

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
CURSO 2017-2018



**ANÁLISIS DE CONTAMINANTES
EMERGENTES DE EFLUENTES DE LA
EDAR DE VALLADOLID**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Presentado por:

NEREIDA PÉREZ LEMUS

Tutor:

ENRIQUE BARRADO ESTEBAN

Julio 2018

Agradecimientos

El Trabajo Fin de Máster “**Análisis de contaminantes emergentes en efluentes de la EDAR**” se ha podido llevar a cabo gracias al proyecto “*Hidrólisis térmica de lodos: Integración eficiente de agua, energía y agricultura*”.

Quiero agradecer a Dr. Enrique Barrado Esteban del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid por su ayuda y orientación en la dirección del trabajo, así como por su libertad para la realización del mismo.

Asimismo, agradezco a la Dra. Sara Isabel Pérez Elvira y, en especial, a la Dra. Rebeca López Serna del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente por su interés y ayuda en la codirección de este trabajo, así como por la atención prestada a lo largo de todo el proyecto.

Una mención especial a la permanente asistencia y buen ambiente de trabajo encontrado durante la duración de dicho proyecto en los Departamentos de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, así como en el Departamento de Química Analítica. Todo ello, junto con el aprendizaje del día a día en cada experiencia me ha permitido una mejora a nivel académico y profesional.

En cuanto a la financiación, debo agradecer el contrato como “investigadora en formación” con cargo al proyecto “*Hidrólisis térmica de lodos: integración eficiente de agua, energía y agricultura*”, Organismo: DICYT (Ref. CTM2015-70722-R), Periodo: 2016/18, IP: Sara Isabel Pérez Elvira, durante todo el periodo de realización de este trabajo.

INDICE

1. Objetivos.....	3
2. Introducción.....	6
2.1. Contaminantes emergentes.....	7
3. Parte Experimental.....	23
3.1. Materiales y reactivos	24
3.2. Métodos analíticos	25
3.3. Optimización de los métodos analíticos.....	40
4. Validación del método y resultados	51
4.1. Inyección directa (LS).....	53
4.2. Fibra SPME (DVB/CAR/PDMS).....	56
4.3. Resultados de la validación del método.....	60
5. Aplicaciones.....	85
5.1. Aplicaciones del método analítico a muestras reales	86
6. Resumen y conclusiones	91
6.1. Resumen	92
6.2. Conclusiones	92
7. Bibliografía.....	94
8. Anexos.....	99
8.1. Anexo I.....	100

1. Objetivos

Este Trabajo Fin de Máster se engloba dentro del proyecto de investigación “*Hidrólisis térmica de lodos: Integración eficiente de agua, energía y agricultura*”, en el que se estudia, como mejor alternativa medioambiental, el empleo de lodos de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales urbanas (EDAR) como posibles abonos en sustitución de los fertilizantes químicos.

La aplicabilidad de los lodos de EDAR como abono radica en una línea de tratamiento que logre la calidad exigida. Para ello, un tema de creciente interés y que se aborda de manera específica en el presente proyecto, es el hecho de que existen numerosos contaminantes orgánicos de uso habitual tanto en los hogares como en lugares públicos, que no han sido considerados en el diseño y operación de los procesos de depuración (tales como productos de limpieza y de desinfección, fármacos, pinturas, hidrocarburos, etc) y que pueden suponer un riesgo especial para el medio ambiente, por lo que deben estar ausentes y por tanto eliminarse adecuadamente.

Un estudio realizado por la EPA (US Environmental Protection Agency) en 2001 puso de manifiesto que algunos nuevos biocidas y desinfectantes presentan una importante capacidad de sorción, observándose elevadas concentraciones en lodos.

Por tanto, el estudio de los denominados contaminantes emergentes se ha convertido en objetivo prioritario para la **Organización Mundial de la Salud** (OMS) y para la Agencia de Protección Medioambiental (EPA). Es necesario desarrollar métodos analíticos que sean muy selectivos y con elevada sensibilidad para conseguir una determinación óptima de estos compuestos.

En consonancia con lo mencionado anteriormente, los objetivos que se plantean en este Trabajo Fin de Máster son los siguientes:

- Identificar y cuantificar los contaminantes emergentes (PPCPs) de interés, que se relacionan en la Tabla 1.1.1, en muestras de lodos, desarrollando diferentes técnicas físicas y químicas para su análisis.

