plackett-Burman.

Estos diseños identifican las variables más importantes, pero el conocimiento sobre las interacciones entre las mismas es muy limitado, en el caso del Plackett-Burman las interacciones son ignoradas. El diseño factorial fraccionado⁹⁵ con dos niveles (1 y -1) contiene solo una fracción del diseño factorial completo y puede examinar los factores, f , a dos niveles usando 2^{f-v} experimentos ($v = 1, 2, 3, \dots, n$). En un diseño factorial completo a dos niveles, $v = 0$.

La peculiaridad del diseño Plackett-Burman, como ya se ha mencionado, es que no considera ninguna interacción entre los factores. A esto se le denomina diseño saturado. El máximo de factores que se puede usar en estos diseños es $f = N - 1$ donde N es el número de experimentos y debe ser múltiplo de 4. Si el número de factores examinados es inferior a $f = N - 1$, es posible aplicar un subconjunto de diseño de Plackett-Burman para N ensayos.

b) *Optimización de variables. Metodología de superficie de respuesta*⁹⁶

Una vez que los factores importantes que afectan a la respuesta han sido identificados, es necesario encontrar los valores óptimos de los factores. Para

⁹⁵ Sharif, K.M.; Rahman, M.M.; Azmir, J.; Mohamed, A.; Jahurul, M.H.A.; Sahena, F.; Zaidul, I.S.M. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 2014, 124, 105-116.

⁹⁶ Bezerra, M.A.; Santelli, R.E.; Oliveira, E.P.; Villar, L.S.; Escalera, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 2008, 76, 965-977.

este fin se usa la metodología de superficie de respuesta. Para comprender en qué consiste esta metodología es necesario definir la función de respuesta predicha. Al decir que un valor de respuesta Y depende de los valores que adquieran f factores estamos diciendo que existe una función matemática g dependiente de f , es decir, $Y = g(f_1, f_2, \dots, f_n)$. Las respuestas experimentales se deben ajustar matemáticamente a dicha función. Si esta función es un polinomio de primer orden, al representar los valores predichos de la respuesta frente a las variables, el gráfico (superficie de respuesta) no debe presentar ninguna curvatura. Este caso particular es el correspondiente a los diseños factoriales de dos niveles que se pueden usar cuando no existan efectos de segundo orden significativos, como interacciones entre las variables. Si queremos evaluar dichas interacciones es necesario introducir en la función polinomial términos adicionales de segundo orden o cuadráticos. Dichas funciones son:

Para dos variables: $Y = b_0 + b_1 f_1 + b_2 f_2 + b_{11} f_1^2 + b_{22} f_2^2 + b_{12} f_1 f_2$

Para tres variables: $Y = b_0 + b_1 f_1 + b_2 f_2 + b_3 f_3 + b_{11} f_1^2 + b_{22} f_2^2 + b_{33} f_3^2 + b_{12} f_1 f_2 + b_{13} f_1 f_3 + b_{23} f_2 f_3$

donde $b_0, b_1, b_2 \dots b_{23}$ son los coeficientes.

La visualización de la ecuación del modelo predicho se puede obtener por el gráfico de la superficie de respuesta. Por lo general, una representación bidimensional de un gráfico tridimensional se puede dibujar. Por tanto, si hay tres o más variables, la trama de visualización es posible sólo si una o más variables se establecen en un valor constante.

Para realizar una superficie de respuesta de segundo orden es necesario estudiar al menos tres niveles de los factores. Dependiendo de la metodología usada para determinar dichos niveles, nos encontramos con diferentes tipos de diseños experimentales. Los más destacados son: factorial de tres niveles, Box-Behnken, compuesto central y Doehlert.

- ✓ **Diseño factorial de tres niveles.** Probablemente el menos utilizado ya que el número de experimentos N es muy alto, $N = 3^f$, con solo tres factores, los ensayos necesarios son 27. En cambio, para dos variables sí que es más utilizado. La Tabla I.2 muestra las matrices codificadas experimentales para la optimización de dos variables usando este diseño.

Tabla I.2. Matriz codificada del diseño factorial de tres niveles para dos variables.

Factor 1	Factor 2	Factor 1	Factor 2
-1	-1	0	1
-1	0	1	-1
-1	1	1	0
0	-1	1	1
0	0		

- ✓ **Diseños de compuesto central (DCC).** Combinan diseños factoriales completos o fraccionados de dos niveles con puntos adicionales axiales o en forma de estrella y al menos un punto en el centro de la región experimental investigada. En la Tabla I.3 se recogen las matrices de experimentos para dos y tres variables.

Tabla I.3. Matrices codificadas para el diseño de compuesto central.

2 Factores		3 Factores		
Factor 1	Factor 2	Factor 1	Factor 2	Factor 3
-1	1	-1	-1	-1
1	-1	1	-1	-1
-1	1	-1	1	-1
1	1	1	1	-1
-a	0	-1	-1	1
a	0	1	-1	1
0	-a	-1	1	1
0	a	1	1	1
0	0	-a	0	0
		a	0	0
		0	-a	0
		0	a	0
		0	0	-a
		0	0	a
		0	0	0

Como se observa, existen cinco niveles para cada factor (- α , -1, 0, +1, + α). El punto central, C_p , corresponde al experimento en el cual el nivel de todos los factores es 0. En este tipo de diseños, el número total de experimentos es $N = f^2 + 2f + C_p$ y α es 1.41, 1.68 y 2.00 para dos, tres y cuatro variables respectivamente.

- ✓ **Diseño Box-Behnken**^{97,98}. Los puntos experimentales en un Box-Behnken se encuentran equidistantes al punto central formando una hiperesfera. Requieren un menor número de experimentos que los DCC, concretamente, $N = 2f(f - 1) + C_p$. Otra de las características es que solo hay tres niveles igualmente espaciados (-1, 0, +1). La matriz de experimentos de tres variables se puede ver en la Tabla I.4.

Tabla I.4. Matriz codificada para el diseño Box-Behnken de tres factores.

Factor 1	Factor 2	Factor 3
-1	-1	0
1	-1	0
-1	1	0
1	1	0
-1	0	-1
1	0	-1
-1	0	1
1	0	1
0	-1	-1
0	1	-1
0	-1	1
0	1	1
0	0	0

⁹⁷ Box, G.E.P.; Behnken, D.W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*, 1960, 2, 1455-1475.

⁹⁸ Ferreira, S.L.; Bruns, R.E.; Ferreira, H.S.; Matos, G.D.; David, J.M.; Brandao, G.C.; da Silva, E. G.; Portugal, L.A.; dos Reis, P.S.; Souza, A.S.; dos Santos, W.N. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597, 179-186.

- ✓ **Diseño Doehlert**⁹⁹. Para dos variables, este tipo de diseño está representado por un punto central rodeado por seis puntos de un hexágono regular, y para tres variables, los puntos representan un sólido geométrico llamado cuboctaedro. La Tabla I.5 muestra las matrices Doehlert para dos y tres variables.

Tabla I.5. Matrices codificadas para el diseño Doehlert.

2 Factores		3 Factores		
Factor 1	Factor 2	Factor 1	Factor 2	Factor 3
0	0	0	0	0
1	0	1	0	0
0.5	0.866	0.5	0.866	0
-1	0	0.5	0.289	0.817
-0.5	-0.866	-1	0	0
0.5	-0.866	-0.5	-0.866	0
-0.5	0.866	-0.5	-0.289	-0.817
		0.5	-0.866	0
		0.5	-0.289	-0.817
		-0.5	0.866	0
		0	0.577	-0.817
		-0.5	0.289	0.817
		0	-0.577	0.817

Como se observa en la matriz mostrada, las características de este diseño son muy distintas a la de los otros. El número de experimentos en este caso es $N = f^2 + f + C_p$ pero la principal diferencia con el resto es que cada variable se estudia en un número diferentes de niveles, algo importante cuando algunas variables están sujetas a restricciones, tales como el costo y / o limitaciones instrumentales o cuando es interesante estudiar una variable en un número mayor o menor de los niveles.

⁹⁹ Doehlert, D.H. Uniform Shell Designs. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*, 1970, 19, 231-239.

En esta Tesis Doctoral, los diseños que se utilizaron fueron el Box-Behnken y el Doehlert para tres y dos factores, respectivamente.

Después de crear el diseño, realizar los experimentos y determinar la respuesta en cada uno de ellos, y con la ayuda de un programa informático, se ajustan los datos experimentales al modelo matemático pertinente, es decir, a la función de respuesta predicha que corresponda según el número de variables. A continuación, a través del análisis de varianza *ANOVA*, se comprueba si la función de regresión se adecua al comportamiento del sistema real. Para este objetivo se usa la prueba de fallo de ajuste ("*lack-of-fit test*", *lof*), mencionado en la optimización univariante. Este test compara el valor del estadístico F de Snedecor calculado con el tabulado a un nivel de confianza dado. Esta relación se evalúa mediante el cálculo del valor P_{lof} del test de fallo de ajuste. Si P_{lof} es mayor a 5%, se acepta la validez del diseño. En el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se empleó un 95% de nivel de confianza. Para aplicar la prueba de fallo de ajuste, el diseño experimental se debe replicar al menos en su punto central.

Como en todo modelo de regresión, es posible calcular el coeficiente de determinación (R^2), de forma que, cuanto más se aproxime R^2 a la unidad, mejor será el ajuste de la función de respuesta predicha a las respuestas reales.

5.1.2. Optimización de múltiples respuestas

Los métodos analíticos desarrollados en esta Memoria son multiresiduo y multiclase, es decir, se determinan varios compuestos a la vez de distintas familias. Es de esperar que los óptimos de las variables sean diferente para cada analito, especialmente para compuestos de diferentes familias. Por lo tanto, es necesario llegar a una situación de compromiso que beneficie a todos los analitos para encontrar los valores óptimos de las variables.

Esta etapa es de vital importancia si los valores óptimos para cada respuesta se localizan en diferentes regiones ya que los cambios en el nivel de un factor

puede mejorar una respuesta de un analito pero tener un efecto muy negativo sobre otro.

Un enfoque para resolver el problema de la optimización de varias respuestas es el uso de una metodología multicriterio. Esta metodología se aplica cuando varias respuestas tienen que ser considerados al mismo tiempo y es necesario llegar a compromisos óptimos entre todas las respuestas. La función Derringer¹⁰⁰ es la metodología multicriterio más importante y más utilizada actualmente en la optimización de los procedimientos analíticos. Esta metodología se basa inicialmente en la construcción de una función de deseabilidad para cada respuesta individual. En resumen, las respuestas se transforman en un valor adimensional escalado, d_i . La escala de la función de deseabilidad individual oscila entre $d = 0$, para una respuesta completamente indeseable, y $d = 1$, para una respuesta totalmente deseada. Esta transformación hace que sea posible combinar los resultados obtenidos para las respuestas en diferentes órdenes de magnitud.

Con las deseabilidades individuales, entonces es posible obtener la deseabilidad general, D , que se define como la media geométrica ponderada de las funciones de deseabilidad individuales, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m}$$

donde m es el número de respuestas estudiadas. Por lo tanto, el proceso de optimización simultánea se reduce a encontrar los valores de factores que demuestran la máxima deseabilidad global.

¹⁰⁰ Murphy, T.E.; Tsui, K.L.; Allen, J.K. A review of robust design methods for multiple responses. *Research in Engineering Design*, 2005, 16, 118-132.

5.2. Calibración del método analítico

5.2.1. Modelo de calibración

La ISO define la calibración como “*el conjunto de operaciones que permiten establecer en determinadas condiciones experimentales, la relación existente entre los valores indicados por el instrumento con los valores obtenidos con la medida de un valor conocido*”.

Pero surge de modo natural la pregunta, ¿cuál es la relación analítica que mejor se ajusta a nuestros datos? En análisis químico, lo más habitual es usar el método de mínimos cuadrados, un procedimiento general que nos permite responder esta pregunta. Además, cuando la relación entre la variable independiente X (concentración) y dependiente Y (señal instrumental), el método de mínimos cuadrados se denomina también regresión lineal, definida por la expresión

$$Y = a + b X$$

donde a y b son dos parámetros, ordenada en el origen y pendiente, respectivamente, estimados a partir de los datos experimentales. Para determinar los mejores valores de a y b es necesario minimizar la siguiente ecuación:

$$X^2 = \sum_i (y_i - (a x_i + b))^2$$

que es una medida de la desviación total de los valores observados y_i respecto de los predichos por el modelo lineal. Los valores a y b pueden obtenerse usando técnicas matemáticas que hacen uso del cálculo diferencial. Actualmente, la mayoría de los programas de análisis de datos, realizan el proceso de minimización de forma automática y dan los valores óptimos de a y b . Experimentalmente, es necesario partir de una serie de n pares de datos experimentales correspondientes a las concentraciones y señales analíticas.

5.2.2. Idoneidad del modelo de calibración

Para determinar la idoneidad del ajuste por mínimos cuadrados, el modelo debe cumplir las siguientes características: normalidad y homocedasticidad de los errores. Dado que los errores del modelo son desconocidos, los términos anteriores pueden y deben chequearse a partir de los residuos ordinarios¹⁰¹ (e_i), que se define como la diferencia entre la observación real (y_i) y la predicha por el modelo (\hat{y}_i). También se acostumbra usar el residuo estandarizado, el cual se obtiene al dividir el residuo ordinario entre la desviación estándar del residuo, y el residuo estudentizado, que es muy similar al anterior. Es muy habitual realizar el análisis de los residuos de forma gráfica.

Se considera que hay normalidad en los errores cuando al representar los residuos en un histograma, estos siguen una distribución normal como la representada en la Figura I.1a.

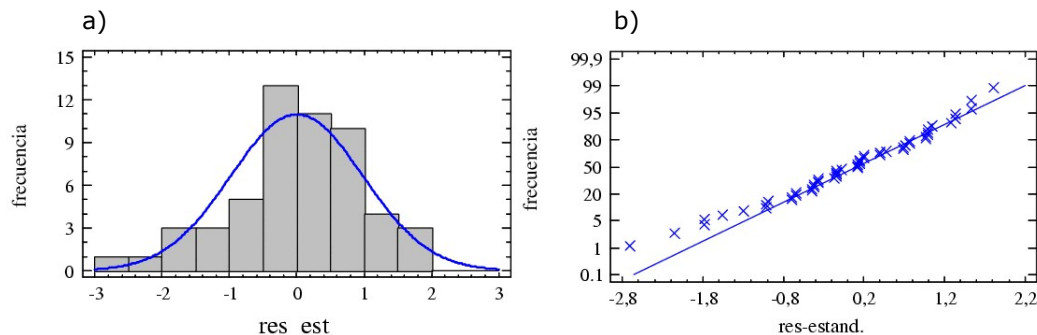


Figura I.1. Representación gráfica de residuos estandarizados en a) histogramas y b) gráfico de normalidad. (Fuente: http://dm.udc.es/assignaturas/estadistica2/sec4_3.html) Visitada 01/06/2017

También existe otro tipo de representación gráfica muy común denominado gráfico de normalidad (Figura I.1b). Si los puntos se aproximan a la recta, se acepta la hipótesis de normalidad.

Por otro lado, hay homocedasticidad si la varianza de los residuos es constante y no varía en todo el rango de la variable independiente estudiado.

¹⁰¹ López-González, E.; González-Such, J.; Lizasoain, L. Explicación del rendimiento a partir del contexto. Algunas propuestas de análisis gráfico y estadístico. Bordón, 2012, 64(2), 127-149.

Una manera sencilla de verificar la homocedasticidad es realizando un gráfico de los residuos frente a los valores predichos, \hat{y}_i . Si la varianza es constante, es de esperar que los residuos fluctúen alrededor del eje horizontal del gráfico de forma aleatoria, y que puedan ubicarse en una banda; si esto no ocurre, puede que la varianza no sea constante y por tanto haya heterocedasticidad.

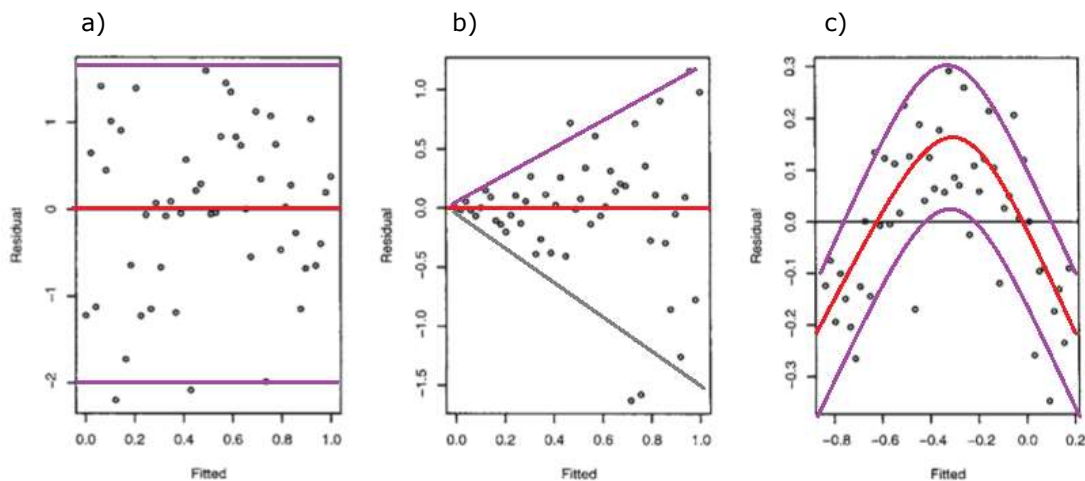


Figura 1.2. Homocedasticidad (a), heterocedasticidad (b) y correlación no lineal (c) de los residuos. (Fuente: <https://stats.stackexchange.com/questions/76226/interpreting-the-residuals-vs-fitted-values-plot-for-verifying-the-assumptions>) Visitada 01/06/2017

Como se muestra en la Figura 1.2, el caso a) es claramente homocedástico ya que no solo los residuos se distribuyen a en una franja constante, sino que además los residuos se encuentran de forma aleatoria tanto por encima como por debajo de la horizontal roja que representa el valor 0 para los residuos. Esto último no ocurre en el caso c) en el que la distribución puede que no siga una relación lineal, mientras que el caso b) es una distribución heterocidástica.

Además del análisis de los gráficos, en esta tesis se ha optado también por la evaluación tanto del coeficiente de determinación R^2 como del valor P del test de fallo de ajuste (P_{lof}). Si R^2 es próximo a 1 y el valor P_{lof} es mayor o igual al 5% se puede afirmar que la regresión lineal es válida para el conjunto de datos estudiados.

5.2.3. Rechazo de valores aberrantes o atípicos y puntos influyentes¹⁰²

La forma más inmediata de saber si existen puntos del calibrado que son anómalos es realizando una inspección visual al gráfico de residuos. Es importante detectar estos valores atípicos ya que pueden afectar drásticamente a los valores predichos, por ello, existe un criterio para su identificación basado también en el análisis de residuales.

Se consideran valores atípicos potenciales, aquellos cuyo residuo ordinario en valor absoluto es mayor a tres veces la desviación estándar respecto de la media. Si se usan los residuos estandarizados, mayores a 3 en valor absoluto indican la presencia de valores atípicos. Ocurre lo mismo para los residuos estudentizados.

Los puntos de influencia o valores influyentes son aquellos que tienen un impacto notable sobre los coeficientes del modelo, por eso es importante localizarlos. Se suele recurrir al estadístico o distancia de Cook¹⁰³ que se determina para cada residuo; si este estadístico es superior a la unidad, entonces el valor de dicho residuo se considera influyente. Siempre que se esté seguro de que los valores atípicos y puntos influyentes proceden de errores en la medición, es posible descartarlos.

5.3. Evaluación del efecto matriz

El efecto matriz consiste en una variación de la respuesta instrumental dada por una disolución que solamente contiene a los analitos y otra disolución que además contiene componentes de la matriz. En LC-MS y LC-MS/MS, al detectar el analito en presencia de otros compuestos, habitualmente se obtiene una disminución de la señal (supresión iónica). Este efecto es la principal desventaja de la técnica de ionización ESI.

¹⁰² Buenaño-Cordero, J.C.; De la Cruz-Cedeño, C. Verificación de calidad de modelos en regresión lineal- Software estadístico de regresión ERLA, 2010: http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/17152/RESUMEN_CICYT_Tesina_Buena%C3%B1o_DeLaCruz%20_I_CM.pdf?sequence=1&isAllowed=y

¹⁰³ Chatterjee, S.; Hadi, A.S. Influential Observations, High Leverage Points, and Outliers in Linear Regression. *Statistical Science*, 1986, 1, 379-393.

Es necesario corregirlo y la forma más habitual de hacerlo es realizando el calibrado con adición de patrón o bien el calibrado con patrón interno. En ambos, se construye el calibrado añadiendo cantidades crecientes y conocidas del analito a la muestra. Lo que los diferencia es lo siguiente:

- ✓ En el método de adición de patrón, para cada muestra es necesario construir un calibrado. Esto supone mucho volumen de trabajo si se analizan muchas muestras.
- ✓ En el método del patrón interno, la muestra debe estar libre de analito (muestra blanca). Este requisito supone un problema en el caso de no encontrar muestras blancas. Si esto ocurre, se deben buscar matrices lo más parecidas posible a la muestra o sintetizarlas.
- ✓ Para el calibrado del patrón interno, junto al analito se añade a cada punto del calibrado y a la misma concentración, otro compuesto de características similares al analito que recibe el nombre de patrón interno o surrogate si se añade antes de la extracción. Cuando la técnica de detección es la espectrometría de masas, lo más recomendable es que los surrogates sean los propios analitos deuterados.

Para evaluar la existencia del efecto matriz, se construyeron dos calibrados: externo (analitos junto con el surrogate disuelto en la fase móvil) y en matriz usando el método de patrón interno. A continuación, se compara las pendientes de ambos calibrados mediante un test estadístico:

1. Se comparan, mediante un test de la F-Snedecor, las desviaciones estándar de la regresión ($s_{x/y}$) de ambos calibrados. Las hipótesis que se consideran en este test son:

$$\text{Varianzas iguales} \quad s_{y/x}^2(1) = s_{y/x}^2(2) \quad F_{cal} < F_{tab} \quad \text{hipótesis nula (H}_0\text{)}$$

$$\text{Varianzas distintas} \quad s_{y/x}^2(1) \neq s_{y/x}^2(2) \quad F_{cal} \geq F_{tab} \quad \text{hipótesis alternativa (H}_1\text{)}$$

donde F_{cal} es igual a la varianza ($s^2_{y/x}$) mayor entre la menor. Los grados de libertad para conocer el valor tabulado de F son n_1-2 y n_2-2 siendo n el número de puntos experimentales de cada calibrado.

2. Se comparan las pendientes a través de un test de la t-Student. En este caso las hipótesis son:

Pendientes iguales $b_1 = b_2$ $t_{cal} < t_{tab}$ hipótesis nula (H_0)

Pendientes distintas $b_1 \neq b_2$ $t_{cal} \geq t_{tab}$ hipótesis alternativa (H_1)

Dependiendo del resultado del primer test, la fórmula para t_{cal} es distinta, así como el cálculo de los grados de libertad. Estas fórmulas se pueden encontrar en la referencia indicada¹⁰⁴.

Si el resultado de este segundo test, es aceptar la hipótesis nula (no hay diferencias significativas entre las pendientes), se concluye que no hay efecto matriz y por tanto, es posible cuantificar usando el calibrado externo.

5.4. Parámetros de validación del método analítico

La validación de un método analítico es "*el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado*"¹⁰⁵. Entre las múltiples razones para validar un método destacan el cumplimiento de los distintos requerimientos regulatorios, el cumplimiento del trabajo bajo los principios de las buenas prácticas de laboratorio y el control de calidad.

A continuación se describe y estudian los parámetros de calidad más destacados para evaluar la validación.

¹⁰⁴ Oliver Rodríguez, B. Comportamiento ambiental de contaminantes químicos. Metodología analítica y estudios de modelización. *Universidad de Granada*, 2013, pp. 121-125.

¹⁰⁵ Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics - Guidance for Industry. Food and Drug Administration, 2015:
<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>

5.4.1. Exactitud

La exactitud se define según la Norma internacional ISO 5725 como "el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y un valor de referencia aceptado"¹⁰⁶. Además combina dos propiedades complementarias: veracidad y precisión de los resultados. La veracidad se logra al eliminar los errores sistemáticos, mientras que la precisión se obtiene al minimizar los errores aleatorios.

- ✓ *Veracidad*. Se define como "el grado de concordancia entre la media aritmética de un conjunto de resultados y el valor aceptado o de referencia"¹⁰⁶. Su evaluación consiste en estimar la concentración media del analito en una muestra y compararla con el valor verdadero. Ya que es imposible 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. Existen dos estrategias para obtener el valor de referencia: mediante estudio interlaboratorio o intralaboratorio. Si disponemos de materiales de referencia certificado (MRCs o CRMs por sus siglas en inglés), basta con analizar la muestra y comparar el valor de referencia con el obtenido del análisis. Pero no existen MRCs para matrices ambientales como las estudiadas en esta Tesis Doctoral. Por tanto, para fijar el valor de referencia es necesario aplicar otro enfoque.

Este otro enfoque implica el dopado de muestras libres de analito (muestras blancas o blanco) con disoluciones de concentración conocida de los mismos y preparadas con los patrones analíticos. Para estimar la veracidad en el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral, se han utilizado ensayos de recuperación sobre blancos dopados con los analitos a tres niveles de concentración. El valor de referencia es la concentración final añadida del analito en la muestra dopada. La muestra dopada se extrae y mediante el modelo de calibración se determina la concentración

¹⁰⁶ Norma ISO 5725. Partes 1 y 2. Exactitud (Veracidad y Precisión). International Organization for Standardization, Ginebra, 1994.

experimental. Dividiendo dicha concentración entre la concentración teórica se obtiene el porcentaje de recuperación (%R). Por tanto, cuanto más se aproxime %R a 100, más veraz será el resultado. Esta forma de validar la veracidad es la aceptada en la Decisión 2002/657/EC¹⁰⁷, cuando no existen materiales de referencia certificados disponibles.

- ✓ *Precisión*. Matemáticamente la precisión se expresa por la desviación estándar relativa (o coeficiente de variación). La desviación estándar relativa de la concentración, DER, que se expresa en tanto por ciento, se calcula dividiendo la desviación estándar (s_c) obtenida a partir de replicados entre el valor medio de la concentración experimental.

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. Cuando en un mismo laboratorio, se realizan cambios de repetibilidad, como efectuar análisis durante varios días, la precisión calculada en estas condiciones se denomina *intermedia* (también conocida como reproducibilidad intralaboratorio).

5.4.2. Límites de detección y cuantificación

Estos parámetros están relacionados con la capacidad del método para detectar, identificar y cuantificar los analitos en las muestras. El límite de detección (LOD)¹⁰⁸ es la cantidad más pequeña o concentración de analito en la muestra de ensayo que puede fielmente ser distinguible de cero. Por su parte, el límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja que puede ser determinada con un nivel aceptable de exactitud.

¹⁰⁷ Commission Decision 2002/657/EEC. Official Journal of the European Communities, L 221, 2002.

¹⁰⁸ M. Thompson, S.L.R.; Ellison, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of method of analyses (IUPAC Technical Report). R. Wood. *Pure and Applied Chemistry*, 2002, 74(5), 835-855.

Existen multitud de métodos para calcular estos parámetros, algunos incluso gráficos¹⁰⁹. Prácticamente todos se basan en determinar experimentalmente o numéricamente la desviación estándar de muestras blanco. La IUPAC¹¹⁰ especifica que LOD y LOQ corresponden a tres y diez veces la desviación estándar del blanco (s_{c0}), respectivamente, dividido entre la pendiente de la función de calibración, b . La dificultad está en determinar correctamente este parámetro. Las guías de validación y la literatura científica describen diferentes métodos:

- ✓ Basados en el tratamiento de la señal del blanco¹¹¹ en los que es necesario analizar varias réplicas del blanco, normalmente 10.
- ✓ Basados en varios parámetros de la función de calibración como la desviación estándar de la ordenada en el origen (s_a), de la pendiente (s_b) y de la regresión ($s_{x/y}$). Algunos de estos métodos son los que se han usado en esta Memoria.

El tratamiento matemático se encuentra explicado y desarrollado en la bibliografía científica^{112,113}.

5.4.3. Otros parámetros de calidad

Otros parámetros de calidad evaluados a lo largo de la presente Tesis Doctoral han sido:

- ✓ *Linealidad*. Indica el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado. Se puede evaluar mediante la inspección

¹⁰⁹ González, A.; Cuadros, L.; Alonso, E.; Vílchez, J.L. Estimate of gas Chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC. *Journal of Chromatography A*, 1996, 726; 133-139.

¹¹⁰ Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemical, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 2002.

¹¹¹ IUPAC. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - II data interpretation. Analytical Chemistry Division. *Spectrochimica Acta B*, 1978, 33; 241-245.

¹¹² García Campaña, A.M.; Baeyens, W.R.G.; 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.

¹¹³ Vial, J.; Jardy, A. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. *Analytical Chemistry*, 1999, 71, 2672-2677.

visual de la recta de calibrado pero lo más correcto es determinando el test de fallo de ajuste (P_{lof}) y el coeficiente de determinación (R^2).

- ✓ *Selectividad*. También se suele llamar especificidad aunque la IUPAC recomienda el primero. Se define como la capacidad de evaluar en forma inequívoca al analito en presencia de los componentes cuya presencia cabría esperar, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La selectividad 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 definiciones cuantitativas imprecisas.

La determinación de la selectividad de un método cromatográfico se puede realizar mediante la comparación de los cromatogramas del blanco con el correspondiente a una muestra dopada con los analitos. La ausencia de interferencias correspondientes a sustancias de la matriz, a los tiempos de retención de los analitos nos indicará que el método es selectivo.

- ✓ *Relación Horwitz (HorRat)*¹¹⁴. Es un parámetro de rendimiento normalizado que indica la aceptabilidad de los métodos analíticos con respecto a la precisión entre laboratorios (reproducibilidad). Aunque es un criterio aceptado para muchos métodos de análisis de la AOAC International y la Unión Europea, algunos autores consideran que es bastante pobre. Hay estudios interlaboratorio que demuestran que la ecuación de Horwitz a veces depende del analito, la matriz y el método¹¹⁵. A pesar de ello, este parámetro se utiliza ahora ampliamente como punto de referencia para la validación de los métodos analíticos, incluyendo los desarrollados de forma intralaboratorio¹¹⁶.

¹¹⁴ Horwitz, W.; Albert, R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*, 2006, 89, 1095-1109.

¹¹⁵ Linsinger, T. P. J.; Josephs, R. D. Limitations of the application of the Horwitz equation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25, 1125-1130.

¹¹⁶ Gustavo González, A., Herrador, M.A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2007, 26, 227-238.

El ratio HorRat se define como la relación entre la desviación estándar relativa en términos de repetibilidad o reproducibilidad (DER) y un valor que se calcula a partir de la ecuación de Horwitz. Esta expresión predice el valor esperado de la desviación estándar relativa para la reproducibilidad entre laboratorios ($PDER_R$) de acuerdo con:

$$PDER_R = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

donde C es la concentración del analito en tanto por uno. Para condiciones intralaboratorio de reproducibilidad, es decir, de precisión intermedia, el valor de DER debe ser de 0.2 a 1 veces el valor calculado de $PDER_R$ ¹¹⁴.

5.4.4. Incertidumbre estándar y robustez

El cálculo de la incertidumbre en un método analítico no es de obligado cumplimiento si la validación se ha evaluado en los términos expuestos anteriormente. Aún así, su cálculo complementa y enriquece la validación. El Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) define la incertidumbre de medida como un parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente podrían ser atribuidos al mensurando. La incertidumbre, por tanto, muestra un intervalo alrededor del valor estimado en el que se encuentra el valor considerado verdadero.

El modelo básico para calcular la incertidumbre, u , de un mensurando, Z , viene dado por tres términos sumatorios:

$$u^2(Z) = S_R^2 + u^2(\delta) + u_{rob}^2(Z)$$

S_R es la desviación estándar de la precisión intermedia, $u(\delta)$ es la incertidumbre asociada con el sesgo o veracidad y u_{rob} es la incertidumbre que proviene de un

estudio de robustez. El cálculo de S_R y $u(\delta)$ se encuentran disponibles en bibliografía^{116,117}.

La robustez es la capacidad del método analítico para no ser afectado por pequeños pero deliberados cambios en las condiciones experimentales, es decir, en los factores. Un estudio de robustez examina la alteración de estos factores, como cabe esperar en una transferencia de métodos entre laboratorios, por lo que es de suma importancia en el cálculo de la incertidumbre. El término u_{rob} se obtiene a partir de un diseño experimental de cribado, principalmente el Plackett-Burmann.

La estrategia para llevar a cabo un estudio de robustez se basa en un procedimiento histórico sugerido por Youden¹¹⁸. En este procedimiento, para cada factor hay que definir los valores nominales y extremos esperados en el trabajo de rutina y codificarlos con 0 y +1 y -1, respectivamente.

De acuerdo con la definición de robustez, el intervalo bajo investigación es muy pequeño por lo que es de esperar que no se observen efectos de segundo orden, como interacciones entre los factores. Por eso, es posible aplicar un modelo lineal Plackett-Burmann. Es una de las diferencias fundamentales entre el estudio de robustez y el estudio de optimización, en el que el intervalo investigado es más amplio. El desarrollo matemático para el cálculo de u_{rob} se encuentra disponible en bibliografía¹¹⁶.

¹¹⁷International Organization for Standardization (ISO). ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement method and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, Switzerland, 1994.

¹¹⁸Youden, W.Y. Statistical Techniques for Collaborative Tests, Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Washington D.C., USA, 1967.

CAPÍTULO II
Determinación de
PPCPs en Compost y
Suelo Agrícola

1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO ASISTIDA POR SALES

La extracción líquido-líquido ha sido durante mucho tiempo una técnica eficaz para la separación de compuestos con diferentes solubilidades en dos líquidos inmiscibles. Por lo general, los dos líquidos son agua y un disolvente orgánico no polar: los compuestos polares migran a la fase acuosa mientras que los no polares se extraen en la fase orgánica.

Pero, ¿qué ocurre si la fase orgánica es miscible con el agua?

Desde hace tiempo se sabe que la adición de una sal inorgánica en una mezcla de agua y un disolvente orgánico miscible provoca una separación del disolvente de la mezcla y la formación de un sistema de dos fases¹¹⁹. Este fenómeno se conoce como separación de fases asistida por sales o "salting-out". En algunos casos, este efecto también puede lograrse con altas concentraciones de sacaridos ("sugaring-out")¹²⁰. A la metodología de extracción se le denomina extracción líquido-líquido asistida por sales (SALLE).

Una de las primeras aplicaciones de SALLE fue en la detección de metales por emisión de llama y espectrometría de absorción atómica. Matkovich y Christian¹²¹ diseñaron una extracción basada en la transferencia de los metales desde una disolución acuosa a acetona mediante la formación de quelatos y la adición de sales. Más tarde, Anastassiades y sus colaboradores¹²² desarrollaron un método para extraer pesticidas en alimentos usando un extracto de acetonitrilo-agua y cloruro sódico y sulfato de magnesio para producir la separación de fases y la migración de los analitos al acetonitrilo.

¹¹⁹ Frankforter, G.B.; Cohen, L. Equilibria in the systems, water, acetone and inorganic salts. *Journal of the American Chemical Society*, 1914, 36, 1103-1134.

¹²⁰ Wang, B.; Ezejias, T.; Feng, H.; Blaschek, H. Sugaring-out: A novel phase separation and extraction system. *Chemical Engineering Science*, 2008, 63, 2595-2600.

¹²¹ Matkovich, C.E.; Christian, G.D. Salting-out of acetone from water. Basis of a new solvent extraction system. *Analytical Chemistry*, 1973, 45, 1915-1921.

¹²² Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 2003, 86, 412-431.

Después de esta etapa, se introduce otra llamada extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) en la que una porción del disolvente orgánico se mezcla con un adsorbente a granel como florisil, C18, alúmina, sílica, carbón activo o una amina primaria-secundaria (PSA) con objeto de retirar del acetonitrilo compuestos de la matriz, es el proceso llamado de limpieza del extracto o "clean-up". Esta metodología fue denominada QuEChERS cuyas siglas en inglés significan rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro y está tan extendida actualmente en el análisis de plaguicidas en una amplia variedad de frutas y verduras, que incluso forma parte de métodos de regulación oficial¹²³. Incluso ha sido aplicada a aceites vegetales para determinar pesticidas¹²⁴. También se ha aplicado la técnica SALLE para la extracción de medicamentos en fluidos biológicos como el Kaletra (Abbott Laboratories) en plasma de humanos y animales¹²⁵.

El fenómeno de "salting-out" puede ser usado para separar compuestos en un extracto miscible de agua y disolvente orgánico procedente por ejemplo de una extracción sólido-líquido. Estos extractos se pueden haber obtenido mediante técnicas diversas como la extracción por asistida por ultrasonidos (UAE, por sus siglas en inglés, **U**ltrasound-**A**ssisted **E**xtraction), por microondas (MAE, **M**icrowave-**A**ssisted **E**xtraction), con disolventes acelerados (ASE, **A**ccelerated **S**olvent **E**xtraction), Soxhlet, etc.; y a través de la adición de sales, separar el extracto en dos fases y transferir los compuestos objeto de estudio a la orgánica. De esta forma, con el "salting-out" se consigue concentrar los analitos y obtener una fase orgánica más limpia.

A continuación, a la totalidad o a una alícuota del disolvente orgánico se le aplica la etapa limpieza de extracción en fase sólida dispersiva. Esta metodología que combina extracción sólido-líquido, adición de sales y dSPE ha sido poco

¹²³ AOAC Official 2001.01 Method: Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. *AOAC International*, 2007.

¹²⁴ Polgár, L.; Kvellár, B.; García-Reyes, J.F.; Fodor, P. Comprehensive evaluation of the clean-up step in QuEChERS procedure for the multi-residue determination of pesticides in different vegetable oils using LC-MS/MS. *Analytical Methods*, 2012, 4, 1142.

¹²⁵ Zhang, J.; Wu, H.; Kim, E.; El-Shourbagy, T.A. Salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile: a new high throughput sample preparation technique for good laboratory practice bioanalysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 2009, 23, 419-425.

utilizada para determinar contaminantes emergentes en matrices ambientales, salvo en extracciones de sedimentos y suelos mediante agitación y/o sonicación en baño de ultrasonidos¹²⁶⁻¹²⁸, matrices que se caracterizan por un bajo contenido de materia orgánica. Tan solo se ha reportado un estudio en compost en el cual se aplica la extracción por microondas para determinar fluoroquinolonas antes de usar la limpieza con sales y el adsorbente dispersivo¹²⁹. Tradicionalmente, los procesos más comunes empleados para la limpieza de extractos procedentes de extracciones sólido-líquido han sido la purificación en columna, normalmente de sílica, y la extracción en fase sólida (SPE). Si algo caracteriza a ambos procedimientos es que por lo general son largos y tediosos, además de recurrir a veces a disolventes muy tóxicos como los clorados. El objetivo en esta Tesis Doctoral fue aplicar a los extractos procedentes de UAE una limpieza basada en la adición de sales denominada limpieza SALLE en lugar de SPE. Posteriormente se evaluará la idoneidad de usar un adsorbente dispersivo en la fase orgánica.

¹²⁶ Bragança, I.; Plácido, A.; Paíga, P.; Domingues, V.F.; Delerue-Matos, C. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Science of The Total Environment*, 2012, 433, 281-289.

¹²⁷ Czech, T.; Bonilla, N.B.; Gambus, F.; González, R.R.; Marín-Sáez, J.; Vidal, J. L.M.; Frenich, A.G. Fast analysis of 4-tert-octylphenol, pentachlorophenol and 4-nonylphenol in river sediments by QuEChERS extraction procedure combined with GC-QqQ-MS/MS. *Science of The Total Environment*, 2016, 557-558, 681-687.

¹²⁸ Pinto, C.G.; Laespada, M.E.F.; Martín, S.H.; Ferreira, A.M.C.; Pavón, J.L.P.; Cordero, B.M. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. *Talanta*, 2010, 81, 385-391.

¹²⁹ Dorival-García, N.; Labajo-Recio, C.; Zafra-Gómez, A.; Juárez-Jiménez, B.; Vilchez, J.L. Improved sample treatment for the determination of 17 strong sorbed quinolone antibiotics from compost by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2015, 138, 247-257.

2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM DE LOS PPCPs ESTUDIADOS

La determinación mediante LC-MS/MS a través de una interfase ESI requiere la optimización de variables tanto de la fuente de ionización como del analizador. En la Tabla II.1 se resumen las variables que se deben optimizar.

Tabla II.1. Variables más comunes de la fuente ESI y el triple cuadrupolo

Fuente ESI	Analizador QqQ
Voltaje del capilar*	Voltaje de cono
Temperatura de la fuente*	Energía de colisión
Temperatura de desolvatación*	Flujo del gas de colisión*
Flujo del gas del cono*	
Flujo del gas de desolvatación*	
Presión del nebulizador*	

La mayor parte las variables, aquellas con asterisco, se fijaron en valores comunes para todos los analitos, con una salvedad el voltaje de capilar. El analizador Xevo empleado permite operar simultáneamente en modo ESI+ y ESI-, es decir, es capaz en un mismo análisis detectar cationes y aniones. El voltaje del capilar suele ser mayor en modo negativo que en positivo, por lo que es necesario fijar valores distintos en cada modo de ionización. Empleando una mezcla de los analitos e infusionándola directamente en el espectrómetro, se optimizaron las variables de la interfase observando los cambios en la intensidad del ion padre de cada analito a medida que estas se modificaban. De esta forma se obtuvieron los siguientes valores:

- ✓ Voltaje de capilar: 0.6 y 2.5 kV para ESI+ y ESI-, respectivamente.
- ✓ Temperatura de la fuente: 150°C
- ✓ Temperatura de desolvatación: 500°C.
- ✓ Flujo del gas del cono (N₂): 150 L h⁻¹.

- ✓ Flujo del gas de desolvatación (N₂): 800 L h⁻¹.
- ✓ Presión del nebulizador: 7.0 bares.

El objetivo final del procedimiento fue maximizar la concentración de ion precursor en la celda de colisión, y optimizar la fragmentación del mismo, para obtener los iones producto. Esto se consigue optimizando el voltaje de cono y energía de colisión para cada uno de los analitos. Por otra parte, el flujo del gas colisión (argón) se fijó en 0.15 mL min⁻¹.

- **Voltaje del cono (CV).** Es el potencial en voltios aplicado al orificio de entrada del espectrómetro para captar los iones generados en el ESI e introducirlos en el conjunto del analizador. Este voltaje permite eliminar las asociaciones no deseadas ("clusters") entre el ion de interés y cualquier otra especie que acompañe al analito durante la formación del spray, incluso la dimerización o polimerización del mismo. Se han reportado formación de dímeros [2M-2H+Na]⁻ o [2M-H]⁻ en fármacos ácidos como el ibuprofeno, flurbiprofeno o carprofen¹³⁰ y en otros tipos de compuestos¹³¹ usando ESI. El voltaje del cono debe ser lo suficientemente elevado como para eliminar estas asociaciones pero lo suficientemente bajo como para no provocar ruptura del ion precursor.
- **Energía de colisión (CE).** La fragmentación del ion precursor en la celda de colisión es controlada mediante la aplicación de un potencial eléctrico medido en electronvoltio. Éste acelera los iones en mayor o menor medida en base a la energía de colisión que se desee. Así, aplicando una mayor energía de colisión se obtendrá como resultado una mayor fragmentación del ion padre.

A través de infusiones directas de disoluciones individuales de cada analito (500 ng mL⁻¹) y usando la aplicación *Intellistart* del software del espectrómetro,

¹³⁰ Schug, K.; McNair, H.M. Adduct formation in electrospray ionization. Part 1: Common acidic pharmaceuticals. *Journal of Separation Science*, 2002, 25, 759-766.

¹³¹ Ostrowski, W.; Wojakowska, A.; Grajzer, M.; Stobiecki, M. Mass spectrometric behavior of phenolic acids standards and their analysis in the plant samples with LC/ESI/MS system. *Journal of Chromatography B*, 2014, 967, 21-27.

se determinaron los valores óptimos de ambos parámetros. En la Tabla II.2 se recogen los voltajes de cono óptimos para cada analito así como las energías de colisión correspondientes a las dos transiciones que dan lugar a los dos iones hijos más intensos. La transición de mayor intensidad (transición 1) se utilizó para cuantificar y la segunda para confirmar.

Tabla II.2. Transiciones seleccionadas y valores óptimos de CV y CE

Analito	Transición 1	CV / CE	Transición 2	CV / CE	Modo	IS
DIC	294 → 250	8 / 10	294 → 214	8 / 18	ESI -	BEN
MEF	240 → 196	8 / 18	240 → 192	8 / 26	ESI -	BEN
FLU	282 → 264	8 / 14	282 → 167	8 / 42	ESI +	KET-d ₃
KET	255 → 209	44 / 14	255 → 105	44 / 24	ESI +	KET-d ₃
NAP	231 → 170	6 / 14	231 → 170	6 / 24	ESI +	KET-d ₃
BEZ	362 → 139	2 / 28	362 → 316	2 / 12	ESI +	MET
FEN	361 → 233	40 / 14	361 → 139	40 / 30	ESI +	MET
GEM	249 → 121	10 / 14	249 → 127	10 / 12	ESI -	MET
IRB	429 → 207	2 / 18	429 → 180	2 / 40	ESI +	KET-d ₃
MPB	151 → 92	38 / 22	151 → 136	38 / 14	ESI -	EPB-d ₅
EPB	165 → 92	38 / 24	165 → 136	38 / 16	ESI -	EPB-d ₅
PPB	179 → 92	42 / 24	179 → 136	42 / 16	ESI -	EPB-d ₅
BPB	193 → 92	42 / 24	193 → 136	42 / 24	ESI -	EPB-d ₅
4-OH-BP	199 → 121	36 / 20	199 → 105	36 / 18	ESI +	BEN
BP1	215 → 137	2 / 18	215 → 105	2 / 32	ESI +	BEN
BP3	229 → 151	4 / 20	229 → 105	4 / 18	ESI +	BEN
BP6	275 → 151	14 / 18	275 → 95	14 / 18	ESI +	BEN
BP8	245 → 121	14 / 20	245 → 151	14 / 20	ESI +	BEN
BEN*	276 → 139	2 / 16	276 → 120	2 / 8	ESI +	
MET*	227 → 141	2 / 14	227 → 85	2 / 8	ESI -	
KET-d₃*	258 → 77	12 / 16	258 → 77	12 / 40	ESI +	
EPB-d₅*	170 → 136	38 / 24	170 → 136	38 / 16	ESI -	

(*) Surrogate (IS)

Finalmente, la adquisición de datos se realizó empleando segmentos de tiempo basados en la separación cromatográfica de los analitos para así maximizar la sensibilidad de la detección.

3. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para optimizar la separación cromatográfica se partió de un método previamente puesto a punto en el grupo de investigación que describe la determinación de parabenos en compost¹³². Brevemente, la fase estacionaria que se emplea en dicho método es una Acquity UPLC-BEH C18 (1.7 μm , 50 mm x 2.1 mm), el flujo de fase móvil es de 0.25 mL min⁻¹, y como fase móvil A y B se usan agua y metanol, respectivamente, ambas con 0.025% (v/v) de amoníaco. La separación, en modo gradiente, consta de las siguientes etapas cromatográficas (ver Tabla II.3).

Tabla II.3. Gradiente del método de partida.

Time (min)	% A	% B	Etapas
0.0	40	60	Etapa de separación
4.0	0	100	
6.5	0	100	Lavado columna
6.6	40	60	Etapa de equilibrado
10.0	40	60	

3.1. Elección de la fase estacionaria

Como fase estacionaria se eligió una columna Acquity UPLC-BEH C18 con tamaño de partícula de 1.7 μm . Este tipo de fase es la más usada habitualmente en el análisis multiclase de PPCPs¹³³. Se probaron dos tamaños de columna: 50 mm x 2.1 mm y 100 mm x 2.1 mm. En ambos casos se obtuvieron una capacidad de resolución de picos similar y prácticamente en el mismo tiempo. Se optó por la columna más pequeña ya que generaba menor presión en el equipo cromatográfico.

¹³² Benítez-Villalba, J.C.; Zafra-Gómez, A.; Dorival-García, N.; Javier Camino-Sánchez, F.; Cantarero, S.; Vílchez, J.L. Ultra-performance liquid chromatography MS/MS method for the determination of parabens in compost from sewage sludge: Comparison of the efficiency of two extraction techniques. *Journal of Separation Science*, 2013, 36, 2635-2645.

¹³³ Löffler, D.; Ternes, T.A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1021, 133-144.