Tabla 1.1.1. Contaminantes emergentes de interés

Clasificación	Contaminantes emergentes (CE)
Productos farmacéuticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ibuprofen (IBP) ▪ Naproxen (NPX) ▪ Diclofenac (DCF) ▪ Carbamazepine (CBZ) ▪ Propranolol (PNL)
Productos de cuidado personal	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Methylparaben (MP) ▪ Ethylparaben (EP) ▪ Propylparaben (PP) ▪ Bisphenol A (BPA) ▪ 4-tert-octylphenol (OP) ▪ 4-nonylphenol (NP) ▪ Triclosan (TCS)

- Optimizar los métodos de análisis. Para la aplicación rutinaria de los métodos de análisis es necesaria la optimización de parámetros experimentales (cantidad de muestra sólida, volumen de disolvente, cantidad de reactivos, tiempos de extracción...). Con este fin se realizarán distintas experiencias para determinar los parámetros experimentales que más influyen y optimizar su valor.
- Desarrollar y validar los procedimientos analíticos para el análisis de los contaminantes emergentes mediante la técnica de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), haciendo hincapié tanto en la preparación de muestra como en el análisis y detección de dichos contaminantes emergentes.
- Evaluar la calidad de las aguas de una planta piloto (Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Medio Ambiente), puesta en marcha previa limpieza y acondicionamiento, mediante la identificación y cuantificación de contaminantes emergentes aplicando la metodología desarrollada.

2. Introducción

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Contaminantes emergentes

El agua es un recurso natural, escaso e indispensable para la vida humana que además permite la sostenibilidad del medio ambiente. Constituye una parte esencial de todo el ecosistema. Una reducción del agua disponible ya sea en cantidad, en calidad o en ambas, provoca efectos negativos graves sobre los ecosistemas.

El medio ambiente tiene una capacidad natural de absorción y de autolimpieza, sin embargo, si se sobrepasa, la biodiversidad se altera, los medios de subsistencia disminuyen, las fuentes naturales de alimentos (como los peces) se deterioran y se generan costes de limpieza extremadamente elevados.

El agua es un recurso limitado que debido al aumento del desarrollo y de la industrialización está siendo cada vez más deteriorado. Se ha ido aumentando la producción de productos químicos y con ello, un aumento de compuestos potencialmente peligrosos para el medio ambiente y para la salud humana (*Bolong et al., 2009*).

En un estudio reciente sobre el agua potable en países desarrollados se observó que un 5,8% de la población estaba expuesta a aguas cuya calidad no estaba conforme con los estándares de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (ONU, Marzo 2009). La creciente demanda de agua y el descubrimiento continuo de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos dejan clara la necesidad de seguir investigando en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana y al medio ambiente.

Las aguas residuales pueden tener diferentes orígenes, siendo las fuentes más comunes, el origen agrícola o ganadero (resultado del riego y de otras labores como la limpieza ganadera), el origen doméstico (provienen de núcleos urbanos), el origen pluvial (se origina por el arrastre de la suciedad que encuentra a su paso el agua de lluvia) o el origen industrial (debido a los procesos industriales).

Durante las últimas décadas, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de los contaminantes químicos cuya presencia en el medio ambiente está regulada en las distintas legislaciones, contaminantes en su mayoría apolares, tóxicos, persistentes y bioacumulables, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los policlorobifenilos (PCBs) o las dioxinas. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de

nuevos y más sensibles métodos de análisis han permitir alertar de la presencia de otros contaminantes, potencialmente peligrosos, denominados “*contaminantes emergentes*”.

Estos contaminantes emergentes (o microcontaminantes) son compuestos de diverso origen y naturaleza química, cuya presencia y consecuencias en el medio ambiente han pasado inadvertidas hasta hace poco tiempo. Se encuentran presentes en las aguas a bajas concentraciones (ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$) y se consideran perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana porque pueden causar diversos efectos en los organismos, como toxicidad crónica, disrupción endocrina y bioacumulación (*Virkutyte et al., 2010*).

La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (*Barceló & López de Alda, 2008*). Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de algunas fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial (*Daughton, 2004; Fent et al., 2006*), residuos de las plantas de tratamiento (*Kolpin et al., 2002*), efluentes hospitalarios (*Kümmerer, 2001*) y actividades agrícolas y ganaderas (*Watanabe et al., 2010*).

Se consideran contaminantes emergentes debido a que no se encuentran aún regulados o están siendo sometidos a un proceso de regulación (*Barceló & López de Alda, 2008*). Dichos compuestos comprenden una amplia gama de compuestos químicos como productos farmacéuticos, productos de cuidado e higiene personal, agentes tensoactivos, plastificantes o aditivos industriales.