3.2. Composición de la fase móvil y optimización del gradiente

Con el fin de obtener la mayor sensibilidad y separación cromatográfica en el menor tiempo posible, se estudió la composición de la fase móvil, así como distintos gradientes. En primer lugar se aplicó el gradiente del método de partida en varias mezclas utilizando las siguientes disoluciones:

- ✓ Fase móvil A: agua sin aditivos y agua con 0.025% (v/v) de NH_3 .

- ✓ Fase móvil B: metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN)

La mezcla agua-ACN con contenido en amoníaco no separó los analitos estudiados ya que eluyeron en el primer minuto. Ocurre lo mismo, en la mezcla agua-MeOH sin amoníaco, en la que muchos de los analitos (en especial los fármacos) eluyen al final de la cromatografía durante la etapa de limpieza con 100% de metanol. Estas dos mezclas demuestran la importancia del pH y la naturaleza del disolvente orgánico para obtener una correcta separación de los analitos.

Con la mezcla agua-ACN sin amoníaco se obtuvo una excelente resolución y morfología gaussiana en los picos cromatográficos. Pero con la mezcla agua (0.025% NH_3)-MeOH, además de buena separación, se consiguió una mejor sensibilidad en la detección de los analitos. Por tanto, se seleccionó como fase móvil A, agua con amoníaco, y como fase móvil B, metanol.

A continuación se procedió a la optimización del gradiente. En fase reversa es habitual comenzar con un alto contenido en agua e ir bajando poco a poco la polaridad de la fase móvil aumentando gradualmente la cantidad de disolvente orgánico. De esta forma, los analitos se separan en el mayor gradiente posible de polaridad que ofrece la combinación de los dos disolventes.

Se comenzó ensayando un gradiente de 6 minutos cuyas condiciones iniciales fueron 90% en la fase móvil A. En este gradiente, los picos de los analitos que eluyen primero se ensanchaban en exceso. Se intentó corregir este

fenómeno, sin éxito, aumentando el flujo hasta 0.4 mL min^{-1} , el máximo que ofrecía el sistema cromatográfico para trabajar con presiones no superiores a 10000 psi. En cambio, modificando las condiciones iniciales a 70% en la fase acuosa para un flujo de 0.35 mL min^{-1} , sí que se obtuvo buen perfil en los picos cromatográficos. El gradiente que finalmente se usó a dicho flujo se muestra en la Tabla II.4. Con este gradiente, todos los analitos se detectan en los primeros seis minutos (etapa de separación) y se evita las posibles interferencias que pueden aparecer durante el lavado de la columna.

Se evaluó el pH de la fase acuosa. A pH ácido ($\text{pH} < 4$), los fármacos se encuentran sin ionizar y como ya se comprobó con la mezcla agua-MeOH, en la forma neutra éstos se retienen demasiado en la columna, por lo que, solo se estudió la influencia del pH en un rango pequeño de basicidad (8.5 – 10). Se construyeron cuatro buffers de formiato amónico 13 mM, cada uno a un pH: 10.0, 9.5, 9.2 y 8.5. No se obtuvieron diferencias significativas entre ninguno de los buffers, tanto en la resolución de los picos como en la sensibilidad. Se optó por el pH 9.25 ya que corresponde al punto con la máxima capacidad amortiguadora del buffer y además es más respetuoso con la columna que el pH en torno a 10.5 de la disolución acuosa amoniacal.

También se ensayaron distintos volúmenes de inyección: 3, 5, 8 y $10 \mu\text{L}$, este último el máximo que permite el sistema de inyección del cromatógrafo. No se observó ensanchamiento en el pico a medida que aumentaba el volumen, por lo que se fijó en $10 \mu\text{L}$. Por otro lado, para disminuir la presión, la temperatura del compartimento de la columna se fijó en 40°C , mayores temperaturas acortan la vida útil del dispositivo según especificaciones de la columna.

La Figura II.1 muestra un cromatograma correspondiente a una disolución patrón de 50 ng mL^{-1} de cada uno de los analitos, incluyendo los patrones internos.

Tabla II.4. Resumen de las condiciones cromatográficas finales

Fase estacionaria	ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 x 100 mm) 1.7 µm		
Fase móvil	A: Buffer 13 mM de formiato amónico a pH 9.25 B: Metanol grado LC-MS		
Modalidad: Gradiente	Tiempo (min)	A %	B %
	0.0	70	30
	5.0	10	90
	6.0	0	100
	7.5	0	100
	7.6	70	30
	10.5	70	30
Flujo	0.35 mL min ⁻¹		
Volumen de inyección	10 µL		
Temperatura del horno	40°C		
Detección	ESI-MS/MS		

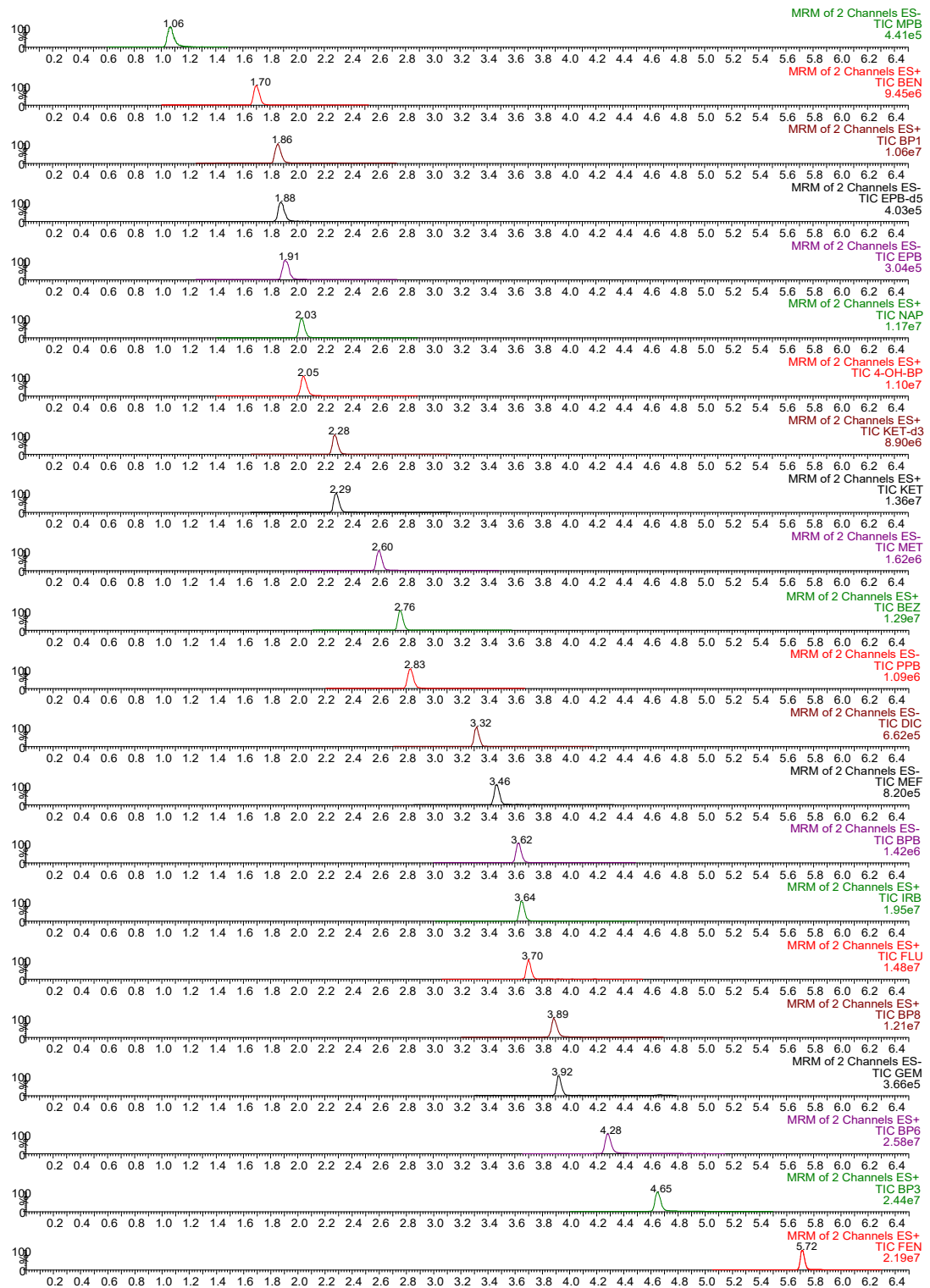


Figura II.1. Cromatograma patrón conteniendo a todos los analitos e IS (50 ng mL⁻¹)

4. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PPCPs EN COMPOST PROCEDENTE DE LODOS EDAR

4.1. Toma y almacenamiento de las muestras

Las muestras objeto de estudio, se obtuvieron de diferentes almacenes y plantas de compostaje ubicadas en el sur de España. Se recogieron 14 muestras diferentes.

Con el fin de garantizar la representatividad de las muestras a granel, se llevó a cabo un procedimiento de muestreo sistemático siguiendo un programa geométrico. Se tomaron porciones de aproximadamente 100 g de compost de al menos 15 puntos de muestreo de la pila de compostaje (peso de la muestra final de 1.5 kg aproximadamente). Después de la recogida, las muestras se liofilizaron y se tamizaron a través de una malla con un tamaño de poro ≤ 1.41 mm. Las muestras se almacenaron en bolsas herméticas en la oscuridad a 4°C hasta el análisis.

Es importante destacar en este punto, que de todos los analitos estudiados en esta investigación, ya descritos en la introducción de la presente Memoria de Doctorado, dos de ellos, el ácido mefenámico y el ibersartan, no pudieron ser estudiados en esta matriz debido a la ausencia de blanco para todos los analitos. Aunque en algunos compost no se encontraron irbesartan y/o ácido mefenámico, éstos estaban contaminados con un número mayor de analitos, lo que los invalidaba como blanco, por eso fue usado como tal aquel en el que solamente se encontraron IRB y MEF, aunque en cantidades elevadas no cuantificadas. Este hecho hizo inviable la validación del método para ambos fármacos y por tanto su inclusión en el presente método.

4.2. Optimización del proceso de extracción

El método de extracción desarrollado consistió en una extracción asistida por ultrasonidos del compost usando un disolvente orgánico. A continuación, añadiendo agua y una combinación de sales (MgSO_4 y NaCl) se realizó una

limpieza basada en SALLE. Por último, se evaluó la idoneidad de incluir una etapa de limpieza adicional aplicando dSPE. La estrategia elegida para la optimización se resume en los siguientes puntos:

- ✓ Selección del disolvente de extracción.
- ✓ Diagnóstico de las variables influyentes en UAE.
- ✓ Optimización de la extracción UAE.
- ✓ Optimización del proceso de limpieza por SALLE y dSPE.

La forma de operar en cada uno de los puntos citados anteriormente siempre fue la misma.

Se doparon muestras de un compost blanco con una disolución que contenía a todos los analitos en una concentración de 150 ng mL⁻¹. En función de la cantidad de muestra ensayada, el volumen de la disolución de dopado varió para ajustarse a la relación gramos de muestra/mililitros de disolución igual a uno. De igual modo, después de obtener el extracto evaporado, el volumen añadido de la disolución de reconstitución, una mezcla de agua mili-Q y metanol grado para espectrometría de masas 1:1 en (v/v), fue el doble al volumen de dopado. A continuación, se sometieron a ultrasonidos los viales en un baño durante 10 min y se centrifugaron a 16.300 x *g* durante 30 min. El sobrenadante se introdujo en el vial cromatográfico para su posterior análisis por UHPLC-MS/MS.

4.2.1. Selección del disolvente de extracción

Dada la baja solubilidad de los compuestos estudiados y para reducir la coextracción de componentes mayoritarios de la matriz solubles en agua como los ácidos fúlvicos, solamente se testaron mezclas de disolventes orgánicos. Se prepararon seis mezclas binarias que resultan de combinar en la misma proporción metanol, acetona, acetonitrilo y acetato de etilo (AcEt). Se realizó

una réplica experimental para cada mezcla ensayada. Las condiciones de extracción se muestran en la Tabla II.5.

Tabla II.5. Variables fijas en el ensayo de la elección del disolvente

Amplitud (%)	Ciclos	Masa de muestra (g)	V (mL)
70	2	1.00	10.0

En este experimento, no se aplicó el paso de limpieza, al igual que en los siguientes dos diseños experimentales, por lo que los extractos obtenidos se evaporaron sin recibir ningún tratamiento.

La señal analítica usada para este ensayo fue el área absoluta normalizada. Además para simplificar la interpretación de los datos, dichas áreas se sumaron y volvieron a normalizar en tres grupos: parabenos (PB), benzofenonas (BP) y fármacos (FA). En la Figura II.2 se muestran los resultados obtenidos.

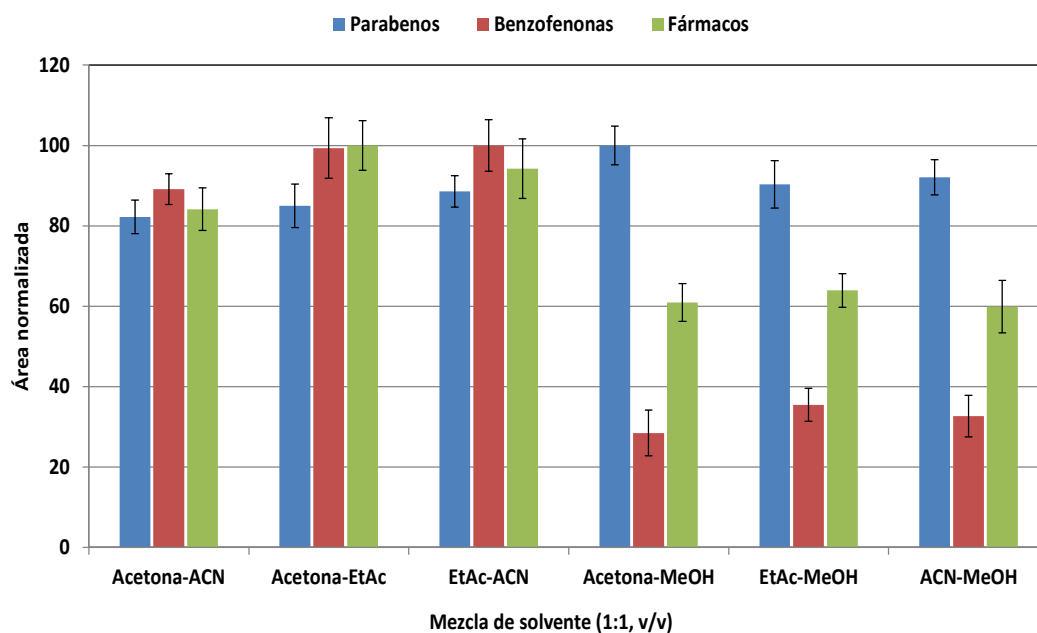


Figura II.2. Elección del disolvente de extracción para el compost

Las mezclas que contienen MeOH muestran una baja eficiencia de extracción para los productos farmacéuticos y las benzofenonas, por lo que dichas mezclas se descartaron. Por otro lado, las mezclas de ACN, acetona y AcEt mostraron un

grado de extracción similar para todos los analitos por lo que cualquiera de las tres podría ser seleccionada.

Uno de los objetivos del tratamiento de muestra propuesto fue realizar una limpieza posterior con SALLE al extracto orgánico obtenido. Dado que el extracto es 100% orgánico, fue necesario añadir agua antes de usar las sales. Debido a que la acetona es menos eficaz que el ACN en un proceso de salting-out, para una misma cantidad de sal, ya que produce menor cantidad de fase orgánica y mayor contenido de agua en ésta¹³⁴, se seleccionó la mezcla formada por ACN y AcEt para el desarrollo de experiencias posteriores.

4.2.2. Selección de variables para UAE. Diseño Plackett-Burman

Con el fin de seleccionar las variables más influyentes que afectan a la extracción asistida por ultrasonidos, se llevó a cabo un diseño de cribado Plackett-Burman (12 experimentos, sin puntos centrales). La composición y volumen del disolvente, la masa de muestra, el número de ciclos y el porcentaje de ácido acético en el disolvente de extracción fueron evaluados. El tiempo de extracción por ciclo se fijó en 10 min además de la amplitud de la sonda en 70%. La extracción se ensayó en medio ácido para asegurar la forma neutra de los fármacos.

En la Tabla II.6 se recogen los valores de las variables del diseño de cribado en cada experimento.

¹³⁴ Tabata, M.; Kumamoto, M.; Nishimoto, J. Chemical Properties of Water-Miscible Solvents Separated by Salting-out and Their Application to Solvent Extraction. *Analytical Sciences*, 1994, 10, 383-388.

Tabla II.6. Matriz del diseño Plackett-Burman para la selección de los parámetros UAE

	Masa (g)	Ciclos	ACN (%)	Ac Acético (%)	V (mL)
1	0.5	1	90	10	15
2	0.5	1	10	0	5
3	0.5	1	10	10	15
4	1.5	1	90	10	5
5	1.5	3	10	10	5
6	1.5	1	10	0	15
7	0.5	3	10	0	5
8	0.5	3	90	10	5
9	1.5	1	90	0	5
10	0.5	3	90	0	15
11	1.5	3	90	0	15
12	1.5	3	10	10	15

La respuesta estudiada fue la recuperación en la extracción (%) definida como la relación entre el área del analito extraído en una muestra dopada previamente (predopado) y el área del mismo analito extraído en una muestra sin dopar cuyo extracto final sí que es dopado (postdopado). Después de analizar el diseño mediante el análisis de la varianza, ANOVA, para cada uno de los analitos, el coeficiente de determinación (R^2) obtenido fue superior al 80% en todos los casos. Al no realizar ninguna réplica experimental o puntos centrales no se determinó la falta de ajuste, aunque tampoco fue objeto de estudio.

Para una mayor simplicidad en la interpretación de los resultados, al igual que en el ensayo anterior, las recuperaciones se sumaron y normalizaron para cada grupo de analitos: parabenos, benzofenonas y fármacos. Estas nuevas respuestas también fueron evaluadas mediante el ANOVA del diseño. Los coeficientes R^2 fueron 74%, 94% y 86% para PB, BP y FA, respectivamente. Los resultados del análisis se representaron en un gráfico de probabilidad normal para los efectos estandarizados (ver Figura II.3).

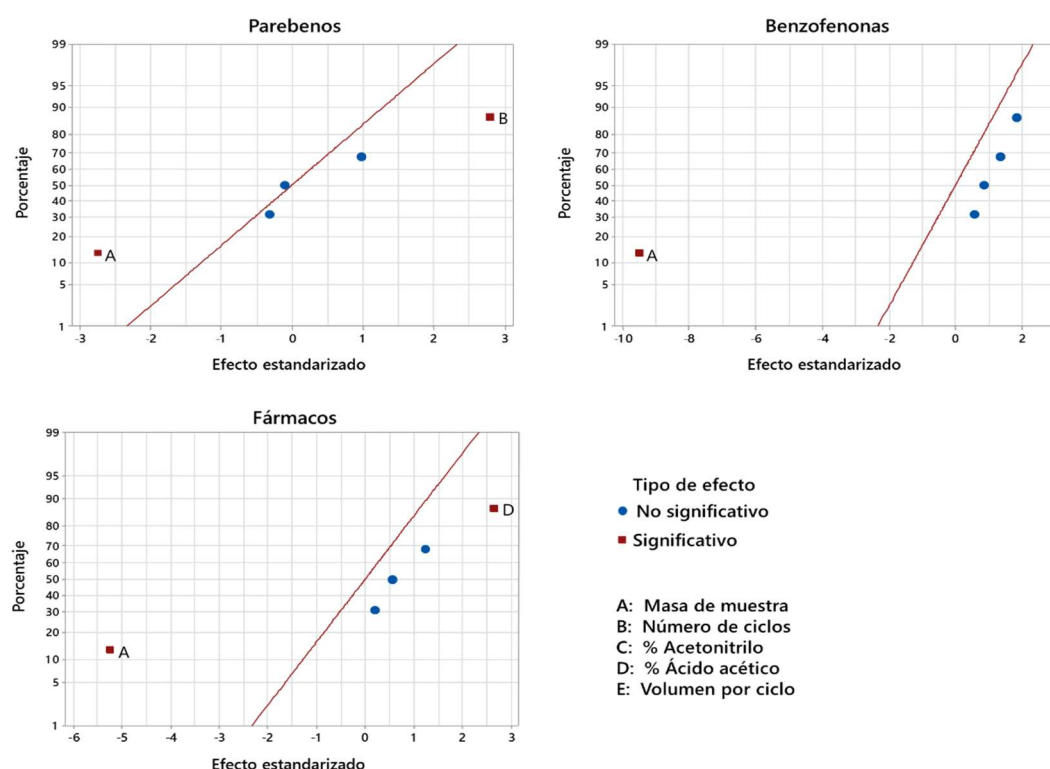


Figura II.3. Gráficas de probabilidad normal del diseño de cribado del compost

Las variables estadísticamente significativas (influyentes) son aquellas que en el gráfico aparecen en rojo. Así, se obtuvo que la concentración de ácido acético, el número de ciclos y la masa de la muestra, son variables influyentes en la extracción UAE de los PPCPs estudiados. La masa se fijó en 0.5 g al observar un efecto negativo muy acusado sobre el proceso en todos los analitos. El volumen de disolvente por ciclo se fijó en 5 mL, el menor volumen ensayado. Por tanto, las variables estudiadas en el diseño posterior de superficie de respuesta fueron la concentración de ácido acético, el número de ciclos y la relación ACN/AcEt en el disolvente de extracción.

4.2.3. Optimización de la extracción UAE

La composición del disolvente (% ACN y % ácido acético) y el número de ciclos se optimizaron usando un diseño experimental Box-Behnken con tres variables. El diseño consistió en 15 experimentos que incluyen tres puntos

centrales. Se consideraron dos niveles para cada variable: 0% y 10% para ácido acético, 50% y 100% para ACN, y 1 y 3 para el número de ciclos. La matriz de experimentos se muestra en la Tabla II.7. El límite inferior de ACN fue del 50% por dos motivos:

- ✓ La dificultad de evaporar extractos con un contenido alto en AcEt. En estos extractos, se observó que a medida que se concentraban, la viscosidad del mismo aumentaba notablemente, lo que dificultaba la evaporación hasta sequedad.
- ✓ La extracción SALLE es efectiva si el disolvente orgánico es parcial o totalmente miscible con el agua. Mientras que el ACN es 100% miscible, el AcEt es solo miscible en un 10%. Un contenido superior de AcEt frente al ACN podría ser contraproducente para la limpieza SALLE.

Tabla II.7. Matriz del diseño Box-Behnken usada para el compost

	ACN (%)	Ac Acético (%)	Ciclos		ACN (%)	Ac Acético (%)	Ciclos
1	100	0	2	9	100	5	3
2	50	5	3	10	75	5	2
3	100	5	1	11	50	5	1
4	50	10	2	12	75	0	1
5	75	10	3	13	75	5	2
6	75	5	2	14	75	0	3
7	50	0	2	15	75	10	1
8	100	10	2				

Como respuesta se evaluó la recuperación de extracción para cada compuesto. Al analizar el diseño se obtuvieron coeficientes de determinación comprendidos entre 85% y 99%. La prueba de fallo de ajuste fue superior a 0.05 en todos los casos. Con estos parámetros estadísticos, se concluyó que el modelo teórico se adecua satisfactoriamente a los datos experimentales con un nivel de confianza del 95%. Las Tablas II.8 a II.10 recogen los efectos estimados sobre la recuperación para los tres grupos de analitos. Aquellos estadísticamente significativos se muestran en rojo.

Tabla II.8. Efectos de cada factor sobre el rendimiento de los fármacos

	DIC	FLU	KET	NAP	BEZ	FEN	GEM
A: % ACN	2.1	-6.0	-2.8	-3.3	-4.5	-1.9	1.7
B: % Ácido	13.9	27.7	16.1	16.9	26.8	17.9	1.4
C: Ciclos	-3.9	18.6	16.0	15.0	16.9	29.8	8.1
AA	3.9	3.3	2.5	2.7	2.3	6.9	3.1
AB	-0.7	-0.1	-3.9	-2.2	-0.9	-4.5	-0.5
AC	4.5	5.9	3.2	4.6	3.6	6.1	6.7
BB	-28.9	-20.9	-7.2	-6.2	-15.2	-6.6	-17.2
BC	-10.9	2.0	4.5	4.1	5.6	5.1	-4.2
CC	4.3	-5.9	-8.9	-9.0	-9.3	-11.0	-11.2

Tabla II.9. Efectos de cada factor sobre el rendimiento de los parabenos

	MPB	EPB	PPB	BPB
A: % ACN	4.0	7.4	6.5	7.1
B: % Ácido	7.4	29.6	6.2	-1.7
C: Ciclos	16.6	29.9	9.3	11.4
AA	6.7	4.4	3.0	3.2
AB	-2.0	-0.8	-4.8	-3.9
AC	-0.8	9.9	1.6	2.3
BB	6.3	-29.1	-5.1	-1.2
BC	4.2	6.9	-6.5	-3.1
CC	-9.1	-19.2	-4.4	-6.4

Tabla II.10. Efectos de cada factor sobre el rendimiento de las benzofenonas

	4-OH-BP	BP1	BP3	BP6	BP8
A: % ACN	-2.5	-2.5	-0.3	-0.8	-0.3
B: % Ácido	4.0	9.0	11.9	1.1	-10.4
C: Ciclos	15.1	15.7	17.0	15.5	9.7
AA	2.1	4.8	1.7	1.3	2.0
AB	-2.3	-0.5	2.9	1.2	-1.9
AC	2.3	2.2	5.2	2.4	1.7
BB	1.9	-2.6	-8.9	0.1	13.7
BC	2.6	0.9	3.9	5.9	5.5
CC	-9.1	-6.4	-6.4	-5.6	0.9

- ✓ **Número de ciclos.** Ambos términos, lineal y cuadrático, fueron significativos en prácticamente todos los compuestos. La diferencia reside en el signo y magnitud de los términos, positivo y alto, en el término lineal; negativo y más bajo, en el término cuadrático. Esto sugiere que se obtiene un mayor aumento en la recuperación al pasar de un ciclo a dos, que de dos a tres ciclos.
- ✓ **Concentración de ácido acético.** Se observó un comportamiento similar para el número de ciclos, término lineal positivo, y cuadrático negativo en la mayoría de los compuestos.
- ✓ **Porcentaje de acetonitrilo.** Los términos lineales y/o cuadráticos fueron estadísticamente significativos para la mitad de los compuestos (BEZ, FEN, FLU, MPB, PPB, BPB, BP1, BP8).
- ✓ Las **interacciones más repetidas** fueron entre el número de ciclos y la concentración de ácido acético (5 positivos y 5 negativos), y el porcentaje de ACN y el número de ciclos (4 positivos).

Como era de esperar, las condiciones experimentales que dan lugar a la recuperación máxima de extracción fueron distintas para cada analito, especialmente entre compuestos de diferentes familias. Por lo tanto, para optimizar la recuperación de extracción de todos los analitos simultáneamente fue necesario encontrar el mejor enfoque de compromiso.

Para ello, se recurrió a la optimización de múltiples respuestas aplicando la función de deseabilidad total, D , descrita en el Capítulo de Introducción. Esta función varía entre 0 y 1, siendo 1 el valor deseable. Así, se obtuvo que las condiciones experimentales correspondientes al máximo de la función D ($D = 0.886$) fueron 100%, 8% y 3 para el porcentaje de ACN, la concentración de ácido acético y el número de ciclos, respectivamente. Con el fin de disminuir la duración del proceso de extracción, D se evaluó para dos ciclos, lo que dio lugar a cambios en las condiciones experimentales, el porcentaje de ACN pasó a 50% y el del ácido acético a 10% para un $D = 0.720$.

Tabla II.11. Comparación de la respuesta en el diseño Box-Behnken para 2 y 3 ciclos

Compuesto	Recuperación extracción 3 ciclos	Recuperación extracción 2 ciclos	% Diferencia
DIC	112	107	-4.7
FLU	79	75	-5.2
KET	59	59	0.2
NAP	54	53	-0.5
BEZ	60	59	-1.9
FEN	89	81	-8.4
GEM	93	88	-6.0
MPB	83	78	-6.0
EPB	126	105	-16.6
PPB	103	99	-3.8
BPB	97	89	-7.9
4-OH-BP	62	62	0.4
BP1	61	59	-3.9
BP3	64	54	-16.7
BP6	56	48	-13.6
BP8	43	39	-10.6

La recuperación de la extracción teórica de cada analito se comparó para los dos óptimos. Las pequeñas diferencias, junto con un tiempo de análisis más corto, justificaron el uso de dos ciclos, y por tanto, emplear como disolución de extracción una mezcla formada por ACN:AcEt (1:1, v/v) al 10% de ácido acético. La superficie de respuesta para D fijando el número de ciclos en dos, se muestra en la Figura II.4.

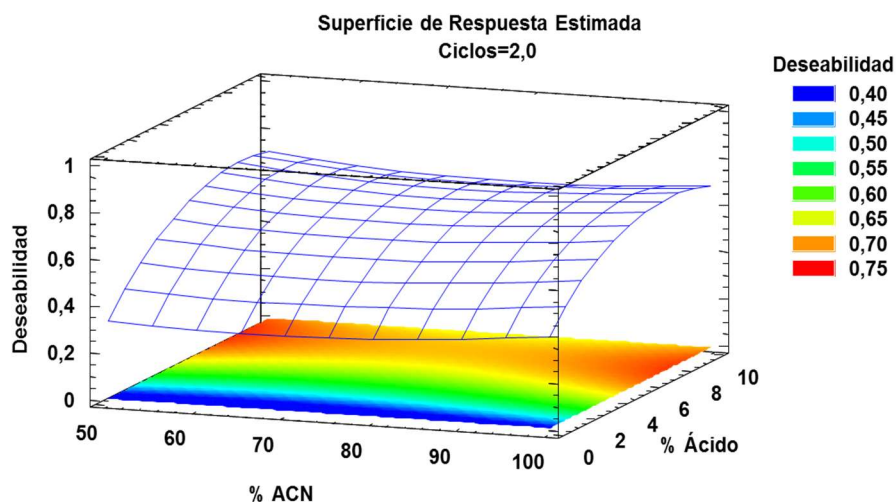


Figura II.4. Optimización del % ACN, concentración de ácido acético y ciclos. Superficie de respuesta obtenida para la función de deseabilidad global (2 ciclos)

4.2.4. Limpieza asistida por sales, SALLE

Con objeto de reducir el efecto matriz y aumentar la sensibilidad del método, el extracto obtenido en la etapa anterior se sometió a una limpieza basada en SALLE. El proceso general consiste en añadir agua al extracto orgánico, agitar vigorosamente en vortex durante un minuto y a continuación adicionar una mezcla de sales, agitar de nuevo y centrifugar. Al término de la centrifugación se obtienen dos fases bien definidas, una acuosa en la parte inferior y otra orgánica en la superior. La fase orgánica se separa físicamente y se seca completamente añadiendo MgSO_4 .

Para determinar las cantidades óptimas de agua y sales, se utilizó un diseño Doehlert de dos variables. La respuesta elegida para el diseño fue, al igual que en la etapa anterior, la recuperación de extracción. Las sales seleccionadas fueron las del QuEChERS original, NaCl y MgSO_4 , así como la proporción 1:4 ($\text{NaCl}:\text{MgSO}_4$) en peso entre las sales, se mantuvo constante en todos los experimentos del diseño. Por tanto, sólo se necesitaron dos variables (volumen de agua y cantidad de una de las sales) para construir el diseño experimental en el que se incluyó 3 puntos centrales (ver Tabla II.12). El volumen de agua se evaluó a cinco niveles y la masa de NaCl a 3 niveles.

Tabla II.12. Matriz del diseño Box-Behnken usada para la limpieza SALLE

	NaCl (g)	Agua (mL)		NaCl (g)	Agua (mL)
1	1.5	8	6	0.5	12
2	1	14	7	1	10
3	1.5	12	8	1	10
4	1	6	9	1	10
5	0.5	8			

Al analizar el diseño, se obtuvieron valores adecuados para la prueba de fallo de ajuste (>0.05) y el coeficiente de determinación (>75%). En las Tablas II.13 a II.15 se muestran los efectos estimados para los fármacos, parabenos y benzofenonas, respectivamente. Aquellos estadísticamente significativos se muestran en rojo.

Tabla II.13. Efectos de cada factor sobre el rendimiento de los fármacos

	DIC	FLU	KET	NAP	BEZ	FEN	GEM
A: NaCl	1.4	-3.7	-6.2	-2.2	0.6	-2.7	0.7
B: Agua	1.2	-12.8	-1.9	1.7	3.7	-9.0	-8.7
AA	12.2	17.3	28.1	18.7	28.3	1.7	10.6
AB	6.2	3.1	16.6	10.9	11.3	12.6	11.3
BB	-6.9	-2.6	16.7	15.2	12.6	-20.0	-0.9

Tabla II.14. Efectos de cada factor sobre el rendimiento de los parabenos

	MPB	EPB	PPB	BPB
A: NaCl	4.4	1.2	-4.6	-3.1
B: Agua	-2.8	-2.6	-0.6	-0.5
AA	8.8	13.1	13.8	13.3
AB	17.7	8.7	10.4	6.7
BB	-8.2	-0.5	-3.5	-3.1

Tabla II.15. Efectos de cada factor sobre el rendimiento de las benzofenonas

	4-OH-BP	BP1	BP3	BP6	BP8
A: NaCl	-5.3	-5.0	4.4	-3.0	1.0
B: Agua	-3.3	4.8	-7.0	-10.7	-9.7
AA	8.5	8.7	1.3	4.8	-1.4
AB	15.9	8.2	12.0	6.3	9.6
BB	-0.6	4.6	-3.7	3.8	-2.6

Para obtener las condiciones óptimas, se utilizó la optimización de múltiples respuestas a través de la función de deseabilidad total, D . El hecho de que las gráficas de superficie de respuesta para la mayoría de los analitos tuvieran la misma forma, de silla de montar, donde los dos máximos correspondían a dos extremos opuestos, se tradujo en un valor óptimo para D cercano a la unidad ($D = 0.950$). Las condiciones experimentales en dicho óptimo fueron 7 mL de agua, 0.5 g de NaCl y, en consecuencia, 2 g de $MgSO_4$. La representación de la superficie de respuesta de dicha función se muestra en la Figura II.5.

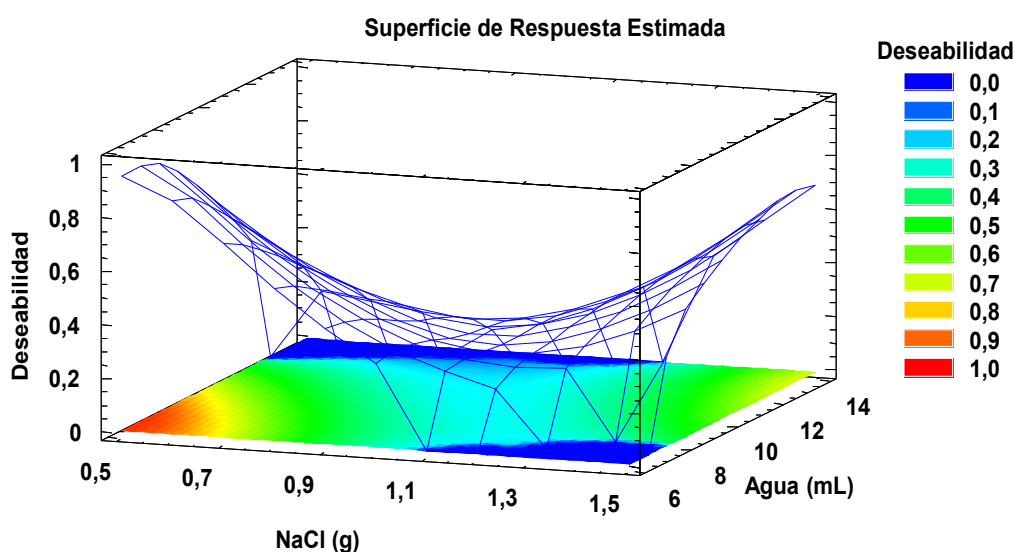


Figura II.5. Optimización del volumen de agua y cantidad de sales para la limpieza SALLE. Superficie de respuesta obtenida para la función de deseabilidad global

4.2.5. Evaluación de la limpieza mediante fase sólida dispersiva, $dSPE$

Para finalizar la etapa de limpieza se ensayaron dos adsorbentes dispersivos, C18 y PSA. El PSA es capaz de retener ácidos orgánicos como los grasos y húmicos, y también compuestos polares de la matriz como los azúcares. Por su parte el C18 se suele usar para limpiar extractos con gran contenido en grasas o en otros compuestos hidrófobos.

Se obtuvieron seis extractos orgánicos con las condiciones óptimas de la etapa de ultrasonidos y de la limpieza SALLE. A dos de los extractos se le

adicionó 200 mg de C18 y a otros dos, la misma cantidad pero de PSA. Los extractos se secaron con 500 mg de $MgSO_4$. Se evaluó el efecto matriz expresado en tanto por ciento (área del analito en matriz/área del analito en disolvente - 1) y se representó en la Figura II.6. No se observó ninguna mejora significativa en el efecto matriz con el uso de C18 o PSA, salvo en MPB y EPB, por lo que en el procedimiento final no se incluyó ninguna etapa de limpieza con adsorbente dispersivo.

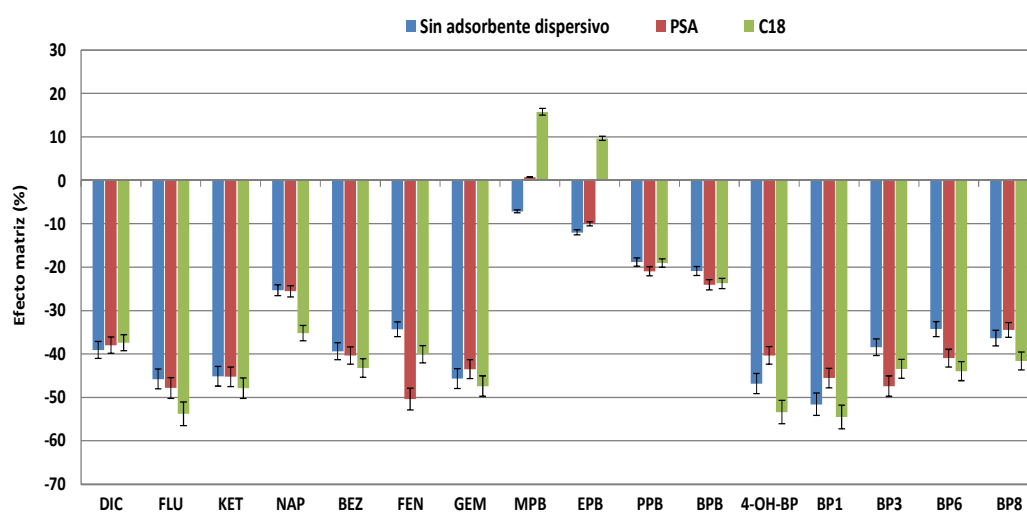


Figura II.6. Selección del adsorbente dispersivo y efecto matriz

4.2.6. Volumen y composición de la disolución de reconstitución

Finalmente, se determinó el volumen así como la composición de la disolución de reconstitución para los extractos secos. Para preparar la disolución se utilizaron los disolventes de la fase móvil: el buffer 13 mM de formiato amónico y el metanol. En primer lugar se ensayaron tres volúmenes (1.0, 0.5 y 0.25 mL) con una mezcla 1:1. Después con el volumen seleccionado, se ensayó una mezcla más, 1:4 de Buffer:MeOH. Ambos ensayos se realizaron por duplicado. Se evaluó el área absoluta y los resultados se normalizaron y representaron como se muestra en la Figura II.7.

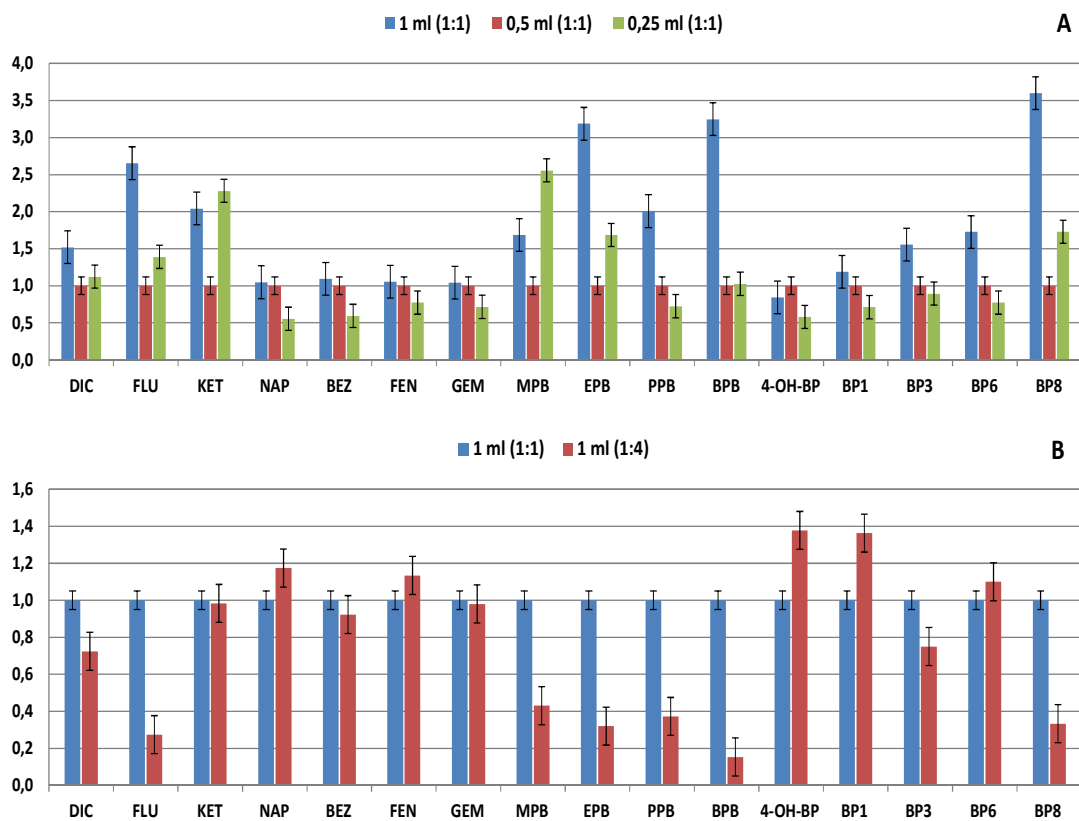


Figura II.7. Volumen (A) y composición (B) de la disolución de reconstitución del extracto final evaporado

- ✓ El volumen ensayado que originó menor supresión en la señal de todos los analitos, excepto en dos (KET y MPB), fue 1 mL.
- ✓ Para 1 mL, con la mezcla 1:1 se obtuvo los mejores resultados tanto en la señal evaluada como en la forma de los picos cromatográficos.

Por lo tanto, se usó 1 mL de una disolución formada por una mezcla 1 a 1 de buffer y metanol para la reconstitución de los extractos evaporados.

4.2.7. Procedimiento final de extracción

Realizada la optimización de la extracción del compost y la limpieza del extracto, el procedimiento final previo a la inyección en el equipo es el siguiente.

1. Se pesan 0.5 g de compost y se coloca en la celda metálica de extracción. Las muestras se dopan con 0.5 mL de solución metanólica de EPB-d₅, KET-d₃, BEN y MET (surrogates) y se dejan secar entre 16-24 h.
2. Las muestras dopadas se extraen, en tandas de cuatro, mediante UAE añadiendo a la celda 5 mL de una mezcla de ACN/AcEt (1:1, v/v) al 10% de ácido acético, fijando las condiciones anteriormente optimizadas.
3. Pasados los 10 minutos de extracción, se transfiere el extracto a un tubo falcon de 50 mL. Se añaden otros 5 mL de la disolución de extracción a la celda para sonicar la muestra una segunda vez.
4. El segundo extracto se recoge junto al primero. A continuación, se añade 7 mL de agua y la mezcla se agita en un vortex durante un minuto. Seguidamente, se añade al falcon 0.5 y 2.0 g de NaCl y MgSO₄, respectivamente y se vuelve a agitar manualmente durante dos minutos. La mezcla se centrifuga durante tres minutos a 3026 x g.
5. Se recoge la fase superior orgánica y se transfiere a otro falcon que contiene 0.5 g de MgSO₄. La mezcla se agita durante un minuto y se centrifuga a 3459 x g.
6. El sobrenadante se transfiere a un vial de vidrio y, después de evaporarlo hasta sequedad a 45°C bajo una corriente de N₂, el residuo que se obtiene se redissuelve en 1 mL de una mezcla de buffer y metanol (1:1, v/v), se sónica en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos y se centrifuga a 16.300 x g durante 30 minutos.
7. Finalmente, el sobrenadante se transfiere a un vial de cromatografía para su análisis por UHPLC-MS/MS.

4.3. Calibración y validación del método analítico

4.3.1. Modelo de calibración

Una limitación importante del análisis cuantitativo mediante ESI-MS es el efecto matriz. Para evaluarlo, se compararon las pendientes de dos curvas de calibración, una obtenida a partir de muestras de compost libres de analitos (calibración de matriz) y otra obtenida a partir de los patrones directamente diluidos en la disolución de reconstitución (calibración externa). Las curvas se representaron gráficamente utilizando la relación, área del analito/área del correspondiente surrogate (área relativa), frente a la concentración teórica. Las pendientes se compararon mediante el procedimiento descrito en el capítulo I. De este análisis estadístico, se concluyó que existía efecto matriz en todos los compuestos estudiados. Por tanto, el calibrado en matriz se hizo necesario e insustituible por el externo para determinar de forma exacta la concentración de los analitos en el compost.

El calibrado en matriz se obtiene dopando muestras de compost blanco (sin analitos) con disoluciones metanólicas que, además de contener los surrogates en una concentración fija, contienen los analitos a concentraciones crecientes de los analitos. Se ensayaron ocho niveles de concentración en un intervalo variable dependiendo del compuesto estudiado. Cada nivel se realizó por duplicado y cada réplica se analizó dos veces. Los parámetros estadísticos de la calibración en matriz para el compost se muestran en la Tabla II.16.

Tabla II.16. Parámetros estadísticos de la calibración en matriz

	DIC	FLU	KET	NAP	BEZ	FEN
n	32	32	32	32	32	32
b	$5.1 \cdot 10^{-3}$	$2.4 \cdot 10^{-2}$	$2.7 \cdot 10^{-1}$	$1.0 \cdot 10^{-1}$	$3.5 \cdot 10^{-1}$	$5.0 \cdot 10^{-1}$
S_b	$9.0 \cdot 10^{-5}$	$3.6 \cdot 10^{-4}$	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$8.3 \cdot 10^{-4}$	$6.5 \cdot 10^{-3}$	$6.0 \cdot 10^{-3}$
S_{y/x}	$6.3 \cdot 10^{-3}$	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$4.2 \cdot 10^{-2}$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^{-1}$	$2.2 \cdot 10^{-1}$
R² (%)	99.2	99.6	99.9	99.8	99.5	99.6
P_{lof} (%)	67.7	26.9	5.3	7.1	89.2	12.1
	GEM	MPB	EPB	PPB	BPB	4-OH-BP
n	32	32	32	32	32	36
b	$3.9 \cdot 10^{-3}$	$4.0 \cdot 10^{-2}$	$2.1 \cdot 10^{-2}$	$8.1 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^{-1}$	$1.4 \cdot 10^{-1}$
S_b	$4.4 \cdot 10^{-5}$	$6.0 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$7.1 \cdot 10^{-4}$	$1.8 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-3}$
S_{y/x}	$3.1 \cdot 10^{-3}$	$5.0 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$4.4 \cdot 10^{-2}$	$9.1 \cdot 10^{-2}$	$5.6 \cdot 10^{-2}$
R² (%)	99.7	99.3	99.9	99.8	99.6	99.7
P_{lof} (%)	92.2	61.6	17.4	12.4	38.0	10.0
	BP1	BP3	BP6	BP8		
n	32	32	32	32		
b	$7.7 \cdot 10^{-2}$	$2.2 \cdot 10^{-1}$	$1.8 \cdot 10^{-1}$	$7.8 \cdot 10^{-2}$		
S_b	$9.9 \cdot 10^{-4}$	$3.0 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$7.1 \cdot 10^{-4}$		
S_{y/x}	$5.6 \cdot 10^{-2}$	$1.6 \cdot 10^{-1}$	$6.9 \cdot 10^{-2}$	$3.2 \cdot 10^{-2}$		
R² (%)	99.5	99.4	99.8	99.8		
P_{lof} (%)	88.8	13.4	14.2	43.0		

n: puntos de calibración; *b*: pendiente; *S_b*: desviación estándar de la pendiente; *S_{y/x}*: desviación estándar de los residuos; *R²*: coeficiente de determinación; %*P_{lof}*: valor P del test de fallo de ajuste.

4.3.2. Validación e incertidumbre del método analítico

El método analítico fue validado en términos de exactitud (veracidad y precisión), sensibilidad (límites de determinación y cuantificación), linealidad y selectividad según la guía de la FDA para la Validación de un Método

Bioanalítico¹³⁵. Además, se ha calculado el ratio HorRat y se hizo un estudio sobre la incertidumbre estándar.

A. Exactitud. La exactitud del método se evaluó en términos de precisión y veracidad. El ensayo consistió en dopar muestras blanco de compost con tres niveles de concentración diferentes. Se realizaron tres réplicas al día para cada concentración durante tres días consecutivos. Además cada réplica experimental se analizó dos veces. Por tanto, para cada nivel de validación se realizaron 18 determinaciones.

Solamente se determinó la precisión interdía y se expresó como desviación estándar relativa (DER, %). Los valores obtenidos para cada nivel de validación se resumen en la Tabla II.17. Todos los valores oscilaron entre el 2.3% y el 11%, lo cual cumple con la directriz de la guía usada¹³⁵, que fija como máximo un 15%.

La veracidad se calculó usando el porcentaje de recuperación (concentración del analito obtenida del calibrado/concentración de dopado teórica). Como se muestra en la Tabla II.17, todas las recuperaciones fueron cercanas al 100% (93.2% -112%).

¹³⁵ Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001.

Tabla II.17. Exactitud del método: veracidad y precisión

	Dopado (ng g ⁻¹)	^a Rec (%)	^b DER (%)		Dopado (ng g ⁻¹)	^a Rec (%)	^b DER (%)
DIC	40	97.7	9.6	EPB	20	99.9	3.5
	200	99.5	6.9		200	99.5	3.8
	640	102.4	7.4		640	100.8	2.7
FLU	28	101.2	11.1	PPB	20	100.9	3.5
	140	106.6	8.6		200	102.9	5.3
	448	102.6	9.5		480	102.5	3.5
KET	5.2	103.5	4.3	BPB	14	93.2	5.7
	26	108.2	1.1		140	100.8	5.1
	83.2	103.5	1.5		336	95.6	6.2
NAP	10	103.2	4.6	4-OH-BP	10	96.5	6.0
	50	109.6	3.5		50	101.1	11.2
	160	105.6	2.3		160	104.1	3.4
BEZ	10	102.0	7.7	BP1	20	109.0	4.3
	50	101.6	5.2		100	108.2	6.9
	160	103.2	4.6		320	105.3	5.2
FEN	10	105.1	8.2	BP3	20	95.8	5.5
	50	111.5	10.3		100	98.6	4.9
	160	109.7	7.4		320	104.4	4.1
GEM	40	97.4	7.3	BP6	20	108.1	3.9
	200	103.3	10.1		100	101.0	4.6
	640	104.9	6.3		320	97.8	3.6
MPB	40	98.5	5.4	BP8	20	109.3	3.5
	200	107.5	5.4		100	102.8	2.7
	640	107.1	6.3		320	100.2	1.8

^a Media de 18 determinaciones; ^b DER (%), desviación estándar relativa; Rec: Porcentaje de recuperación

A la luz de estos resultados, se puede afirmar que el método es exacto en el rango de concentración evaluado para cada compuesto.

B. Límites de detección y cuantificación. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calcularon mediante dos métodos diferentes. En el primer método, se utilizó la desviación estándar de los residuos ($S_{y/x}$), la pendiente (b) y una estimación de la desviación estándar del blanco (S_0) obtenida por extrapolación de la recta de calibrado a cero.

LOD se calcula como $3 \cdot S_0$ y LOQ como $10 \cdot S_0$. En el segundo método, que no requiere de ninguna extrapolación, LOD se calcula como $3(S_{y/x} - a)/b$ y LOQ como $10(S_{y/x} - a)/b$. Se obtuvieron límites similares con ambos métodos. Los resultados y el rango dinámico lineal (LDR) se muestran en la Tabla II.18. LOQ varió entre 2 y 13 ng g⁻¹.

Tabla II.18. Límites de detección (LOD), de cuantificación (LOQ) y rango dinámico lineal para el compost (RDL)

	DIC	FLU	KET	NAP	BEZ	FEN
LOD (ng g⁻¹)	4	2	0.5	0.8	1	1
LOQ (ng g⁻¹)	12	8	2	2	4	4
RDL (ng g⁻¹)	12-640	8-448	2-104	2-160	4-160	4-160
	GEM	MPB	EPB	PPB	BPB	4-OH-BP
LOD (ng g⁻¹)	2	4	2	2	2	1
LOQ (ng g⁻¹)	8	13	5	5	6	4
RDL (ng g⁻¹)	8-640	13-800	5-800	5-480	6-336	4-200
	BP1	BP3	BP6	BP8		
LOD (ng g⁻¹)	2	2	1	1		
LOQ (ng g⁻¹)	7	7	4	7		
RDL (ng g⁻¹)	7-400	7-320	4-320	7-320		

C. Linealidad. Se evaluó el coeficiente de determinación lineal y la prueba de fallo de ajuste para la calibración en matriz. R² varió entre 99.2% y 99.9%; por su parte P_{lof} (%) superó el 5% en todos los casos para un nivel de confianza del 95%. Ambos estadísticos indican una buena linealidad dentro de los rangos indicados para cada compuesto. Los datos se muestran en la Tabla II.18 mostrada anteriormente.

D. Selectividad. Para establecer la especificidad del método propuesto, se compararon los cromatogramas de una muestra blanco con IS con los de una muestra blanco dopada con los contaminantes de interés e IS. En el análisis comparativo, no se observaron interferencias al tiempo de retención de los analitos. Este hecho demuestra la alta selectividad del método UHPLC-MS/MS propuesto.

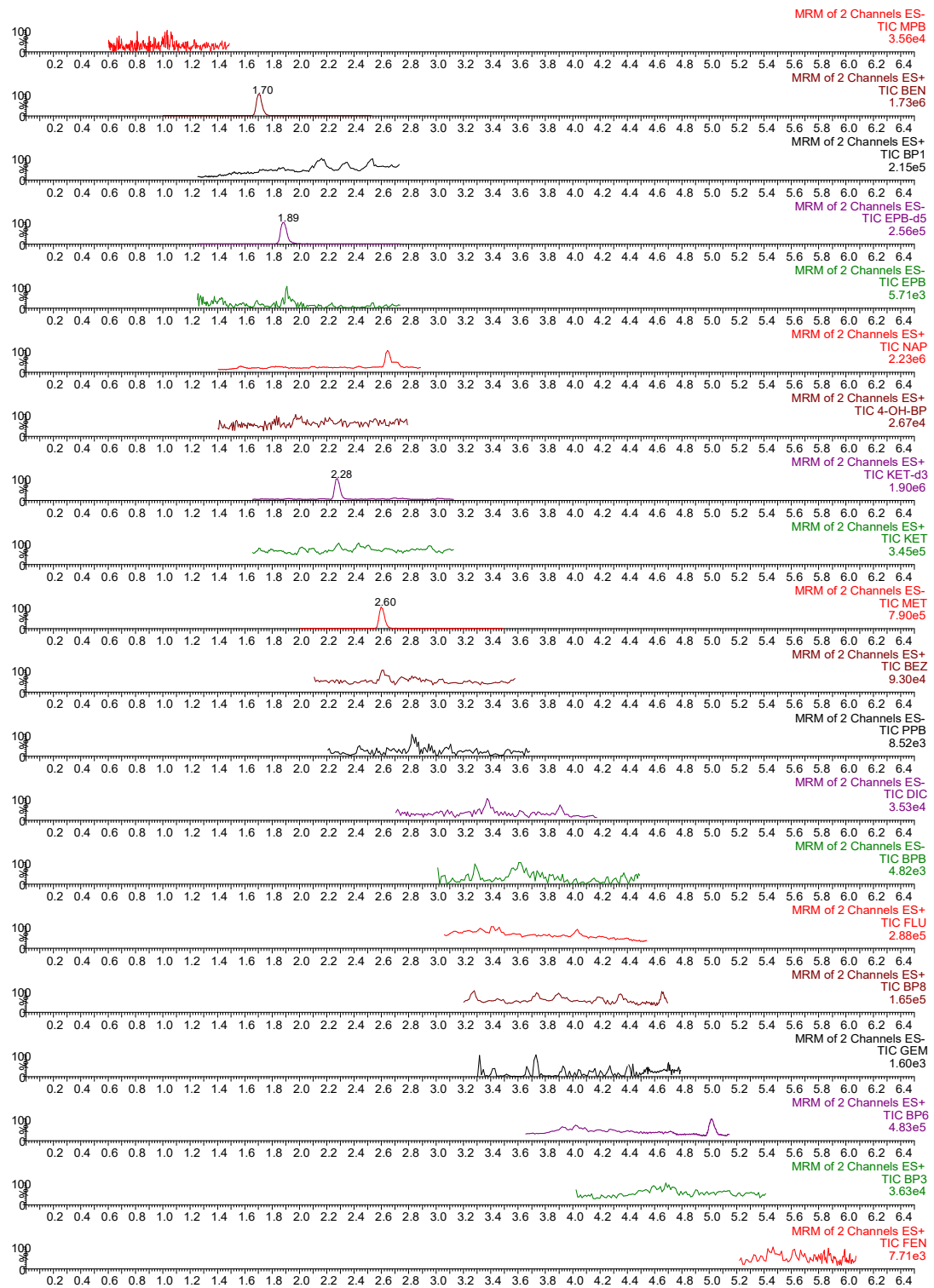


Figura II.8. Cromatograma del compost blanco dopado con ISs

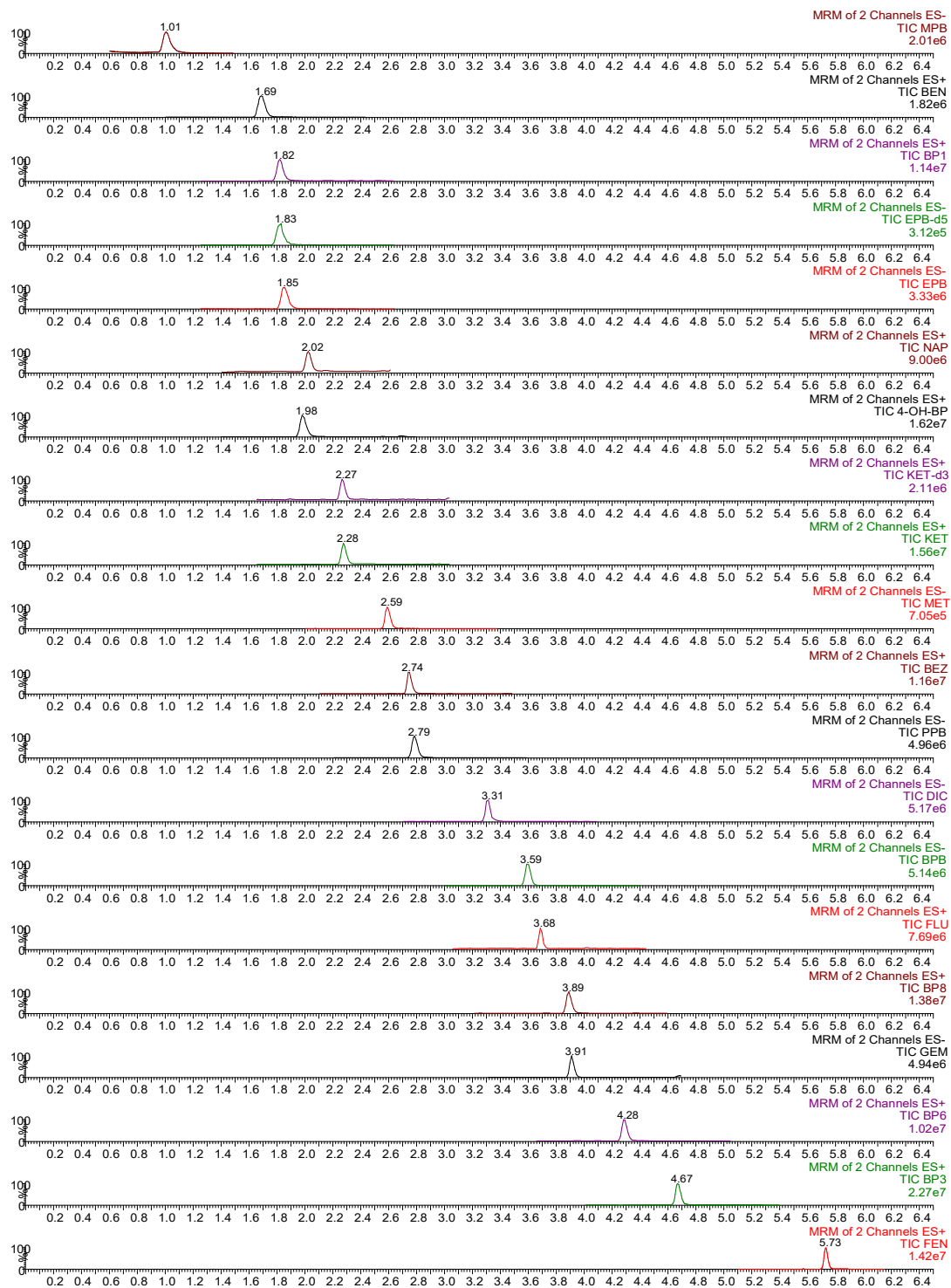


Figura II.9. Cromatograma de compost blanco dopado con los analitos e ISs (Patrón 7)

E. Incertidumbre estándar y HorRat. Para finalizar la validación del método, se determinó la incertidumbre estándar, $u(Z)$ y la razón Horwitz (HorRat) para cada nivel de concentración validado siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo I.

En el diseño experimental Plackett-Burmann para evaluar la robustez, se incluyeron las siguientes ocho variables: el porcentaje de ácido acético y de acetonitrilo, el volumen de agua, la cantidad de NaCl y MgSO₄, el voltaje del capilar tanto en ESI+ como ESI-, la temperatura de desolvatación y el flujo del gas de desolvatación. Se obtuvieron 12 experimentos más tres puntos centrales. El dominio experimental del diseño así como el cambio en la variable que se esperaría cuando el método está funcionando de forma rutinaria (δ_{esperado}) y el cambio en la variable especificado en el estudio de robustez (δ_{test}), se muestran en la Tabla II.19.

Tabla II.19. Dominio experimental del diseño, δ_{esperado} y δ_{test}

	Óptimo	Nivel inferior	Nivel superior	δ_{test}	δ_{esp}
% ACN	50	45	55	10	4
% Ácido	10	9	11	2	0.5
Agua (mL)	7	6.5	7.5	1	0.3
NaCl (g)	0.5	0.45	0.55	0.1	0.05
MgSO₄ (g)	2	1.8	2.2	0.4	0.1
Voltaje del capilar * (kV)	0.6 (2.5)	0.5 (2.4)	0.7 (2.6)	0.2	0.1
T Desolvatación (°C)	500	490	510	20	5
Gas desolvatación (L h⁻¹)	800	780	820	40	10

* Entre paréntesis el voltaje de capilar ESI-

En la Tabla II.20, además de la incertidumbre estándar y HorRat, se recogen los valores de la incertidumbre asociada a la veracidad y el estudio de robustez, así como la precisión intermedia. Los valores de HorRat variaron entre 0.06 y 0.48, por lo que el método puede ser aceptado (HorRat < 1).

Tabla II.20. Incertidumbre estándar y HorRat

	Dopado (ng g ⁻¹)	^a S _R (ng g ⁻¹)	^b u(δ) (ng g ⁻¹)	^c DER _{rob} (%)	^d u _{rob} (Z) (ng g ⁻¹)	^e u(Z) (ng g ⁻¹)	HorRat
DIC	40	4.1	1.7		1.2	4.6	0.39
	200	14.6	4.0	3.0	6.0	16.3	0.34
	640	46.4	14.2		19.0	52.1	0.42
FLU	28	3.3	1.2		1.7	3.9	0.43
	140	13.2	5.9	5.9	8.3	16.6	0.41
	448	28.0	8.5		26.4	39.4	0.32
KET	5.2	0.2	0.07		0.1	0.2	0.12
	26	0.3	0.08	2.1	0.5	0.6	0.04
	83.2	1.3	0.3		1.7	2.2	0.06
NAP	10	0.5	0.2		0.3	0.6	0.15
	50	2.0	0.5	2.9	1.4	2.5	0.14
	160	4.3	1.9		4.6	6.6	0.12
BEZ	10	0.8	0.3		0.4	0.9	0.25
	50	2.6	0.7	3.9	2.0	3.3	0.21
	160	8.4	3.8		6.3	11.2	0.24
FEN	10	0.9	0.4		0.6	1.1	0.27
	50	5.6	1.8	5.9	2.9	6.6	0.40
	160	12.8	3.7		9.4	16.3	0.35
GEM	40	2.9	0.8		2.7	4.0	0.29
	200	20.3	6.4	6.8	13.5	25.2	0.48
	640	41.6	11.9		43.2	61.2	0.36
MPB	40	2.1	0.6		2.7	3.5	0.21
	200	11.3	3.5	6.8	13.7	18.1	0.26
	640	43.4	12.1		43.8	62.8	0.37
EPB	20	1.4	0.3		0.8	1.6	0.13
	200	7.4	2.3	3.8	7.6	10.8	0.18
	640	17.7	4.4		24.3	30.3	0.16
PPB	20	1.4	0.4		1.4	2.0	0.13
	200	11.2	3.5	7.1	14.2	18.4	0.27
	480	22.5	6.2		34.0	41.3	0.20

Tabla II.20 cont. Incertidumbre estándar y HorRat

	Dopado (ng g ⁻¹)	^a S _R (ng g ⁻¹)	^b u(δ) (ng g ⁻¹)	^c DER _{rob} (%)	^d u _{rob} (Z) (ng g ⁻¹)	^e u(Z) (ng g ⁻¹)	HorRat
BPB	14	1.5	0.4		0.7	1.7	0.20
	140	7.0	2.1	4.9	6.8	10	0.23
	336	26.9	7.0		16.3	32.2	0.35
4-OH-BP	10	0.6	0.1		0.4	0.7	0.19
	50	5.7	1.7	3.8	1.9	6.2	0.45
	160	5.7	1.5		6.1	8.5	0.16
BP1	20	1.0	0.3		0.8	1.3	0.15
	100	7.3	2.3	4.0	4.0	8.6	0.30
	320	18.2	6.4		12.9	23.2	0.28
BP3	20	1.0	0.3		0.9	1.4	0.19
	100	5.1	1.3	4.4	4.4	6.9	0.22
	320	13.0	4.2		14.1	19.7	0.21
BP6	20	0.9	0.4		1.0	1.4	0.14
	100	4.8	1.5	5.0	5.0	7.1	0.21
	320	11.3	2.8		15.9	19.7	0.19
BP8	20	0.7	0.2		0.7	1.0	0.12
	100	2.7	0.7	3.6	3.6	4.6	0.12
	320	6.0	2.1		11.6	13.2	0.10

^a Precisión intermedia; ^b Incertidumbre de la veracidad; ^c Desviación estándar relativa del estudio de robustez; ^d Incertidumbre de la robustez; ^e Incertidumbre estándar

4.4. Aplicación del método analítico

Para aplicar el método desarrollado, se analizaron 14 muestras de compost comercial procedentes de lodos de depuradora. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.21.

Tabla II.21. Aplicación del método analítico a muestras comerciales de compost

^a Concentración (ng g ⁻¹ d.w.) (DE)					
	01	02	03	04	05
DIC	33 (1)	40 (2)	34.9 (0.7)	43 (4)	ND
FLU	ND	174 (7)	210 (20)	90 (7)	66 (3)
KET	2.2 (0.1)	3.7 (0.3)	8.8 (0.5)	26 (2)	5.1 (0.1)
NAP	ND	19 (1)	8.1 (0.3)	ND	9.1 (0.3)
BEZ	NQ	NQ	NQ	5.9 (0.3)	NQ
FEN	NQ	9.0 (0.8)	4.4 (0.1)	NQ	NQ
GEM	ND	23 (1)	20 (1)	34 (3)	14.6 (0.9)
MPB	160 (10)	170 (10)	76 (6)	240 (20)	29 (2)
EPB	NQ	NQ	ND	NQ	6.5 (0.3)
PPB	NQ	NQ	NQ	NQ	5.9 (0.4)
BPB	6.2 (0.5)	ND	ND	ND	NQ
4-OH-BP	NQ	14.5 (0.7)	32 (1)	9.3 (0.4)	46 (1)
BP1	ND	NQ	NQ	NQ	NQ
BP3	11.0 (0.5)	14.2 (0.4)	11.9 (0.4)	8.2 (0.3)	17.8 (0.9)
BP6	ND	ND	ND	ND	ND
BP8	NQ	ND	ND	ND	ND
^a Concentración (ng g ⁻¹ d.w.) (DE)					
	06	07	08	09	10
DIC	44 (2)	175 (7)	79 (5)	109 (4)	68 (6)
FLU	173 (9)	128 (8)	82 (3)	81 (8)	130 (10)
KET	6.0 (0.2)	510 (40)	16.6 (0.6)	16.5 (0.7)	16.8 (0.6)
NAP	ND	19.8 (0.7)	ND	ND	6.5 (0.5)
BEZ	ND	ND	ND	ND	ND
FEN	ND	9.5 (0.8)	4.7 (0.3)	NQ	7.9 (0.6)
GEM	13.8 (0.9)	23 (1)	15 (1)	15.0 (0.8)	16.3 (0.9)
MPB	NQ	34 (3)	13 (1)	16.7 (0.8)	31 (2)
EPB	NQ	NQ	ND	ND	ND
PPB	7.0 (0.2)	NQ	ND	ND	NQ
BPB	6.9 (0.3)	ND	ND	ND	ND
4-OH-BP	8.7 (0.3)	70 (4)	36 (3)	25.3 (0.9)	27 (1)
BP1	NQ	ND	ND	ND	7.4 (0.6)
BP3	13.3 (0.4)	32 (1)	13.7 (0.3)	12.2 (0.8)	26 (1)
BP6	ND	ND	ND	ND	ND
BP8	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla II.21 cont. Aplicación del método analítico a muestras comerciales de compost

	^a Concentración (ng g ⁻¹ d.w.) (DE)			
	11	12	13	14
DIC	510 (10)	50 (2)	72 (3)	47 (3)
FLU	190 (10)	40 (1)	200 (10)	370 (20)
KET	118 (3)	5.8 (0.2)	29.5 (0.7)	6.3 (0.3)
NAP	250 (9)	7.0 (0.3)	ND	13.4 (0.6)
BEZ	12.6 (0.5)	ND	ND	ND
FEN	4.7 (0.2)	ND	NQ	NQ
GEM	83 (3)	ND	20 (1)	55 (2)
MPB	228 (6)	92 (3)	14 (1)	ND
EPB	NQ	NQ	ND	ND
PPB	6.1 (0.2)	NQ	ND	NQ
BPB	NQ	NQ	ND	ND
4-OH-BP	9.0 (0.6)	4.3 (0.3)	30.9 (0.9)	22.5 (0.6)
BP1	NQ	NQ	ND	NQ
BP3	86 (2)	13.4 (0.7)	14.2 (0.3)	9.4 (0.2)
BP6	ND	ND	ND	ND
BP8	ND	ND	ND	ND

^a Media de seis determinaciones; DE: desviación estándar; ND: no detectado (<LOD); NQ: no cuantificado (entre LOD y LOQ)

4-OH-BP, BP3 y MPB aparecieron en todas las muestras, lo que puede indicar que el compost se obtuvo de lodos procedentes de aguas residuales urbanas. Para el resto de benzofenonas, sólo BP1 y BP8 se detectaron en nueve muestras y una, respectivamente. EPB, PBP, BPB se detectaron entre el 79% y el 36% de las muestras. El diclofenaco se encontró en todas las muestras, excepto en una, y además en altas concentraciones. KET y FLU también se cuantificaron en la mayoría de las muestras (no se detectó FLU en C1).

El hallazgo de concentraciones elevadas de DIC, FLU y KET (> 100 ng g⁻¹ d.w.) en algunas muestras fue sorprendente. Debe resaltarse que no se ha informado de la existencia de FLU, hasta ahora, ni en compost ni en lodo. NAP, se encontró en ocho muestras. En cuanto a los reguladores lipídicos, GEM fue el más recurrente, detectado en 12 muestras y siempre por encima de 14 ng g⁻¹

d.w. La Figura II.10 corresponde a un cromatograma de una de las muestras analizadas (11).

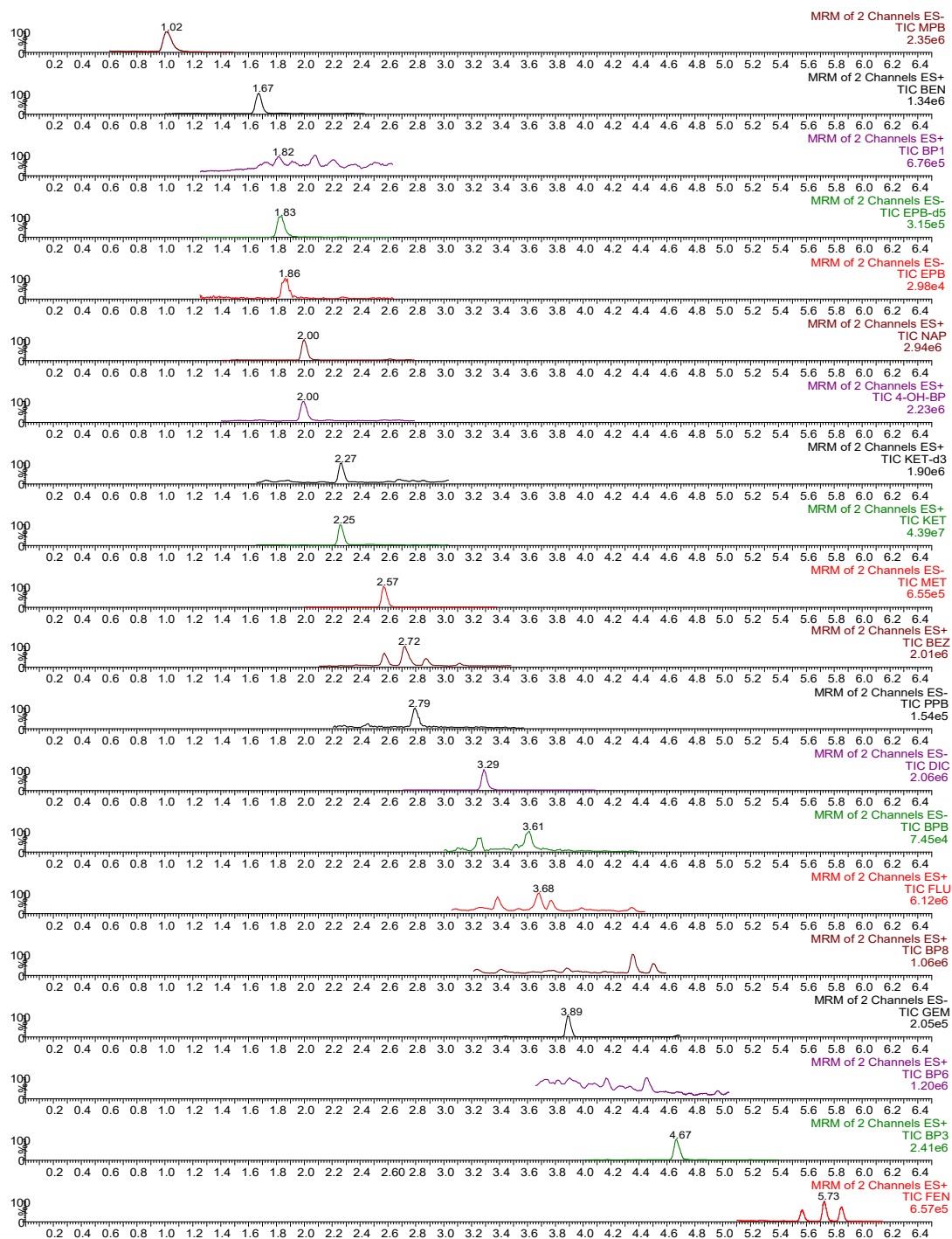


Figura II.10. Cromatograma de una muestra real de compost (11)

4.5. Comparación de los resultados con los previamente publicados

Muy pocos métodos analíticos son los publicados en la literatura científica para la determinación de los PPCPs propuestos en la presente investigación en compost procedente de lodo de depuradora, y un número aún menor de métodos, analizan diferentes familias de compuestos. La Tabla II.22 muestra un resumen de los más relevantes publicados hasta la fecha para la determinación de los analitos estudiados en el presente trabajo, bien en compost o en otros tipos de biosólidos utilizados en agricultura¹³⁶⁻¹⁴².

¹³⁶ Martin, J.; Santos, J.L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. *Journal of Separation Sciences*, 2010, 33, 1760-1766.

¹³⁷ Benítez-Villalba, J.C.; Zafra-Gómez, A.; Dorival-García, N.; Javier Camino-Sánchez, F.; Cantarero, S.; Vilchez, J.L. Ultra-performance liquid chromatography MS/MS method for the determination of parabens in compost from sewage sludge: Comparison of the efficiency of two extraction techniques. *Journal of Separation Science*, 2013, 36, 2635-2645.

¹³⁸ Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Miguel, E.; Aznar, R.; Tadeo, J.L. Determination of selected pharmaceutical compounds in biosolids by supported liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1336, 52-58.

¹³⁹ Guerra, P.; Kim, M.; Shah, A.; Alaei, M.; Smyth, S.A. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*, 2014, 473-474, 235-243.

¹⁴⁰ Kinney, C.A.; Furlong, E.T.; Zaugg, S.D.; Burkhardt, M.R.; Werner, S.L.; Cahill, J.D.; Jorgensen, G.R. Survey of Organic Wastewater Contaminants in Biosolids Destined for Land Application. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40, 7207-7215.

¹⁴¹ Liu, Y.S.; Ying, G.G.; Shareef, A.; Kookana, R.S. Simultaneous determination of benzotriazoles and ultraviolet filters in ground water, effluent and biosolid samples using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 5328-5335.

¹⁴² Liu, Y.S.; Ying, G.G.; Shareef, A.; Kookana, R.S. Occurrence and removal of benzotriazoles and ultraviolet filters in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Pollution*, 2012, 165, 225-232.

Tabla II.22. Métodos analíticos publicados en compost y biosólidos

Analito	LC ng g ⁻¹ d.w.	Extracción	Detección	Tipo de muestra	Cantidad ng g ⁻¹ d.w.	Ref.
DIC	5.3	UAE	LC-FLD	Compost	< LOQ	136
	2.3	SLE	GC-MS/MS	Biosolid	ND - 390	138
FLU	-	-	-	-	-	-
KET	7.7	UAE	LC-FLD	Compost	< LOQ	136
	5.6	SLE	GC-MS/MS	Biosolid	No data	138
NAP	0.4	UAE	LC-FLD	Compost	< LOQ	136
	2.6	SLE	GC-MS/MS	Biosolid		138
	6.0	UAE + SPE	LC-MS/MS	Biosolid	ND - 150	139
BEZ	-	-	-	-	-	-
FEN	4.2	SLE	GC-MS/MS	Biosolid	13-101	138
GEM	114	UAE	LC-FLD	Compost	< LOQ	136
	4.8	SLE	GC-MS/MS	Biosolid	ND - 67	138
	18	PLE + SPE	GC/MS	Compost	ND - 420	140
MPB	13	PLE	LC-MS/MS	Compost	No data	137
EPB	10	PLE	LC-MS/MS	Compost	No data	137
PPB	15	PLE	LC-MS/MS	Compost	No data	137
BPB	13	PLE	LC-MS/MS	Compost	No data	137
4-OH-BP	-	-	-	-	-	-
BP1	-	-	-	-	-	-
BP3	24.4	PLE + SPE	GC-MS/MS	Biosolid	74	141
	24.4	PLE + SPE	GC-MS/MS	Biosolid	16	142
BP6	-	-	-	-	-	-
BP8	-	-	-	-	-	-

UAE: extracción asistida por ultrasonidos; SLE: supported liquid extraction; PLE: extracción con líquidos presurizados; SPE: extracción en fase sólida; ND: no detectado (<LD)

Como resumen final, se puede afirmar que:

- ✓ No se ha publicado ningún estudio en el que se analice en un único método parabenos, benzofenonas y fármacos.
- ✓ Incluso, algunos compuestos de los seleccionados en la presente Tesis Doctoral no han sido estudiados hasta ahora en este tipo de muestras.

- ✓ Los límites de cuantificación del presente trabajo son similares a los encontrados en la literatura, y en algunos casos son mejorados (para DIC, NAP y GEM).
- ✓ Es notable que los niveles de concentración encontrados hasta la fecha son similares a los datos encontrados en el presente estudio.
- ✓ Por último, no se ha informado hasta la fecha sobre la detección de alguno de los analitos (FLU, BEZ, 4-OH-BP, BP1 o BP8) en compost o biosólidos.

El estudio presentado en este apartado, ha sido publicado recientemente en la revista científica internacional de alto impacto *Journal of Chromatography A*.

5. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS EN MUESTRAS DE SUELO AGRÍCOLA

5.1. Toma y almacenamiento de muestras

Las muestras objeto de estudio se obtuvieron de suelo agrícola de la Vega de Granada y de otros dos municipios de la provincia de Granada y Málaga (Loja y Vélez-Málaga respectivamente). Así mismo, se recogieron muestras de arriates del centro urbano de Granada. En total se tomaron 10 muestras de diferente procedencia.

El muestreo se realizó tomando pequeñas porciones de la parte superficial de 5 puntos del suelo o arriate. Cada porción fue rociada con una disolución al 1% de formaldehído para detener la actividad microbiana. Después de la recogida, las muestras se liofilizaron y tamizaron a través de una malla con un tamaño de poro ≤ 1.41 mm. Por último, las muestras se almacenaron en bolsas herméticas en oscuridad y a 4°C hasta el momento del análisis.

5.2. Optimización del proceso de extracción

En este apartado se detalla el desarrollo de un método para la extracción de los analitos a partir de las muestras de suelo, empleando como técnica la UAE. Se evaluó además la idoneidad del procedimiento de limpieza SALLE y dSPE. La estrategia seguida fue la siguiente:

- ✓ Selección del disolvente de extracción.
- ✓ Diagnóstico de las variables influyentes en UAE.
- ✓ Optimización de la extracción UAE.
- ✓ Evaluación de limpieza por SALLE y dSPE.

En las cuatro etapas se operó de la misma forma que en el caso de las muestras de compost. Se doparon muestras blanco de suelo, respetando la

proporción 1:1 (m/V) entre los gramos de muestra y los mililitros de la disolución de dopado. Los extractos finales se evaporaron hasta sequedad total.

5.2.1. Selección del disolvente de extracción

Para llevar a cabo la selección del disolvente de extracción, se prepararon las mismas seis mezclas binarias que en el caso del compost combinando metanol, acetona, acetonitrilo y acetato de etilo. Para cada mezcla se realizó una réplica experimental. Las condiciones iniciales de extracción se muestran en la Tabla II.23.

Tabla II.23. Variables fijadas en el ensayo de la elección del disolvente

Amplitud (%)	Ciclos	Masa de muestra (g)	V (mL)
70	2	1.00	10.0

Como en el compost, para este ensayo, no se aplicó el paso de limpieza y los extractos obtenidos se evaporaron sin recibir ningún tratamiento. La señal analítica usada para este ensayo fue el área absoluta normalizada.

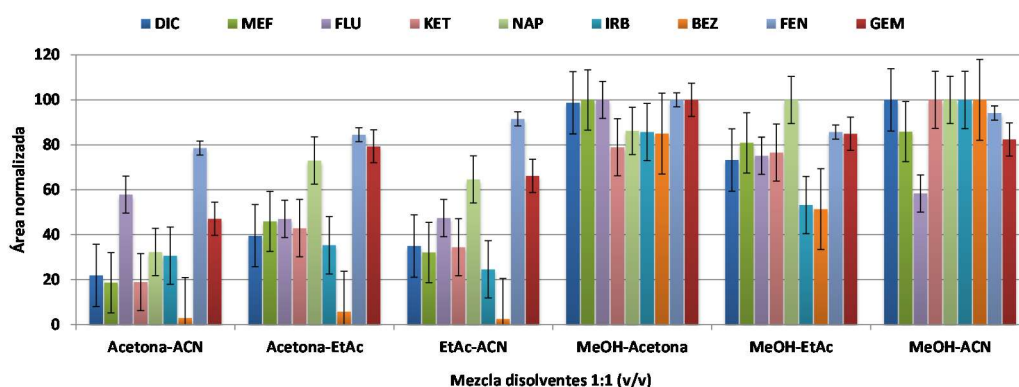


Figura II.11. Elección del disolvente de extracción para el suelo

Como se observa en la Figura II.11, las mezclas con MeOH mostraron los mejores resultados. De las tres mezclas, la mejor fue la que contenía acetona. Con MeOH-ACN el área fue un 40% menor para el ácido flufenámico, al igual que para el irbesartan y bezafibrato con la mezcla MeOH-AcEt.

5.2.2. Selección de variables para UAE. Diseño Plackett-Burman

La siguiente etapa fue seleccionar las variables más influyentes que afectan a la extracción por ultrasonidos. Se llevó a cabo un diseño de cribado Plackett-Burman, en el que se incluyeron tres puntos centrales (12+3 experimentos). Las variables fueron las mismas que en el método optimizado para el compost (composición y volumen del disolvente, masa de muestra, número de ciclos y porcentaje de ácido acético) incluyendo además el tiempo por ciclo. En este experimento, solo se fijó la amplitud de la sonda al 70%. En la Tabla II.24 se recogen los valores de las variables del diseño para cada experimento.

Tabla II.24. Matriz del diseño Plackett-Burman para la selección de los parámetros UAE en la extracción del suelo

	Ácido (%)	Acetona (%)	Ciclos	Masa (g)	V (mL)	t (min)
1	10	90	3	0.5	15	15
2	0	90	3	0.5	15	5
3	10	90	1	2.0	5	5
4	0	90	1	0.5	5	15
5	5	50	2	1.25	10	10
6	5	50	2	1.25	10	10
7	5	50	2	1.25	10	10
8	10	10	1	0.5	15	15
9	0	90	3	2.0	5	15
10	0	10	3	2.0	15	5
11	0	10	1	0.5	5	5
12	10	10	3	0.5	5	5
13	10	10	3	2.0	5	15
14	0	10	1	2.0	15	15
15	10	90	1	2.0	15	5

La respuesta que se evaluó fue la recuperación de la extracción (%). Los coeficientes de determinación (R^2) que se obtuvieron para todos los fármacos después de analizar el diseño fueron superiores al 75%. En ningún analito se obtuvo un valor P_{lof} superior a 0.05, por lo que se concluye que es necesario realizar un diseño de superficie de respuesta para optimizar las variables demostradas como influyentes. Para determinar los factores más influyentes se recurrió a los diagramas de Pareto (ver Figura II.12).

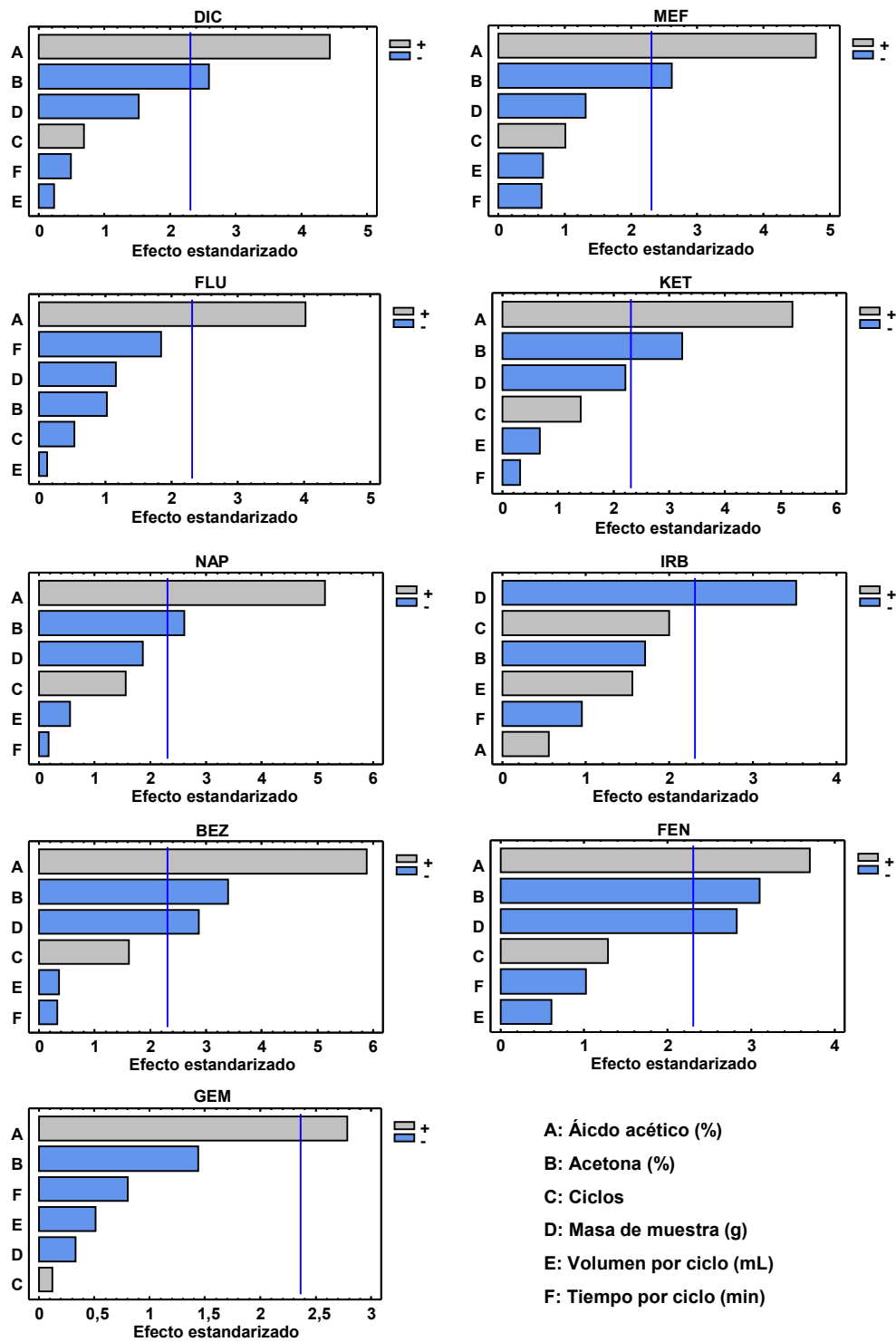


Figura II.12. Diagramas de Pareto del diseño de cribado del suelo

Del análisis de los gráficos, se concluye que el porcentaje de acetona y de ácido acético son las variables más significativas en la mayoría de los fármacos, seguidos del número de ciclos y la masa de muestra (en 3 y 4 casos, respectivamente). El volumen por ciclo solo fue significativo en el caso del IRB, y en cuarto lugar. Por este motivo, se fijó en el menor volumen ensayado, 5 mL, al igual que el tiempo de extracción por ciclo (5 min). Entre el número de ciclos y la masa, se seleccionó el primero junto a la composición del disolvente (% Acetona y % Ac. acético) para evaluar en un posterior diseño de superficie de respuesta. La masa de muestra se fijó en 1 g que corresponde a un valor muy próximo al del punto central.

5.2.3. Optimización de la extracción UAE

Se optimizó la composición del disolvente (% acetona y % ácido acético) y el número de ciclos mediante un diseño experimental Box-Behnken con tres variables. El diseño consistió en 15 experimentos en los que se incluyen tres puntos centrales. Los dos niveles para cada variable fueron 0% y 10% para ácido acético, 0% y 100% para acetona, y 1 y 3 para el número de ciclos. La matriz de experimentos se muestra en la Tabla II.25.

Tabla II.25. Matriz del diseño Box-Behnken usada para el suelo

	Acetona (%)	Ac Acético (%)	Ciclos		Acetona (%)	Ac Acético (%)	Ciclos
1	50	5	2	9	100	5	3
2	50	10	3	10	100	10	2
3	0	5	1	11	100	0	2
4	0	10	2	12	50	0	3
5	50	10	1	13	50	5	2
6	0	5	3	14	0	0	2
7	50	5	2	15	100	5	1
8	50	0	1				

Como respuesta se evaluó la recuperación de extracción de cada compuesto. Al analizar el diseño se obtuvieron coeficientes de determinación comprendidos entre 85% y 99%, así como P_{lof} superiores a 0.05 menos para DIC (0.03). En la

Tabla II.26 se recogen los efectos estimados sobre la recuperación. Aquellos estadísticamente significativos se muestran en rojo.

Tabla II.26. Efectos de cada factor sobre el rendimiento de extracción de los fármacos

	NSAIDs e IRB					Reguladores lipídicos			
	DIC	MEF	FLU	KET	NAP	IRB	BEZ	FEN	GEM
A: % Acetona	-4.2	0.2	-2.0	-3.1	-2.4	17.8	-6.1	5.1	3.8
B: % Ácido	50.4	51.2	56.7	61.0	65.0	-40.6	65.4	0.1	27.8
C: Ciclos	17.0	16.3	21.6	18.7	21.0	18.5	21.4	16.7	16.8
AA	-2.9	-4.8	-5.1	-3.9	-4.4	-25.9	-5.1	-4.4	-5.8
AB	12.4	11.5	11.4	8.6	6.4	21.6	9.3	-3.1	10.6
AC	0.1	0.7	-0.2	1.2	0.2	-1.7	0.8	2.8	-1.7
BB	-57.9	-58.6	-59.4	-64.5	-62.8	12.0	-64.9	-3.1	-37.6
BC	-3.2	0.4	4.6	5.3	7.4	4.0	7.5	2.6	-1.8
CC	-6.4	-5.1	-7.4	-7.6	-7.8	-25.2	-17.3	-8.9	0.7

El análisis de los datos obtenidos permite concluir que:

- ✓ **Número de ciclos.** Su término lineal es significativo en todos los analitos excepto el IRB. Es positivo, como era de esperar, pero aparece como el tercer o cuarto efecto más importante excepto para el FEN en el que aparece el primero.
- ✓ **Concentración de ácido acético.** Es sin ninguna duda la variable más influyente tanto en su término lineal (positivo) como cuadrático (negativo). Los efectos B y BB son significativos en todos los analitos menos el FEN, precisamente uno de los que no presenta carácter ácido-base.
- ✓ **Porcentaje de acetona.** Los efectos A y AA no son significativos para la extracción de estos fármacos. Sin embargo, la interacción AB, relacionada con la composición del disolvente de extracción (porcentaje tanto de ácido como de acetona), sí que es significativa en casi todos los compuestos menos en tres.

5.2.4. Optimización de múltiples respuestas

De forma análoga a lo llevado a cabo en el caso del compost, se usó la función de deseabilidad global para obtener las condiciones óptimas de la extracción (Figura II.13).

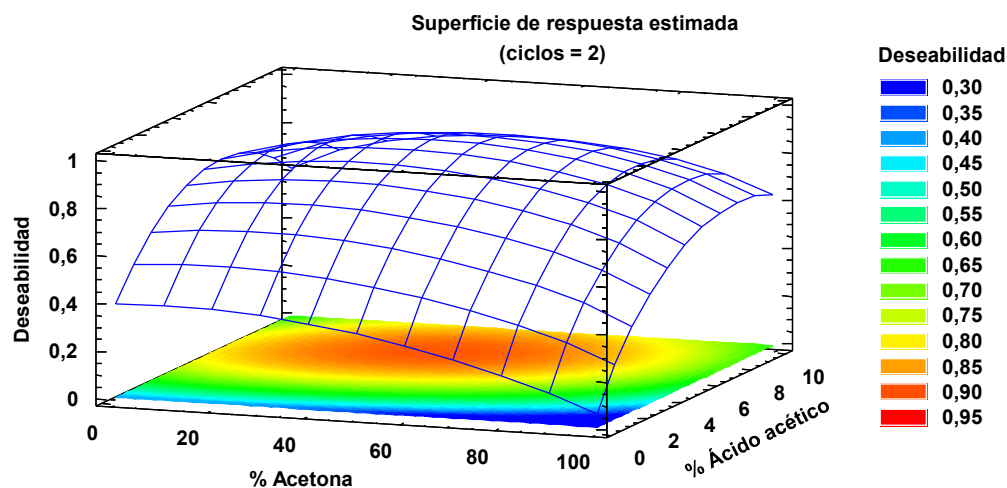


Figura II.13. Optimización del % acetona, concentración de ácido acético y ciclos para la extracción UAE en suelo. Superficie de respuesta obtenida para la función de deseabilidad global (2 ciclos)

Las condiciones experimentales óptimas ($D = 0.937$) fueron 45%, 7% y 3 para el porcentaje de acetona, la concentración de ácido acético y el número de ciclos, respectivamente.