Con los avances en las técnicas para detectar y cuantificar productos químicos a niveles de trazas, estos compuestos pueden ser identificados y cuantificados en bajas concentraciones, con el propósito de estudiar los efectos que tienen sobre el medio ambiente y la salud humana.

Los estudios realizados han demostrado que existe una relación entre la exposición a estos contaminantes y variaciones en el metabolismo, problemas en el crecimiento y fertilidad o la feminización en varios tipos de organismos (*Pal et al., 2010; Jackson & Sutton, 2008*). Debido a la importancia de los efectos sobre actividades hormonales, los estudios sobre los efectos en humanos han ido en aumento, encontrando relaciones entre la exposición

durante el embarazo o a edades tempranas y diversos efectos sobre el desarrollo de órganos que pueden crear efectos permanentes (Lyche et al., 2011).

Uno de los principales problemas de este tipo de contaminantes se encuentra en que las actuales plantas de tratamiento de aguas residuales no consiguen eliminarlos debido a que se encuentran diseñadas para eliminar la materia orgánica y nutrientes en mayores concentraciones (g.L^{-1}). Por ello, los contaminantes emergentes se encuentran presentes en aguas superficiales, aguas subterráneas y agua de consumo humano. Además, la degradación primaria de algunos de estos compuestos en las plantas de tratamiento de aguas residuales o en el propio ambiente, genera productos más persistentes y de mayor peligrosidad (Giger et al., 1984).

Para conseguir eliminar estos contaminantes se están estudiando tratamientos físico-químicos, tratamientos biológicos y procesos híbridos para diseñar plantas de tratamiento de agua que permitan erradicarlos. La realización de estudios realizados en diversas plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (EDARs), determinaron un aumento de los vertidos de fármacos y plaguicidas, entre otros compuestos, a nuestras aguas, compuestos que llegan, al no ser eliminados, finalmente a nuestros ríos (Gros et al., 2007; Barceló & López de Alda, 2008). De este modo queda totalmente justificada la necesidad de implementar en las EDARs nuevos procedimientos que permitan la eliminación de estos contaminantes de las aguas de consumo.

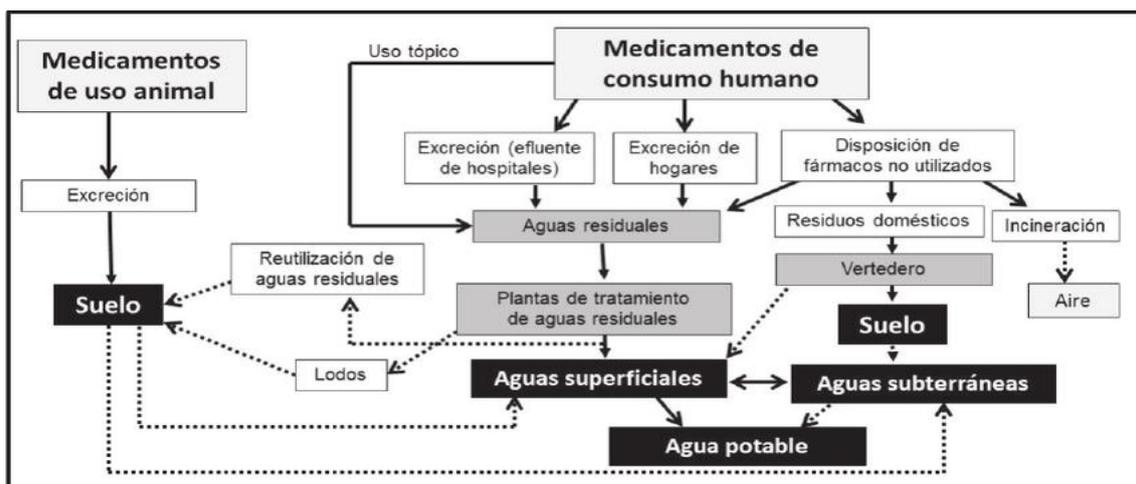


Figura 2.1.1. Ruta de exposición de los PPCPs en las aguas residuales y en el medio acuático

La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticas. Dentro de esa variedad de contaminantes orgánicos encontramos los fármacos y los productos de cuidado personal (PPCPs “pharmaceutical and personal care products”), un amplio grupo de compuestos químicos empleados en el cuidado de la salud humana y animal. Los PPCPs engloban una amplia variedad de sustancias químicas que se diferencian en su estructura, función y propiedades (*Daughthon and Ternes, 1999*). Este grupo incluye a los medicamentos prescritos, productos de limpieza, cosméticos, fragancias y hormonas tanto sintéticas como naturales.