Por último, al igual que en el caso del compost, se evaluó la posibilidad de emplear dos ciclos de extracción. Se comprobó que la disminución a dos ciclos no supone cambio en la composición del disolvente, afectando mínimamente al máximo de la función D ($D = 0.883$). Además, se comparó la recuperación teórica en la extracción para dos y tres ciclos (Figura II.14). El análisis de los resultados obtenidos demuestra que no existen diferencias significativas, con el consiguiente beneficio en términos de tiempo y cantidad de disolvente que supone el usar un ciclo menos en la extracción.

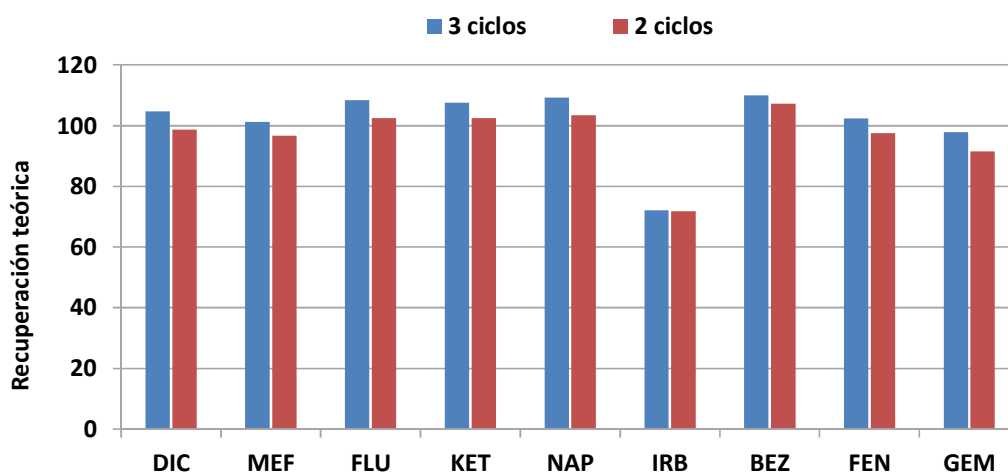


Figura II.14. Recuperación teórica comparativa entre usar 2 y 3 ciclos con la misma disolución de extracción MeOH:Acetona (55:45) al 7% de ácido acético.

5.2.5. Limpieza asistida por sales, SALLE

Dado que el extracto procedente del UAE solo contenía disolvente orgánico, fue necesario añadir agua para llevar a cabo la limpieza con la técnica SALLE. Para ello, se prepararon varias mezclas de extracto orgánico:agua en una proporción 1:1 (10 mL aproximados del extracto más otro 10 mL de agua). Para conseguir la separación de fases se usaron las siguientes cantidades y tipos de sales:

1. 5 g de NaCl.
2. 5 g de KCl.
3. 1 g de NaCl + 4 g de MgSO₄.
4. 1 g KCl + 4 g de MgSO₄.
5. 5 g de (NH₄)₂SO₄.
6. 1 g de (NH₄)₂SO₄ + 4 g de MgSO₄.

Por otro lado, con objeto de observar con mayor facilidad la separación de fases se añadió unas gotas de colorante alimentario. Todas las mezclas se agitaron en vortex el mismo tiempo (2 minutos) y se centrifugaron a $3459 \times g$ (3 minutos). En ninguno de los ensayos se observó separación de las fases. Adicionalmente se añadió a cada falcon 5 g más de NaCl, sin obtener el resultado deseado como se puede ver en la Figura II.15.



Figura II.15. Mezclas de extracto orgánico:agua con distintas sales ensañadas en la limpieza SALLE

5.2.6. Evaluación de la limpieza mediante fase sólida dispersiva, dSPE

Se probaron varios adsorbentes dispersivos de forma individual: florisil, alúmina, PSA, sílica y C18. Los ensayos se realizaron por triplicado y la cantidad empleada fue de 200 mg. También se llevó a cabo un ensayo en ausencia de adsorbente dispersivo. Se compararon las áreas absolutas obtenidas de muestras sin tratar con muestras tratadas con adsorbente mediante un análisis ANOVA simple para determinar si existían diferencias significativas entre las medias para cada uno de los adsorbentes dispersivos. En muchos de los casos P_{lof} fue menor a 0.05, por lo que se concluyó, con un nivel del 95%, que las medias eran diferentes. En la Figura II.16 se muestran los resultados obtenidos para cada adsorbente.

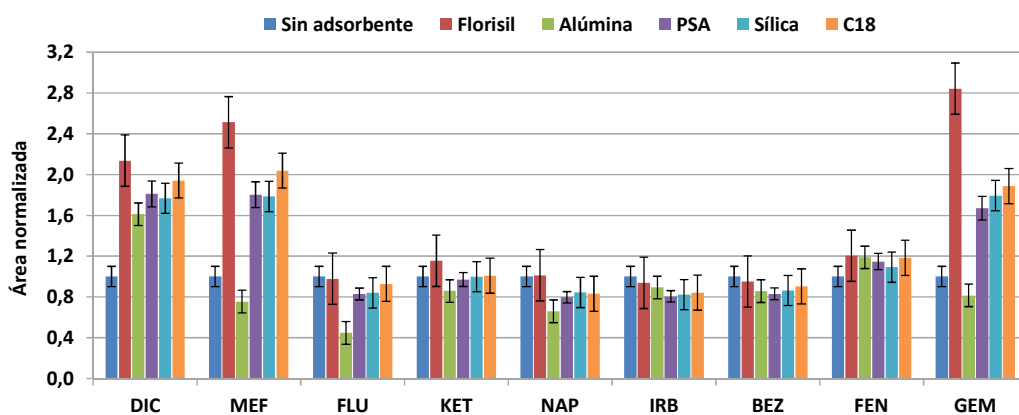


Figura II.16. Uso de adsorbente dispersivo en el suelo

Al realizar este ensayo se observó que el uso de adsorbente dispersivo florisil es ligeramente contraproducente solo en dos casos, IRB y BEZ. En el resto de los fármacos o bien no afecta significativamente o, mejora notablemente la señal (DIC, MEF y GEM). A la vista de los resultados obtenidos, se decidió adicionar 200 mg de dicho adsorbente dispersivo para llevar a cabo la limpieza final del extracto orgánico procedente de UAE.

5.2.7. Volumen y composición de la disolución de reconstitución

Se estudió el volumen de la disolución de reconstitución de los extractos secos previo a la inyección en el cromatógrafo de líquidos. Para ello, se ensayaron cuatro volúmenes de una mezcla Buffer:MeOH 1:1 (v/v): 0.50, 0.60, 0.70 y 1.00 mL, basada en la fase móvil empleada en la separación cromatográfica. Se evaluó el área absoluta y los resultados se normalizaron y representaron en la Figura II.17.

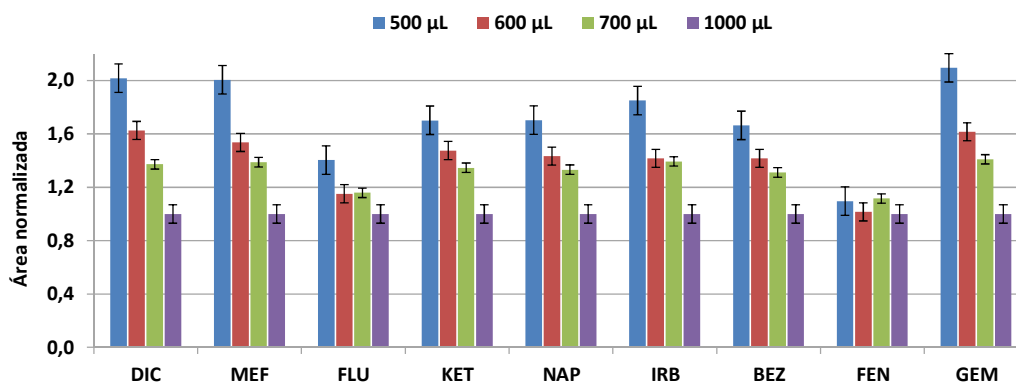


Figura II.17. Volumen de la disolución de reconstitución del extracto final evaporado en el suelo

Los resultados obtenidos demuestran que al concentrar el extracto se consiguió mayor señal analítica, sin observar un aumento de la supresión iónica por efecto del aumento de la concentración de los concomitantes. Por este motivo, se eligió 0.5 mL como volumen de reconstitución.

Finalmente, del mismo modo que en el caso del compost estudiado en el apartado anterior, se procedió al estudio del efecto matriz (área absoluta en matriz/área absoluta en disolvente - 1) derivado de todo el método analítico. Los resultados se muestran en la Figura II.18.

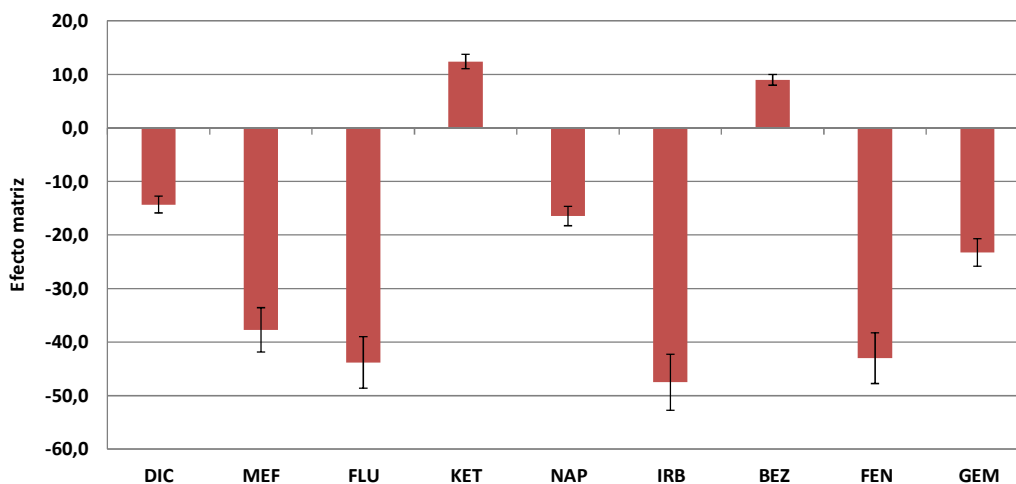


Figura II.18. Efecto matriz del método de suelo

Dada la complejidad de las muestras analizadas, se concluye que es altamente complicado eliminar completamente el efecto matriz, sin embargo, se puede dar como correcta la disminución conseguida con el tratamiento de muestra aplicado.

5.2.8. Procedimiento final de extracción

Una vez finalizada la optimización de la extracción del suelo y limpieza del extracto, el procedimiento de tratamiento de muestra previo a la inyección en el cromatógrafo de líquidos puede ser resumido del siguiente modo:

1. Se pesa 1.0 g de suelo y se coloca en la celda metálica de extracción. Las muestras se dopan con 1.0 mL de solución metanólica de KET-d₃, BEN y MET (surrogates) y se dejan secar durante 16-24h.
2. Las muestras dopadas se extraen, en tandas de cuatro, mediante UAE añadiendo a la celda 5 mL de una mezcla de Acetona/MeOH (45:55, v/v) con un 7% de ácido acético. Se extrae durante 5 min por ciclo (2 ciclos), con un 70% de amplitud en el ultrasonido.
3. Los extractos obtenidos en cada ciclo de extracción se unen en un tubo Falcon de 50 mL y a continuación, se añaden 200 mg de florisil, se agita durante un minuto en vortex y se centrifuga a 3459 x *g* durante 3 minutos.
5. El sobrenadante se transfiere a un vial de vidrio y, después de evaporarlo hasta sequedad a 45°C bajo una corriente de N₂, el residuo que se obtiene se redissuelve en 0.5 mL de una mezcla de buffer y metanol (1:1, v/v), se sónica en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos y se centrifuga a 16300 x *g* durante 30 minutos.
6. Finalmente, el extracto se transfiere a un vial de cromatografía para su análisis mediante UHPLC-MS/MS.

5.3. Calibración y validación del método analítico

5.3.1. Modelo de calibración

Para evaluar el efecto matriz, se compararon las pendientes del calibrado externo y en matriz. Las curvas se representaron gráficamente utilizando la relación, área del analito/área del correspondiente surrogate (área relativa), frente a la concentración teórica. Al comparar las pendientes igual que se hizo en el caso del compost, se observó que existía efecto matriz en todos los compuestos menos en KET. Por tanto, se decidió analizar todas las muestras de suelo y validar el método con el calibrado en matriz.

Para construir el calibrado en matriz se analizaron, empleando el método optimizado, ocho niveles de concentración en un intervalo variable dependiendo del compuesto estudiado. Cada nivel se realizó por duplicado y cada réplica se analizó dos veces. Los parámetros estadísticos de la calibración en suelo se muestran en la Tabla II.27.

Tabla II.27. Parámetros estadísticos de la calibración en matriz para el suelo

	DIC	MEF	FLU	KET	NAP	IRB
n	32	32	32	32	32	32
b	$1.8 \cdot 10^{-1}$	$3.3 \cdot 10^{-1}$	$8.6 \cdot 10^{-2}$	$7.2 \cdot 10^{-1}$	$1.4 \cdot 10^{-1}$	8.8
S_b	$1.8 \cdot 10^{-3}$	$3.6 \cdot 10^{-3}$	$9.8 \cdot 10^{-4}$	$4.3 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$8.6 \cdot 10^{-2}$
S_{y/x}	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$4.5 \cdot 10^{-2}$	$2.2 \cdot 10^{-2}$	$3.1 \cdot 10^{-2}$	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$2.1 \cdot 10^{-1}$
R² (%)	99.8	99.8	99.7	99.9	99.9	99.9
P_{lof} (%)	9.7	58.6	29.8	28.4	13.5	12
	BEZ	FEN	GEM			
n	32	32	32			
b	$8.7 \cdot 10^{-2}$	$5.4 \cdot 10^{-2}$	$2.7 \cdot 10^{-2}$			
S_b	$8.5 \cdot 10^{-4}$	$8.1 \cdot 10^{-4}$	$2.4 \cdot 10^{-4}$			
S_{y/x}	$9.5 \cdot 10^{-3}$	$6.1 \cdot 10^{-3}$	$5.3 \cdot 10^{-3}$			
R² (%)	99.8	99.7	99.9			
P_{lof} (%)	92.3	12.1	91.3			

n: puntos de calibración; *b*: pendiente; *S_b*: desviación estándar de la pendiente; *S_{y/x}*: desviación estándar de los residuos; *R²*: coeficiente de determinación; %*P_{lof}*: valor P del test de fallo de ajuste.

5.3.2. Validación del método analítico

El método analítico fue validado en términos de exactitud (veracidad y precisión), sensibilidad (límites de determinación y cuantificación), linealidad y selectividad según la guía internacional de la FDA para la Validación de un Método Bioanalítico¹⁰⁵.

A. Exactitud. La exactitud del método se evaluó en términos de precisión y veracidad. Para llevar a cabo el ensayo, se doparon muestras blanco de suelo a tres niveles de concentración diferentes. Para cada punto de concentración, se realizaron tres réplicas diarias durante tres días diferentes. Cada réplica experimental se analizó dos veces. Se determinó la precisión interdía y se expresó como desviación estándar relativa (DER, %); y la veracidad se expresó en términos de recuperación (concentración del analito obtenida del calibrado/concentración de dopado teórica) respecto a la cantidad añadida de cada uno de los analitos. Los resultados se resumen en la Tabla II.28.

Tabla II.28. Parámetros estadísticos de la calibración en matriz para el suelo

	Dopado (ng g ⁻¹)	^a Rec (%)	^b DER (%)		Dopado (ng g ⁻¹)	^a Rec (%)	^b DER (%)
DIC	2	98.6	4.3		0.4	94.3	6.1
	20	108.2	2.1	IRB	4.0	104.2	4.2
	40	103.5	3.5		8.0	102.3	3.4
MEF	2	103.4	4.6			2	107.8
	20	109.6	3.5	BEZ	20	96.2	7.1
	40	105.6	2.3		40	102.9	3.5
FLU	4	102.0	6.7		2	95.2	5.7
	40	99.3	5.2	FEN	20	100.9	5.1
	80	110.4	4.6		40	97.1	6.2
KET	0.4	97.7	4.6		4	92.8	7.3
	4.0	99.1	3.9	GEM	40	97.5	5.6
	8.0	102.4	4.4		80	105.1	6.0
NAP	2	94.1	5.1				
	20	106.7	4.6				
	40	102.6	4.5				

^a Rec: recuperación (media de 18 determinaciones)

^b DER (%), desviación estándar relativa

En cuanto la DER, todos los valores oscilaron entre el 2.1% y el 8.4%, lo cual cumple con la directriz de la guía de validación empleada, que fija como máximo un 15% para cualquier valor y un 20% en la zona del límite de cuantificación. Por su parte, todas las recuperaciones fueron cercanas al 100% (92.8% -110.4%). A la luz de estos resultados, se puede afirmar que el método es exacto en el rango de concentración evaluado para cada compuesto.

B. Límites de detección y cuantificación. En este caso se calcularon usando los parámetros de calibración. Se realizó una estimación de la desviación estándar del blanco (S_0) obtenida por extrapolación de la recta de calibrado a cero. El LOD se calculó como $3 \cdot S_0$ y el LOQ como $10 \cdot S_0$. Los resultados y el rango dinámico lineal (RDL) se muestran en la Tabla II.29.

Tabla II.29. Límites de detección, de cuantificación y rango dinámico lineal para el suelo

	DIC	MEF	FLU	KET	NAP	IRB
LOD (ng g⁻¹)	0.4	0.4	0.7	0.1	0.4	0.07
LOQ (ng g⁻¹)	1	1	2	0.4	1	0.2
RDL (ng g⁻¹)	1-50	1-50	2-100	0.4-10	1-50	0.2-10
	BEZ	FEN	GEM			
LOD (ng g⁻¹)	0.3	0.3	0.5			
LOQ (ng g⁻¹)	1	1	2			
RDL (ng g⁻¹)	1-50	1-50	2-100			

C. Linealidad. Se evaluó el coeficiente de determinación de la recta de calibración y se realizó la prueba de fallo de ajuste. En todos los casos, R^2 fue superior al 99 % y el valor P_{lof} (%) superó el 5%, para un nivel de confianza del 95%. Ambos estadísticos indican una buena linealidad dentro de los rangos indicados para cada compuesto. Los datos se muestran en la Tabla II.27.

D. Selectividad. Los cromatogramas de un suelo blanco limpio de los compuestos objeto de estudio e IS, se compararon con los cromatogramas de otra muestra blanco dopada con los contaminantes de interés e IS (ver Figura II.20 y Figura II.19, respectivamente). En el análisis comparativo, no se observaron interferencias al tiempo de retención de los analitos. Este hecho demuestra la alta selectividad del método UHPLC-MS/MS propuesto.

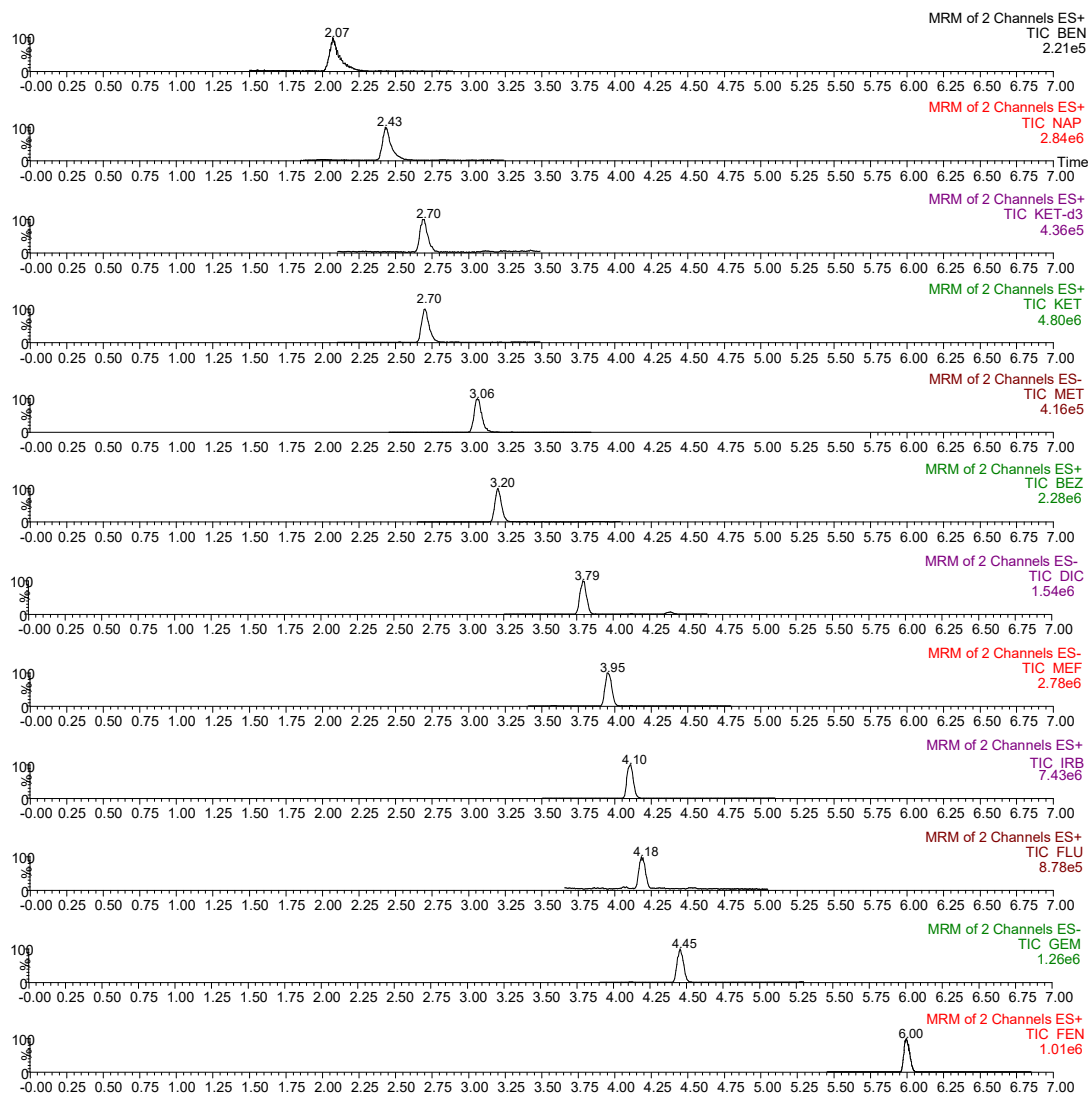


Figura II.19. Cromatograma del suelo blanco dopado con los analitos e ISs

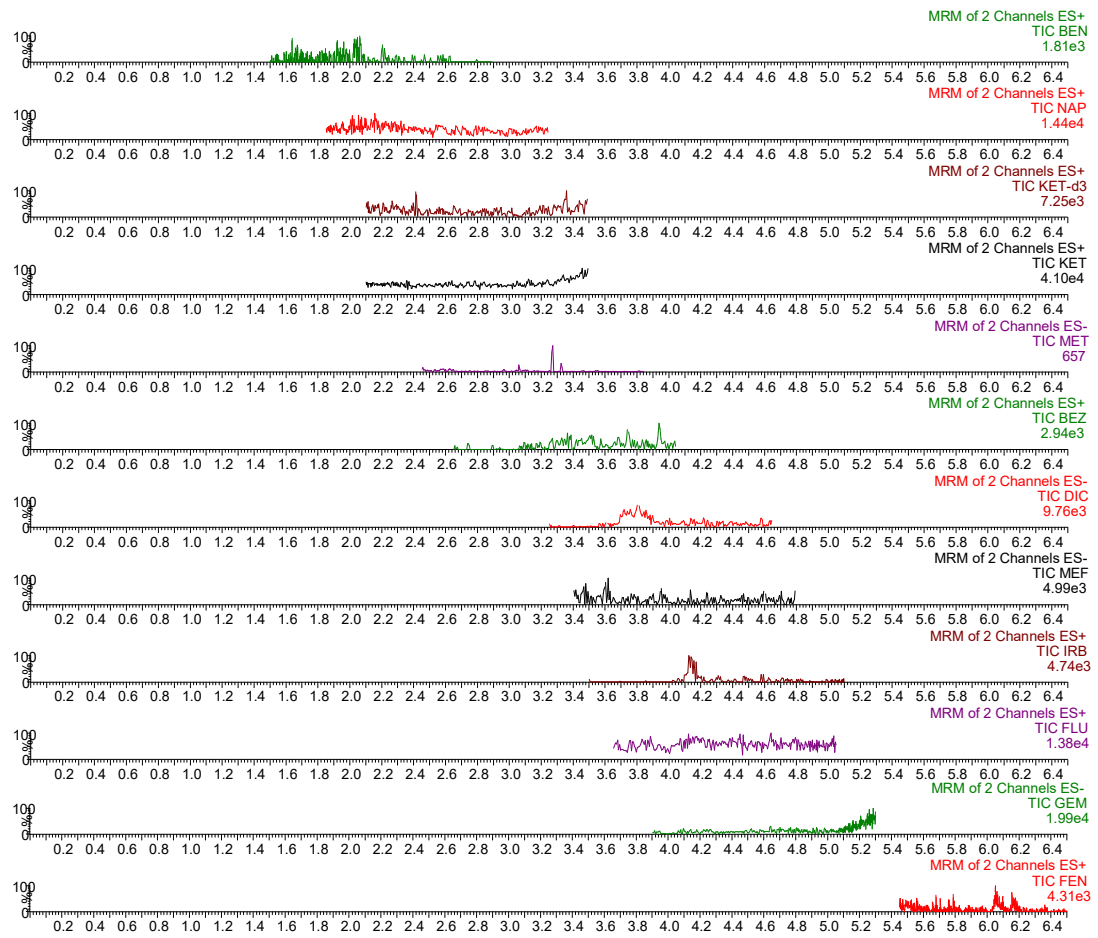


Figura II.20. Cromatograma del suelo blanco sin dopar

5.4. Aplicación del método analítico

Para aplicar el método validado, se analizaron 7 muestras de suelo agrícola y 3 de espacios verdes públicos de diferente procedencia. Los análisis se realizaron por triplicado aplicando el método de análisis desarrollado en el presente apartado. En la Tabla II.30 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla II.30. Análisis de muestras de suelo agrícola y espacios públicos

^a Concentración (ng g ⁻¹ d.w.) (DE)					
	S1	S2	S3	S4	S5
DIC	ND	ND	ND	ND	ND
MEF	ND	ND	ND	ND	ND
FLU	ND	NQ	ND	ND	ND
KET	ND	ND	ND	ND	ND
NAP	ND	ND	ND	ND	ND
IRB	ND	NQ	ND	ND	0.35 (0.03)
BEZ	ND	ND	ND	ND	ND
FEN	ND	ND	ND	ND	ND
GEM	ND	ND	ND	ND	ND
	S6	S7	S8	S9	S10
DIC	ND	ND	ND	ND	ND
MEF	ND	ND	ND	ND	ND
FLU	ND	ND	ND	ND	ND
KET	ND	0.53 (0.06)	ND	ND	NQ
NAP	ND	ND	ND	ND	ND
IRB	ND	ND	ND	ND	0.41 (0.05)
BEZ	ND	ND	ND	ND	NQ
FEN	ND	ND	ND	ND	ND
GEM	ND	ND	ND	ND	ND

^a Media de seis determinaciones; DE: desviación estándar; ND: no detectado (<LOD); NQ: no cuantificado (entre LOD y LOQ)

Como se observa en la tabla anterior, solo en cuatro muestras se obtuvieron resultados positivos, detectándose tan solo tres de los fármacos (KET, BEZ e IRB). La muestra S5 se recogió en un arriate de Granada que fue abonado un par de días antes. En la Figura II.21 se muestra el cromatograma de la muestra

S10, una de las dos de tipo agrario que no fue recogida en la Vega de Granada, sino en una zona agraria del municipio de Vélez-Málaga.

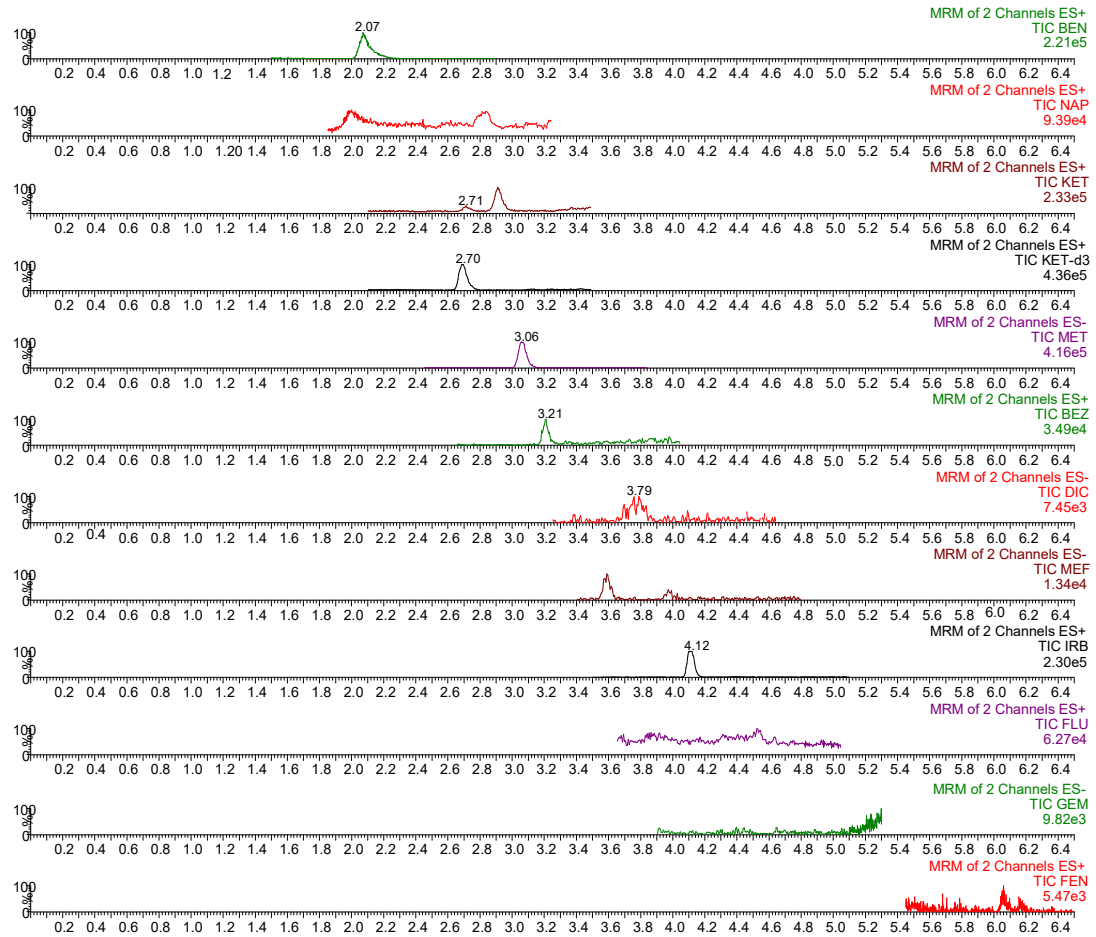


Figura II.21. Cromatograma de una muestra real de suelo (S10)

Es complicado comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con otros previamente publicados en la literatura científica, ya que es muy escasa la metodología analítica propuesta para el análisis de estos fármacos en la matriz seleccionada. Sí se han encontrado algunos datos, referidos a matrices sólidas naturales, en especial a sedimentos de aguas continentales¹⁴³⁻¹⁵¹, pero apenas hay trabajos aplicados a suelos agrícolas¹⁵² o de espacios públicos¹⁵³. Hasta la fecha, el irbesartan es el único cuya presencia ha sido puesta de manifiesto hasta el momento en un estudio desarrollado en el mar Menor, Murcia¹⁵⁴.

-
- ¹⁴³ Löffler, D.; Ternes, T.A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1021, 133-144.
- ¹⁴⁴ Rice, S.L.; Mitra, S. Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 2007, 589, 125-132.
- ¹⁴⁵ Vazquez-Roig, P.; Segarra, R.; Blasco, C.; Andreu, V.; Picó, Y. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 2471-2483.
- ¹⁴⁶ Silva, B.F.D.; Jelic, A.; López-Serna, R.; Mozeto, A.A.; Petrovic, M.; Barceló, D. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere*, 2011, 85, 1331-1339.
- ¹⁴⁷ Camacho-Muñoz, D.; Martín, J.; Santos, J.L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Distribution and Risk Assessment of Pharmaceutical Compounds in River Sediments from Doñana Park (Spain). *Water, Air, & Soil Pollution*, 2013, 224, 1665.
- ¹⁴⁸ Duan, Y.P.; Dai, C.M.; Zhang, Y.L.; Ling, C. Selective trace enrichment of acidic pharmaceuticals in real water and sediment samples based on solid-phase extraction using multi-templates molecularly imprinted polymers. *Analytica chimica acta*, 2013, 758, 93-100.
- ¹⁴⁹ Corada-Fernández, C.; Jiménez-Martínez, J.; Candela, L.; González-Mazo, E.; Lara-Martín, P.A. Occurrence and spatial distribution of emerging contaminants in the unsaturated zone. Case study: Guadalete River basin (Cadiz, Spain). *Chemosphere*, 2015, 119, Supplement, S131-S137.
- ¹⁵⁰ Agunbiade, F.O.; Moodley, B. Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa. *Environmental toxicology and chemistry*, 2016, 35, 36-46.
- ¹⁵¹ Tan, J.H.; Tang, J.J.; Ouyang, P.Y.; Wang, Y.L.; Xie, Q.L.; Yang, Y.X.; Chen, Z.X.; Liu, X.Y. Determination of seven new emerging pollutants in sediment using UPLC-QTOF-MS. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2016, 37, 52-59.
- ¹⁵² Pérez-Carrera, E.; Hansen, M.; León, V.M.; Björklund, E.; Krogh, K.A.; Halling-Sørensen, B.; González-Mazo, E. Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398, 1173-1184.
- ¹⁵³ Kumirska, J.; Migowska, N.; Caban, M.; Łukaszewicz, P.; Stepnowski, P. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and oestrogenic hormones in environmental solid samples. *Science of The Total Environment*, 2015, 508, 498-505.
- ¹⁵⁴ Moreno-González, R.; Rodríguez-Mozaz, S.; Gros, M.; Barceló, D.; León, V.M. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environmental Research*, 2015, 138, 326-344.

CAPÍTULO III
ESTUDIO DE CAMPO

1. LA VEGA DE GRANADA

1.1. Antecedentes

La Vega de Granada es una comarca española situada en la parte central de dicha provincia. Tiene una extensión de 22 kilómetros de longitud por 8 km de anchura, siguiendo el eje del río Genil en dirección Este-Oeste. La superficie total es de 2900 km² de los que apenas el 3.5% están dentro de la capital. Está formada por 27 municipios franqueada por Cenes de la Vega al Este y Láchar al Oeste. Bajo la Vega se extiende un gran acuífero que corresponde al depósito aluvial del río Genil y de sus afluentes (ríos Dílar, Monachil, Darro, Beiro, Cubillas y Velillos) y está constituido por capas alternadas de gravas, arenas y limos. La profundidad media del acuífero es de 250 m en la parte central (la que corresponde al cauce del río Genil) y va disminuyendo hacia los bordes¹⁵⁵.

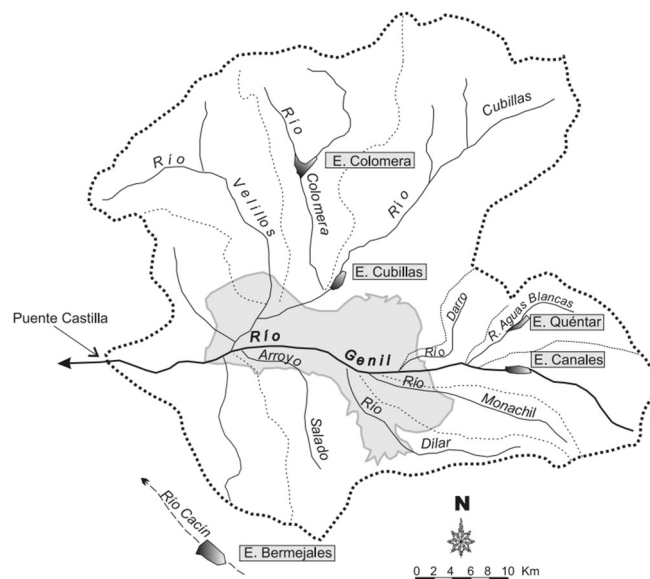


Figura III.1. Red hidrográfica principal de la cuenca del Alto Genil y situación de la Vega de Granada (zona sombreada)

(Fuente: <http://proyectoaguas.es/download/Libros/2010.II.pdf>)

¹⁵⁵ Castillo. A. El acuífero de la Vega de Granada. Ayer y hoy (1966-2004). *Agua, Minería y Medio Ambiente. Libro Homenaje al Profesor Rafael Fernández Rubio*. López Geta et al. (eds). IGME, 2005, pag. 161-172.

Se trata de uno de los acuíferos detríticos más importantes de Andalucía. Las estimaciones sobre los recursos renovables del acuífero han oscilado entre 150 y 240 hm³/año desde los 80 hasta la actualidad y la principal fuente de infiltración se debe a la escorrentía superficial.

El principal uso de explotación del acuífero es como regadío en agricultura y en menor medida como abastecimiento a la población de la comarca, siendo una fuente alternativa y adicional de suministro de agua en épocas de sequía. Actualmente los cultivos predominantes en la Vega son el olivar, los cereales, destacando el maíz y la alfalfa que sirven como base para alimentar al ganado, y el espárrago. Otros cultivos destacados son los frutales, el chopo y el tabaco¹⁵⁶. En la Tabla III.1 se recoge la superficie y jornales generados por los diferentes cultivos.

Tabla III.1. Superficie y jornales generados en los principales cultivos¹⁵⁶

Cultivo	Superficie (ha)	Jornales
Olivar	1713	29770
Frutales	893	75905
Maíz	1293	10313
Trigo blando	406	1544
Trigo duro	135	512
Avena	377	1401
Cebada	135	485
Tabaco	529	76254
Chopos	507	2535
Alfalfa	689	15158
Espárrago	1028	113798
Hortalizas	748	31410
TOTAL	8453	359085

¹⁵⁶ Junta de Andalucía. Plan Especial de Ordenación de la Vega de Granada. Documento para la concertación. *Consejería obras públicas y vivienda*, 2012, pag. 47.

En las últimas décadas se ha ido perdiendo suelo destinado al uso agrícola en favor de la expansión urbana e industrial que se ha traducido en la ocupación del suelo para instalaciones industriales, centros urbanos, vías de carretera, centros comerciales, etc. cuyo objetivo ya no es mejorar el sistema productivo agrario sino resolver los problemas de movilidad urbana y crear nuevas oportunidades de desarrollo en otros sectores productivos.

1.2. Contaminación del acuífero y la Vega de Granada

La contaminación en la Vega de Granada se ha estudiado desde comienzos de los 80. Los primeros contaminantes que se evaluaron fueron los nitratos y nitritos; en 1980 un muestreo con 123 puntos ya señalaban zonas con altas concentraciones anormales en nitratos debido al empleo de fertilizantes¹⁵⁷.

Los contaminantes detectados fueron los plaguicidas organoclorados (OCIs), como el DDT. Acuña en 1981¹⁵⁸, encontró representantes de esta familia de compuestos en las aguas subterráneas y superficiales a una concentración por debajo del máximo permitido de la época (1975) para aguas potables. Tres años más tarde, un nuevo estudio detectó también dichos compuestos en suelos de cultivo de la Vega¹⁵⁹. Como bien es sabido, el uso de los OCIs hoy en día está muy restringido o prohibido debido a su alta toxicidad y persistencia. En estos años, en diferentes campañas de análisis, se han encontrado de forma puntual metales pesados¹⁵⁷. Más tarde, en los primeros años de los 90, un vertido accidental de gasolina en la Vega afectó a un gran número de pozos de la zona¹⁶⁰. La concentración de hidrocarburos en el agua subterránea fue estudiada durante más de dos años. Recientemente, un estudio ha encontrado altos niveles de ibuprofeno y acetaminofeno o paracetamol en las aguas superficiales, sobre

¹⁵⁷ http://aguas.igme.es/igme/publica/lib_mvalle/pg185.pdf

¹⁵⁸ Acuña, M.J. Contaminación por plaguicidas organoclorados en la Vega de Granada. Memoria de Tesis Doctoral. *Universidad de Granada*, 1981, pag. 380.

¹⁵⁹ Agustín C. Contaminación por plaguicidas en aguas superficiales y suelos de cultivo de la provincia de Granada. Memoria de Tesis Doctoral. *Universidad de Granada*, 1983, pag. 378.

¹⁶⁰ Cruz-Sanjulián, J.; Olías, M. Characterization of hydrocarbon spreading in an alluvial aquifer by cross correlation study of precipitation and contaminant content data. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1995, 81, 337-347.

todo en puntos cercanos a vertidos de EDARs. Este estudio demuestra además que las aguas residuales contaminan el acuífero¹⁶¹.

En estos últimos años se ha llevado a cabo un proyecto en Vegas del Genil, uno de los municipios de la Vega, que pretende utilizar el cultivo de chopos como un "filtro verde" para la depuración natural de aguas residuales¹⁶². A pesar de los esfuerzos de la comunidad científica y autoridades europeas para evaluar y estudiar el riesgo medioambiental de las aguas residuales, varios municipios de la Vega de Granada siguen actualmente realizando vertidos ilegales sin control de sus aguas fecales debido a que carecen de las infraestructuras necesarias¹⁶³.

1.3. Caracterización del suelo y agua empleados

El lugar donde se realizó el estudio fue en la Huerta Santa María situada en la Vega de Granada, en la localidad de Belicena a 5 km de la capital (coordenadas 37° 11'08.50" N; 3° 41'21.85" O) y con una extensión de 2500 m². En la Figura III.2 se muestra su localización.

¹⁶¹ Luque-Espinar, J.A.; Navas, N.; Chica-Olmo, M.; Cantarero-Malagón, S.; Chica-Rivas, L. Seasonal occurrence and distribution of a group of ECs in the water resources of Granada city metropolitan areas (South of Spain): Pollution of raw drinking water. *Journal of Hydrology*, 2015, 531, Part 3, 612-625.

¹⁶² Hispagua. Sistema Español de Información sobre el Agua. Manual de Depuración de Aguas Residuales Urbanas, 2008, pág. 77. <http://hispagua.cedex.es/documentacion/documento/32891> (Visitada 19/06/2017).

¹⁶³ <http://www.ideal.es/granada/provincia-granada/201607/11/supremo-acorralla-trece-localidades-20160711005522.html>



Figura III.2. Situación de la parcela experimental. Huerta de Santa María

Las características físico-químicas del suelo de esta huerta se obtuvieron de la tesis doctoral de Oliver-Rodríguez¹⁶⁴ y se muestran en las Tablas III.2 y III.3.

Tabla III.2. Propiedades físicas del suelo agrícola estudiado

Propiedades físicas			
Propiedades generales		Textura	
Densidad aparente (g cm ⁻³)	1.39	Arenas totales (%)	20.00
Densidad real (g cm ⁻³)	2.75	Limos gruesos (%)	24.50
Porosidad (%)	42.18	Limos finos (%)	33.55
Permeabilidad (cm s ⁻¹)	4.42·10 ⁻⁵	Arcillas (%)	21.95
Composición mineralógica			
Illita (%)	39.72	Caolinita (%)	10.25
Calcita (%)	23.71	Feldespatos (%)	8.34
Esmeclita (%)	13.33	Cuarzo (%)	4.65

¹⁶⁴ Oliver-Rodríguez B. Comportamiento ambiental de contaminantes orgánicos. Metodología analítica y estudios de modelización. Memoria de Tesis Doctoral. *Universidad de Granada*, 2013, pag. 340-353.

Tabla III.3. *Propiedades químicas del suelo agrícola estudiado*

Propiedades Químicas	
pH (KCl)	7.4
pH (agua)	7.9
Materia orgánica (%)	1.81
Carbono orgánico (%)	1.05
Carbonatos (%CO ₂)	15.4
Nitrato total (%)	0.07
Capacidad de cambio (meq Na ⁺ /100 g suelo)	22.12
Bases de cambio (meq/100 g de suelo)	
Ca ²⁺	29.78
Mg ²⁺	2.56
Na ⁺	0.34
K ⁺	0.49
Aniones solubles del suelo (mg kg⁻¹)	
SO ₄ ⁻²	241
Cl ⁻	91.5
Cationes solubles del suelo (mg kg⁻¹)	
Ca ²⁺	44.5
Mg ²⁺	37.0
Na ⁺	42.5

Al analizar detenidamente las propiedades mostradas en las Tablas anteriores, se extraen dos conclusiones de gran importancia. Por un lado, los compuestos del suelo, al tener carácter coloidal y poseer carga eléctrica, pueden contribuir notablemente a la interacción sólido-fluido y, en consecuencia, a la capacidad de cambio. Efectivamente, en estudios previos de nuestro grupo de investigación, se ha demostrado una importante capacidad de este suelo para retener solutos procedentes del agua de riego. Por otro lado, es evidente que las propiedades físicas del suelo, condicionan decisivamente en el comportamiento del mismo frente al movimiento vertical del agua.

Por último, en la Tabla III.4, se recogen las principales características físico-químicas del agua de pozo del que dispone esta finca. Dicha información también se obtuvo de la tesis mencionada¹⁶⁵.

Tabla III.4. Contenido iónico del agua del pozo de la Huerta de Santa María

Contenido en iones			
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	23.6	Na ⁺ (mg L ⁻¹)	26.3
NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	23.4	K ⁺ (mg L ⁻¹)	6.00
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	60.6	Ca ⁺² (mg L ⁻¹)	45.0
PO ₄ ⁻³ (mg L ⁻¹)	43.6	Mg ⁺² (mg L ⁻¹)	4.42
SO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)	95.0	Al ⁺³ (mg L ⁻¹)	0.02
SiO ₂ (mg L ⁻¹)	12.2	Fe ⁺³ (mg L ⁻¹)	0.13
pH	7.53	Conductividad (µS)	1026

¹⁶⁵ Oliver-Rodríguez B. Comportamiento ambiental de contaminantes orgánicos. Metodología analítica y estudios de modelización. Memoria de Tesis Doctoral. *Universidad de Granada*, 2013, pag. 354-357.

2. EXPERIMENTO DE CAMPO

Este estudio se realizó conjuntamente con uno mayor con el objeto de evaluar el comportamiento de varios PPCPs, algunos no estudiados en esta Tesis Doctoral como antibióticos, en un determinado ambiente natural, donde los contaminantes pueden ser aportados por diferentes vías. En todos los experimentos se hizo uso de la irrigación forzada con el agua del pozo.

Con la finalidad de no destruir la biota natural del suelo, se seleccionaron solo algunos analitos. La selección de los mismos se realizó en base a:

- ✓ Estudios anteriores en la misma región. Los parabenos y benzofenonas ya habían sido estudiadas en una tesis doctoral anterior¹⁶⁶ por lo que no se seleccionaron.
- ✓ Ketoprofeno, irbesartan y bezafibrato fueron seleccionados al estar presentes en alguna de las muestras de suelo agrícola analizadas en el capítulo II.
- ✓ Diclofenaco y gemfibrozil se incluyeron por ser dos de los fármacos más persistentes de los estudiados en la presente Tesis Doctoral.
- ✓ Por último, también se eligió el ácido flufenámico dado sus escasos estudios medioambientales.

2.1. Descripción de las parcelas experimentales

Dentro del terreno agrícola de la Huerta de Santa María, se delimitó una parcela experimental con una extensión de 100 m², donde se realizaron los estudios de campo. En el suelo agrícola de dicha parcela no se ha utilizado ningún tipo de pesticida, herbicida o insecticida en los últimos 15 años.

¹⁶⁶ Oliver-Rodríguez B. Comportamiento ambiental de contaminantes orgánicos en suelos agrícolas. Estudio de los procesos de compostaje y enmendado de suelos. Memoria de Tesis Doctoral. *Universidad de Granada*, 2013.

Dentro de dicha parcela subdividieron pequeñas parcelas de 2 m² (1.41 x 1.41 m). Cada una de estas parcelas se empleó para un estudio concreto. Para la realización de estas subparcelas se procedió de la siguiente manera; en primer lugar se preparó debidamente el suelo mediante su arado con un motocultivador equipado con un retovato, a continuación, mediante el uso de un azadón se levantaron varios caballones para formar y dividir las distintas subparcelas y retener las aguas de los riegos. En la Figura III.3 se muestra el aspecto final de las subparcelas. Al inicio del estudio se procedió a la limpieza de toda la vegetación superficial existente, para evitar interferencias tanto en los mecanismos de adsorción-desorción o degradación de los compuestos, como en variables climatológicas como el índice de evaporación del agua.



Figura III.3. *Subparcelas experimentales.*

2.2. Tratamiento y toma de muestra

Para comenzar los distintos estudios, como simulación de un aporte de los correspondientes fármacos al suelo de labor, se experimentaron distintas situaciones, cada una de las cuales se estudió en una subparcela distinta. En total se prepararon cuatro subparcelas. La cantidad de los compuestos adicionada, mostrada en la Tabla III.5, fue la misma para todas las subparcelas.

Tabla III.5. Cantidad añadida de los fármacos a las subparcelas

Cantidades añadidas (mg)			
DIC	1250	IRB	300
FLU	500	GEM	600
KET	400	BEZ	400

Previo al riego, las subparcelas 1 y 2 fueron enmendadas con compost procedente de lodo EDAR, contaminado con 2.5 L de una disolución metanólica que contenía a los analitos objeto de estudio. El dopado se llevó a cabo a modo de spray rociando cuidadosamente sobre la superficie del compost removiendo continuamente. Se emplearon 10 kg de compost para cada una de las subparcelas pesados y dopados individualmente. Tras contaminar con la disolución metanólica de los analitos, se dejó secar extendido durante 24 h antes de aplicarlo a las subparcelas, para eliminar completamente el metanol. Además, el compost de la subparcela 1 se dopó con una disolución de tensioactivos para evaluar el efecto de la presencia de los mismos sobre el comportamiento medioambiental de los contaminantes. Para las subparcelas 3 y 4 se preparó una disolución acuosa de 25 L donde se disolvieron todos los fármacos ensayados. En el primer riego por inundación de las subparcelas, se añadieron estas disoluciones. Además, al igual que en el caso de la subparcela 1, en la 3 se adicionó una disolución de tensioactivos. Antes del dopado, se realizó una toma de muestra a modo de blanco en las cuatro subparcelas.

Los compuestos objeto de estudio se añadieron a una concentración elevada con el objeto de detectarlos y establecer su comportamiento a distintas profundidades. Este tratamiento supone un aporte al suelo por encima de los valores habitualmente encontrados en el agua residual, el lodo de depuradora o el propio compost. Esto supone una mayor garantía en cuanto al conocimiento del comportamiento de los compuestos, en el caso de una contaminación accidental elevada en este ambiente. Una vez aportados los contaminantes al suelo, se llevó a cabo una serie de muestreos y riegos a lo largo de un tiempo suficiente que permitiera evaluar el comportamiento de dichos analitos en el suelo agrícola.

Siguiendo las costumbres agrícolas de la zona, el riego se realizó por inundación. La cantidad de agua de pozo añadida fue de 120 L m⁻². Dado que cada parcela tenía una superficie de 2 m², se necesitaron 240 L aportada por una bomba (flujo de 37.5 L min⁻¹). Las experiencias previas realizadas, demostraron que la mayor frecuencia de muestreo se debía realizar durante la primera semana de aplicación, correspondiente al primer tramo de la caída exponencial de la concentración. La frecuencia de regadío se estableció, según ensayos previos, en un riego diario, y se mantuvo constante durante todo el tiempo que duró cada estudio. Los días de muestreo se muestran en la Tabla III.6.

Tabla III.6. Tomas realizadas y tiempo transcurrido tras el dopado

Toma	Tiempo (h)	Toma	Tiempo (h)
Dopado (0)	0.0	7	360.5
1	25.5	8	433.0
2	49.0	9	527.5
3	72.5	10	726.5
4	97.0	11	1026.5
5	168.5	12	1398.5
6	240.5		

La toma de muestra se realizó a distintas profundidades (2, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 cm) utilizando un muestreador de 2 cm de calado para la toma superficial y una barrena helicoidal tipo EIJKELKAMP para el resto (ver Figura III.4). Como convenio, se recogió la muestra de la parte central de la barrena.



Figura III.4. Toma de muestra con muestreador de calado y barrena helicoidal

El agujero resultante de la toma de muestra se rellenó con tierra limpia para evitar la entrada de agua de forma preferente durante los riesgos posteriores y se señaló adecuadamente con una varilla para evitar muestrear de nuevo sobre la misma zona y asegurar un muestreo representativo del total de las subparcelas tal y como se muestra en la Figura III.5. Una vez tomada la muestra, se realizó el riego correspondiente.



Figura III.5. Señalización de los muestreos

2.3. Pre-tratamiento de muestra

Antes de analizar las muestras, recogidas en este estudio de campo, en todos los casos se sometieron a los siguientes pre-tratamientos:

- ✓ Adición de formaldehído 1 % (v/v) con un spray para evitar el crecimiento microbiano en las muestras.
- ✓ Secado de las muestras, en bandejas de plástico a temperatura ambiente durante al menos 24 h.

Una vez secas se molturaron con un mortero de hierro y se tamizaron a través de una malla de 2 mm. Posteriormente se introdujeron en una bolsa de plástico y se llevaron al laboratorio donde permanecieron a una temperatura de 4°C hasta su análisis.

2.4. Análisis

Para analizar las muestras se siguió el método desarrollado en el Capítulo II para la determinación de PPCPs en suelo agrícola. Sin embargo, en lugar de utilizar un UHPLC-MS/MS descrito con anterioridad se usó el mismo cromatógrafo de líquidos, pero en este caso acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple, llamado QDA, adquirido por nuestro grupo de investigación durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral y que nos permitió realizar el estudio de campo con un gran ahorro económico. Este detector se muestra en la Figura III.6.



Figura III.6. Analizador de masas simple cuadrupolo, QDA de Waters

Al igual que el Xevo, dispone de una fuente de ionización ESI que puede operar simultáneamente en positivo y negativo y de una etapa StepWave situada entre la fuente y el cuadrupolo, tal y como se muestra en la Figura III.7.

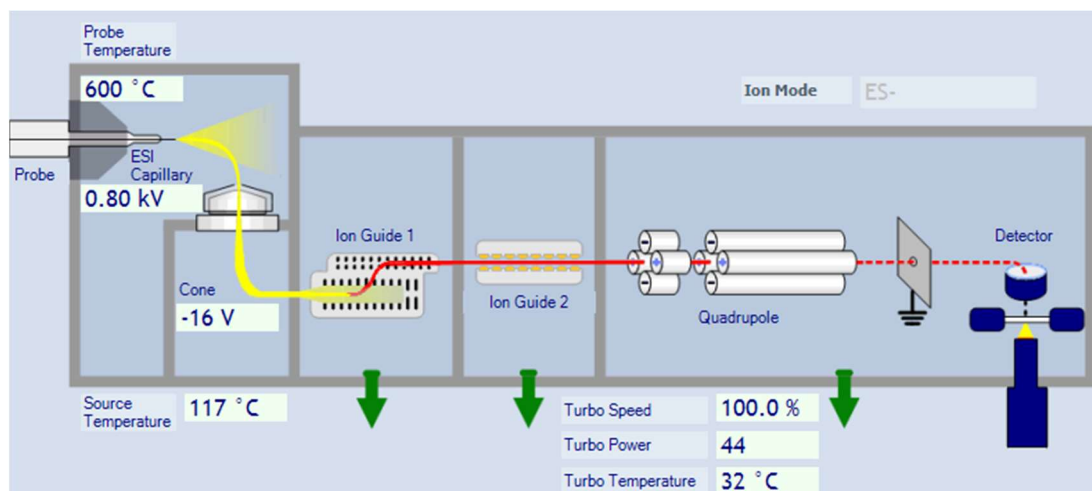


Figura III.7. Configuración de la fuente y elementos del analizador QDA

En primer lugar, antes de analizar las muestras, fue necesario optimizar la detección de los analitos estudiados en este capítulo empleando este nuevo equipo. También se modificó ligeramente el método cromatográfico para reducir el tiempo de análisis y mejorar la separación, previo a la calibración analítica.

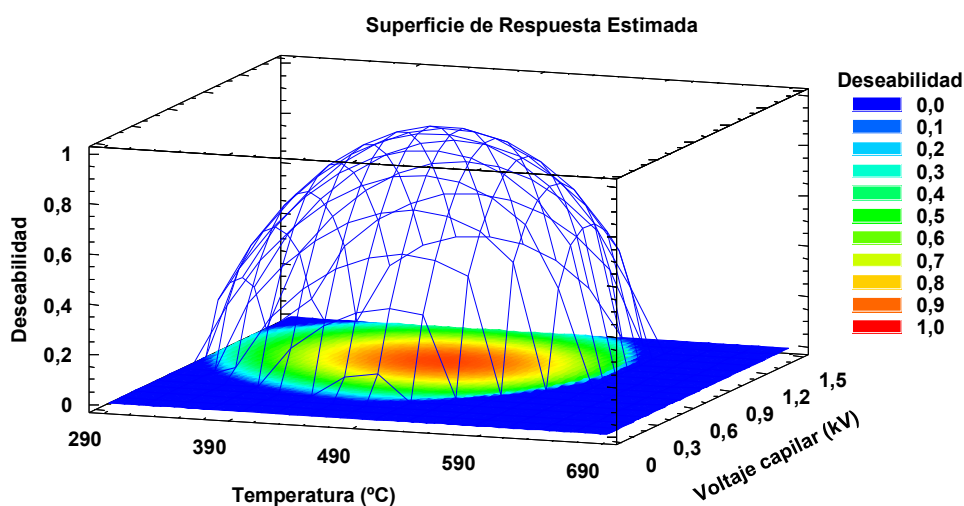
2.4.1. Optimización de la separación y detección por UHPLC-QDA

Se preparó una disolución de 500 ng mL^{-1} que contenía tanto a los analitos (KET, DIC, BEZ, GEM, FLU, IRB) como a los patrones internos (KET-d3, MET y BEN). Se inyectaron $10 \text{ }\mu\text{L}$ empleando el método cromatográfico descrito en el capítulo II. La detección se realizó fijando el voltaje del capilar para ESI+ y ESI- y la temperatura de desolvatación en 1 kV y 500°C , respectivamente. Los voltajes de cono para todos los analitos fue 10 V . Así, se obtuvo, a diferencia del método en el equipo Xevo, la detección de GEM y FLU en ESI+. Además la detección simultánea en modo positivo y negativo se observó contraproducente para la reproducibilidad, por lo que solo se usó ESI+ sacrificando la detección del patrón interno MET usado para GEM y BEZ. Al determinar un menor número de analitos, se optó por modificar ligeramente el gradiente de la fase móvil para así mejorar y reducir el tiempo de la cromatografía. En la Tabla III.7 se muestra el gradiente optimizado, sin variar el flujo y las fases móviles (buffer 13 mM de formiato amónico a pH 9.25 y metanol).

Tabla III.7. Gradiente de elución para el estudio de campo

Tiempo	% A	% B	Flujo (mL/min)	Etapa
0.0	70	30	0.35	
1.0	40	60	0.35	Separación cromatográfica
3.5	15	85	0.35	
3.6	0	100	0.35	Lavado columna
4.5	0	100	0.35	
4.6	70	30	0.35	Acondicionamiento columna
7.0	70	30	0.35	

A continuación, se optimizó mediante un diseño de experimentos el voltaje del capilar y la temperatura de la sonda solo para los analitos. Se llevó a cabo un diseño compuesto central de 8 experimentos más cuatro puntos centrales. Como respuesta se empleó el área absoluta, replicando todos los puntos. Los límites del diseño fueron 340°C y 600°C para la temperatura y, 0.5 y 1.5 para el voltaje del capilar. Al analizar el diseño, en el que se alcanzaron valores de R^2 y P_{lor} superiores a 85% y 5%, respectivamente, en todos los casos, y al aplicar la optimización de múltiples respuestas, se obtuvo 465°C y 1 kV como valores óptimos. En la Figura III.8 se recoge el gráfico de deseabilidad global.

**Figura III.8.** Gráfica de deseabilidad global para la optimización de la detección QDA en el estudio de campo

Para finalizar, se optimizó de forma individual el voltaje de cono para los analitos y los dos patrones internos evaluando el área absoluta. Estos valores se recogen en la Tabla III.8.

Tabla III.8. Voltajes de cono de los analitos e ISs en la detección QDA

Compuesto	Voltaje (V)	Compuesto	Voltaje (V)
DIC	5	KET	15
FLU	10	IRB	2
BEZ	10	GEM	10
KET-d ₃	15	BEN	2

En la Figura III.9 se muestra un cromatograma en modo SIR (*selected ion recording*) obtenido en el QDA.

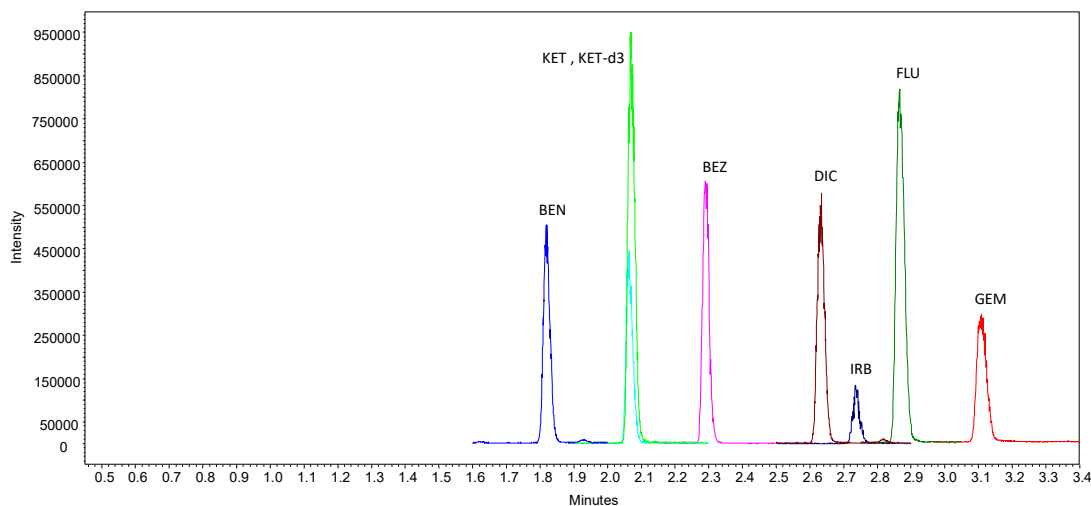


Figura III.9. Cromatograma de los compuestos e ISs estudiados en la aplicación de campo.

2.4.2. Calibración

El calibrado se realizó en matriz a partir de un suelo blanco. Para evaluar todo el rango de concentración de las muestras de campo fue necesario realizar dos calibrados. Ambos calibrados se obtuvieron empleando ocho niveles de calibración. Cada nivel se realizó por duplicado y cada réplica se analizó dos veces. El calibrado con el rango más bajo se obtuvo analizando las muestras

dopadas como se describe en el procedimiento de extracción del suelo (Capítulo II). Por su parte, para el calibrado de mayor rango, en lugar de evaporar todo el extracto procedente de la etapa de limpieza, solo se evaporó una alícuota de 1 mL. Los parámetros estadísticos de ambos calibrados se pueden ver en las Tablas III.9 y III.10.

Tabla III.9. Parámetros estadísticos del calibrado bajo para el estudio de campo

	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
n	32	32	32	32	32	32
b	$9.7 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$7.9 \cdot 10^{-3}$	$9.5 \cdot 10^{-3}$	$1.8 \cdot 10^{-3}$
S _b	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$5.2 \cdot 10^{-5}$	$9.6 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$	$8.5 \cdot 10^{-5}$	$3.0 \cdot 10^{-5}$
S _{y/x}	$3.1 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-3}$	$3.7 \cdot 10^{-3}$	$3.0 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^{-3}$	$1.8 \cdot 10^{-3}$
R ² (%)	99.6	98.3	99.9	98.6	99.7	99.3
P _{lof} (%)	34.8	6.4	8.2	12.4	5.8	10.4
RDL (ng g ⁻¹)	6-100	30-500	6-150	4-30	6-100	30-500

n: puntos de calibración; *b*: pendiente; *S_b*: desviación estándar de la pendiente; *S_{y/x}*: desviación estándar de los residuos; *R²*: coeficiente de determinación; %*P_{lof}*: valor P del test de fallo de ajuste; *RDL*: rango dinámico lineal

Tabla III.10. Parámetros estadísticos del calibrado alto para el estudio de campo

	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
n	32	28	32	32	32	32
b	$8.4 \cdot 10^{-4}$	$2.1 \cdot 10^{-4}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-2}$	$5.5 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-4}$
S _b	$6.6 \cdot 10^{-6}$	$2.5 \cdot 10^{-6}$	$9.4 \cdot 10^{-6}$	$3.3 \cdot 10^{-4}$	$3.4 \cdot 10^{-6}$	$9.7 \cdot 10^{-7}$
S _{y/x}	$7.1 \cdot 10^{-4}$	$2.9 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$7.3 \cdot 10^{-4}$	$4.6 \cdot 10^{-4}$	$2.3 \cdot 10^{-4}$
R ² (%)	99.8	99.7	99.9	99.4	99.8	99.7
P _{lof} (%)	5.8	5.7	8.9	32.8	6.47	8.65
RDL (ng g ⁻¹)	96-1440	480-3600	96-2400	32-400	96-2400	480-7200

n: puntos de calibración; *b*: pendiente; *S_b*: desviación estándar de la pendiente; *S_{y/x}*: desviación estándar de los residuos; *R²*: coeficiente de determinación; %*P_{lof}*: valor P del test de fallo de ajuste; *RDL*: rango dinámico lineal

Como patrón interno para BEZ y GEM, se obtuvo mejor resultado en la calibración con el KET-d₃.

3. RESULTADOS

Con el objetivo de simplificar la evaluación de la cinética de desaparición de los contaminantes, en lugar de analizar cada toma de profundidad en cada una de las parcelas de forma individual, se optó por seguir una metodología diferente.

Se crearon muestras compuestas para cada día de toma. Se pesaron 5 g de muestra de cada profundidad y se mezclaron aquellas del mismo día en un tubo de centrifuga de polipropileno. Se agitaron manualmente y en un vortex durante algunos minutos, antes de introducirlos en un agitador giratorio durante 24 horas. A continuación, el contenido se transfirió a una bolsa hermética. Este procedimiento se aplicó a las cuatro parcelas, por lo que para cada una de ellas se obtuvo 12 muestras compuestas, una por cada día de toma. Con esta metodología, no solo se simplificó el estudio al realizar un menor número de análisis, sino que además se obtiene un valor más representativo de la concentración media en los 60 cm de estrato estudiados. Cada muestra compuesta se analizó por duplicado.

Los factores que pueden alterar al transporte y transformación de los contaminantes en el suelo son varios y se recogen en la Figura III.10¹⁶⁷.

¹⁶⁷ Flury, M. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils. *A review. Journal of Environmental Quality*, 1996, 25, 25-45.

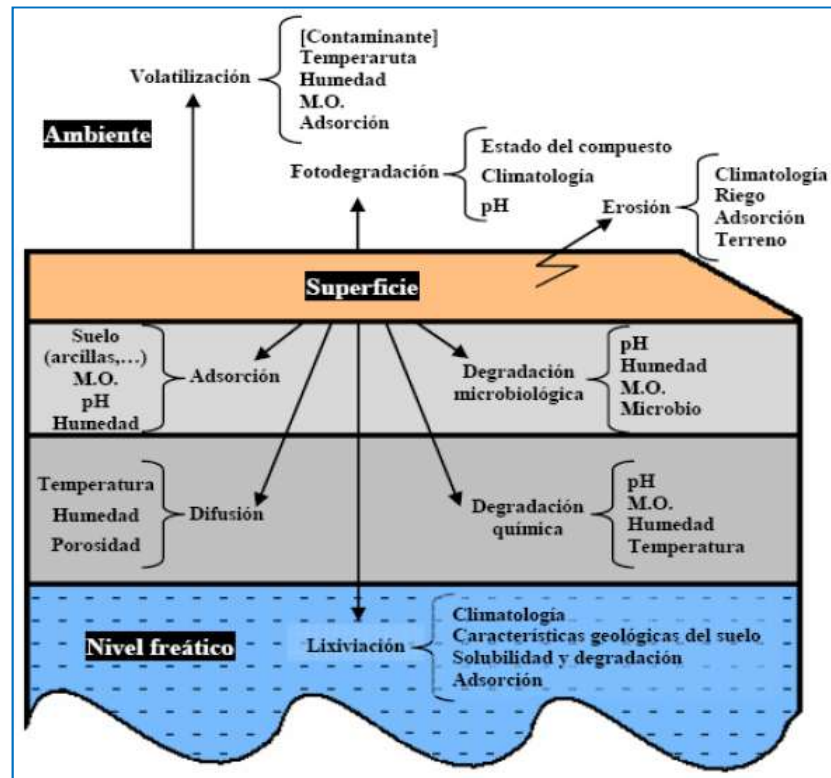
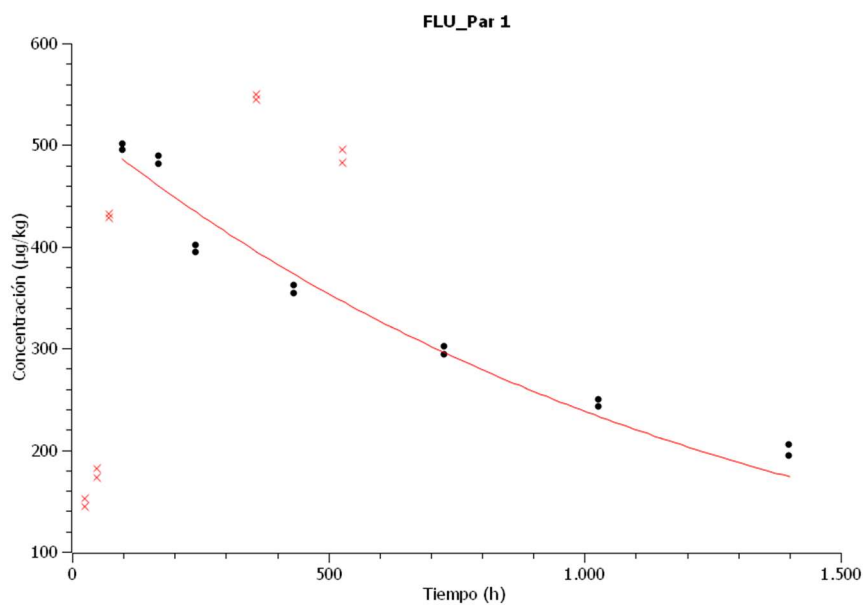
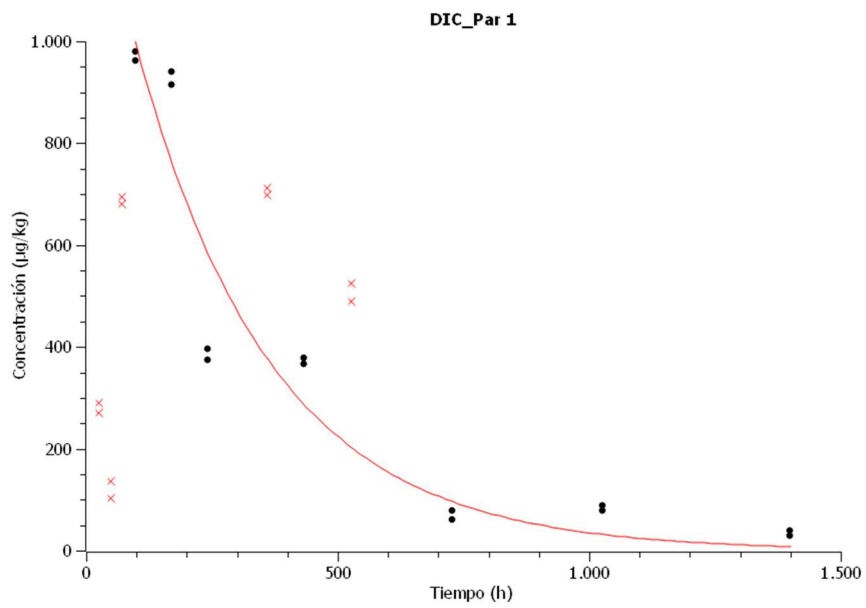


Figura III.10. Procesos que afectan al transporte de contaminantes en el suelo

Estos factores afectan a varios procesos sobre la dinámica de los contaminantes en el suelo como a la adsorción-desorción, volatilización, lixiviación, escorrentía, difusión o degradación. Dado que es imposible determinar y aislar cada uno de estos procesos en un estudio de campo como este, se hablará de cinética de desaparición de cada analito cuando sea posible. La concentración de la muestra compuesta se representó frente al tiempo en horas y se evaluó si la desaparición de los analitos seguía alguna cinética en particular.

3.1. Desaparición de los compuestos en la parcela 1

En las siguientes Figuras se representa la variación de las concentraciones para cada analito.



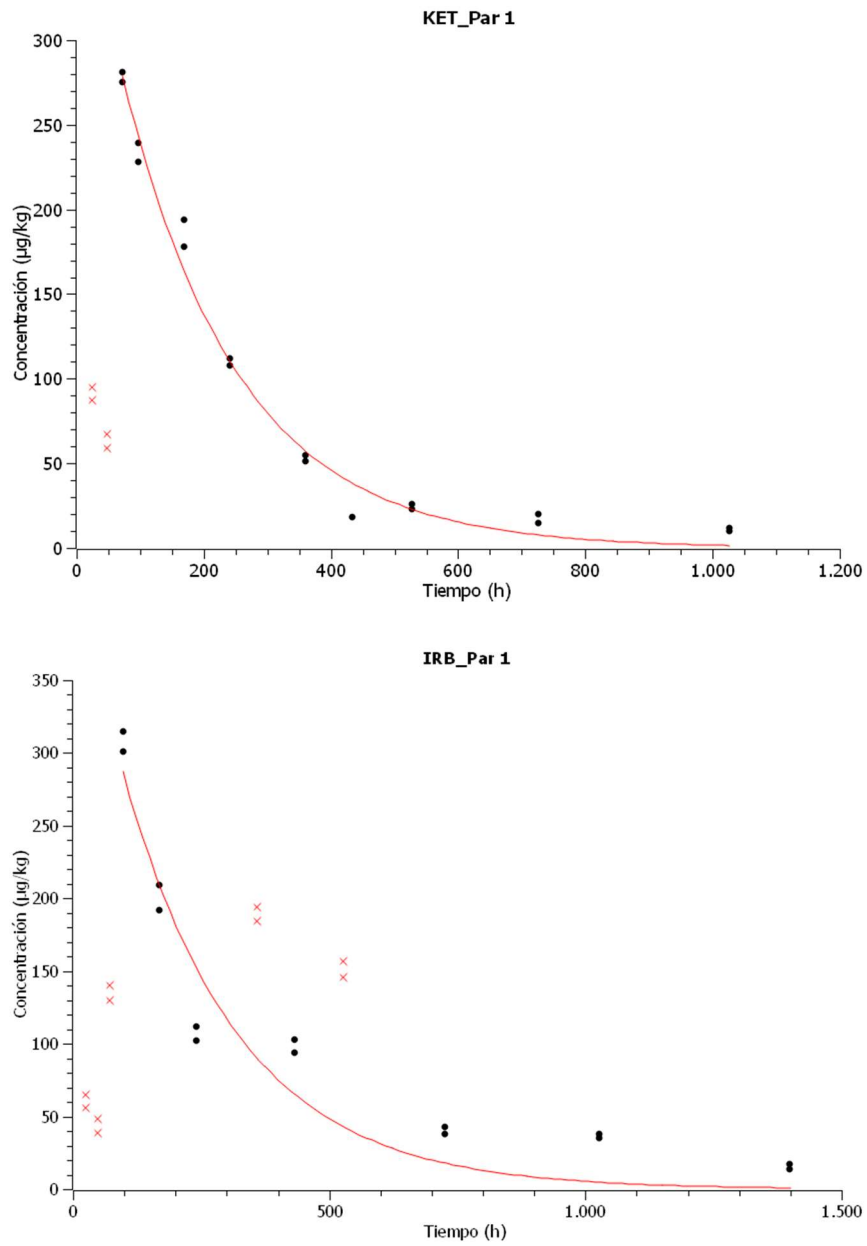


Figura III.11. Variación de la concentración de los NAISDs e IRB para la parcela 1 en los primeros 60 cm

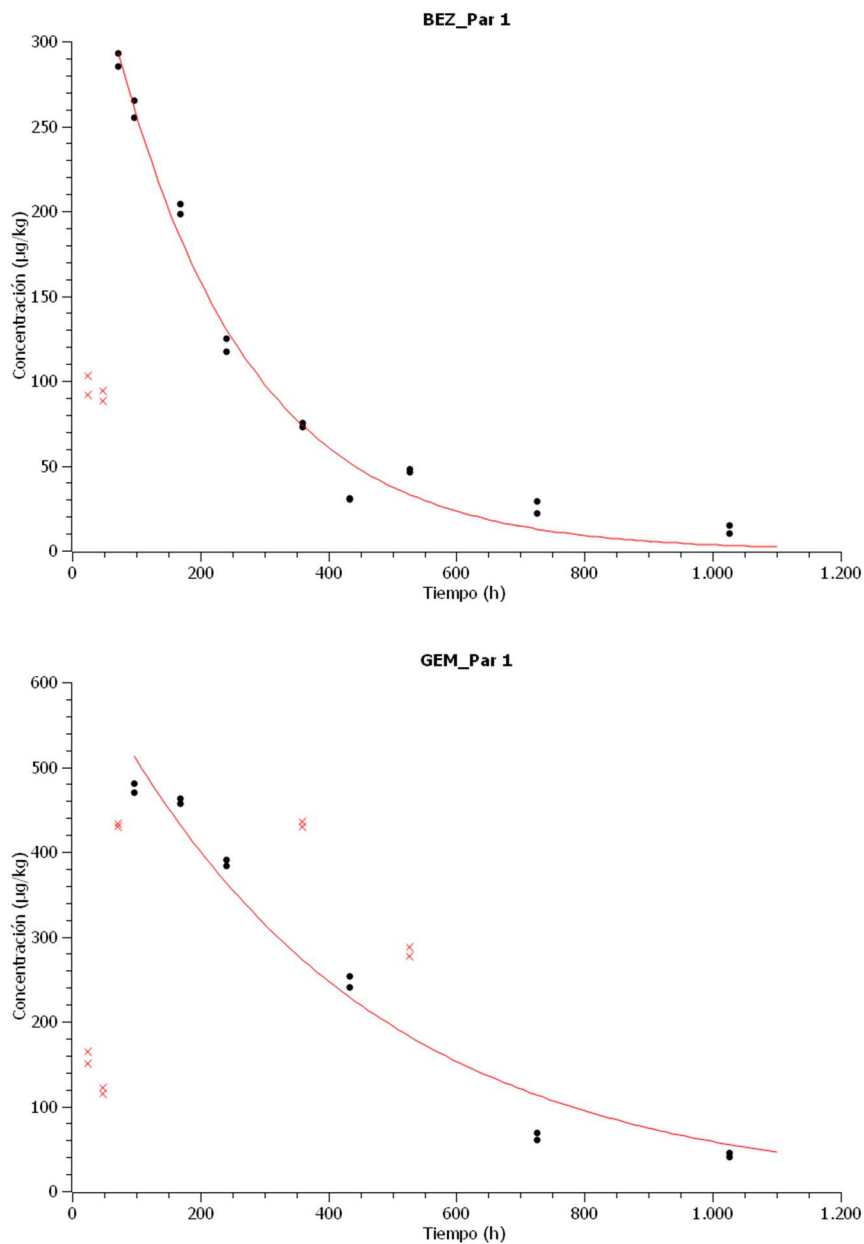


Figura III.12. Variación de la concentración de los reguladores lipídicos para la parcela 1 en los primeros 60 cm

En cada una de las gráficas se representa una curva roja que corresponde al ajuste de los datos con una cinética de desaparición de primer orden. Este modelo se rige por la siguiente ecuación: $C = C_0 \cdot e^{-kt}$

donde, C representa la concentración de analito ($\mu\text{g kg}^{-1}$) a un tiempo determinado t (h), C_0 es la concentración inicial del analito ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y k es una constante cinética (h^{-1}).

Además, los puntos con cruces rojas son valores que no se ajustan a la curva y que se han desechado para el análisis. Estos puntos corresponden a las tomas 1 y 2 en todos los casos, más 3, 7 y 9 en DIC, FLU, IRB y GEM. Los valores correspondientes a la constante de desaparición del compuesto (k), el tiempo de vida media en cada zona del suelo ($t_{1/2}$) y el coeficiente de determinación (R^2) para cada compuesto se muestran en la Tabla III.11.

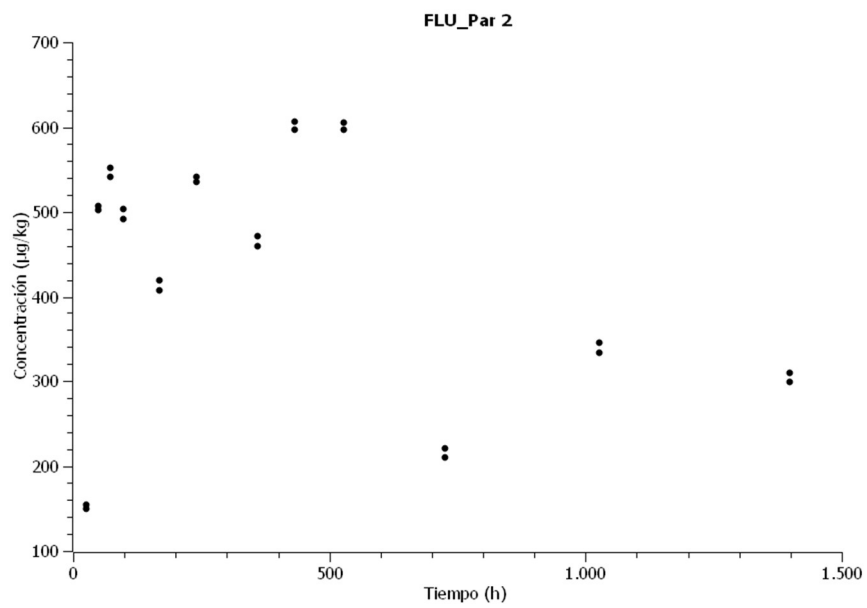
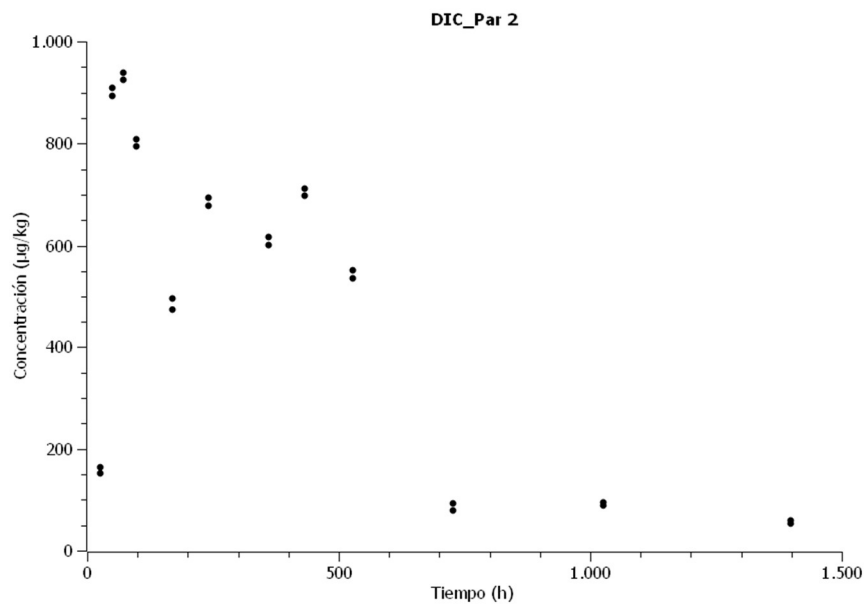
Tabla III.11. Parámetros del ajuste para los analitos en la parcela 1

	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
R^2 (%)	90.0	94.8	98.5	90.2	98.4	95.3
k (h^{-1})	$3.7 \cdot 10^{-3}$	$7.9 \cdot 10^{-4}$	$5.5 \cdot 10^{-3}$	$4.4 \cdot 10^{-3}$	$4.8 \cdot 10^{-3}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$
$t_{1/2}$ (h)	187	876	126	157	144	289
$t_{1/2}$ (día)	7.8	36.5	5.3	6.5	6.0	12.0

El tiempo de vida media, aquel para que haya desaparecido la mitad de la concentración inicial del compuesto, se calcula, para una reacción de primer orden, como el logaritmo neperiano de dos dividido entre k .

3.2. Desaparición de los compuestos en la parcela 2

Las Figuras III.13 y III.14 muestran la variación en la concentración de los compuestos objeto de estudio en los primeros 60 cm.



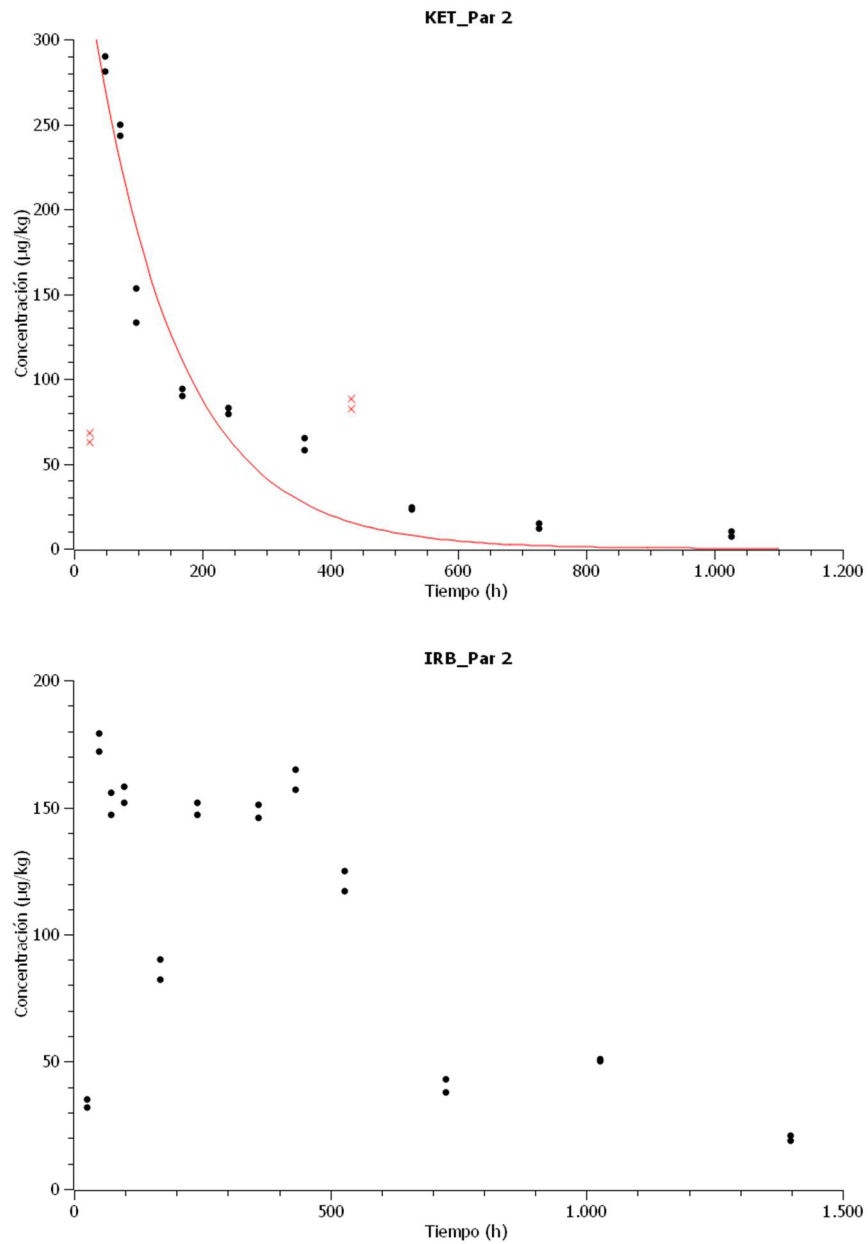


Figura III.13. Variación de la concentración de los NAISDs e IRB para la parcela 2 en los primeros 60 cm

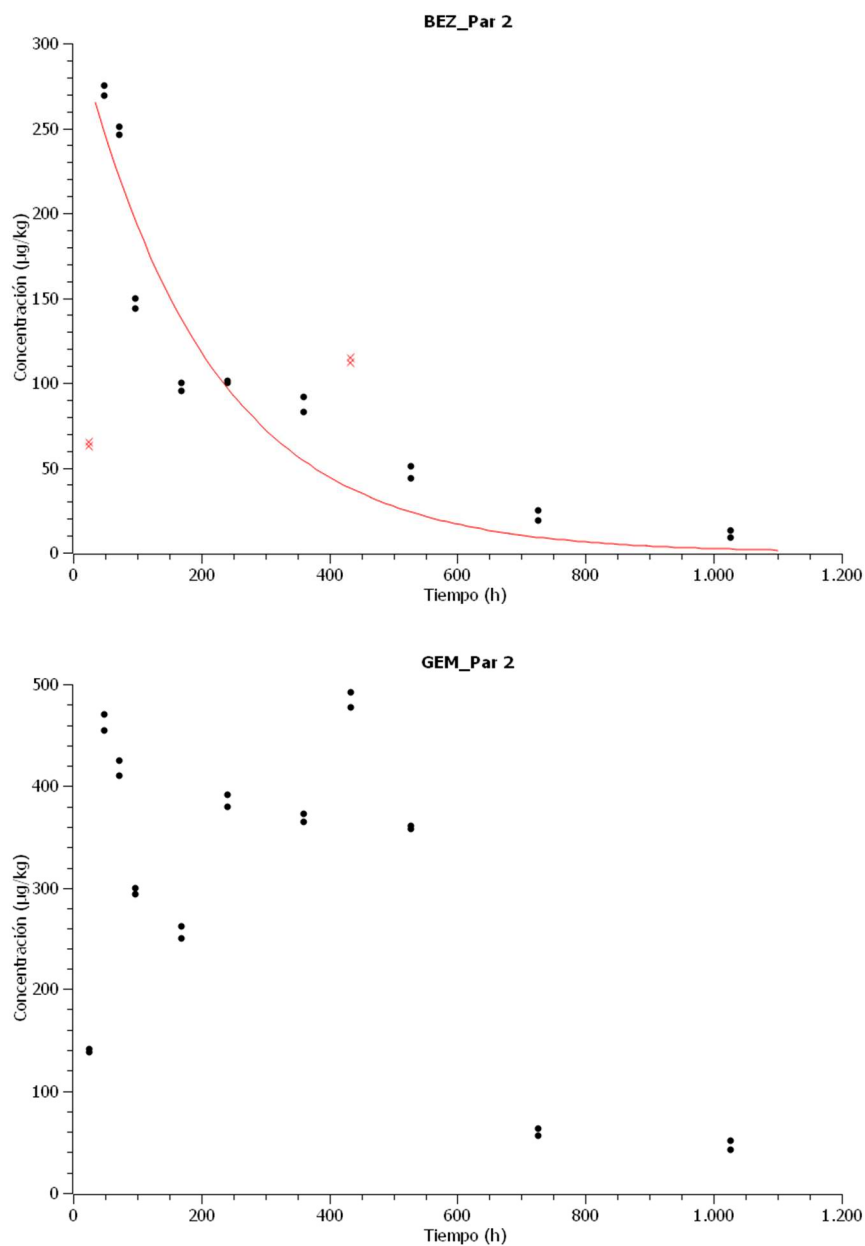


Figura III.14. Variación de la concentración de los reguladores lipídicos para la parcela 2 en los primeros 60 cm

En este caso, salvo en dos compuestos (KET y BEZ), no se pudo ajustar los datos a ningún tipo de cinética. Para KET y BEZ se obtuvo una cinética de primer orden, igual que en la parcela anterior. Los parámetros de dicho ajuste se pueden ver en la Tabla III.12.

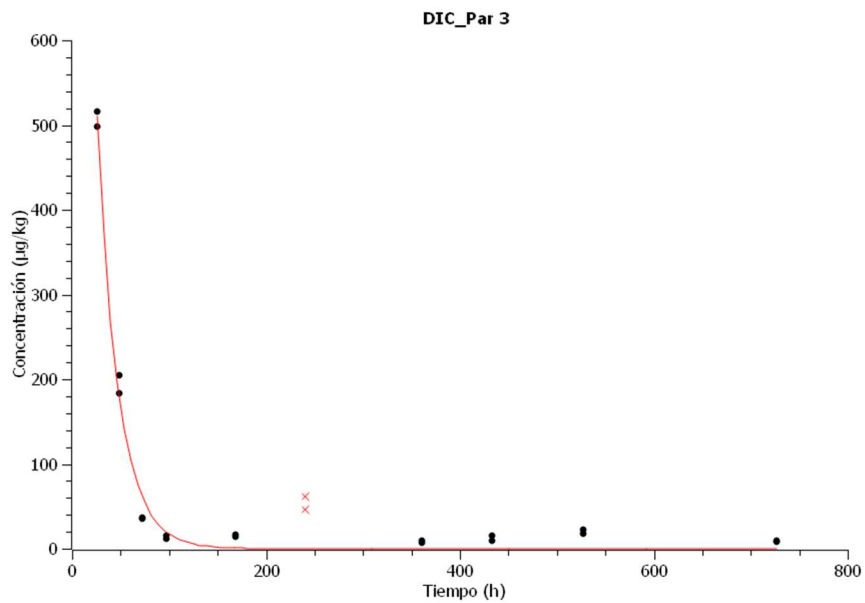
Tabla III.12. Parámetros del ajuste para KET y BEZ en la parcela 2

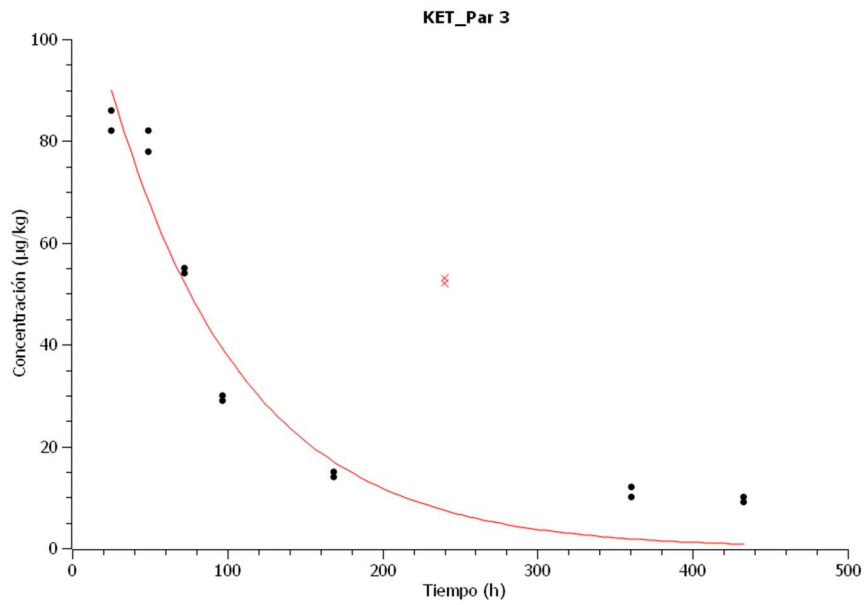
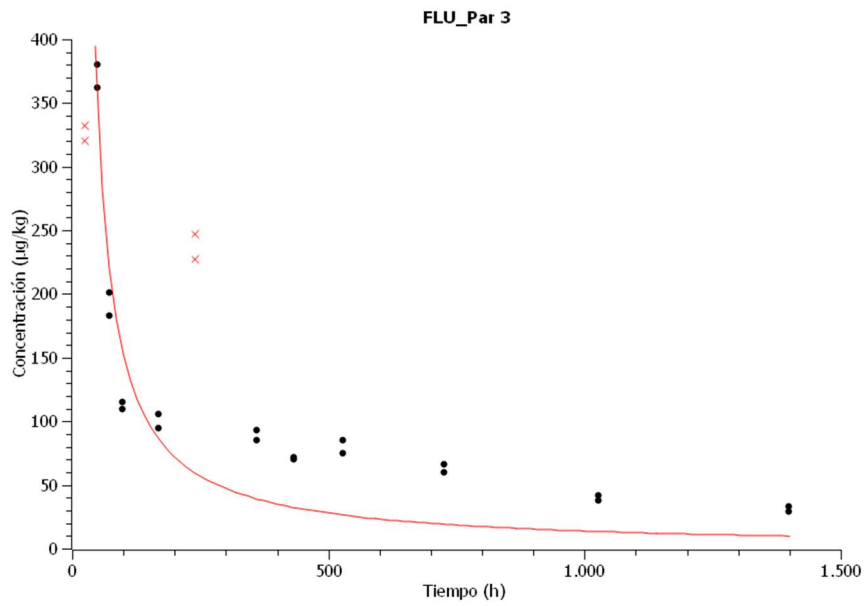
	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
R ² (%)	--	--	92.7	--	88.1	--
k (h ⁻¹)	--	--	$7.5 \cdot 10^{-3}$	--	$4.9 \cdot 10^{-3}$	--
t _{1/2} (h)	--	--	93	--	142	--
t _{1/2} (día)	--	--	3.9	--	5.9	--

Como ya ocurrió en la parcela 1, hubo que descartar algunas tomas, concretamente 1 y 9, para realizar el ajuste.