Los fármacos son los contaminantes emergentes que más interés ha suscitado y han sido objeto de estudios más exhaustivos, cogiendo fuerza en la década de los 90. Debido a sus propiedades físico-químicas y a las características de los suelos, estas sustancias pueden alcanzar aguas subterráneas, contaminando los acuíferos o permanecer retenidas en los suelos. El control de los productos farmacéuticos es muy complejo, su origen no radica en las industrias dedicadas a su producción que se encuentran perfectamente reguladas y controladas, sino en el uso por parte de las personas que vierten constantemente fármacos y restos de los mismos, haciendo que sea algo casi imposible de controlar (*Barceló & López de Alda, 2008*).

Los fármacos más prescritos en medicina son los analgésicos/antiinflamatorios, tales como ibuprofeno, diclofenaco, y los antiepilépticos, sin olvidarse que el uso de productos farmacéuticos en veterinaria, agricultura, ganadería y avicultura ha ido aumentando en los últimos años (*Barceló & López de Alda, 2008*).

A continuación, se muestra la clasificación de contaminantes emergentes que queremos identificar en las muestras de fango mixto espesado de la EDAR (estación depuradora de aguas residuales) en Valladolid.

Tabla 2.1.2. Contaminantes emergentes de interés

PPCPs	Contaminantes emergentes (CE)	Clasificación
Productos farmacéuticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ibuprofen (IBP) ▪ Naproxen (NPX) ▪ Diclofenac (DCF) 	Analgésico /Antiinflamatorio
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Carbamazepine (CBZ) 	Neurofármaco
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Propranolol (PNL) 	Antihipertensivo

PPCPs	Contaminantes emergentes (CE)	Clasificación
Productos de cuidado personal	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Methylparaben (MP) ▪ Etylparaben (EP) ▪ Propylparaben (PP) 	Parabeno
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 4-tert-Octylphenol (OP) ▪ 4-Nonylphenol (NP) ▪ Bisphenol A (BPA) ▪ Triclosan (TCS) 	Disruptor endocrino

2.1.1. Legislación

El rápido crecimiento de la población y el incremento de las actividades agrícolas e industriales conllevan como resultado un aumento de la producción y la demanda de agua, así como de la producción de aguas residuales. En consecuencia, los recursos hídricos están cada vez más expuestos a la contaminación por diferentes fuentes, como fugas en las redes de alcantarillado y fosas sépticas, aplicación de fertilizantes en los campos agrícolas, vertido de residuos de forma intencional o involuntaria y efluentes de aguas residuales.

En los últimos años, un gran número de contaminantes se han encontrado en todo el mundo en aguas superficiales y subterráneas. La presencia de estas sustancias aumenta la preocupación cuando se utiliza el agua para la producción de agua potable, y entre estos contaminantes se encuentran los denominados contaminantes emergentes.

Según define la **Directiva 2013/39/UE**, los contaminantes emergentes son aquellos que en la actualidad no están incluidos en los programas de seguimiento sistemático de la Unión Europea, pero que suponen un importante riesgo, lo cual exige su regulación, dependiendo de los efectos ecotoxicológicos y toxicológicos, y de sus niveles en el medio acuático. Aunque las concentraciones en el medio ambiente son bastante bajas, oscilando entre ng/L y µg/L, una exposición continua puede dar lugar a efectos potencialmente nocivos.

En el contexto europeo, la calidad de las aguas superficiales y las aguas subterráneas está regulada por la **Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/UE)**, y posteriores modificaciones, la **Directiva 2008/105/UE** y la **Directiva 2013/39/UE**. Estas directivas exigen el monitoreo de contaminantes orgánicos "prioritarios" en el medio ambiente acuático, tales como ciertos plaguicidas y sus productos de degradación, disolventes clorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, subproductos de desinfectantes, compuestos orgánicos volátiles y biocidas. Sin embargo, debido a la falta de información sobre la toxicidad y los impactos ambientales, un gran número de contaminantes, especialmente los compuestos orgánicos, no están incluidos en la lista de los productos químicos a vigilar, por lo tanto, el número de compuestos que son regulados actualmente por la legislación es probable que aumente.

La **Directiva 2000/60/CE** establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, considera el agua no como un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal. Se hace necesario interrumpir o reducir progresivamente la contaminación por vertido, emisión o pérdida de sustancias peligrosas prioritarias, entendiendo como tal aquellas sustancias o grupos de sustancias tóxicas, persistentes y que pueden causar bioacumulación, así como otras sustancias o grupo de sustancias que entrañan un nivel de riesgo análogo y que a la hora de determinarlas se debe tener en cuenta el principio de cautela, en particular al determinar los efectos potencialmente negativos que se derivan del producto y al realizar la evaluación científica del riesgo.