3.3. Desaparición de los compuestos en la parcela 3

En las siguientes Figuras se representa la variación de las concentraciones para cada analito en la parcela 3.





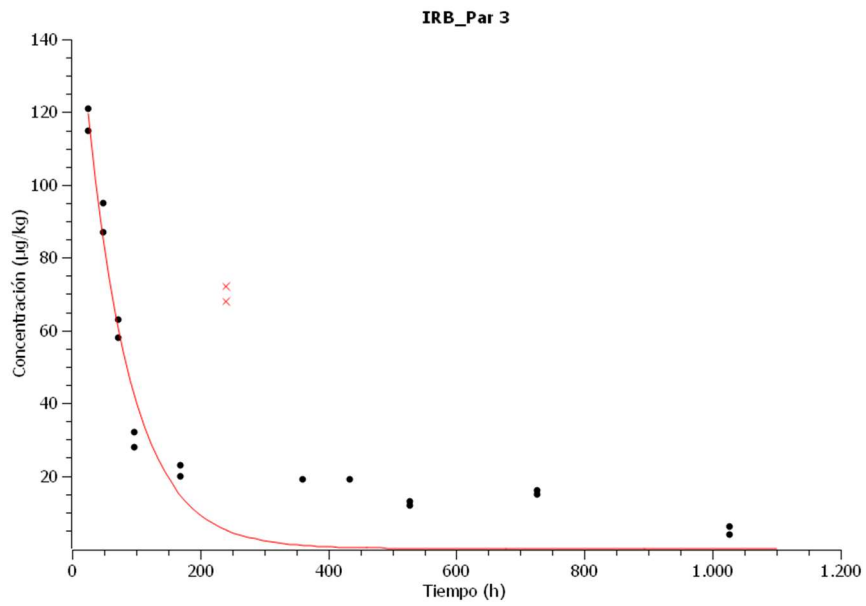
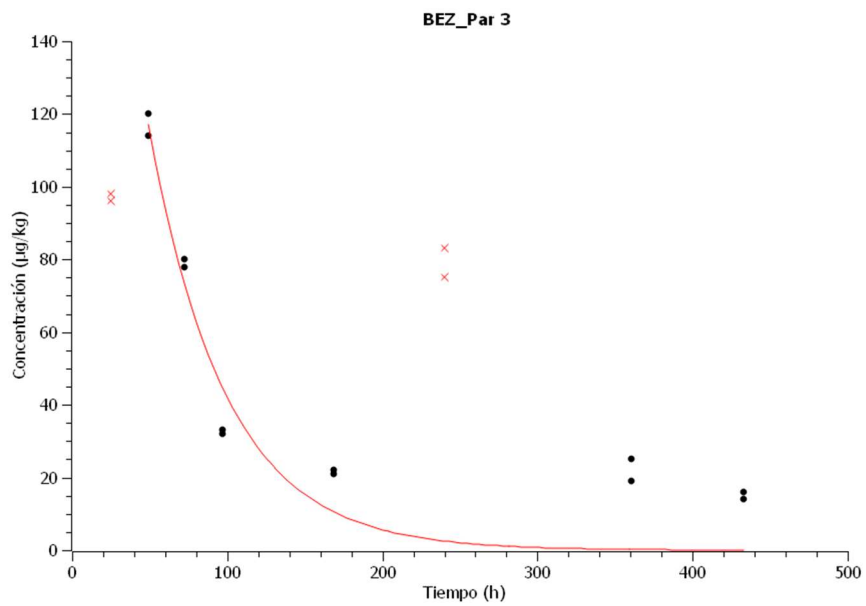


Figura III.15. Variación de la concentración de los NAISDs e IRB para la parcela 3 en los primeros 60 cm



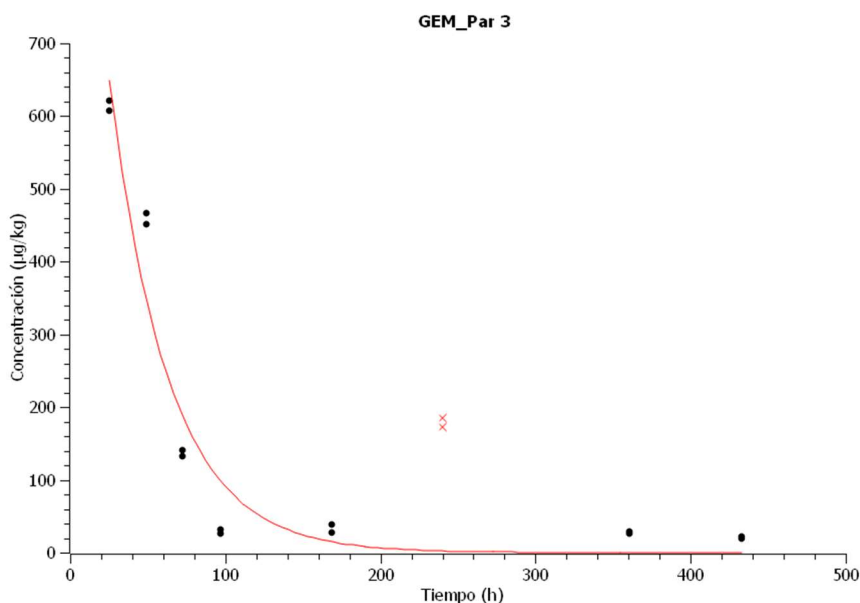


Figura III.16. Variación de la concentración de los reguladores lipídicos para la parcela 3 en los primeros 60 cm

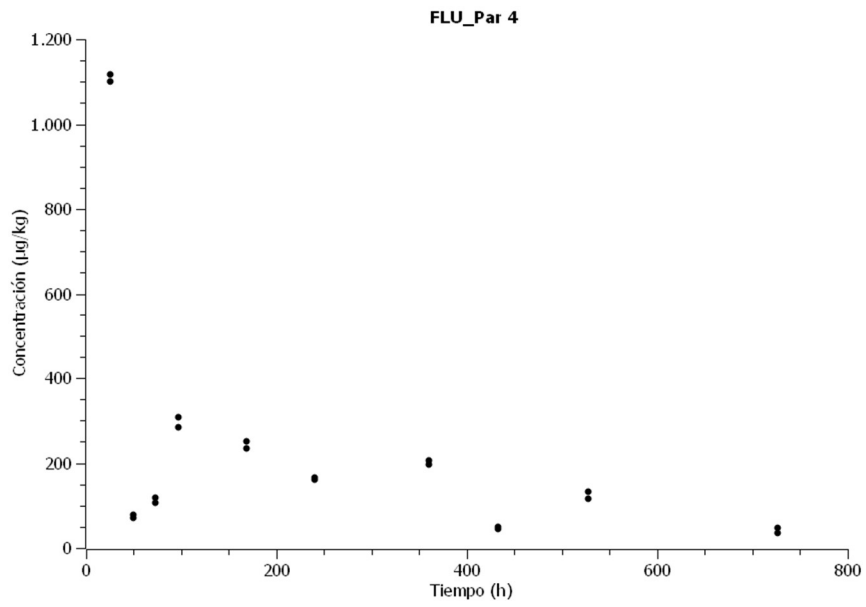
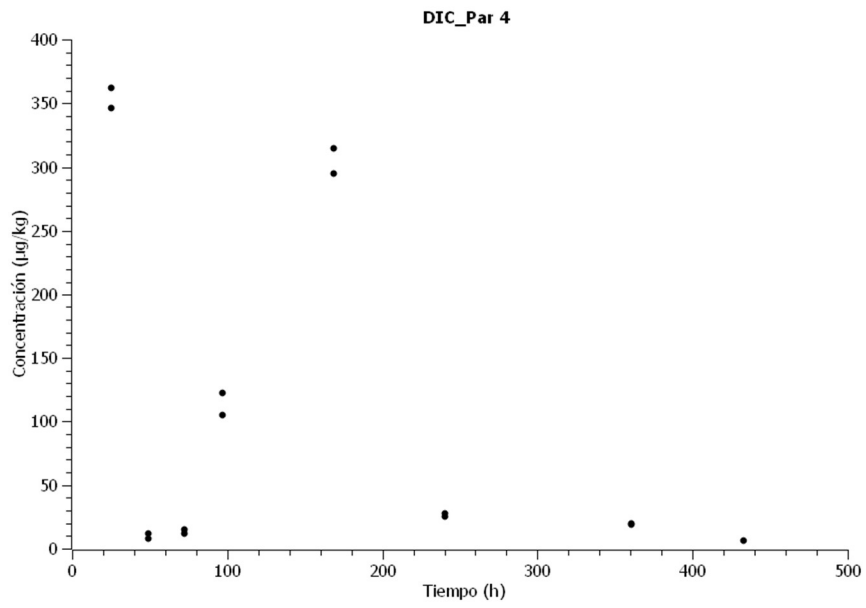
Para la parcela 3, al quitar ciertas tomas, se pudo ajustar los datos a una cinética de primer orden. Los parámetros de la curva se muestran en la Tabla III.13.

Tabla III.13. Parámetros del ajuste para los analitos en la parcela 3

	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
R ² (%)	99.0	84.2	92.3	88.6	87.9	93.8
k (h ⁻¹)	4.5 · 10 ⁻²	8.0 · 10 ⁻³	1.2 · 10 ⁻²	1.5 · 10 ⁻²	2.0 · 10 ⁻²	2.6 · 10 ⁻²
t _{1/2} (h)	15.3	86.7	59.6	47.5	34.4	26.3
t _{1/2} (día)	0.6	3.6	2.5	2.0	1.4	1.1

3.4. Desaparición de los compuestos en la parcela 4

En las siguientes Figuras se representa la variación de las concentraciones para cada analito de la parcela 4.



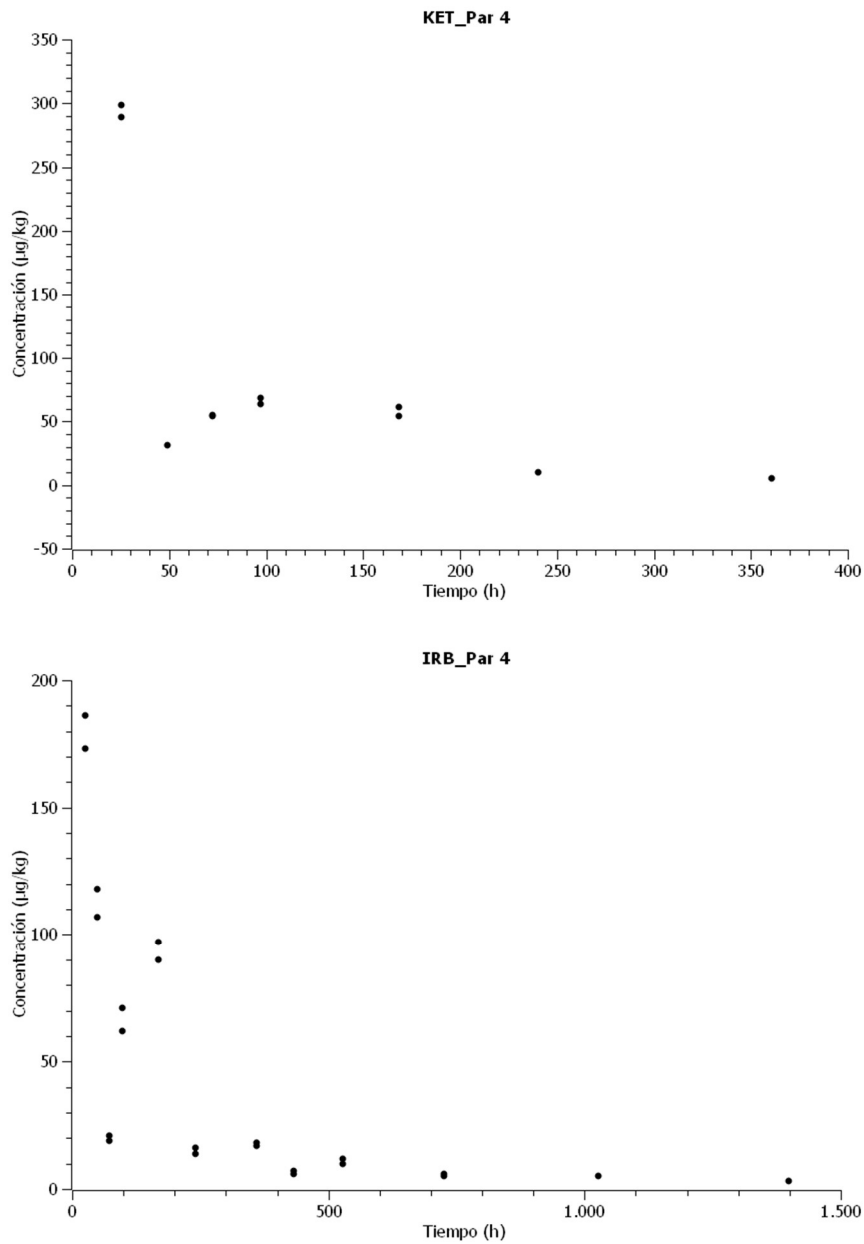


Figura III.17. Variación de la concentración de los NAISDs e IRB para la parcela 4 en los primeros 60 cm

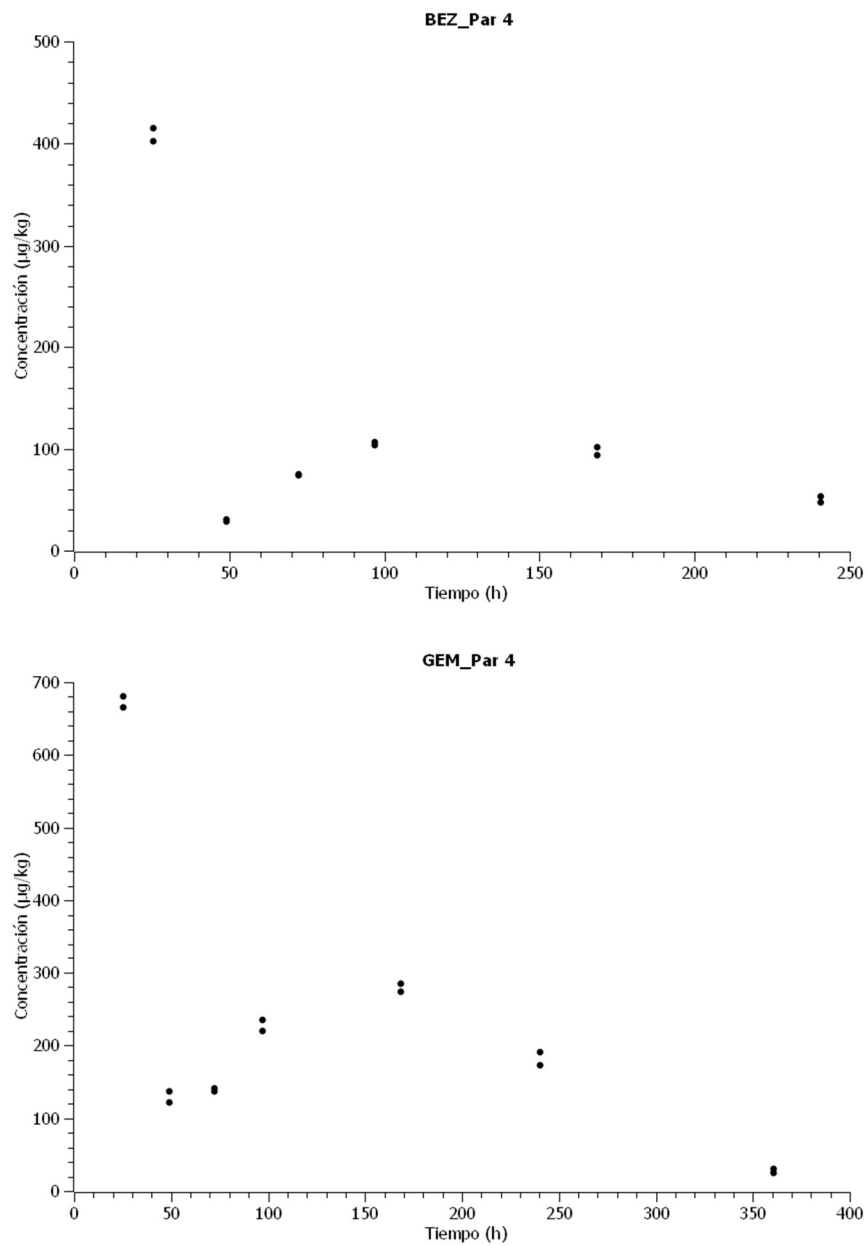


Figura III.18. Variación de la concentración de los reguladores lipídicos para la parcela 4 en los primeros 60 cm

En esta parcela, en ninguno de los casos se pudo realizar un ajuste cinético de los datos.

3.5. Análisis de los datos

En primer lugar, hay que señalar que los datos de las subparcelas 2 y 4 no pudieron ajustarse a ninguna cinética, exceptuando KET y BEZ para la 2; no ocurrió lo mismo en las subparcelas 1 y 3 aunque para ello hubo que descartar algunas tomas. Las razones por las que dichas tomas contenían concentraciones anómalas de los fármacos pueden ser las siguientes:

- ✓ **Falta de homogeneidad en las subparcelas.** Este hecho puede deberse a varios factores como la presencia de analitos no disueltos en el momento de dopado o la formación de canales preferenciales.
- ✓ **Contaminación cruzada entre las subparcelas.** Aunque se separaron lo suficiente para asegurar que no existiera trasvase superficial de agua entre ellas durante los riegos por inundación, se podría haber creado canales en el interior que las conectara.
- ✓ **Pre-tratamiento de las muestras.** El objetivo de esta etapa es detener lo antes posible la actividad microbiana mediante la adición de formaldehído y el secado. Pero ambos procesos son difíciles de reproducir ya que la cantidad de muestra, así como su estado de agregación, es difícil de controlar y las condiciones de humedad y temperatura pueden ser muy variables como ocurrió en esta ocasión en los que durante un periodo se alternó días de lluvia con otros muy calurosos.

En cuanto al análisis de los resultados obtenidos en las subparcelas 1 y 3 cabe resaltar dos aspectos. En ambas parcelas se adicionaron los tensioactivos.

- ✓ Los tiempos de vida media fueron mayores para todos los fármacos estudiados en la subparcela 1, que contenía el compost, que en la 3 (ausencia del mismo).
- ✓ Mientras que los compuestos en la subparcela 1 compostada se detectaron hasta la penúltima incluso en algunos casos última toma (días

42 y 58), en la subparcela 3 algunos analitos (KET y BEZ) se detectaron por última vez en la toma 8 (día 22).

Estas grandes diferencias en el comportamiento de los analitos entre ambas subparcelas se deben básicamente a una mayor lixiviación de los compuestos en la parcela 3 en comparación con la parcela 1, sobre todo durante los primeros días. Dado que la única diferencia entre ambas parcelas es el enmedado de la primera con compost procedente de lodo EDAR, es evidente que este comportamiento es una consecuencia directa de la adición del compost al suelo. Al aportar una gran cantidad de materia orgánica se favorece la retención, principalmente por adsorción de los analitos por la presencia de compuestos químicos, como los ácidos húmicos, que favorecen dicha adsorción.

Esto tiene dos consecuencias directas de gran relevancia medioambiental, la primera positiva, pero la segunda bastante negativa y peligrosa para la salud del ser humano:

- ✓ Al enmendar el suelo, los contaminantes quedan retenidos al mismo provocando que no lixivien hacia las aguas subterráneas y evitando así la contaminación del acuífero y por extensión, evitando la difusión de los contaminantes a través de las aguas subterráneas.
- ✓ Al retenerse en mayor proporción los compuestos en el suelo, aunque con ello se aumente la posibilidad de biodegradación y eliminación definitiva de los contaminantes, por la mayor biodisponibilidad para los microorganismos; también se aumenta de forma exponencial el riesgo de asimilación de los mismos por parte de las plantas y árboles cultivados en estos suelos enmendados. Este hecho aumenta notablemente el riesgo de paso de los fármacos y otros contaminantes químicos a la cadena trófica.

CAPÍTULO IV
Estudio de Adsorción

1. ADSORCIÓN

1.1. Descripción y fundamentos

La adsorción es un proceso de transferencia de masa por el cual las moléculas de un compuesto que se encuentra en una fase determinada, son retenidas en la superficie de otra sustancia o mezcla, que se encuentra en una fase distinta. El compuesto que se concentra en la superficie se denomina adsorbato, mientras que la fase en la que se produce la acumulación se denomina adsorbente. Este proceso puede tener lugar en una interfase gas-sólido o líquido-sólido.

Dependiendo de la naturaleza de las fuerzas que provocan la adsorción, se puede distinguir entre fisisorción, quimisorción e intercambio.

- ✓ **Fisisorción.** Característica cuando las fuerzas predominantes son de tipo van der Waals. En este tipo de adsorción el adsorbato conserva su naturaleza química ya que no comparte ni transfiere electrones con el adsorbente ni con otras moléculas de adsorbato. Por eso, la adsorción física es totalmente reversible. Además la interacción no es específica por lo que las moléculas de adsorbato pueden llegar a cubrir toda la superficie del adsorbente y formarse varias capas.
- ✓ **Quimisorción (adsorción química).** Se da cuando se forman enlaces covalentes entre el adsorbente y adsorbato. Tiene lugar sólo en determinadas zonas del sólido (centros activos), dando lugar a una monocapa de moléculas del adsorbente sobre la superficie del centro activo. Por lo general, se trata de un proceso irreversible. Dado que se producen enlaces químicos, los calores de quimisorción son del mismo orden de magnitud que los de las reacciones químicas.
- ✓ **Adsorción por intercambio.** En este proceso el soluto y el adsorbente se atraen por fuerzas electrostáticas. Es un proceso mediante el cual los iones de una sustancia se concentran en una superficie como resultado

de la atracción electrostática en los lugares cargados de la superficie. Para dos adsorbatos iónicos posibles, a igualdad de otros factores, la carga del ion es el factor determinante en la adsorción de intercambio. Para iones de igual carga, el tamaño molecular (radio de solvatación) determina el orden de preferencia para la adsorción.

La mayoría de los fenómenos de adsorción son combinaciones de estos tres tipos de adsorción, y muchas veces resulta difícil distinguir la fisisorción de la quimisorción.

La adsorción sólido-líquido es más compleja que la adsorción sólido-gas, ya que las fuerzas de interacción no son sólo adsorbente-adsorbato, sino que también intervienen fuerzas de interacción adsorbente-disolvente, adsorbato-disolvente y adsorbato-adsorbato. Por ello, la afinidad de un adsorbente por un adsorbato no depende solamente de la naturaleza de las interacciones entre ambos, sino también de la naturaleza del disolvente en el que se disuelve el adsorbato. En este estudio, el solvente que se usó siempre fue agua. Pero la lista de factores que influyen en la adsorción en fase líquida es extensa como veremos más adelante.

1.2. Factores influyentes en la adsorción líquida

Estos factores son diversos y se pueden atribuir a la naturaleza del adsorbato, del adsorbente y otras condiciones del medio.

1.2.1. Características físico-químicas del adsorbato

Las características físico-químicas del adsorbato influyen de forma crucial en la adsorción, así:

- ✓ La **estructura** condiciona la naturaleza de los enlaces que se establecen con la superficie de las partículas del adsorbato, en el caso del presente estudio el suelo. Así, distinguimos entre moléculas con carga y moléculas neutras polares y no polares. Las primeras, normalmente se

fijan mediante mecanismos de intercambio iónico. Para el resto, la presencia de grupos funcionales como dobles enlaces, anillos aromáticos, grupos halogenados u otros grupos polares puede dar lugar a adsorción específica.

- ✓ **Peso molecular y tamaño.** La afinidad del compuesto por ser adsorbido varía con su peso molecular. El tamaño del adsorbato va a condicionar la velocidad del proceso de adsorción.
- ✓ **Solubilidad.** Existe una relación inversa entre la capacidad de adsorción del soluto y su solubilidad en el medio. Para el agua, se espera que aquellas sustancias menos solubles se adsorban más en el suelo.

Otras propiedades relacionadas con el adsorbato que pueden afectar a la adsorción son la polaridad y el grado de ionización.

1.2.2. Naturaleza del adsorbente

En la adsorción en fase líquida pueden ser tan importantes las propiedades químicas superficiales del adsorbente como sus características estructurales. Por un lado, la naturaleza química de la superficie del adsorbente influirá en los enlaces que se formen entre éste y el adsorbato y, por otro, sus propiedades texturales, como son la superficie específica, el volumen de poros y tamaño de partícula, influirán tanto en la cantidad total de adsorbato retenida en el equilibrio, como en la cinética del proceso. En el caso particular del suelo, el contenido en arcillas, materia orgánica y óxidos e hidróxidos es de vital importancia en el proceso de adsorción.

- ✓ **Arcilla.** Las propiedades fisicoquímicas particulares de los minerales de arcilla, hacen de éstas, materiales importantes como adsorbentes en una multitud de procesos como la depuración de aguas residuales¹⁶⁸. Estas propiedades provienen de su reducido tamaño de partícula (< 2

¹⁶⁸ Andrade, L.; Covelo, E.F.; Vega, F.A. Uso de arcillas especiales para depuración de aguas residuales. *Información tecnológica*, 2005, 16, 3-10.

µm), morfología laminar y la capacidad de poseer déficit de cargas producto de las sustituciones isomórficas de cationes interlaminares débilmente ligados¹⁶⁹. Todo esto da lugar a un valor elevado de área superficial y sitios activos, lo que provoca que éste material posea una gran capacidad de intercambio catiónico, como resultado de tender a compensar el déficit de cargas generadas en el espaciado interlaminar de cationes débilmente ligados, con variado estado de hidratación.

- ✓ **Materia orgánica.** La interacción de la materia orgánica del suelo con el adsorbato incrementa la adsorción de éstos sobre el suelo.
- ✓ **Óxidos e hidróxidos libres de hierro y aluminio** pueden presentar cargas positivas, debidas a los agrupamientos del tipo $\text{Al}(\text{OH})_x^+$ y $\text{Fe}(\text{OH})_x^+$, que dan lugar a la adsorción de los aniones. Los hidróxidos de aluminio suelen recubrir las superficies de la arcilla.

1.2.3. Condiciones del medio

Principalmente temperatura, pH y presencia de otros compuestos químicos.

- ✓ **Temperatura.** El efecto depende del sistema adsorbato-adsorbente. En general, la capacidad de adsorción aumenta al disminuir la temperatura, pero en bibliografía se encuentran ejemplos de lo contrario¹⁷⁰. Esto se debe a que la adsorción es un fenómeno exotérmico.
- ✓ **pH.** El pH de la fase líquida afecta tanto al sólido adsorbente como al adsorbato. Por una parte, los iones H_3O^+ y OH^- se adsorben de forma fuerte sobre algunos adsorbentes, estableciéndose una competencia con la retención del adsorbato. Por otro lado, el pH determina el grado de disociación del adsorbato, de manera que se puede aumentar la solubilidad en la fase líquida o su retención en la fase sólida. No

¹⁶⁹ Cruz-Guzmán Alcalá, M. La contaminación de suelos y aguas: su prevención con nuevas sustancias naturales. *Universidad de Sevilla*, 2007, 78-80.

¹⁷⁰ El-Sheikh, A.H.; Newman, A.P.; Al-Daffaee, H.K.; Phull, S.; Cresswell, N. Characterization of activated carbon prepared from a single cultivar of Jordanian Olive stones by chemical and physicochemical techniques. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2004, 71, 151-164.

obstante, este factor no afecta por igual a todos los sistemas adsorbato-adsorbente y debe determinarse experimentalmente.

- ✓ **Presencia de otros compuestos.** Esto puede favorecer la adsorción o interferir, haciéndola más lenta e incluso bloqueando el proceso. En la práctica, con el objetivo de evaluar la adsorción en condiciones más reales, se suele trabajar con fases líquidas multicomponentes ya que los contaminantes nunca se encontrarán aislados. Este modo de trabajo ha sido el empleado en la presente investigación.

1.3. Mecanismo general de la adsorción

La adsorción obedece a las leyes de equilibrio entre la concentración en fase líquida y concentración en fase sólida, sobre la superficie del adsorbente. La adsorción de un soluto se efectúa según una sucesión de cuatro etapas cinéticas:

- 1. Transferencia del adsorbato** desde el seno de la disolución hacia la película líquida que rodea el adsorbente. Esta transferencia ocurre por difusión y/o convección.
- 2. Transferencia del soluto** a través de la película líquida hacia la superficie del adsorbente. Se denomina difusión externa.
- 3. Difusión interna o difusión intraparticular**, que es la transferencia del adsorbato desde la superficie de la partícula a los sitios activos en el interior de la misma a través de la red porosa del sólido.
- 4. Adsorción propiamente dicha**, entendida como el enlace formado tras el acceso del adsorbato a un sitio de adsorción disponible.

Estas etapas se efectúan en serie siendo la más lenta la que impone la cinética. Para la mayoría de los autores, la última etapa es la más rápida, de hecho se considera que se alcanza el equilibrio de forma instantánea. Igual

ocurre con la primera etapa, por lo que la difusión externa y/o intraparticular son las etapas que controlan la cinética de adsorción.

1.4. Modelos cinéticos de adsorción

En bibliografía hay numerosos modelos muy usados para analizar la cinética de los procesos de adsorción, algunos destacan por su sencillez en la aplicación y su fácil interpretación. A continuación se hace una breve descripción de los evaluados en esta Tesis Doctoral.

1.4.1. Modelo de pseudo-primer orden

Lagergren (1898)¹⁷¹ presentó una ecuación de velocidad de primer orden para describir el proceso cinético de adsorción en fase líquida-sólida de ácido oxálico y ácido malónico sobre carbón, que se cree que es el modelo más antiguo descrito para estudiar la velocidad de un proceso de adsorción. Es una de las ecuaciones de velocidad más usadas para la adsorción de un soluto en una solución acuosa. Viene dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{dq}{dt} = k_1(q_e - q_t)$$

donde k_1 (h^{-1}) es constante de velocidad de pseudo-primer orden, q_e y q_t ($\mu\text{g kg}^{-1}$) son la cantidad de soluto adsorbido en el equilibrio, en un tiempo t (h), respectivamente. Al integrar la ecuación anterior y aplicar las condiciones límites $q_t = 0$ para $t = 0$ y $q_t = q_t$ cuando $t = t$, se obtiene la ecuación:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t})$$

y en el caso de que ocurran dos procesos de adsorción con distinta velocidad, las cinéticas experimentales se ajustan a la siguiente ecuación cinética de pseudo primer orden múltiple:

¹⁷¹ Lagergren, S.; Svenska, B.K. Zur theorie der sogenannten adsorption geloester stoffe. *Veternskapsakad Handlingar*, 1898, 24, 4, 1-39.

$$q_t = q_{e1}(1 - e^{-k_{11}t}) + q_{e2}(1 - e^{-k_{12}t}) + \dots + q_{en}(1 - e^{-k_{1n}t})$$

donde k_{11} y k_{12} , en general k_{1n} , son las constantes de velocidad para cada proceso de adsorción, y q_{e1} y q_{e2} (q_{en}) son las correspondientes cantidades de soluto adsorbidas en el equilibrio.

1.4.2. Modelo de pseudo-segundo orden

Este modelo ha sido aplicado con éxito en procesos de adsorción en suelos cuando la velocidad de difusión intraparticular ha sido la limitante para el proceso de adsorción¹⁷². La ecuación de este modelo es:

$$\frac{dq}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2$$

Al integrar bajo las condiciones límites, la ecuación resultante es:

$$\frac{t}{q_t} = \left(\frac{1}{k_2 q_e^2} \right) + \left(\frac{1}{q_e} \right) t$$

Representando t/q_t frente t , se obtiene una línea recta y se puede calcular k_2 (constante de velocidad de pseudo-segundo orden, $\text{kg } \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de la ordenada en el origen y q_e de la pendiente.

1.4.3. Modelo de Elovich

La ecuación de Elovich¹⁷³ se ha aplicado satisfactoriamente sobre algunos datos de quimisorción. Es a menudo válida para sistemas en los que la superficie de adsorción es heterogénea. La ecuación se formula como:

¹⁷² Plazinski, W.; Dziuba, J.; Rudzinski, W. Modeling of sorption kinetics: the pseudo-second order equation and the sorbate intraparticle diffusivity. *Adsorption*, 2013, 19, 1055-1064.

¹⁷³ Wu, F.C.; Tseng, R.L.; Juang, R.S. Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems. *Chemical Engineering Journal*, 2009, 150, 366-373.

$$\frac{dq}{dt} = \alpha \cdot e^{(-\beta q_t)}$$

donde α y β son la velocidad inicial de adsorción ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) y la constante de desorción ($\text{kg } \mu\text{g}^{-1}$), respectivamente. Este último parámetro se relaciona con el número de centros activos disponibles. Al asumir que $\alpha\beta t \gg 1$ e integrar se obtiene:

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln(t)$$

1.4.4. Modelo de Weber-Morris

Este modelo es uno de los más sencillos para evaluar los procesos de difusión. Weber y Morris¹⁷⁴ encontraron que en muchos casos de adsorción, la cantidad de soluto adsorbido variaba casi proporcionalmente con $t^{1/2}$ ($\text{h}^{1/2}$).

$$q_t = k_p t^{1/2} + B$$

donde k_p es la constante de velocidad de difusión intraparticular ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$). Si al realizar la representación de q_t frente a $t^{1/2}$, la recta pasa por el cero se determina que la difusión intraparticular es el único paso limitante de la velocidad. Si esto no ocurre, se concluye que la cinética de adsorción puede estar controlada simultáneamente por la difusión externa e intraparticular¹⁷⁵. En este caso se obtiene B ($\mu\text{g kg}^{-1}$), una constante que da idea sobre el espesor de la película líquida que rodea (*boundary layer*) al adsorbente.

¹⁷⁴ Weber, W.J.; Morris, J.C. Kinetics of adsorption carbon from solutions. *Journal Sanitary Engineering Division Proceedings. American Society of Civil Engineers*, 1963, 89, 31-60.

¹⁷⁵ Qiu, H.; Lv, L.; Pan, B.-c.; Zhang, Q.-j.; Zhang, W.-m.; Zhang, Q.-x. Critical review in adsorption kinetic models. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*, 2009, 10, 716-724.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para obtener las cinéticas de adsorción, los experimentos se llevaron a cabo utilizando una técnica en discontinuo denominada en tanque o "batch"¹⁷⁶. Se basa en la agitación y mezcla con suelo, a temperatura constante, de disoluciones acuosas que contienen a los analitos en estudio. Los compuestos evaluados fueron los mismos que se usaron en el estudio de campo del capítulo anterior. Esta mezcla se agita durante tiempos determinados en frascos de polipropileno y después se centrifuga con objeto de separar la fase sólida de la líquida. Para evaluar la cantidad de compuesto retenida por el suelo, se determina la concentración de cada especie en la disolución sobrenadante, calculando mediante un balance de materia la correspondiente a la fase sólida. Esta forma de operar se denomina método indirecto.

Los compuestos ensayados se disuelven en una disolución 0.01M de cloruro cálcico (CaCl₂) en agua desionizada. La presencia de la sal favorece la centrifugación y minimiza el intercambio catiónico.

Se estudió el comportamiento de 6 fármacos. La concentración de los analitos fue 100 ng mL⁻¹ para IRB, 300 ng mL⁻¹ para BEZ, KET y DIC, y 600 ng mL⁻¹ para FLU y GEM.

Los intervalos de tiempo empleados fueron 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 y 90 minutos y 2, 3, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 72 y 96 horas. Para cada intervalo se prepararon tres réplicas experimentales. La relación masa-disolvente se fijó en 1:5 en base a la bibliografía científica existente¹⁷⁷. Así, se emplearon 3 g de suelo con 15 mL de disolución. Además, a cada réplica se le añadió 5 mg de azida sódica para evitar la actividad microbiana durante el experimento. La temperatura ambiental de trabajo se mantuvo constante durante todo el tiempo a 23°C.

¹⁷⁶ OECD. Adsorption-desorption using a batch Equilibrium Method. *Guideline for the testing of chemicals*, 2000, 106.

¹⁷⁷ Lin, K.; Gan, J. Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere*, 2011, 83, 240-246.

Los tubos donde se realiza la mezcla se sometieron a agitación rotatoria (12 rpm) mediante el uso de un agitador orbital de tubos. Al finalizar el tiempo de agitación, y centrifugar la mezcla durante 20 min a $3460 \times g$, se tomaron aproximadamente 5 mL del sobrenadante y se filtraron con una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ de PVCF. Por último, se prepararon dos viales cromatográficos mezclando una alícuota de 700 μL del sobrenadante filtrado con 300 μL de una disolución metanólica que contenía los patrones internos, KET- d_3 y BEN.

El análisis de los fármacos estudiados se realizó mediante la metodología UHPLC-MS (QDA) desarrollada en el capítulo anterior de la presente Memoria de Doctorado.

Con objeto de evaluar el efecto matriz, se preparó un calibrado en sobrenadante y otro externo en disolvente. El sobrenadante para el primer calibrado, se obtuvo agitando 8 tubos durante tres días, cada uno con 4 g de suelo blanco, 20 mL de "agua de lluvia", como se denomina a la disolución 0.01M de CaCl_2 , y 5 mg de azida sódica. Después de centrifugar los tubos, se juntaron los sobrenadantes y se filtraron a través de una membrana de $0.22 \mu\text{m}$. Este sobrenadante se usó para enrasar los matraces de la función de calibrado, donde previamente se habían añadido los analitos en disolución metanólica y evaporado hasta casi sequedad. Se prepararon dos viales cromatográficos por cada nivel de calibración. Para el calibrado externo, en lugar de preparar las disoluciones de calibración con el sobrenadante, los matraces se enrasaron con agua destilada.

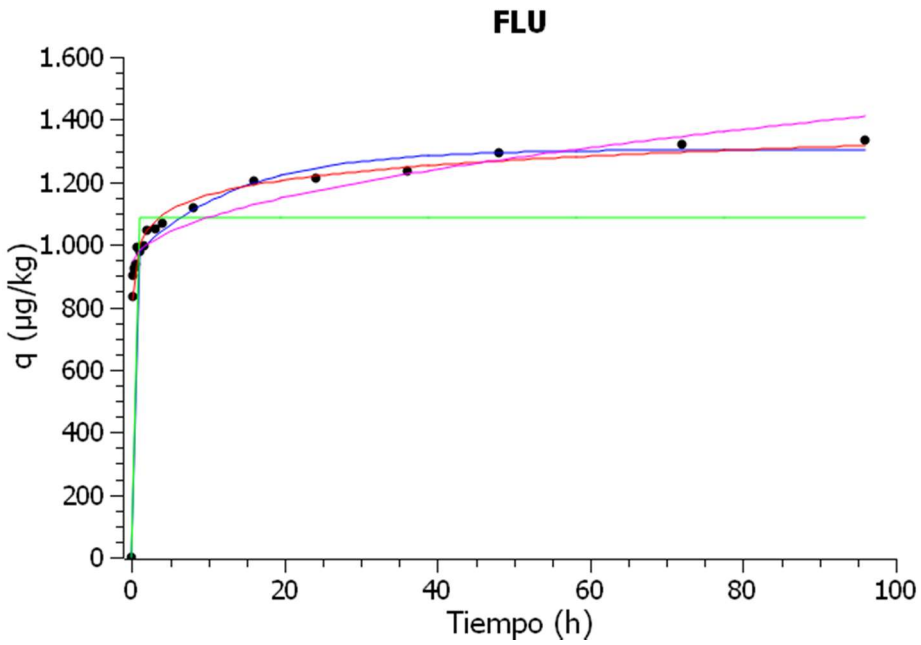
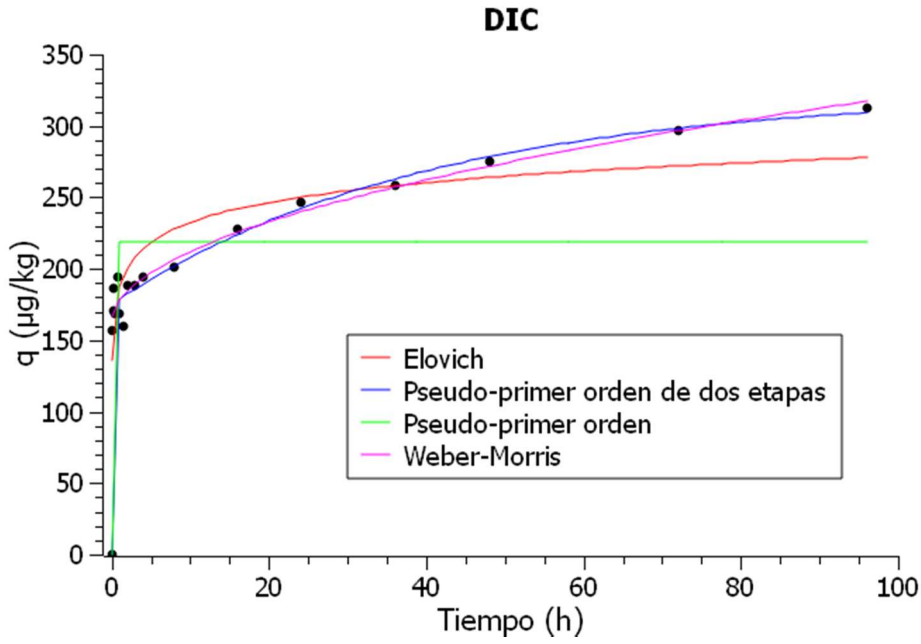
Al comparar ambas rectas de calibrado para cada uno de los fármacos ensayados, se comprobó que existía efecto matriz en los casos del DIC y FLU. En consecuencia, se decidió preparar en todos los casos las curvas de calibración en el sobrenadante.

3. RESULTADOS

Después de analizar todas las réplicas de sobrenadante en todos los intervalos, se determinó q_t ($\mu\text{g kg}^{-1}$ de suelo) empleando la siguiente ecuación matemática:

$$q_t = (C_i - C_t) * 5$$

donde C_i y C_t son las concentraciones de analito al iniciar el ensayo, es decir, en la disolución de trabajo, y en el sobrenadante correspondiente al intervalo de tiempo, t . El factor de conversión entre $\mu\text{g L}^{-1}$ de sobrenadante y $\mu\text{g kg}^{-1}$ de suelo es de 5. A continuación se representaron los datos experimentales q_t frente al tiempo y se aplicaron los ajustes de los modelos cinéticos de pseudo-primer orden, pseudo-primer orden de dos etapas, Elovich y Weber-Morris. Dicha representación así como los ajustes se muestran en la Figura IV.1 y IV.2.



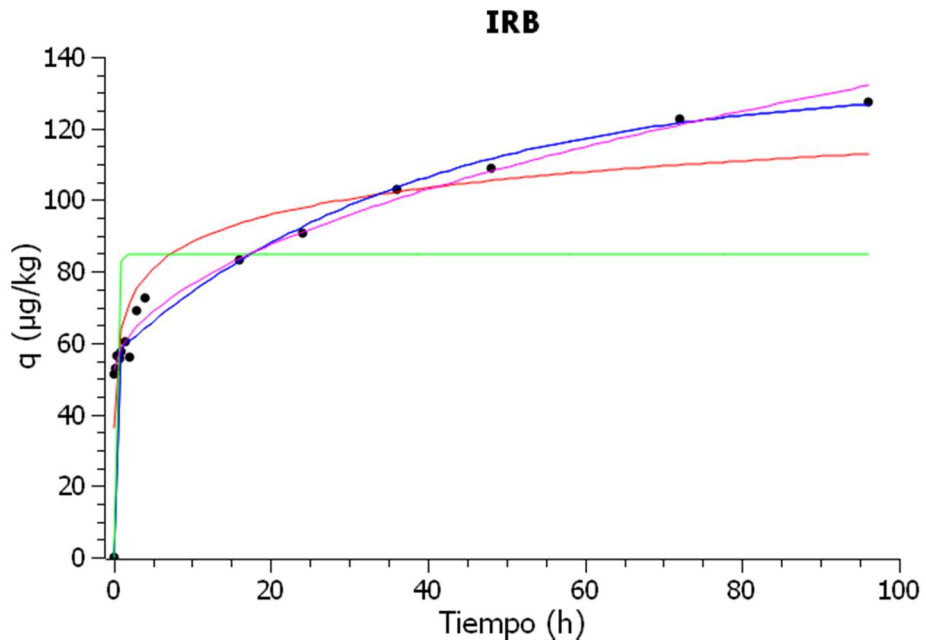
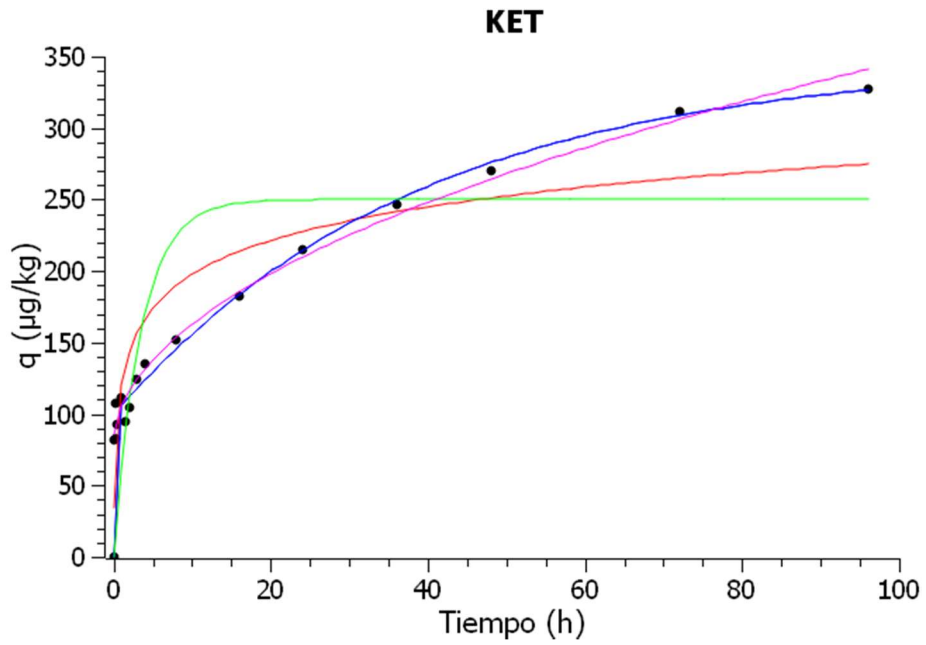


Figura IV.1. Cinéticas de adsorción y modelos para NSAIDs e IRB

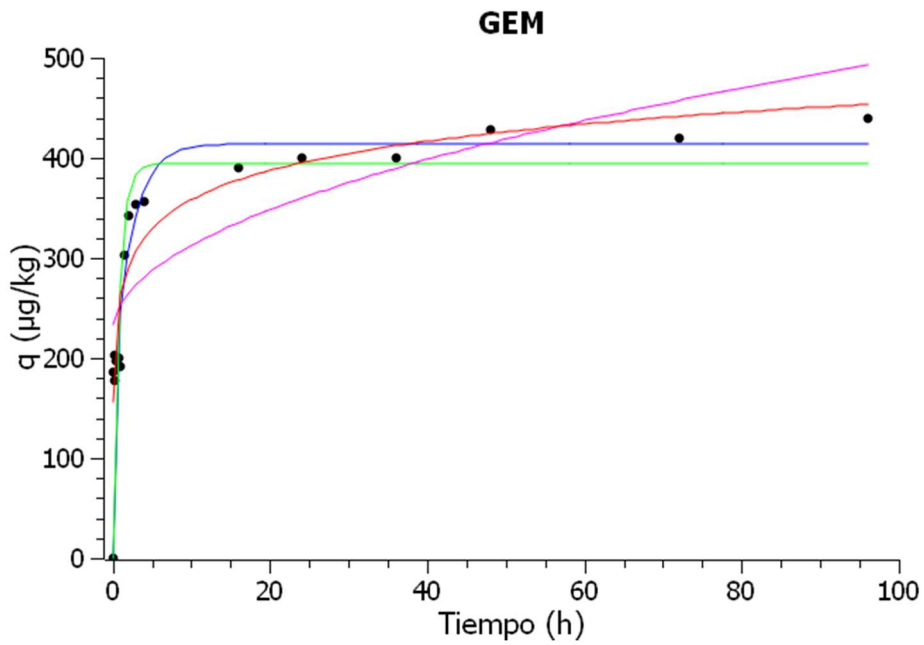
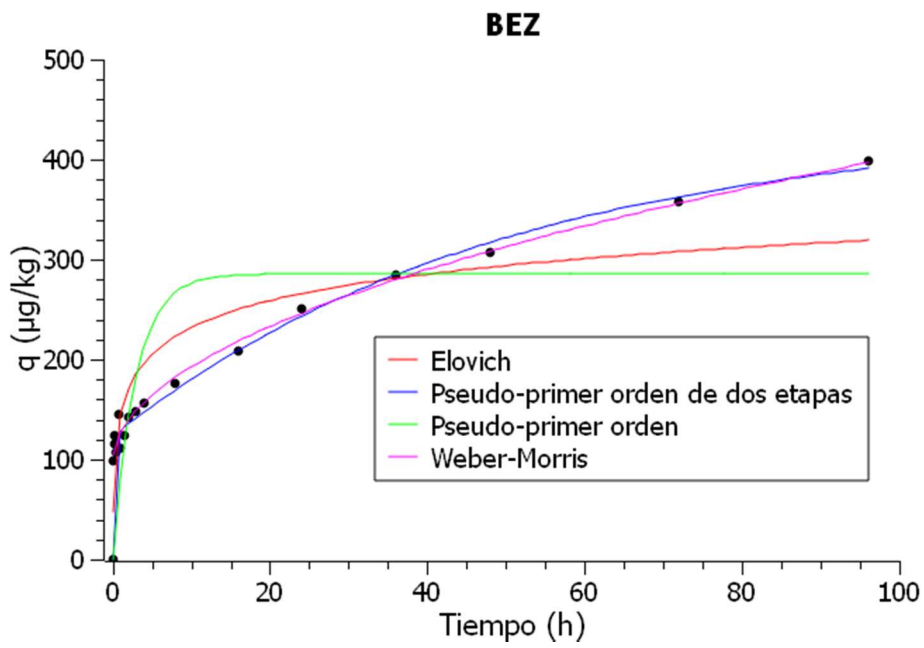


Figura IV.2 Cinéticas de adsorción y modelos para los reguladores lipídicos

Analizando las gráficas anteriores se concluye que el modelo de pseudo-primer orden no es adecuado para describir la cinética de adsorción en ninguno de los compuestos. En cambio, el modelo de pseudo-primer orden de dos etapas o procesos, parece ser el mejor ajuste para todos los analitos, aunque en algunos casos también podrían ser válidos los otros dos modelos restantes. Los parámetros de los ajustes, excepto el del pseudo-primer orden, se muestran en las Tablas IV.1, IV.2 y IV.3.

Tabla IV.1. Parámetros del ajuste del modelo de pseudo-primer orden de dos etapas

	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
k_{11}	26.9	23.2	17.7	26.6	18.9	204
k_{12}	$2.5 \cdot 10^{-2}$	$7.3 \cdot 10^{-2}$	$2.6 \cdot 10^{-2}$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	$2.0 \cdot 10^{-2}$	0.429
q_{e1}	175	955	99	56	123	158
q_{e2}	147	349	248	76	313	256
R^2	98.6	99.3	99.3	99.0	99.1	96.4

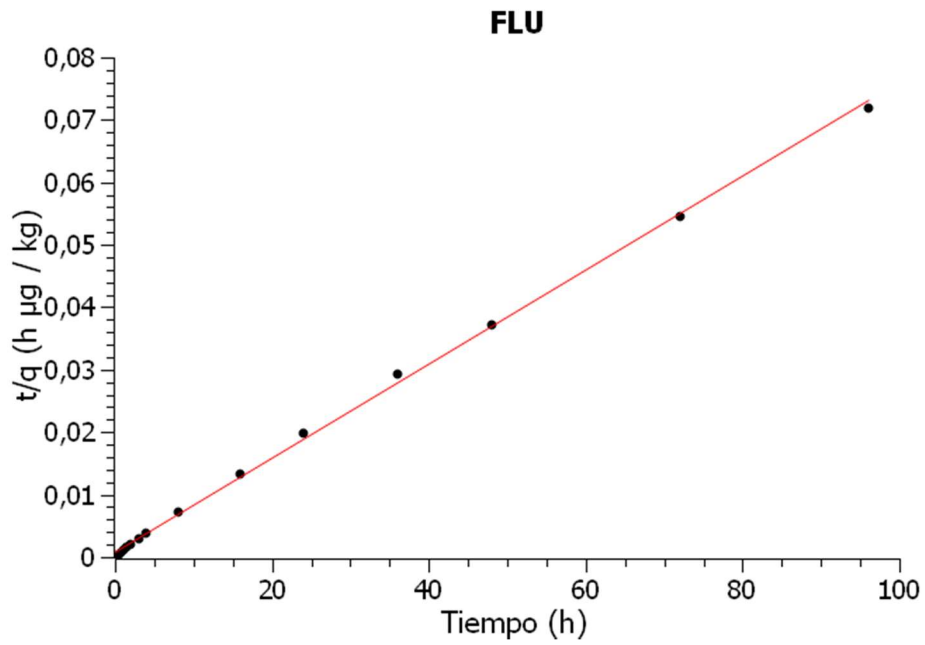
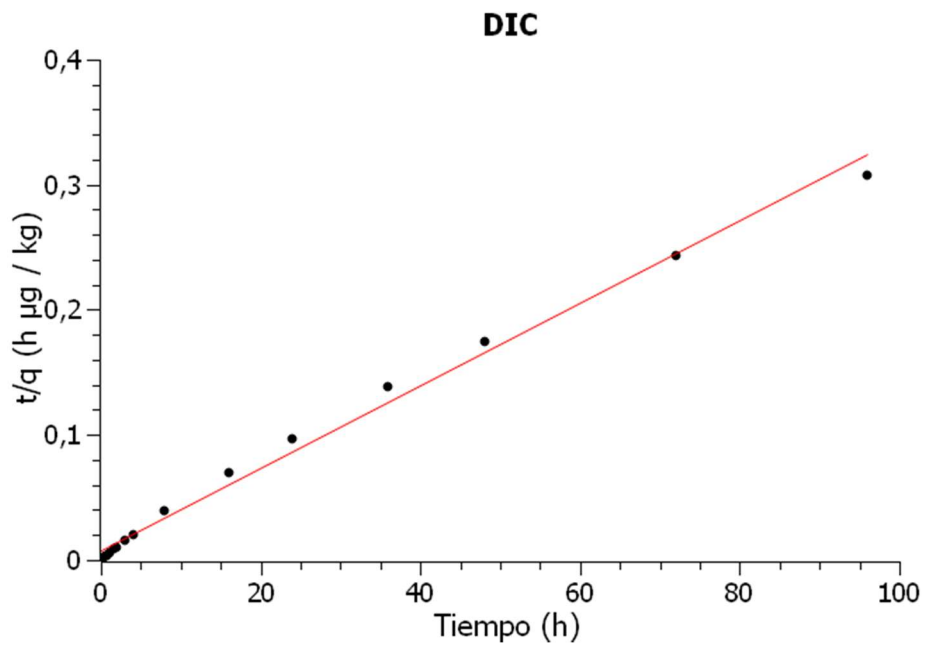
Tabla IV.2. Parámetros del ajuste del modelo de Weber-Morris

	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
k_p	15.9	48.8	26.9	8.36	30.7	27.2
B	162	932	77.7	50.0	95.4	226.2
R^2	96.3	90.2	98.9	98.8	98.9	70.7

Tabla IV.3. Parámetros del ajuste del modelo de Elovich

	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
α	$2.17 \cdot 10^5$	$1.08 \cdot 10^8$	1114	3616	1590	$2.07 \cdot 10^4$
β	0.050	0.014	0.029	0.092	0.026	0.024
R^2	81.5	98.2	84.3	87.9	82.2	88.9

Así mismo, se representó t/q_t frente a t para evaluar el ajuste de pseudo-segundo orden (ver Figura IV.3 y IV.4). Los parámetros obtenidos de este ajuste se muestran en la Tabla IV.4.



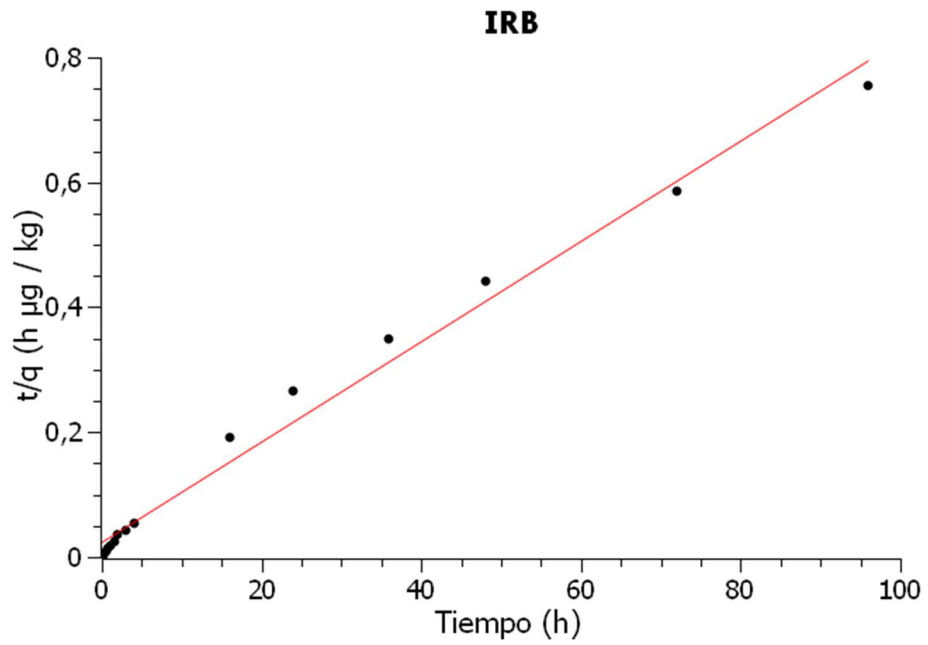
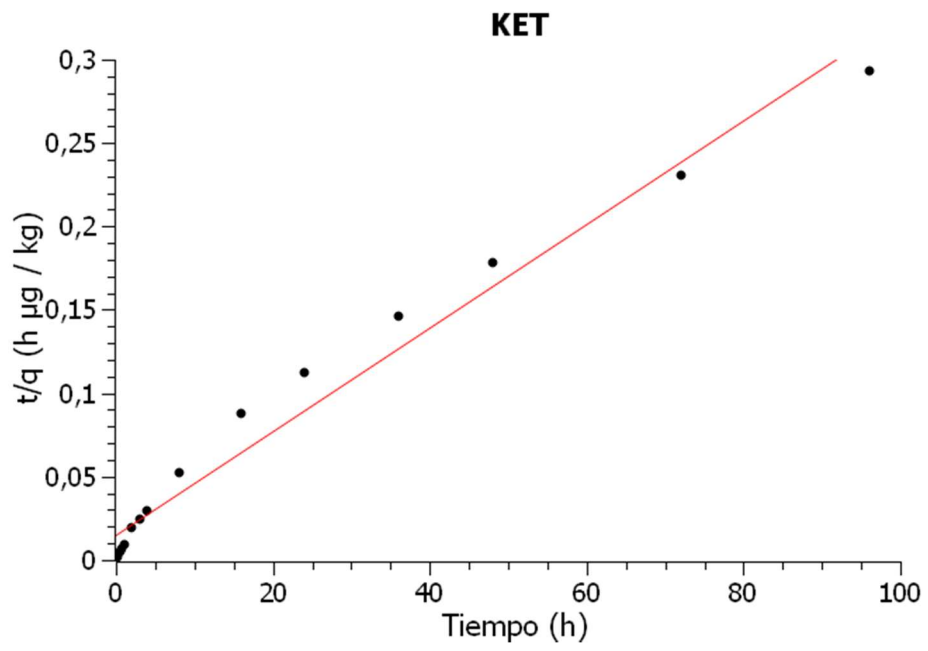


Figura IV.3. Ajuste de pseudo-segundo orden para NSAIDs e IRB

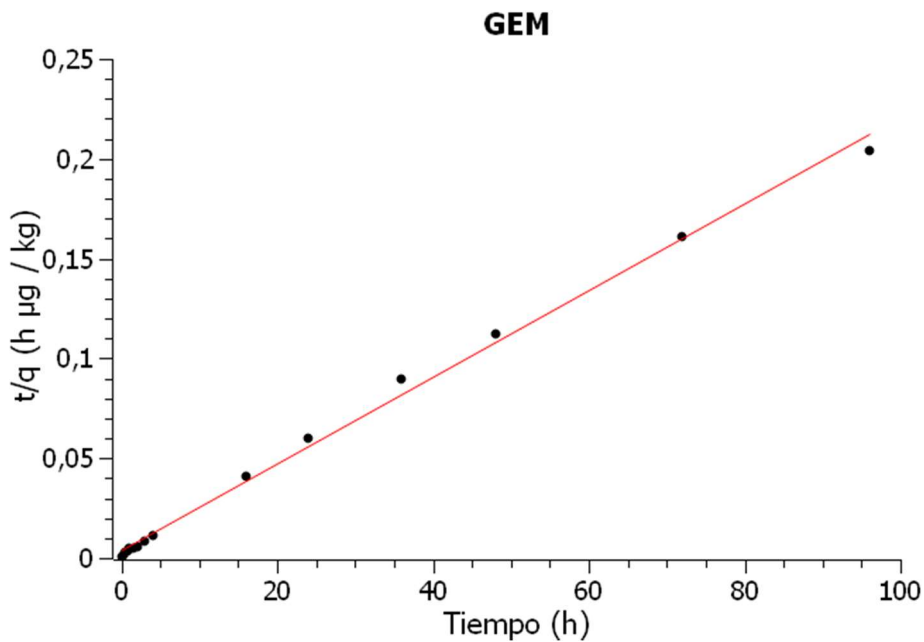
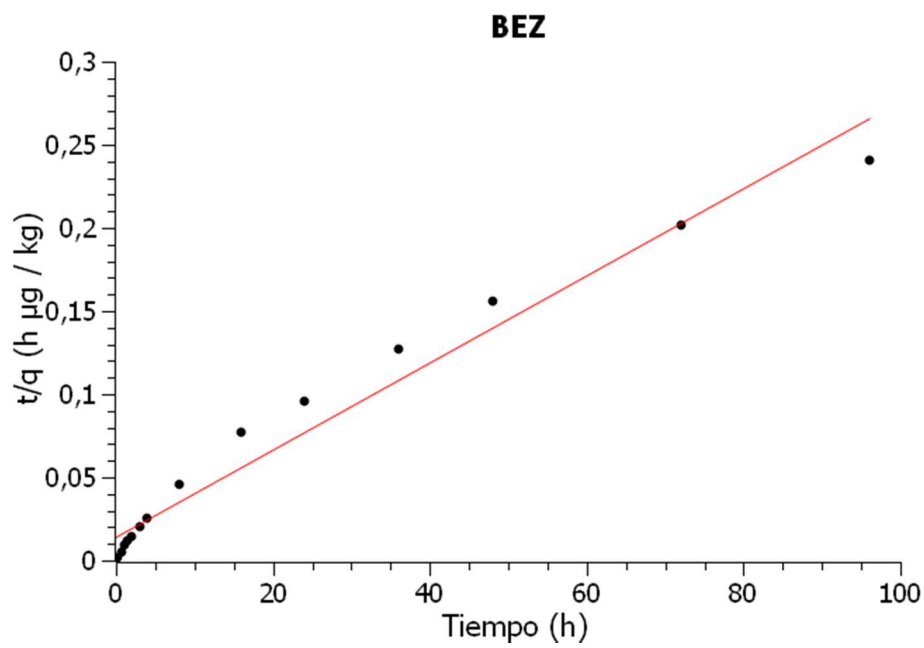


Figura IV.4. Ajuste de pseudo-segundo orden para los reguladores lipídicos

Tabla IV.4. Parámetros del ajuste del modelo de pseudo-segundo orden

	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
k_2	$1.63 \cdot 10^{-2}$	$6.35 \cdot 10^{-3}$	$6.61 \cdot 10^{-3}$	$2.63 \cdot 10^{-2}$	$5.96 \cdot 10^{-3}$	$7.21 \cdot 10^{-3}$
q_e	277	1281	267	111	311	436
R^2	98.0	99.6	92.3	96.7	91.6	99.6

Como se observa de las gráficas y los parámetros, el ajuste de pseudo segundo orden puede ser válido solamente para FLU, GEM y DIC. En los otros tres, no solo los datos no se ajustan a una recta sino que el valor de q en el equilibrio es menor al obtenido a las 96 horas.

Tras evaluar los modelos cinéticos (gráficas y parámetros cinéticos), se observa que en algunos compuestos como FLU, es difícil concluir que modelo es el más adecuado. Para resolver este problema se recurrió a la comparación de la desviación estándar normalizada¹⁷⁸ (Δq) de cada modelo. Dicha desviación viene dada por la siguiente expresión:

$$\Delta q(\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum \left[\frac{q_{t,exp} - q_{t,cal}}{q_{t,exp}} \right]^2}{N - 1}}$$

donde los subíndices *exp* y *cal* definen los valores experimentales y calculados, respectivamente, y N es el número de puntos experimentales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.5.

Tabla IV.5. Valores de Δq para cada uno de los modelos

Modelo	DIC	FLU	KET	IRB	BEZ	GEM
1	4.7	2.4	6.4	5.1	6.1	7.4
2	5.1	4.5	6.4	4.0	7.3	18.1
3	10.5	2.0	24.3	13.3	24.9	10.5
4	28.4	14.9	49.4	35.9	52.3	22.2

1: Pseudo-primer orden de dos etapas; 2: Weber-Morris; 3: Elovich; 4: Pseudo-segundo orden

¹⁷⁸ Tseng, R.L.; Wu, F.C.; Juang, R.S. Characteristics and applications of the Lagergren's first-order equation for adsorption kinetics. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2010, 41, 661-669.

Como conclusión a los resultados obtenidos, se puede afirmar que:

- ✓ Dados los valores de R^2 (el más bajo es 96.1%) y Δq (7.4 es el valor más alto), el modelo de pseudo-primer orden con dos etapas es el que mejor explica la cinética de adsorción de todos los fármacos estudiados. Le sigue, el modelo de Weber-Morris (R^2 mayores a 90.2 y Δq menores a 7.3), que se puede aceptar en todos los casos menos para GEM.
- ✓ Estas dos cinéticas, ponen de manifiesto que la adsorción de estos compuestos en el suelo se rige por fenómenos de difusión, tanto externa como intraparticular. Podemos asignar k_{11} y k_{12} a estas dos etapas de difusión, pero sin poder diferenciar entre ellas.
- ✓ Los datos de adsorción demuestran que los analitos DIC, KET, IRB y BEZ no llegan al equilibrio en el tiempo ensayado de tres días. En cambio FLU y GEM lo alcanzan aproximadamente en el segundo y primer día, respectivamente.
- ✓ A partir del modelo de pseudo-primer orden de dos etapas se puede determinar que el tiempo de equilibrio para el resto de compuestos es aproximadamente de 8 días (200 h). Además, de la suma de q_{e1} y q_{e2} es posible calcular el porcentaje total que se retiene bajo las condiciones ensayadas en el tiempo de equilibrio. Estos valores fueron 32%, 61%, 21%, 39%, 29% y 29% para DIC, FLU, KET, IRB, BEZ y GEM, respectivamente.
- ✓ El modelo de Elovich no ha sido satisfactorio para ningún compuesto exceptuando FLU (R^2 igual a 98.2 y Δq de 2.0). Como ya se ha dicho con anterioridad, las cinéticas de tipo quimisorción suelen ajustarse bien a este modelo, por lo que se puede suponer que parte de la adsorción en FLU es de tipo química mientras que en el resto de analitos es de naturaleza física.
- ✓ El modelo de pseudo-segundo orden, dado los altos valores de Δq , no es aplicable a ningún compuesto.

Conclusiones

Como resultado de la investigación realizada durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones principales:

1. Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación de PPCPs en compost procedente de lodo de depuradora. Se han detectado y cuantificado 6 fármacos (DIC, FLU, KET, BEZ, FEN y GEM) y 9 productos de cuidado personal, incluyendo 4 parabenos (MPB, EPB, PPB y BPB) y 5 filtros ultravioleta (benzofenonas 1, 4, 6, 8 y 4-OH-PB).
2. Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación de fármacos en suelo agrícola procedente de una parcela de la Vega de Granada. Se han detectado y cuantificado 5 antiinflamatorios no esteroideos (DIC, MEF, FLU, KET, MAP), IRB y 3 reguladores lipídicos (BEZ, FEN y GEM).
3. En ambos casos, la técnica de extracción empleada en la etapa de tratamiento de muestra ha sido la extracción asistida con ultrasonidos (UAE). Se han optimizado cuidadosamente las variables que afectan al proceso de extracción de los analitos a partir de las muestras de compost y suelo empleando estrategias de optimización multivariante (diseño de experimentos).
4. El procedimiento final de tratamiento de muestra para el compost parte de 0.5 g de compost. Las muestras se extraen mediante 2 ciclos de UAE con una mezcla de ACN/AcEt (1:1, v/v) al 10% de ácido acético, para cada ciclo. Tras la extracción el extracto se somete a un proceso de limpieza asistido con sales (NaCl y MgSO₄).
5. El procedimiento final de tratamiento de muestra para el suelo agrícola parte de 1.0 g de muestra. Las muestras se extraen, en tandas de cuatro, mediante 2 ciclos de UAE con una mezcla de Acetona/MeOH (45:55, v/v) con un 7% de ácido acético. Tras la extracción el extracto se somete a un proceso de limpieza con adsorbentes dispersivos (florisil).

6. En ambos casos, la técnica analítica empleada para el análisis de los extractos obtenidos ha sido la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS). EPB-d₅, KET-d₃, BEN y MET han sido usados como patrones internos de tipo surrogate.
7. El método puesto a punto en compost ha permitido obtener recuperaciones de los analitos estudiados comprendidas entre 95.6 % para BPB y 109.7% para FEN, con DER menores del 11.2%. Estos valores son acordes con la guía de validación de la FDA empleada y por tanto, se puede concluir que el método es exacto (veraz y preciso).
8. El método puesto a punto en suelo ha permitido obtener recuperaciones de los analitos estudiados comprendidas entre 94.1 % para NAP hasta 109.6% para MEF, con DER menores del 8.4%. Estos valores son acordes con la guía de validación de la FDA empleada y por tanto, se puede concluir que el método también es exacto (veraz y preciso).
9. En ambos casos, el resto de parámetros de calidad calculados junto a los límites de detección y cuantificación obtenidos (suficientemente bajos como para poder emplear estos métodos para la detección y cuantificación de estos compuestos en las muestras medioambientales seleccionadas), han permitido la aplicación del método a muestras naturales.
10. La aplicación de los métodos a matrices reales ha demostrado un importante riesgo del uso de compost procedente de lodos EDAR para el enmendado de suelos de labor. Así, en las muestras de compost se observó que la 4-OH-BP, BP3 y MPB aparecían en todas las muestras analizadas. BP1 y BP8 se detectaron en varias muestras; y EPB, PBP, BPB se detectaron entre el 79% y el 36% de las mismas. En cuanto a los fármacos, el DIC se encontró en todas las muestras a altas concentraciones, excepto en una. KET y FLU también se cuantificaron en la mayoría de las muestras (no se detectó FLU en C1). El NAP, se encontró en ocho muestras. En cuanto a los reguladores lipídicos, GEM fue el más recurrente, detectado en 12 muestras y siempre

por encima de $14 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ Por su parte, en el caso del suelo bruto solo en cuatro muestras se obtuvieron resultados positivos, detectándose tres de los fármacos estudiados (KET, BEZ e IRB).

11. El hallazgo de concentraciones elevadas de DIC, FLU y KET ($> 100 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$) en algunas muestras de compost fue sorprendente. Debe resaltarse que no se ha informado hasta la fecha de la existencia de FLU, ni en compost ni en lodo EDAR.
12. Los métodos analíticos desarrollados ofrecen una importante innovación científica, ya que en la actualidad son muy pocos los métodos publicados sobre el estudio de estos contaminantes en las dos matrices seleccionadas, suelo agrícola y compost procedente de lodos EDAR.
13. Se ha llevado a cabo un estudio de campo en un determinado ambiente natural, donde los contaminantes pueden ser aportados por diferentes vías. Se estudió el comportamiento de 6 fármacos en suelos agrícolas de la Vega de Granada: KET, IRB, BEZ, DIC, GEM y FLU. Se evaluó la cinética de desaparición de los compuestos estudiados después de ser añadidos en concentraciones controladas al suelo.
14. Se prepararon 4 subparcelas de suelo agrícola, dos enmendadas con compost de lodo EDAR (1 y 2) y dos sin él (3 y 4). En las parcelas 1 y 3 se adicionó además una mezcla de tensioactivos. Se determinaron las concentraciones de estos compuestos a diferentes profundidades empleando la metodología previamente puesta a punto con ligeras modificaciones, y a partir de estos valores se demostró que todos los compuestos en las diferentes condiciones, tienen un comportamiento similar ajustando su cinética de desaparición a una ecuación exponencial de primer orden, $C = C_0 \cdot e^{-kt}$. Se determinó el tiempo de vida medio para cada fármaco y la constante cinética (k). Es importante señalar que los datos obtenidos para las subparcelas 2 y 4 no pudieron ajustarse a ninguna cinética, exceptuando KET y BEZ para la parcela 2.

15. Los resultados más relevantes desde un punto de vista medioambiental se obtuvieron en las parcelas 1 (con) y 3 (sin compost) en presencia de los tensioactivos. Se encontraron grandes diferencias en el comportamiento de los analitos entre ambas subparcelas debido a una mayor lixiviación de los compuestos en la parcela 3 sobre todo durante los primeros días. Los tiempos de vida media fueron mayores en todos los casos para la subparcela 1, detectándose compuestos hasta la penúltima incluso, en algunos casos, última toma (días 42 y 58); en la subparcela 3 algunos analitos (KET y BEZ) se detectaron por última vez en la toma 8 (día 22).
16. Dado que la única diferencia entre ambas parcelas es el enmedado de la primera con compost procedente de lodo EDAR, es evidente que este comportamiento es una consecuencia directa de la adición del compost al suelo. Al aportar una gran cantidad de materia orgánica se favorece la retención, principalmente por adsorción de los analitos por la presencia de compuestos, como los ácidos húmicos, que favorecen dicha adsorción.
17. Desde un punto de vista medioambiental, se concluye que:
 - ✓ Al enmendar el suelo, los contaminantes quedan retenidos al mismo provocando que no lixivien hacia las aguas subterráneas y evitando así la contaminación del acuífero y por extensión, evitando la difusión de los contaminantes a través de las aguas subterráneas.
 - ✓ Al retenerse en mayor proporción los compuestos en el suelo, aunque con ello se aumente la posibilidad de biodegradación y eliminación definitiva de los contaminantes; también se aumenta de forma exponencial el riesgo de asimilación de los mismos por parte de las plantas y árboles cultivados en estos suelos enmendados. Este hecho aumenta el riesgo de paso de los fármacos y otros contaminantes químicos a la cadena trófica.
18. Por último se ha llevado a cabo un estudio de adsorción en batch de 6 fármacos en suelo agrícola y se ha modelizado el comportamiento de estos compuestos en cuanto a su adsorción al suelo. Se ha observado que:

- ✓ El modelo de pseudo-primer orden con dos etapas es el que mejor explica la cinética de adsorción de todos los fármacos estudiados. Le sigue, el modelo de Weber-Morris, que se puede aceptar en todos los casos menos para GEM.
- ✓ Estas dos cinéticas, ponen de manifiesto que la adsorción de estos compuestos en el suelo se rige por fenómenos de difusión, tanto externa como intraparticular.
- ✓ A partir del modelo de pseudo-primer orden de dos etapas se han calculado los tiempos de equilibrio para los fármacos estudiados, que es aproximadamente de 8 días (200 h), menos para FLU y GEM que es menor.
- ✓ Se ha calculado el porcentaje total que se retiene bajo las condiciones ensayadas en el tiempo de equilibrio; 32%, 61%, 21%, 39%, 29% y 29% para DIC, FLU, KET, IRB, BEZ y GEM, respectivamente.
- ✓ El modelo de Elovich no ha sido satisfactorio para ningún compuesto exceptuando FLU; y el de pseudo-segundo orden, dado los altos valores de Δq , no es aplicable a ningún compuesto.

ANEXO
Publicación relevante



Multiclass method for the determination of pharmaceuticals and personal care products in compost from sewage sludge using ultrasound and salt-assisted liquid–liquid extraction followed by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis



A. Luque-Muñoz, J.L. Vílchez, A. Zafra-Gómez*

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 24 January 2017

Received in revised form 6 April 2017

Accepted 23 May 2017

Available online 26 May 2017

Keywords:

Pharmaceuticals and personal care

products

Compost

Sewage sludge

UAE

SALLE

UHPLC–MS/MS

ABSTRACT

An analytical method for the analysis of 16 pharmaceuticals and personal care products in compost from sewage sludge is successfully validated. Ultrasound assisted extraction with a mixture of acetonitrile:ethyl acetate (1:1, v/v) containing 10% (v/v) of acetic acid was carried out. Two cycles of extraction of 10 min were applied. A clean-up of the extracts using salt-assisted liquid–liquid extraction (SALLE) was also included. Experimental design was used for the optimization of the main parameters involved in the extraction and cleaned-up steps. The chromatographic separation was carried out by ultrahigh performance liquid chromatography using a mobile phase gradient mixture of a 13 mM buffer ammonium formate solution (pH 9.25) (solvent A) and methanol (solvent B). An ACQUITY UPLC® BEH C18 column (1.7 μm; 2.1 × 50 mm) column was used. Analytes were separated in less than 11 min. The compounds were detected and quantified using single reaction monitoring electrospray tandem mass spectrometry. The limits of detection calculated ranged from 0.5 to 4 ng g⁻¹ d.w., and the limits of quantification from 2 to 13 ng g⁻¹ d.w. Recoveries from 93% to 111%, with relative standard deviations lower than 11% in all cases, were obtained. The method was applied to natural compost samples. High concentrations of some analytes were found. Ketoprofen (510 ng g⁻¹ d.w.), methylparaben (240 ng g⁻¹ d.w.), diclofenac (175 ng g⁻¹ d.w.) and flufenamic acid (128 ng g⁻¹ d.w.) were the most abundant.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Contamination by pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) is an environmental issue great of concern, as stated in the EU Directive 2013/39/EU19 on priority substances in the field of water policy [1]. PPCPs have been detected in water bodies throughout the world, even in Antarctic waters [2]. In Europe, the rate of increase in the consumption and production of PPCPs has grown markedly in the last 20 years. Most PPCPs, up to 90% in the case of pharmaceuticals, enter the environment [3] through human consumption and excretion in the domestic wastewater stream. PPCPs are often filtered ineffectively by wastewater treatment plants (WWTPs) which are not designed to manage them. Another impor-

tant sources are improper disposal of unused medicines (e.g. by flushing them down the sink or toilet) an release of active pharmaceutical ingredients by manufacturers [3]. These compounds enter the aquatic environments through the effluents from WWTPs and hospitals and enter systems through treated sewage sludge (biosolids) intended for agricultural use and reclaimed wastewater irrigation.

For more than one decade, many papers have reported on the harmful health effects of exposure and bioaccumulation of PPCPs on living organisms. Most studies were conducted on freshwater [4–6] and saltwater (marine) [7] organisms. Diclofenac has been detected in brown trout [6] and mussels [7]; antidepressants and antiepileptic, in fish in rivers of the United States [5]; gemfibrozil, in goldfish [4]; and benzophenone uv-filters in fish in Spanish rivers [8,9]. Terrestrial fauna can also be exposed to PPCPs. Some studies show that overuse of diclofenac in livestock and inefficient disposal of dead livestock resulted in the death of vultures that feed on carcasses of

* Corresponding author.

E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

dead animals treated with diclofenac [10]. This drug was approved for veterinary use in Spain in 2013 [11]. Moreover, parabens and their metabolites were detected in black bears and in some birds such as bald eagles and albatrosses [12].

The reason why these substances accumulate in the ecosystem is their biodegradation rate is lower than their emission rate. For this reason, traditional techniques used in WWTPs for PPCPs removal need to be improved. More advanced technologies such as advanced oxidation processes (AOPs), UV-photolysis and ozonation, are already used in some countries [13,14]. But even these new technologies cannot eliminate completely very persistent compounds such as diclofenac, while others such as ketoprofen and naproxen are rapidly degraded [15,16]. More recently, composting of the sewage sludge (biosolids), a by-product of wastewater treatment has been proposed as a good alternative for recycling sludge in many countries [17,18]. PPCPs amounts are greatly diminished after composting, but these compounds can still be detected in the final compost [19,20]. Also, fly larvae composting has been used to remove pharmaceuticals and pesticides with excellent results [21]. Crop uptake of PPCPs from reclaimed wastewater and biosolids and the effect of these compounds on the microbial communities in soil [22] have been reported by several authors. This warrants the need to remove completely PPCPs from compost [23–28].

While there is much literature on the determination of PPCPs in sewage sludge and wastewater, there is little information available on the analysis of composted sewage sludge [29–38]. In addition, the most commonly analyzed group of substances is antibiotics, followed by the rest of pharmaceutical products and, to a lesser extent, preservatives and other additives with demonstrated endocrine activity used in personal care products [39,40]. The published methods involve an endless number of techniques such as ultrasound-assisted extraction (UAE), Soxhlet extraction, pressurized-liquid extraction (PLE), supercritical fluid extraction (SFE), microwave-assisted extraction (MAE) or solid-phase extraction (SPE). One of the newest extraction techniques applied is QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) [41–44], which is based on salting-out-assisted liquid–liquid extraction (SALLE) followed by a cleanup step with SPE sorbent. However, for cleanup QuEChERS has not been as widely applied as SPE, that is a more time-consuming and costly technique [45].

The present work describes a multiclass analytical method for the determination of parabens, benzophenone uv-filters, lipid regulators and non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge compost at trace levels. Since the compounds belongs to different families, the physicochemical properties and, therefore, their behavior are different. However, the objective of the present work was to optimize and validate an analytical method to analyze PPCPs of great use worldwide. For example, PPCPs that not need medical prescription for use or related with common diseases such as obesity. The method involves UAE, followed by a cleanup step based on SALLE, used to reduce matrix effect. UHPLC–MS/MS was used to detect and quantify the selected analytes. The method was applied to samples of sewage sludge compost. This approach can be used for the development of more in-depth research on the occurrence and fate of these PPCPs during the composting process.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Diclofenac sodium salt (DIC), naproxen sodium salt (NAP), methylparaben (MPB), ethylparaben (EPB), propylparaben (PPB), butylparaben (BPB) and benzophenone 6 (BP6) were purchased from Alfa-Aesar (Ward Hill, MA, USA). Flufenamic acid (FLU), ketoprofen (KET), bezafibrate (BEZ), fenofibrate (FEN),

gemfibrozil (GEM), 4-hydroxybenzophenone (4-OH-BP), benzophenone 1 (BP1), benzophenone 3 (BP3), benzophenone 8 (BP8); surrogates 2-((2-chlorobenzoyl)amino) benzoic acid (BEN), 2-(4-chloro-3-methyl-phenoxy)-2-methyl-propionic acid (MET) and ketoprofen-d₃ (KET-d₃) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and ethyl-d₅-paraben (EPB-d₅) from TRC Toronto (Toronto, ON, Canada). Individual standard solutions of compounds (200 µg mL⁻¹) were prepared in methanol, except for deuterated surrogates that were prepared in acetonitrile, and stored at –20 °C. These solutions were prepared fresh every three months. Working standard mixtures were prepared by diluting the individual stock solution in acetonitrile. These solutions were stored at –20 °C and prepared fresh monthly. Anhydrous magnesium sulphate and sodium chloride used for the SALLE cleanup procedures were provided by Panreac (Darmstadt, Germany). BAKERBOND[®] Octadecyl C18 and dispersive sorbents PSA were obtained from Avantar (Center Valley, PA; USA) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), respectively. Technical methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), ethyl acetate (EtAc), acetone and glacial acetic acid used for the preparation of extraction solutions was purchased from VWR (Radnor, Pennsylvania, USA). LC–MS grade water, MeOH, ACN, ammonia (≥25%) and formic acid (≥98%) used for the preparation of standards, mobile phases and pH adjustments were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Instrumentation and software

UAE was performed with a 400W digital sonifier (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA), with a 0.5 inch (12.7 mm) probe operating at a frequency of 20 kHz. UHPLC–MS/MS analyses were performed using a Waters Acquity UPLC[™] H–Class system (Waters, Manchester, UK). Separation of compounds was performed on ACQUITY UPLC[®] BEH C18 column (1.7 µm; 2.1 × 50 mm) (Waters, Manchester, UK). A Xevo[™] TQS tandem quadrupole mass spectrometer (Waters) equipped with StepWave ion guide and an orthogonal Z–spray[™] electrospray ionization (ESI) source was used for mass analyses. Compost samples were freeze-dried using a SCANVAC CoolSafe[™] freeze dryer (Lyngø, Denmark). A digital pH-meter (EUTECH Instruments Ltd, Singapore), a vortex-mixer (IKA, Wilmington, NC, USA), a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttlingen, Germany), a Digicen 21 centrifuge (Orto Alresa, Madrid, Spain), a sample concentrator (Stuart, Staffordshire, UK) and an ultrasound bath (Selecta, Barcelona, Spain) were also used. Statgraphics, Minitab and Excel software were used for statistical treatment of data. MassLynx software 4.1 was used for UHPLC–MS/MS instrument control, peak detection and integration.

2.3. Sample collection and storage

Samples were obtained from different stores and composting plants located in Southern Spain. A total of 14 different samples were collected. In order to ensure the representativeness of bulk samples, a systematic sampling procedure was carried out. A geometric schedule was followed and portions of about 100 g of compost were taken from at least 15 sampling points of the composting pile (final sample weight 1.5 kg approximately). After collection, samples were freeze-dried, sieved through a mesh with ≤1.41 mm pore size and stored in airtight bags in the dark at 4 °C until analysis. In relation to the composition of the obtained material, since it is not a natural product, compost from sewage sludge does not have a defined chemical composition. However, the typical values of a generic compost are defined. Data are included as supplementary material (Table S1).

Table 1
Optimized MRM conditions and product ions.

Compound	Transition for quantification Cone (V)/Collision (eV)	Transition for confirmation Cone (V)/Collision (eV)	Surrogate used	Reference
Non-steroidal anti-inflammatory drug				
Diclofenac (DIC)	294 > 250 [M-H-CO ₂] ⁻ 8/10	294 > 214 8/18	BEN	[37]
Flufenamic acid (FLU)	282 > 264 [M+H-H ₂ O] ⁺ 8/14	282 > 167 [M+H-C ₂ H ₂ O ₂ F ₃] ⁺ 8/42	KET-d ₃	
Ketoprofen (KET)	255 > 209 [M+H-CH ₂ O ₂] ⁺ 44/14	255 > 105 [C ₇ H ₅ O] ⁺ 44/24	KET-d ₃	[46]
Naproxen (NAP)	231 > 185 [M+H-CH ₂ O ₂] ⁺ 6/14	231 > 170 [M+H-C ₂ H ₅ O ₂] ⁺ 6/24	KET-d ₃	[46]
Lipid regulators				
Bezafibrate (BEZ)	362 > 139 [C ₇ OClH ₄] ⁺ 2/28	362 > 316 [M+H-CH ₂ O ₂] ⁺ 2/12	MET	[37]
Fenofibrate (FEN)	361 > 233 [M+H-C ₇ O ₂ H ₁₂] ⁺ 40/14	361 > 139 [C ₇ OClH ₄] ⁺ 40/30	MET	[37]
Gemfibrozil (GEM)	249 > 121 [M-H-C ₇ O ₂ H ₁₂] ⁻ 10/14	249 > 127 [M-H-C ₈ OH ₁₀] ⁻ 10/12	MET	[37]
Parabens				
Methylparaben (MPB)	151 > 92 [C ₆ OH ₄] ⁻ 38/22	151 > 136 [M-H-CH ₃] ⁻ 38/14	EPB-d ₅	
Ethylparaben (EPB)	165 > 92 [C ₆ OH ₄] ⁻ 38/24	165 > 136 [M-H-C ₂ H ₅] ⁻ 38/16	EPB-d ₅	
Propylparaben (PPB)	179 > 92 [C ₆ OH ₄] ⁻ 42/24	179 > 136 [M-H-C ₃ H ₇] ⁻ 42/16	EPB-d ₅	
Butylparaben (BPB)	193 > 92 [C ₆ OH ₄] ⁻ 42/24	193 > 136 [M-H-C ₄ H ₉] ⁻ 42/24	EPB-d ₅	[47]
Benzophenones				
4-Hydroxybenzophenone (4-OH-BP)	199 > 121 [M+H-C ₆ H ₆] ⁺ 36/20	199 > 105 [C ₇ OH ₅] ⁺ 36/18	BEN	[48]
Benzophenone 1 (BP1)	215 > 137 [M+H-C ₆ H ₆] ⁺ 2/18	215 > 105 [C ₇ OH ₅] ⁺ 2/32	BEN	[48]
Benzophenone 3 (BP3)	229 > 151 [C ₈ O ₃ H ₇] ⁺ 4/20	229 > 105 [C ₇ OH ₅] ⁺ 4/18	BEN	[48]
Benzophenone 6 (BP6)	275 > 151 [C ₈ O ₃ H ₇] ⁺ 14/18	275 > 95 14/18	BEN	
Benzophenone 8 (BP8)	245 > 121 [M+H-C ₇ O ₂ H ₈] ⁺ 14/20	245 > 151 [C ₈ O ₃ H ₇] ⁺ 14/20	BEN	
Surrogates				
2-((2-Chlorobenzoyl)amino)benzoic acid (BEN)	276 > 139 2/16	276 > 120 2/8		
2-(4-Chloro-3-methyl-phenoxy)-2-methyl-propionic acid (MET)	227 > 141 2/14	227 > 85 2/8		
Ketoprofen-d ₃ (KET-d ₃)	258 > 212 [M+H-CH ₂ O ₂] ⁺ 12/16	258 > 77 12/40		[46]
Ethyl-d ₅ paraben (EPB-d ₅)	170 > 92 [C ₆ OH ₄] ⁻ 38/24	170 > 136 [M-H-C ₂ D ₅] ⁻ 38/16		

2.4. Preparation of spiked samples

Due to the absence of certified materials, compost samples for development of the analytical method were spiked with a standard solution in acetonitrile containing the analytes under study at different concentrations. The compost amounts used in this step were 0.5, 1.0 and 1.5 g, and the volumes of the solution were 0.5, 1.0 and 1.5 mL, respectively. The ratio mass/volume was constant. In order to reach adsorption equilibrium and to allow complete evaporation of acetonitrile from samples, the mixtures were stirred in a vortex-mixer for 2 min and were left for 18 h to 24 h at room temperature in the dark prior to analysis. For method validation (recovery assays, precision, trueness, robustness and standard uncertainty), blank samples were spiked at different concentrations by adding 0.5 mL of the spiking standard solution containing the analytes and the surrogates to 0.5 g of compost samples. Blank samples were analyzed to ensure the absence of analytes or that these were below

the LODs of the method. A commercial compost from sewage sludge free of the compounds was used as blank.

2.5. Extraction procedure

Compost sample (0.5 g) was placed in a metallic vessel and 5 mL of extraction solvent, a mixture of ACN/EtAc (1:1, v/v) containing 10% acetic acid, was added. The ultrasound probe was submerged to a depth of 35 mm, together with the sample, in a container with a liter of water and extracted for 10 min each cycle (2 cycles) at 70% of amplitude level. Four samples were processed simultaneously. After sonication, the extract was transferred to a 50 mL Falcon conical tube and a SALLE procedure was used for sample cleanup. For that, 7 mL of deionized water were added to the extract, and the mixture was vortexed for 1 min. After this, 0.5 g of NaCl and 2 g of anhydrous MgSO₄ were added and the mixture was hand-shaken for 2 min and centrifuged for 3 min at 3026 × g. To

ensure that the organic extract did not contain water, the organic phase containing the analytes was transferred to a Falcon conical tube containing 0.5 g of anhydrous MgSO_4 . The mixture was hand-shaken for 1 min and centrifuged for 1 min at $3459 \times g$. The supernatant was transferred to a glass vial and, after evaporation to dryness at 45°C under a N_2 stream, the residue was dissolved in 1 mL of a MeOH:water mixture (1:1, v/v), sonicated for 10 min and centrifuged at $16,300 \times g$ for 30 min. The supernatant was introduced into the chromatographic vial for UHPLC–MS/MS analysis.

2.6. Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Chromatographic separation was performed using a binary gradient mobile phase consisting of 13 mM buffer ammonium formate solution (pH 9.25 adjusted with formic acid) (solvent A) and MeOH (solvent B). Flow rate was $350 \mu\text{L min}^{-1}$ and the column was maintained at 40°C . Injection volume was $10 \mu\text{L}$. Gradient program was as follows: initial, 30% B; 0–5.0 min, 30–90% B; 5.0–6.0 min, 90–100% B; 6.0–7.5 min, 100% B (to clean the column); from 7.5 to 7.6 min back to initial conditions; 7.6–10.5 min (to equilibrate the column).

The mass spectrometer (MS) was operated with electrospray ionization (ESI) in positive and negative ion mode. For increased sensitivity and selectivity, mass spectrometric analyses were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode and MS/MS parameters were optimized individually for each compound by continuous infusion into the mass spectrometer of $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of a standard solution prepared in the initial mobile phase. The combined mode was used and $[\text{M} + \text{H}]^+$ or $[\text{M} - \text{H}]^-$ were selected as precursor ions depending on analyte. Instrument operating parameters were as follows: capillary voltage, 0.60 kV for ESI+ and 2.5 kV for ESI-; source temperature, 150°C ; desolvation temperature,

500°C ; cone gas flow, 150L h^{-1} ; desolvation gas flow, 800L h^{-1} ; collision gas flow, 0.15 mL min^{-1} , and nebulizer gas flow, 7.0 bar. Nitrogen ($\geq 99.995\%$) was used as cone and desolvation gas and argon (99.999%) was used as 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 to obtain 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 selected to achieve 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. The optimum collision energies and cone voltages selected for each transition, as well as retention times are shown in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of UAE conditions

3.1.1. Selection of the extraction solvent

A preliminary experiment was carried out where different mixtures of MeOH, ACN, acetone and EtAc (1:1, v/v), were tested using 1 g per sample. The extraction of each sample was performed in duplicate. In this experiment, the cleanup step was not applied. After evaporation of the extracts, the residues were dissolved in 2 mL of a MeOH:water mixture (1:1, v/v), sonicated for 10 min and centrifuged at $16,300 \times g$ for 30 min. The supernatant was introduced into the chromatographic vial for UHPLC–MS/MS analysis. The results obtained are shown in Fig. 1.

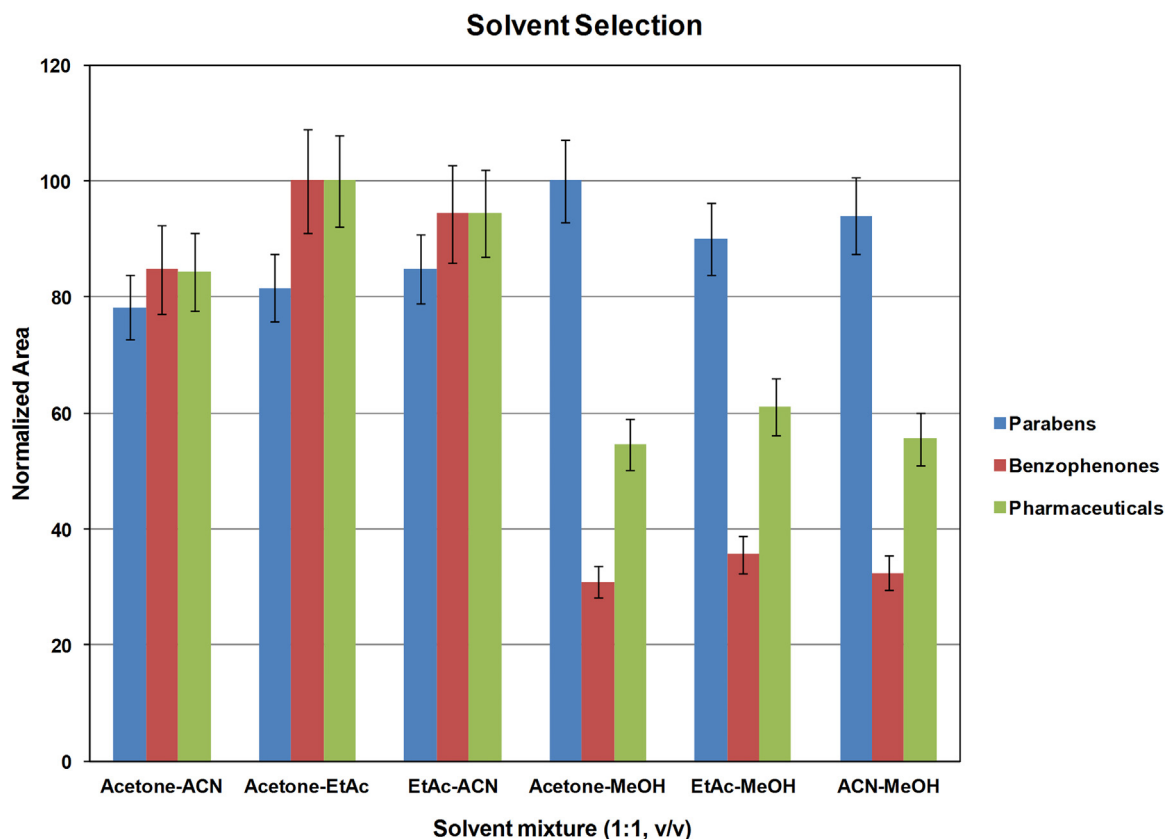


Fig. 1. Solvent selection.