Destacar que el objetivo final de esta importante directiva en materia de calidad de aguas, es establecer un marco para la protección de las aguas superficiales continentales, las aguas

de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas que prevenga todo deterioro adicional, proteja y mejore el estado de los ecosistemas acuáticos.

2.1.2. Productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs)

Los **fármacos** son productos químicos naturales o sintéticos que se encuentran en medicamentos con prescripción humana o veterinaria. Estos compuestos se caracterizan por tener ingredientes activos con efectos farmacológicos que aportan beneficios significativos.

La presencia de productos químicos farmacéuticos en el medio acuático, como se ha mencionado anteriormente, es reconocida como una preocupación. Las vías principales de productos farmacéuticos en el medio ambiente son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados y por el uso agrícola. Una amplia gama de productos farmacéuticos se ha detectado en aguas superficiales y subterráneas, asociada con la eliminación de las aguas residuales. Estos residuos farmacéuticos son transportados al ciclo del agua por diferentes rutas: las plantas de tratamiento de aguas residuales actúan como una puerta de entrada de estos productos a los cuerpos de agua, porque muchos de estos compuestos no son realmente retenidos en sus procesos y, además, porque muchos residuos farmacéuticos veterinarios son descargados directamente al ecosistema.

Lo que ha despertado una mayor preocupación con respecto a estos fármacos ha sido el hallazgo de algunos de ellos (como ibuprofen, diclofenac, carbamazepine o clofíbric acid) en aguas potables (*Bedner M, Maccrehan WA, 2006*).

Según las propiedades físico-químicas de los fármacos, sus metabolitos, productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica.

Los **productos de cuidado personal** representan una amplia variedad de miles de sustancias químicas que son producidos para uso directo sobre el cuerpo humano por razones de salud o cosméticas. En general, estos productos están dirigidos a alterar el olor, el aspecto, el tacto y no deben mostrar actividad bioquímica significativa. Muchos de estos productos son usados como ingredientes activos o suplementos en cosméticos, productos de baño o fragancias.

En ocasiones, estas sustancias son usadas en cantidades mayores a las recomendadas. Se tratan normalmente de compuestos orgánicos sintéticos.

Los productos de cuidado personal que forman parte de los contaminantes emergentes son: fragancias, agentes de protección solar, repelentes de insectos, productos de higiene o suplementos alimenticios (Marugan, *et al.*, 2008). Se diferencian de los productos farmacéuticos porque en grandes cantidades pueden ser directamente introducidos al ambiente, por ejemplo, estos productos pueden ser liberados dentro de las aguas recreacionales o volatilizados en el aire. Pueden afectar a los organismos acuáticos y a los humanos en ciertas concentraciones.

A pesar del riesgo potencial que presentan los PPCPs, en la actualidad no existe ninguna normativa que regule los límites de vertido de estos compuestos presentes en las aguas residuales cuando son descargados en los ríos o en el mar, a excepción del nonylphenol (NP) y del octylphenol (OP). Sin embargo, en los últimos años se han empezado a tomar medidas para limitar el vertido de algunos de estos compuestos, así, en enero de 2012, la Comisión Europea realizó una propuesta (Comisión Europea, 2012) para modificar la Directiva 2000/60/CEE en lo que respecta a sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas donde se incluyen las concentraciones máximas admisibles en aguas superficiales correspondientes a tres PPCPs (17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol y diclofenac). En algunos países como Canadá se ha prohibido el uso del triclosan en productos de consumo debido a su carácter como disruptor endocrino, mientras que otras asociaciones de elevada relevancia como es el caso de la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense (EPA) han solicitado la prohibición de este compuesto en productos de consumo.

2.1.3. Caracterización de los compuestos seleccionados

Durante el desarrollo de este trabajo se estudiará la identificación y el análisis de 12 contaminantes emergentes presentes en muestras de fango mixto espesado: 5 fármacos, 3 cosméticos y 4 disruptores endocrinos. Los compuestos seleccionados son representativos de cada uno de los grupos y presentan diferentes características físico-químicas.

Algunos de los criterios que se han considerado para su elección fueron: su elevado consumo en las viviendas, su riesgo potencial sobre el medio ambiente o su carácter persistente.

➤ **Fármacos**

A escala mundial, los fármacos más usados son analgésicos/antiinflamatorios, antihipertensivos, neurofármacos y antibióticos (*Paredes Barro, L. (2013)*).

- **Analgésicos/antiinflamatorios:** son fármacos que se utilizan para prevenir o disminuir la inflamación de los tejidos, así como para reducir ciertas dolencias asociadas a los procesos gripales debido a su carácter analgésico. Los antiinflamatorios son compuestos de carácter ácido ya que presentan en su estructura un grupo carboxilo. Se caracterizan por su elevada polaridad y una solubilidad intermedia. Son uno de los fármacos de mayor consumo mundial y son considerados los de mayor automedicación. El diclofenac y el ASA se encontraron presentes en aguas residuales, el naproxen, el ibuprofeno y el acetaminophen (paracetamol) se encontraron en aguas residuales hospitalarias. Lo anterior es un indicador importante de la necesidad de conocer las rutas metabólicas de cada uno de los compuestos, para determinar o descartar el origen de su toxicidad. (**Tabla 2.1.3**)

- **Antihipertensivos.** Son usados frecuentemente ya que la hipertensión arterial es la enfermedad cardiovascular más común en el mundo. Constituyen un grupo muy amplio y dentro de ellos se destacan el calcio-antagonista, los inhibidores de la enzima productora de angiotensina y los β -bloqueadores, entre otros. Algunos β -bloqueadores como el atenolol, el metoprolol y el propranolol han alcanzado niveles superiores a los 0.017 $\mu\text{g/L}$ en efluentes de aguas municipales. (**Tabla 2.1.4**)

- **Antibióticos:** son fármacos de amplio uso en el mundo, su efecto contra microorganismos patógenos en animales y humanos, así como su uso para la preservación de alimentos, han incrementado su producción y consumo, permitiendo grandes descargas sobre los cuerpos de agua con manifestaciones de resistencia microbiana en las zonas de estudio.

Hay evidencia de la presencia de residuos de antibióticos en el ambiente y su implicación en los mecanismos de defensa propios de los organismos vivos. Entre los antibióticos con

mayor reporte en los cuerpos de agua están las tetraciclinas, los aminoglicósidos, los macrólidos, los betalactámicos y la vancomicina, entre otros.

- Neurofármacos: son compuestos farmacéuticos que se utilizan en el tratamiento de enfermedades que afectan al sistema nervioso. En nuestro caso, la carbamazepine es un compuesto neutro y relativamente soluble en agua. Su carácter recalcitrante dificulta que pueda ser eliminado durante el tratamiento biológico de las aguas residuales. (**Tabla 2.1.5**)

De otro lado, fármacos como disruptores endocrinos (asociados a la secreción de hormonas como la hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH), la luteinizante (LH) y la estimulante del folículo (FSH)) no se remueven con facilidad en las plantas de tratamiento de agua residuales, y terminan en aguas superficiales y aguas para el consumo humano, exponiendo de forma crónica la especie humana a sus efectos tóxicos.

Los fármacos presentan una serie de características que deben tenerse en cuenta a la hora de su caracterización y cuantificación:

- Incluyen compuestos formados por moléculas grandes y químicamente complejas pero muy diferentes en peso molecular, estructura y funcionalidad.
- Son moléculas polares y tienen más de un grupo ionizable. El grado de ionización y sus propiedades dependen del pH.
- El principio activo puede ser excretado sin ningún cambio, como un metabolito principal o como una mezcla de muchos metabolitos.
- Dependiendo del compuesto, su persistencia en el medio ambiente es variable pero pueden permanecer durante años, por lo que pueden acumularse alcanzando niveles biológicamente activos.

Tabla 2.1.3. Analgésicos/antiinflamatorios seleccionados

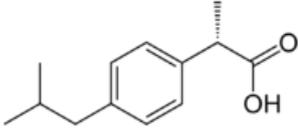
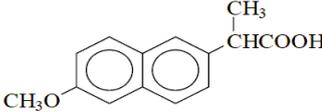
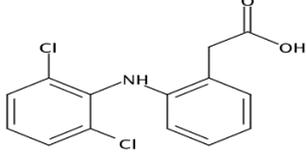
Compuesto	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Estructura
Ibuprofen (IBP)	$C_{13}H_{18}O_2$	206,3	
Naproxen (NPX)	$C_{14}H_{14}O_3$	230,3	
Diclofenac (DCF)	$C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$	318,1	