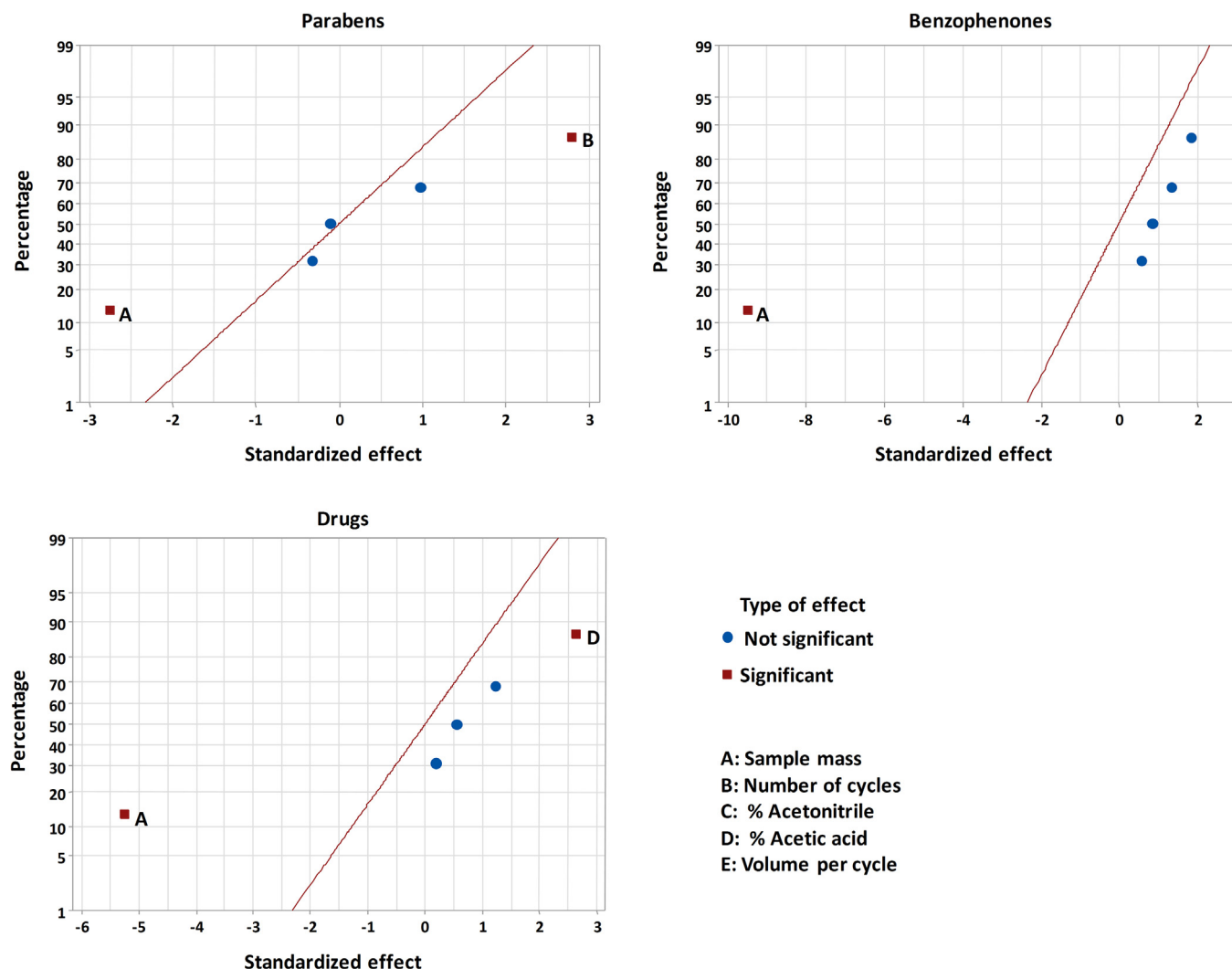


Fig. 2. Normal probability plot for the main effects and statistically significant effects of the variables screened with Student's *t*-test for ANOVA.

As Fig. 1 shows, the mixtures containing MeOH showed low extraction efficiencies for pharmaceuticals and benzophenones and were therefore directly discarded. ACN, acetone and EtAc mixtures showed similar extraction efficiency for all analytes. Since water must be added to the extract for the SALLE procedure, acetone in the extraction solvent has a negative effect on efficiency and a large amount of water was present in the final organic layer. Therefore, the preferred solvent for the experiments was a mixture of ACN and EtAc (1:1, v/v).

3.1.2. Plackett-Burman design for screening

In order to select the most influential variables that affect UAE, a Plackett-Burman design (12 experiments, without central points) was conducted [49]. Solvent composition, sample mass, solvent volume (per cycle), number of cycles and percentage of acetic acid in the extraction solvent were modified at two different levels. Extraction time per cycle was set at 10 min. The studied response was the extraction recovery (%). Acetic acid was included to ensure the acidic (neutral) form of the analytes. Table S2 (supplementary material) shows the screening design.

A normal probability plot was used to determine the significant effects and the 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. Fig. 2 shows the statistically

significant effect of each variable as the sum of analyte recoveries. Analyte were grouped into three classes: parabens, benzophenones and pharmaceuticals.

Correlation coefficient was higher than 80% in all cases. Significant variables were acetic acid concentration, number of cycles and sample mass. Sample mass was set at 0.5 g since a negative effect on the extraction was observed in all compounds. Volume of extraction solvent per cycle was set at 5 mL. Therefore, the variables studied in the subsequent response surface design were acetic acid concentration, number of cycles and the ratio of ACN/EtAc in the extraction solvent.

3.1.3. Optimization of significant parameters. Box-Behnken design

Solvent composition (% of ACN and acetic acid) and number of cycles were optimized using a Box-Behnken experimental design. The matrix design consisted of 15 experiments, including three central points (Table S3, supplementary material). Two levels were considered for each variable: 0% to 10% for acetic acid, 50% to 100% for ACN, and 1–3 for number of cycles. The lower limit of ACN was 50% because the drying process evaporation of extracts with >50% of ethyl acetate was found to be highly difficult due to the viscosity of the extract.

Data were analyzed with an ANOVA which yielded determination coefficients (r^2) between 0.847 and 0.991. Lack-of-fit test was

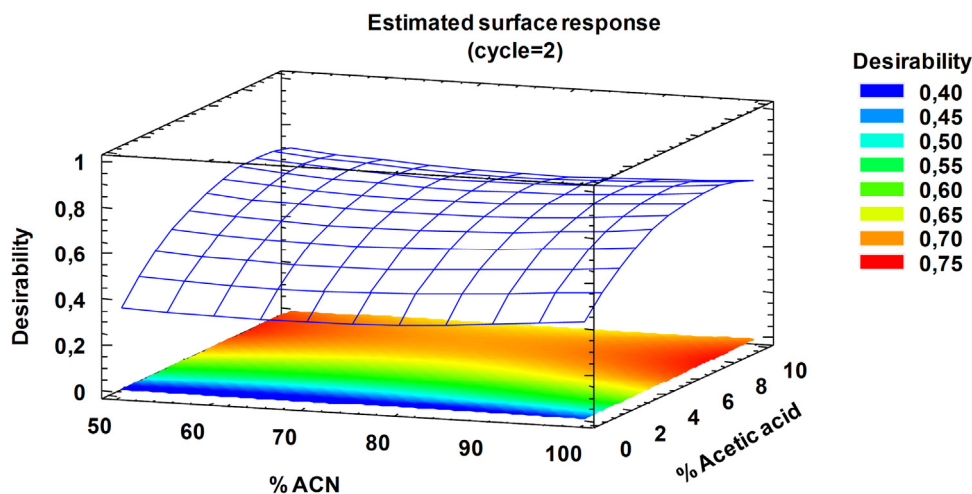


Fig. 3. Optimization of %ACN and acetic acid concentration for UAE. Response surface obtained for the global desirability function (2 cycles).

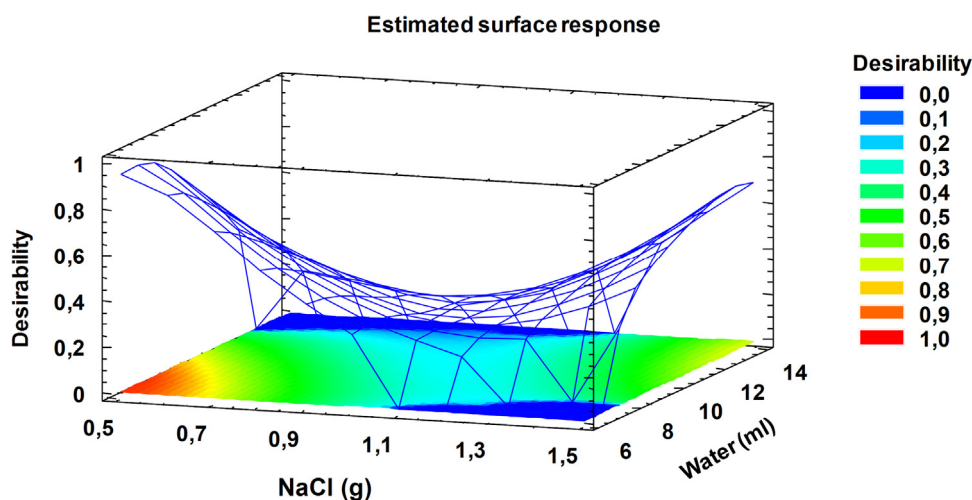


Fig. 4. Optimization of volume of water and weight of salt for SALLE procedure. Global desirability graph for Doehlert experimental design.

>0.05 in all cases. The model appears to be satisfactory with a 95% confidence level.

As for number of cycles, both terms, linear and quadratic, were significant in all compounds. The difference resides in the sign and influence of the terms, positive and more influential, in the linear term, and negative and less influential, in the quadratic term. This suggests that higher extraction efficiencies are achieved from one cycle to two, than from two to three cycles. A similar behavior was observed for the acetic acid concentration, positive in the linear term and negative in the quadratic term. The linear and/or quadratic terms for ACN% were statistically significant for half of the compounds (BEZ, FEN, FLU, MPB, PPB, BPB, BP1, BP8). The most repeated interactions were between number of cycles and acetic acid concentration (5 positive and 5 negative), ACN% and number of cycles (4 positive).

3.1.4. Optimization of multiple responses

As expected, the maximum extraction recoveries were different for each analyte, especially for compounds of different families. Therefore, to optimize the extraction recovery of all analytes simultaneously is necessary to find the best approach. This was done by using the global desirability function (D), which is used to summarize the objectives of a response surface analysis in a single equation. When the analysis involves multiple response variables (16 in our case), each one is assigned an individual desirability value

[d(i)] between 0 (least desirable) and 1 (most desirable). D is the geometric mean of the individual desirability functions. Under the mentioned optimization criteria, the experimental conditions corresponding to the maximum in the obtained desirability function ($D=0.886$) were 100%, 8% and 3% for ACN, acetic acid concentration and number of cycles, respectively. In order to decrease the extraction process duration, D was evaluated for two cycles, which resulted in changes in experimental conditions to 50% ACN and 10% acetic acid ($D=0.720$). Theoretical extraction recovery of each analyte was compared for the two optimal ones (Table S4, supplementary material). Small differences, together with a shorter analysis time, warrant the use of two cycles. The response surface of D for two cycles is shown in Fig. 3. The desirability decreases when acid concentration decreases. Therefore, better extraction efficiencies require an acid medium.

3.2. Optimization of cleanup procedures by SALLE and dispersive sorbents

To reduce matrix effect and increase method sensitivity, a cleaning step based on SALLE was used. The addition of electrolytes to a miscible mixture (although not in all proportions) generates two effects: a decrease in the miscibility of liquids, and transfer of some compounds from aqueous phase to organic phase (salting-

Table 2
Analytical and statistical parameters.

	DIC	FLU	KET	NAP	BEZ	FEN
n	32	32	32	32	32	32
b	5.1·10 ⁻³	2.4·10 ⁻²	2.7·10 ⁻¹	1.0·10 ⁻¹	3.5·10 ⁻¹	5.0·10 ⁻¹
S _b	9.0·10 ⁻⁵	3.6·10 ⁻⁴	1.4·10 ⁻³	8.3·10 ⁻⁴	6.5·10 ⁻³	6.0·10 ⁻³
S _{y/x}	6.3·10 ⁻³	1.9·10 ⁻²	4.2·10 ⁻²	2.7·10 ⁻²	1.5·10 ⁻¹	2.2·10 ⁻¹
R ² (%)	99.2	99.6	99.9	99.8	99.5	99.6
P _{lof} (%)	67.7	26.9	5.3	7.1	89.2	12.1
LOD (ng g ⁻¹)	4	2	0.5	0.8	1	1
LOQ (ng g ⁻¹)	12	8	2	2	4	4
LDR (ng g ⁻¹)	12–640	8–448	2–104	2–160	4–160	4–160
	GEM	MPB	EPB	PPB	BPB	4-OH-BP
n	32	32	32	32	32	32
b	3.9·10 ⁻³	4.0·10 ⁻²	2.1·10 ⁻²	8.1·10 ⁻²	1.5·10 ⁻¹	1.4·10 ⁻¹
S _b	4.4·10 ⁻⁵	6.0·10 ⁻⁴	1.1·10 ⁻⁴	7.1·10 ⁻⁴	1.8·10 ⁻³	1.3·10 ⁻³
S _{y/x}	3.1·10 ⁻³	5.0·10 ⁻²	1.1·10 ⁻²	4.4·10 ⁻²	9.1·10 ⁻²	5.6·10 ⁻²
R ² (%)	99.7	99.3	99.9	99.8	99.6	99.7
P _{lof}	92.2	61.6	17.4	12.4	38.0	10.0
LOD (ng g ⁻¹)	2	4	2	2	2	1
LOQ (ng g ⁻¹)	8	13	5	5	6	4
LDR (ng g ⁻¹)	8–640	13–800	5–800	5–480	6–336	4–200
	BP1	BP3	BP6	BP8		
n	32	32	32	32		
b	7.7·10 ⁻²	2.2·10 ⁻¹	1.8·10 ⁻¹	7.8·10 ⁻²		
S _b	9.9·10 ⁻⁴	3.0·10 ⁻³	1.5·10 ⁻³	7.1·10 ⁻⁴		
S _{y/x}	5.6·10 ⁻²	1.6·10 ⁻¹	6.9·10 ⁻²	3.2·10 ⁻²		
R ² (%)	99.5	99.4	99.8	99.8		
P _{lof}	88.8	13.4	14.2	43.0		
LOD (ng g ⁻¹)	2	2	1	1		
LOQ (ng g ⁻¹)	7	7	4	7		
LDR (ng g ⁻¹)	7–400	7–320	4–320	7–320		

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.

out). Water-soluble matrix compounds extracted during UAE could be separated from analytes.

For cleanup, water was added to the extract obtained from UAE. This mixture was mixed in vortex for 1 min and the salts were added. A two-variable Doehlert design [50] was used to determine the optimum amounts of water and salts for achieving maximum extraction recoveries. The selected salts, as well as the design boundary conditions, were obtained from the original QuEChERS [41], in which NaCl and MgSO₄ are used in 1:4 (w/w) ratio, which was applied in all experiments of the design. Thus, only two variables (water volume and amount of one salt) were necessary for the design. The experiments, including three central points, are shown in Table S5 (supplementary material). Adequate values of lack of fit test (>0.05) and %R² (>75%) were obtained. The desirability was calculated. Fig. 4 shows the result obtained.

Response surface plots for most analytes were saddle-shaped where the two maximums correspond to two opposite ends. This means that D optimal value was very close to 1 (D = 0.950). Experimental conditions corresponding to optimal D were 7 mL of water, 0.5 g of NaCl and, consequently, 2 g of MgSO₄.

Moreover, the addition of two dispersive sorbents (C18 and PSA) was tested by adding 200 mg of PSA and C18 to two identical UAE extracts. The test was performed in duplicate. No significant differences were observed in the matrix effect (peak area solvent standard/peak area matrix – 1) of the compounds of interest between using PSA, C18 or none of them. See supplementary material (Fig. S1).

Finally, the volume and composition of the solvent used prior to UHPLC–MS/MS analysis was also determined. This solution was a mixture of the solvents used in the chromatographic mobile phase [13 mM buffer ammonium formate and MeOH, 1:1 (v/v)]. Three volumes, 1.00, 0.50 and 0.25 mL were tested. The first volume was

selected as volume of dissolution because of the lower signal suppression observed for most compounds (supplementary material, Fig. S2A). Different ratios were also tested. The lower signal suppression and the best peak shape was obtained with the mixture 1:1 (v/v). Thus, the optimal solution was 1:1 (v/v, Buffer:MeOH). Fig. S2B (supplementary material) shows the comparison between 1:1 and 1:4 (v/v) mixtures. The results are expressed as normalized absolute area referred to the 1:1 mixture.

3.3. Analytical performance. Method validation

A major limitation of quantitative analysis with ESI–MS is matrix effect. In order to evaluate this effect, calibration curves obtained in compost samples free of the analytes (matrix-matched calibration) and in the initial mobile phase (standard calibration) were compared using a Student's *t*-test. Curves were plotted using analyte/surrogate peak area ratio versus concentration. First, slope variances were compared using a Snedecor's *F* test and the *t*-test was then applied to slopes. Statistical differences between slope values for the calibration curves of all compounds were found. Therefore, the presence of matrix effect was confirmed in all compounds and the quantification was done using matrix-matched calibration.

Eight levels of concentration were measured. Each calibration level was done in duplicate and analyzed twice. The statistical parameters of the matrix calibration for each compound are shown in Table 2.

The analytical method was validated in terms of linearity, selectivity, sensitivity and accuracy (trueness and precision), according to the US Food and Drugs Administration (FDA) guideline for Bio-analytical Method Validation [51].

Table 3
Validation of the method. Precision, trueness, standard uncertainty and Horwitz ratio.

	Spiked (ng g ⁻¹)	^a R (%)	^b RSD (%)	^c S _R (ng g ⁻¹)	^d u(δ) (ng g ⁻¹)	^e RSD _{rob} (%)	^f u _{rob} (Z) (ng g ⁻¹)	^g u(Z) (ng g ⁻¹)	^h HorRat
DIC	40	98	9.6	4	2		1	5	0.39
	200	99	6.9	15	4	3.0	6	16	0.34
	640	102	7.4	46	14		19	52	0.42
FLU	28	101	11.1	3	1		2	4	0.43
	140	107	8.6	13	6	5.9	8	17	0.41
	448	103	9.5	28	8		26	39	0.32
KET	5.2	104	4.3	0.2	0.07		0.1	0.2	0.12
	26	108	1.1	0.3	0.08	2.1	0.5	0.6	0.04
	83.2	104	1.5	1	0.3		2	2	0.06
NAP	10	103	4.6	0.5	0.2		0.3	0.6	0.15
	50	110	3.5	2	0.5	2.9	1	3	0.14
	160	106	2.3	4	2		5	7	0.12
BEZ	10	102	7.7	0.8	0.3		0.4	0.9	0.25
	50	102	5.2	3	0.7	3.9	2	3	0.21
	160	103	4.6	8	4		6	11	0.24
FEN	10	105	8.2	0.9	0.4		0.6	1	0.27
	50	112	10.3	6	2	5.9	3	7	0.40
	160	110	7.4	13	4		9	16	0.35
GEM	40	97	7.3	3	0.8		3	4	0.29
	200	103	10.1	20	6	6.8	14	25	0.48
	640	105	6.3	42	12		43	61	0.36
MPB	40	98	5.4	2	0.6		3	4	0.21
	200	108	5.4	11	4	6.8	14	18	0.26
	640	107	6.3	43	12		44	63	0.37
EPB	20	99	3.5	1	0.3		0.8	2	0.13
	200	99	3.8	7	2	3.8	8	11	0.18
	640	101	2.7	18	4		24	30	0.16
PPB	20	101	3.5	1	0.4		1	2	0.13
	200	103	5.3	11	4	7.1	14	18	0.27
	480	103	3.5	22	6		34	41	0.20
BPB	14	93	5.7	2	0.4		0.7	2	0.20
	140	101	5.1	7	2	4.9	7	1	0.23
	336	96	6.2	27	7		16	32	0.35
4-OH-BP	10	97	6.0	0.6	0.1		0.4	0.7	0.19
	50	101	11.2	6	2	3.8	2	6	0.45
	160	104	3.4	6	2		6	9	0.16
BP1	20	109	4.3	1	0.3		0.8	1	0.15
	100	108	6.9	7	2	4.0	4	9	0.30
	320	105	5.2	18	6		13	23	0.28
BP3	20	96	5.5	1	0.3		0.9	1	0.19
	100	99	4.9	5	1	4.4	4	7	0.22
	320	104	4.1	13	4		14	20	0.21
BP6	20	108	3.9	0.9	0.4		1	1	0.14
	100	101	4.6	5	2	5.0	5	7	0.21
	320	98	3.6	11	3		16	20	0.19
BP8	20	109	3.5	0.7	0.2		0.7	1	0.12
	100	103	2.7	3	0.7	3.6	4	5	0.12
	320	100	1.8	6	2		12	13	0.10

^a R, recovery (mean of 18 determinations).^b RSD (%), relative standard deviation.^c intermediate precision.^d uncertainty of trueness.^e relative uncertainty of the robustness.^f uncertainty of robustness.^g standard uncertainty.^h Horwitz ratio.

3.3.1. Linearity

Linear correlation coefficient (R^2 , %) and the lack-of-fit test (P_{lof}) were evaluated. R^2 ranged from 99.2% to 99.9% and P_{lof} values were >5% in all cases. This indicates a good linearity within the stated ranges. Data are shown in Table 2.

3.3.2. Sensitivity

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated by two different methods. In the first method, the standard deviation of the residues ($S_{y/x}$), slope (b) of the calibration graphs and an estimate S_0 obtained by extrapolation of the standard deviation of the blank, were used. LOD was $3 S_0$ and LOQ was $10 S_0$ [52]. In the second method, $S_{y/x}$ was necessary, and LOD was $3 (S_{y/x} - a)/b$ and LOQ $10 (S_{y/x} - a)/b$ [53]. Similar limits were obtained

with both methods. The results are shown in Table 2. LOQ varied between 2 and 13 ng g⁻¹ d.w.

3.3.3. Accuracy (precision and trueness)

The precision of the method was evaluated in terms of inter-day variability using blank samples of compost spiked at three different concentration levels for each compound. % RSD was calculated for three spiked compost per day for each level for three different days. The values obtained are summarized in Table 3.

The RSD values ranged from 2.3% to 11%, which is in compliance with the FDA guideline, the maximum value that can be obtained in the method to be considered reproducible (<15%). Due to the absence of certified reference materials, recovery assays were performed to assess trueness. As shown in Table 3, recoveries were close to 100% (93.2%–112%) in all cases. Data indicate that this

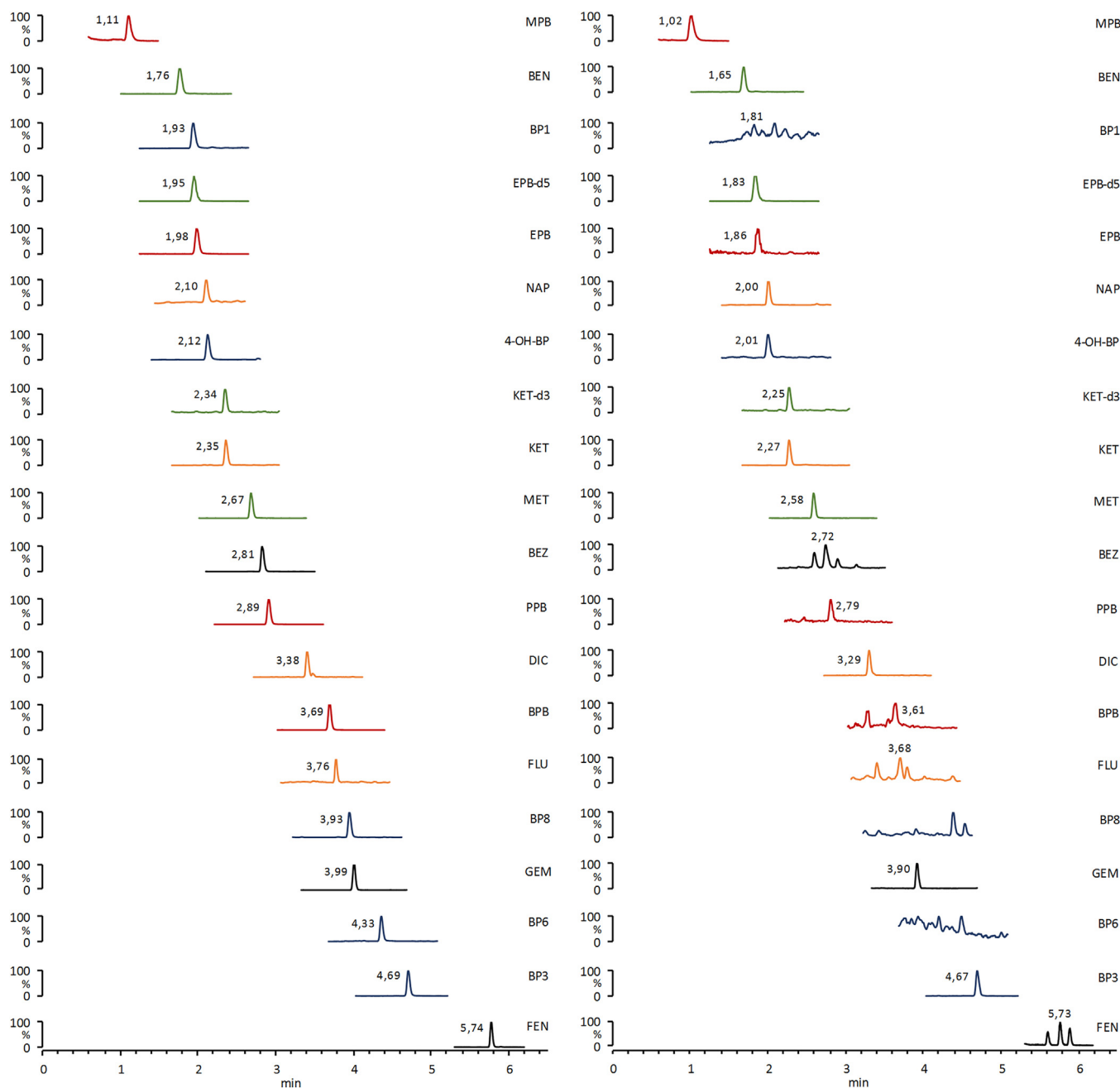


Fig. 5. Chromatograms of: (A) a blank sample spiked with the target analytes (point 5 of the calibration curve) and (B) contaminated natural sample (sample 11).

method is accurate, and that the presence of co-extractives, which typically suppresses analyte signal in MS (range from -57% to -7% , see Fig. S1, without dispersive sorbent, in supplementary material), little affects the method performance.

3.3.4. Standard uncertainty. Study of robustness

To finalize the validation of the method, the standard uncertainty, $u(Z)$, and the Horwitz ratio (HorRat) were determined for each concentration level validated. The uncertainty shows an interval around the estimated value in which the value considered true is found. HorRat is a normalized performance parameter indicating the acceptability of analytical methods with respect to the inter-laboratory precision (reproducibility). This parameter is now widely used as a benchmark for the performance of analytical methods [54].

The basic model for calculating the uncertainty of a measurand Z , is given by three terms [54]. S_R is the intra-laboratory-reproducibility standard deviation (intermediate precision), $u(\delta)$ is the uncertainty associated with the bias or trueness of the procedure, and u_{rob} is the uncertainty coming from a robustness exercise. S_R y $u(\delta)$ were obtained by applying the formulas and the procedure described in references [55] and [54], respectively.

The term u_{rob} , was obtained with design of experiments. A two-level Plackett-Burmann matrix with eight factors and 12 run was carried out. The factors and their values are shown as supplementary material (Table S5). The interval for each factor under investigation is short. Then, by applying the procedure described in reference [54], u_{rob} was calculated for each analyte in the three levels of spiking.

Finally, the standard uncertainty was calculated by applying the above formula. The Horwitz ratio [54] was determined using the

Table 4
Method application to commercial compost samples.

^a Concentration (ng g ⁻¹ d.w.) (SD)							
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
DIC	33 (1)	40 (2)	34.9 (0.7)	43 (4)	ND	44 (2)	175 (7)
FLU	ND	174 (7)	210 (20)	90 (7)	66 (3)	173 (9)	128 (8)
KET	2.2 (0.1)	3.7 (0.3)	8.8 (0.5)	26 (2)	5.1 (0.1)	6.0 (0.2)	510 (40)
NAP	ND	19 (1)	8.1 (0.3)	ND	9.1 (0.3)	ND	19.8 (0.7)
BEZ	NQ	NQ	NQ	5.9 (0.3)	NQ	ND	ND
FEN	NQ	9.0 (0.8)	4.4 (0.1)	NQ	NQ	ND	9.5 (0.8)
GEM	ND	23 (1)	20 (1)	34 (3)	14.6 (0.9)	13.8 (0.9)	23 (1)
MPB	160 (10)	170 (10)	76 (6)	240 (20)	29 (2)	NQ	34 (3)
EPB	NQ	NQ	NQ	NQ	6.5 (0.3)	NQ	NQ
PPB	NQ	NQ	NQ	NQ	5.9 (0.4)	7.0 (0.2)	NQ
BPB	6.2 (0.5)	ND	ND	ND	NQ	6.9 (0.3)	ND
4-OH-BP	NQ	14.5 (0.7)	32 (1)	9.3 (0.4)	46 (1)	8.7 (0.3)	70 (4)
BP1	ND	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	ND
BP3	11.0 (0.5)	14.2 (0.4)	11.9 (0.4)	8.2 (0.3)	17.8 (0.9)	13.3 (0.4)	32 (1)
BP6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BP8	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Concentration (ng g ⁻¹ d.w.) (SD)							
	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14
DIC	79 (5)	109 (4)	68 (6)	510 (10)	50 (2)	72 (3)	47 (3)
FLU	82 (3)	81 (8)	130 (10)	190 (10)	40 (1)	200 (10)	370 (20)
KET	16.6 (0.6)	16.5 (0.7)	16.8 (0.6)	118 (3)	5.8 (0.2)	29.5 (0.7)	6.3 (0.3)
NAP	ND	ND	6.5 (0.5)	250 (9)	7.0 (0.3)	ND	13.4 (0.6)
BEZ	ND	ND	ND	12.6 (0.5)	ND	ND	ND
FEN	4.7 (0.3)	NQ	7.9 (0.6)	4.7 (0.2)	ND	NQ	NQ
GEM	15 (1)	15.0 (0.8)	16.3 (0.9)	83 (3)	ND	20 (1)	55 (2)
MPB	13 (1)	16.7 (0.8)	31 (2)	228 (6)	92 (3)	14 (1)	ND
EPB	ND	ND	ND	NQ	NQ	ND	ND
PPB	ND	ND	NQ	6.1 (0.2)	NQ	ND	NQ
BPB	ND	ND	ND	NQ	NQ	ND	ND
4-OH-BP	36 (3)	25.3 (0.9)	27 (1)	9.0 (0.6)	4.3 (0.3)	30.9 (0.9)	22.5 (0.6)
BP1	ND	ND	7.4 (0.6)	NQ	NQ	ND	NQ
BP3	13.7 (0.3)	12.2 (0.8)	26 (1)	86 (2)	13.4 (0.7)	14.2 (0.3)	9.4 (0.2)
BP6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BP8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Mean of six determination; SD: standard deviation; ND: not detected (<LOD); NQ: not quantified (between LOD and LOQ).

Table 5
Summary of methods published for the determination of the analytes studied in the present work in compost and other biosolids used in agriculture.

Analyte	LOQ (ng g ⁻¹ d.w.)	Extraction method	Detection technique	Type of sample	Amount (ng g ⁻¹ d.w.)	Reference
DIC	5.3	UAE	LC-FLD	Compost	< LOQ	[32]
	2.3	SLE	GC-MS/MS	Biosolid	ND – 390	[56]
FLU	–	–	–	–	–	–
KET	7.7	UAE	LC-FLD	Compost	< LOQ	[32]
	5.6	SLE	GC-MS/MS	Biosolid	No data	[56]
NAP	0.4	UAE	LC-FLD	Compost	< LOQ	[32]
	2.6	SLE	GC-MS/MS	Biosolid	[56]	[56]
	6	UAE + SPE	LC-MS/MS	Biosolid	ND – 150	[57]
BEZ	–	–	–	–	–	–
FEN	4.2	SLE	GC-MS/MS	Biosolid	13–101	[56]
GEM	114	UAE	LC-FLD	Compost	< LOQ	[32]
	4.8	SLE	GC-MS/MS	Biosolid	ND – 67	[56]
	18	PLE + SPE	GC/MS	Compost	ND – 420	[58]
MPB	13	PLE	LC-MS/MS	Compost	No data	[39]
EPB	10	PLE	LC-MS/MS	Compost	No data	[39]
PPB	15	PLE	LC-MS/MS	Compost	No data	[39]
BPB	13	PLE	LC-MS/MS	Compost	No data	[39]
4-OH-BP	–	–	–	–	–	–
BP1	–	–	–	–	–	–
BP3	24.4	PLE + SPE	GC-MS/MS	Biosolid	74	[59]
	24.4	PLE + SPE	GC-MS/MS	Biosolid	16	[60]
BP6	–	–	–	–	–	–
BP8	–	–	–	–	–	–

UAE: ultrasound-assisted extraction; SLE: supported liquid extraction; PLE: pressurized-liquid extraction; SPE: solid-phase extraction; ND: not detected (< LOD).

intermediate precision expressed as relative standard deviation. The interval of HorRat varies between 0.06 and 0.48 in all cases ($\text{HorRat} \leq 1$), and therefore, the method can be accepted. The results are shown in Table 3.

3.3.5. Selectivity

Chromatograms of blank were compared with chromatograms of a blank sample spiked with the compounds of interest (Fig. 5A, second level of spiked, see Table 3). No interferences were observed at the retention time of the analytes when this chromatogram was compared with the one corresponding to the blank (any peaks were detected in the MRM mode in this case). This finding demonstrates the high selectivity of the proposed UHPLC–MS/MS method.

3.4. Method application

The validated method was applied to determine the selected analytes in 14 commercial compost samples from sewage sludge. The results are shown in Table 4.

4-OH-BP, BP3 and MPB appeared in all samples probably due to the presence of compost from urban sewage sludge. For the remaining benzophenones, only BP1 was detected in nine samples and BP8 only in one. EPB, PBP, BPB were detected in between 79% and 36% of the samples. Diclofenac was found in all but one of the samples, and at high concentrations. KET and FLU were also quantified in most samples (FLU was not detected in C1). The finding of high concentrations of DIC, FLU and KET ($>100 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$) in some samples was surprising. It must be highlighted that FLU has not been reported, so far, in compost or sludge. NAP, was found in eight samples. As for lipid regulators, GEM was the most abundant, detected in 12 samples and always above $14 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ Fig. 5B shows a chromatogram of one of the analyzed samples (C11).

Very few methods are available to determine PPCPs in compost from sewage sludge, and an even lower number of method to collect different families of compounds. Table 5 shows the most relevant methods published in the scientific literature, for the determination of the analytes studied in the present work, in compost and other biosolids used in agriculture.

None of the methods found in the literature focuses on the determination of parabens, benzophenones, and drugs simultaneously in this type of samples. Even some analytes have not been studied until now. The limits of quantification reported in the present work are similar to those found in the literature, and in some cases they are improved (for DIC, NAP and GEM). It is remarkable that the concentration levels found are similar to the data found in the present study. Finally, the detection of some analytes (FLU, BEZ, parabens, 4-OH-BP, BP1 or BP8) in compost and biosolids has not been previously reported.

4. Conclusions

In the present work it is successfully validated a multiclass analytical method for the determination of 16 PPCPs, of great use worldwide, in compost from sewage sludge. The target compounds belongs to different families, with different physicochemical properties and behavior. In this method are included, for example, PPCPs that not need medical prescription for use or related with common diseases such as obesity.

Ultrasound assisted extraction with a mixture of acetonitrile:ethyl acetate (1:1, v/v) containing 10% (v/v) of acetic acid is proposed for analyte isolation. The procedure also involves a clean-up step using SALLE prior to the UHPLC–MS/MS analysis of the extracts. The method was proved to be selective, sensitive at $\text{ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ levels, accurate and robust. LODs between $4 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ and $0.5 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ were obtained.

After validation, the method was applied to the determination of the selected PPCPs in different compost from sewage sludge samples. It was revealed the presence of these important pollutants in not negligible quantities in all samples.

Very few methods are available in the literature to determine PPCPs in compost from sewage sludge, and an even lower number of method to collect different families of compounds. The proposed method could be also applied to the study of composting process efficiency, helping to obtain compost free of PPCPs that can be used safely for amendment of agricultural soils. This point is of great interest for the manufactures of this recycled material.

Acknowledgements

The present work was supported by the Ministry of Science and Innovation of Spain (Projects CTQ2011-24210/PPQ).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.051>.

References

- [1] European union: directive 2013/39/EU of the european parliament of the council amending directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, Off. J. Eur. Commun. L226 (2013) 1–17.
- [2] P. Emnet, S. Gaw, G. Northcott, B. Storey, L. Graham, Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base, Environ. Res. 136 (2015) 331–342.
- [3] D.J. Caldwell, Sources of pharmaceutical residues in the environment and their control, in: R.E. Hester, R.M. Harrison (Eds.), *Issues in Environmental Science and Technology. Pharmaceuticals in the Environment*, The Royal Society of Chemistry, UK, 2016, pp. 92–119.
- [4] C. Mimeault, A.J. Woodhouse, X.S. Miao, C.D. Metcalfe, T.W. Moon, V.L. Trudeau, The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish *Carassius auratus*, Aquat. Toxicol. 73 (2005) 44–54.
- [5] A. Ramirez, R. Brain, S. Usenko, M. Mottaleb, J. O'Donnell, L. Stahl, J. Wathen, B. Snyder, J. Pitt, P. Perez-Hurtado, L. Dobbins, B. Brooks, C. Chambliss, Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States, Environ. Toxicol. Chem. 28 (2009) 2587–2597.
- [6] B. Hoeger, B. Köllner, D.R. Dietrich, B. Hitzfeld, Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*), Aquat. Toxicol. 75 (2005) 53–64.
- [7] H. Ericson, G. Thorsén, L. Kumblad, Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels, Aquat. Toxicol. 99 (2010) 223–231.
- [8] P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins, Sci. Total Environ. 518–519 (2015) 518–525.
- [9] A. Careghini, A.F. Mastorgio, S. Saponaro, E. Sezenna, Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, ground water, surface water, sediments, and food: a review, Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (2015) 5711–5741.
- [10] J.L. Oaks, M. Gilbert, M.Z. Virani, R.T. Watson, C.U. Meteyer, B. a Rideout, H.L. Shivaprasad, S. Ahmed, M.J.I. Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A.A. Khan, Diclofenac residues as the cause of culture population decline in Pakistan, Nature 427 (2004) 630–633.
- [11] A. Margalida, G. Bogliani, C.G.R. Bowden, J.A. Donazar, F. Genero, M. Gilbert, W.B. Kares, R. Kock, J. Lubroth, X. Manteca, V. Naidoo, A. Neimanis, J.A. Sánchez-Zapata, M.A. Taggart, J. Vaarten, L. Yon, T. Kuiken, R.E. Green, One Health approach to use of veterinary pharmaceuticals, Science 346 (2014) 1296–1298.
- [12] J. Xue, K. Kannan, Accumulation profiles of parabens and their metabolites in fish black bear, and birds, including bald eagles and albatrosses, Environ. Int. 94 (2016) 546–553.
- [13] Y. Luo, W. Guo, H.H. Ngo, L.D. Nghiem, F.I. Hai, J. Zhang, S. Liang, X.C. Wang, A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment, Sci. Total Environ. 473–474 (2014) 619–641.
- [14] E. Illés, E. Szabó, E. Takács, L. Wojnárovits, A. Dombi, K. Gajda-Schrantz, Ketoprofen removal by O₃ and O₃/UV processes: kinetics, transformation products and ecotoxicity, Sci. Total Environ. 472 (2014) 178–184.

- [15] C.I. Kosma, D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Occurrence and removal of PPCPs in municipal and hospital wastewaters in Greece, *J. Hazard. Mater.* 179 (2010) 804–817.
- [16] X. Chen, J. Vollertsen, J.L. Nielsen, A. Gieraltowska Dall, K. Bester, Degradation of PPCPs in activated sludge from different WWTPs in Denmark, *Ecotoxicology* 24 (2015) 2073–2080.
- [17] K. Hara, T. Mino, Environmental assessment of sewage sludge recycling options and treatment processes in Tokyo, *Waste Manag.* 28 (2008) 2645–2652.
- [18] G. Agegnehu, A.M. Bass, P.N. Nelson, M.I. Bird, Benefits of biochar compost and biochar-compost for soil quality, maize yield and greenhouse gas emissions in a tropical agricultural soil, *Sci. Total Environ.* 543 (2016) 295–306.
- [19] S.R. Smith, Organic contaminants in sewage sludge (biosolids) and their significance for agricultural recycling, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 367 (2009) 4005–4041.
- [20] P. Verlicchi, E. Zambello, Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: occurrence and environmental risk in the case of application on soil – A critical review, *Sci. Total Environ.* 538 (2015) 750–767.
- [21] C. Lalander, J. Senecal, M. Gros Calvo, L. Ahrens, S. Josefsson, K. Wiberg, B. Vinnerås, Fate of pharmaceuticals and pesticides in fly larvae composting, *Sci. Total Environ.* 565 (2016) 279–286.
- [22] A. Barra Caracciolo, E. Topp, P. Grenni, Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106 (2015) 25–36.
- [23] W. Schmidt, C.H. Redshaw, Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 112 (2015) 212–222.
- [24] X. Wu, L.K. Dodgen, J.L. Conkle, J. Gan, Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: a review, *Sci. Total Environ.* 536 (2015) 655–666.
- [25] E.L. Miller, S.L. Nason, K.G. Karthikeyan, J.A. Pedersen, Root uptake of pharmaceuticals and personal care product ingredients, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 525–541.
- [26] M. Edwards, E. Topp, C.D. Metcalfe, H. Li, N. Gottschall, P. Bolton, W. Curnoe, M. Payne, A. Beck, S. Kleywegt, D.R. Lapen, Pharmaceutical and personal care products in tile drainage following surface spreading and injection of dewatered municipal biosolids to an agricultural field, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 4220–4230.
- [27] R.S. Prosser, S. Trapp, P.K. Sibley, Modeling uptake of selected pharmaceuticals and personal care products into food crops from biosolids-amended soils, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 11397–11404.
- [28] X. Wu, F. Ernst, J.L. Conkle, J. Gan, Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables, *Environ. Int.* 60 (2013) 15–22.
- [29] E.N. Evgenidou, I.K. Konstantinou, D.A. Lambropoulou, Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review, *Sci. Total Environ.* 505 (2015) 905–926.
- [30] T.L. Jones-Lepp, R. Stevens, Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1173–1183.
- [31] R.H. Lindberg, M. Östman, U. Olofsson, R. Grabic, J. Fick, Occurrence and behaviour of 105 active pharmaceutical ingredients in sewage waters of a municipal sewer collection system, *Water Res.* 58 (2014) 221–229.
- [32] J. Martín, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1760–1766.
- [33] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, Pressurized liquid extraction: a useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 752–764.
- [34] A.I. Olives, V. Gonzalez-Ruiz, M.A. Martin, Isolation and quantitative methods for analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Antiinflamm. Antiallergy. Agents Med. Chem.* 11 (2012) 65–95.
- [35] O. Zuloaga, P. Navarro, E. Bizkarguenaga, A. Iparraguirre, A. Vallejo, M. Olivares, A. Prieto, Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: a review, *Anal. Chim. Acta.* 736 (2012) 7–29.
- [36] J. Beausse, Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination occurrence and properties of principal substances, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 753–761.
- [37] M. Petrović, M.D. Hernando, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1–14.
- [38] M. Shafir, D. Avisar, Development method for extracting and analyzing antibiotic and hormone residues from treated wastewater sludge and composted biosolids, *Water Air Soil Pollut.* 223 (2012) 2571–2587.
- [39] J.C. Benítez-Villalba, A. Zafra-Gómez, N. Dorival-García, F. Javier Camino-Sánchez, S. Cantarero, J.L. Vilchez, Ultra-performance liquid chromatography MS/MS method for the determination of parabens in compost from sewage sludge: comparison of the efficiency of two extraction techniques, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2635–2645.
- [40] F. Vela-Soria, I. Jiménez-Díaz, R. Rodríguez-Gómez, A. Zafra-Gómez, O. Ballesteros, M.F. Fernández, N. Olea, A. Navalón, A multiclass method for endocrine disrupting chemical residue analysis in human placental tissue samples by UHPLC–MS/MS, *Anal. Methods* 3 (2011) 2073–2081.
- [41] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaheer, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [42] I. Bragança, A. Plácido, P. Paiga, V.F. Domingues, C. Delerue-Matos, QuEChERS: a new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils, *Sci. Total Environ.* 433 (2012) 281–289.
- [43] M.B.R. Cerqueira, J.R. Guilherme, S.S. Caldas, M.L. Martins, R. Zanella, E.G. Primel, Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC–ESI–MS/MS, *Chemosphere* 107 (2014) 74–82.
- [44] D. Rossini, L. Cio, C. Ancillotti, L. Checchini, M.C. Bruzzoniti, L. Rivoira, Innovative combination of QuEChERS extraction with on-line solid-phase extract purification and pre-concentration, followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of non-steroidal anti-inflammatory, *Anal. Chim. Acta* 935 (2016) 269–281.
- [45] N. Dorival-García, C. Labajo-Recio, A. Zafra-Gómez, B. Juárez-Jiménez, J.L. Vilchez, Improved sample treatment for the determination of 17 strong sorbed quinolone antibiotics from compost by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta* 138 (2015) 247–257.
- [46] T. Nemoto, X.-P. Lee, T. Kumazawa, C. Hasegawa, M. Fujishiro, A. Marumo, Y. Shouji, K. Inagaki, K. Sato, High-throughput determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by HILIC–MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 71–80.
- [47] Z. Wang, Q. Wu, Y. Yu, C. Yang, H. Jiang, Q. Wang, B. Yang, H. Kuang, Determination and pharmacokinetic study of four xanthenes in rat plasma after oral administration of *Gentianaella acuta* extract by UHPLC–ESI–MS/MS, *J. Ethnopharmacol.* 174 (2015) 261–269.
- [48] P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Multi-residue method for trace level determination of UV filters in fish based on pressurized liquid extraction and liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1286 (2013) 93–101.
- [49] K.M. Sharif, M.M. Rahman, J. Azmir, A. Mohamed, M.H.A. Jahurul, F. Sahena, I.S.M. Zaidul, Experimental design of supercritical fluid extraction – A review, *J. Food Eng.* 124 (2014) 105–116.
- [50] S.L.C. Ferreira, W.N.L. Dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque-Sendra, Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry – Review, *Talanta* 63 (2004) 1061–1067.
- [51] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001.
- [52] A.M. García Campaña, W.R.G. Baeyens, G. Van Der Weken, L. Cuadros Rodríguez, F. Alés Barrero, A first and straightforward approach to detection limits for narrow-bore HPLC and CE, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 177–178.
- [53] J. Vial, A. Jardy, Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2672–2677.
- [54] A. Gustavo González, M. Ángeles Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 227–238.
- [55] International Organization for Standardization (ISO), ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement method and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method, Geneva, Switzerland, 1994.
- [56] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, R. Aznar, J.L. Tadeo, Determination of selected pharmaceutical compounds in biosolids by supported liquid extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1336 (2014) 52–58.
- [57] P. Guerra, M. Kim, A. Shah, M. Alaei, S.A. Smyth, Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes, *Sci. Total Environ.* 473–474 (473) (2014) 235–
- [58] C.A. Kinney, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, M.R. Burkhardt, S.L. Werner, J.D. Cahill, G.R. Jorgensen, Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7207–7215.
- [59] Y.S. Liu, G.G. Ying, A. Shareef, R.S. Kookana, Simultaneous determination of benzotriazoles and ultraviolet filters in ground water, effluent and biosolid samples using gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5328–5335.
- [60] Y.S. Liu, G.G. Ying, A. Shareef, R.S. Kookana, Occurrence and removal of benzotriazoles and ultraviolet filters in a municipal wastewater treatment plant, *Environ. Pollut.* 165 (2012) 225–232.