Tabla 2.1.4. Antihipertensivos seleccionados

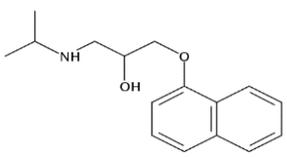
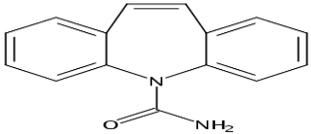
Compuesto	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Estructura
Propranolol (PNL)	$C_{16}H_{21}NO_2$	259,3	

Tabla 2.1.5. Neurofármacos seleccionados

Compuesto	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Estructura
Carbamazepine (CBZ)	$C_{15}H_{12}N_2O$	236,3	

➤ Parabenos

Los parabenos son un tipo de compuestos químicos que se introdujeron por primera vez a mediados de 1920 como conservantes en productos farmacéuticos (*Liebert, 1984*). Actualmente, son conservantes y ampliamente utilizados en cosméticos y productos farmacéuticos aunque también en productos alimenticios e industriales. Estos compuestos y sus sales son usados principalmente por sus propiedades bactericidas y fungicidas. Son considerados conservantes ideales por tener una amplia actividad anti-microbiana y son estables con la variación de pH (*Bledzka et al., 2014; Soni et al., 2005*).

Entre los principales parabenos se encuentran el methylparaben (MP), el ethylparaben (EP) y el propylparaben (PP). Las principales aplicaciones de los parabenos son las siguientes:

- Uso como ingrediente alimentario

Desde la década de 1930 se añaden a la alimentación y su uso ha aumentado constantemente. Se emplean en los alimentos procesados, incluyendo conservas vegetales, productos orneados, grasas y aceites, condimentos, sustitutos de azúcar, extractos de café, zumos de fruta, refrescos y productos lácteos congelados en concentraciones entre 450 y 2000 ppm (*Daniel, 1986*).

- Uso en cosméticos

Se pueden encontrar en champús, geles de baño, jabones, cremas hidratantes, autobronceadores y dentífricos. Estos compuestos se utilizan en casi todos los tipos de cosméticos, usándose en más de 13200 formulaciones. Es un excelente conservante gracias a la estabilidad química con el pH (eficaz entre 4,5-7,5) y la temperatura. Los parabenos se encuentran presentes en el 80% de los productos de cuidado personal (*Pouillot et al., 2006*). (**Tabla 2.1.6**)

- Uso farmacéutico

Se comenzaron a utilizar por primera vez en la década de 1900 y desde ese momento se han empleado con mucha frecuencia en una gran variedad de formulaciones. El propylparaben es uno de los más utilizados en preparaciones farmacéuticas (*Boehm & Maddox, 1973; Soni et al., 2005*). (**Tabla 2.1.7**)

Tabla 2.1.6. Uso en cosméticos seleccionados

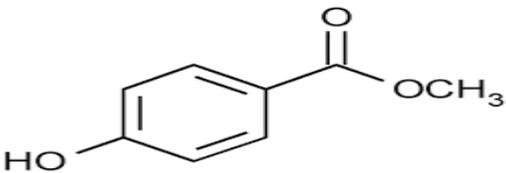
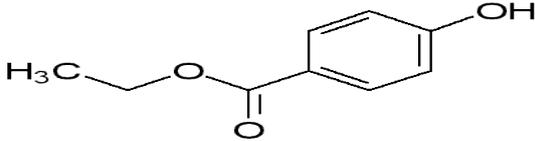
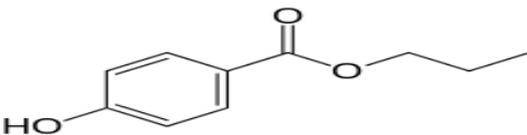
Compuesto	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Estructura
Methylparaben (MP)	$C_8H_8O_3$	152,15	

Tabla 2.1.7. Uso farmacéutico seleccionado

Compuesto	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Estructura
Ethylparaben (EP)	$C_9H_{10}O_3$	166,17	
Propylparaben (PP)	$C_{10}H_{12}O_3$	180,2	

Las propiedades fisicoquímicas de los parabenos se muestran a continuación:

- Son moderadamente solubles en agua, aunque la solubilidad disminuye al aumentar la longitud de la cadena.
- No son muy volátiles y sus puntos de ebullición son relativamente altos.
- En general, con el aumento de la longitud de la cadena del grupo alquilo, la resistencia a la hidrólisis de las soluciones acuosas de parabenos aumenta.
- Las propiedades antibacterianas de los parabenos son directamente a la longitud de la cadena del grupo éster, por ejemplo, el butylparaben tiene cuatro veces mayor capacidad de inhibir el crecimiento microbiano que el ethylparaben.

➤ **Disruptores endocrinos**

Los disruptores endocrinos son sustancias químicas capaces de alterar el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario y, por tanto, poseen la capacidad de provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o de su progenie. La capacidad que tienen algunas sustancias químicas sintéticas de interferir en el sistema hormonal humano se conoce desde los años 40, cuando se empezó a utilizar el fármaco DES para prevenir abortos espontáneos.

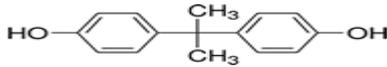
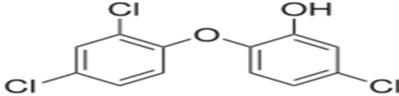
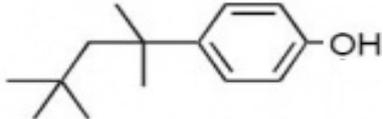
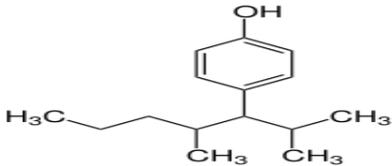
El término disruptor endocrino se define como un conjunto diverso y heterogéneo de compuestos químicos exógenos, capaces de alterar la síntesis, liberación, transporte, metabolismo, enlace, acción o eliminación de las hormonas naturales en el organismo. El catálogo de disruptores endocrinos es muy amplio y crece día a día, comprendiendo desde productos químicos sintetizados por el hombre hasta sustancias que se encuentran de manera natural en el medio ambiente (*Pombo et al., 2002*).

Hay dos clases de sustancias que pueden causar alteraciones endocrinas:

1. Hormonas naturales, como los estrógenos y andrógenos, responsables del desarrollo sexual, que se encuentra naturalmente en el cuerpo de los seres humanos y los animales, y los fitoestrógenos, sustancias presentes en algunas plantas, que muestran actividad similar al estrógeno cuando son ingeridos por el cuerpo. Estas hormonas naturales se cree que se descomponen fácilmente en el cuerpo humano, por lo que no afectan al organismo, pero no así en el caso de las sustancias artificiales.
2. Sustancias artificiales que incluyen:
 - a. Hormonas producidas sintéticamente, incluyendo aquellas hormonas que son idénticas a las hormonas naturales, tales como anticonceptivos orales, el tratamiento de sustitución hormonal y algunos aditivos de alimentos para animales, que han sido diseñado intencionalmente para alterar y regular el sistema endocrino.
 - b. Productos químicos fabricados por el hombre: diseñadas para usos industriales, como en los productos de limpieza industriales, algunos pesticidas agrícolas, y en algunos aditivos plásticos. En este grupo también se incluyen los productos químicos producidos durante los procesos industriales, como es el caso de las

dioxinas. Algunos de estos disruptores endocrinos son persistentes en el medio ambiente al no poder ser degradados fácilmente (contaminantes orgánicos persistentes o COPs), por lo que pueden llegar a acumularse y generar serios problemas.

Tabla 2.1.8. Disruptores endocrinos seleccionados

Compuesto	Fórmula	Peso molecular	Estructura
Bisfenol A (BPA)	$C_{15}H_{16}O_2$	228,3	
Triclosan (TCS)	$C_{12}H_7O_2Cl_3$	289,5	
4-tert-octylphenol (OP)	$C_{14}H_{22}O_2$	206,0	
4- Nonylphenol (NP)	$C_{15}H_{24}O$	220,3	

Cerca de 800 sustancias químicas interfieren o son sospechosas de hacerlo, con los receptores hormonales, la síntesis o la degradación hormonal. Sin embargo, sólo una pequeña parte de estos productos químicos han sido investigados en ensayos capaces de identificar efectos endocrinos. Para los seres humanos, las posibles vías de exposición a los disruptores endocrinos son la directa a través del lugar de trabajo y/o a través de productos de consumo como alimentos, ciertos plásticos, pinturas, detergentes y cosméticos, así como la exposición indirecta a través del medio ambiente (aire, agua, suelo).

En nuestro caso particular se han seleccionado como compuestos representativos de este grupo el bisphenol A (utilizado en la fabricación de plásticos), el triclosan (componente empleado como antibacteriano en las pastas de dientes), el 4-tert-octylphenol y 4-nonylphenol (utilizados en productos de limpieza) ya que son cuatro de los compuestos que están generando mayor controversia en la actualidad debido a sus posibles efectos negativos sobre la salud.

3. Parte experimental

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y reactivos

A continuación, se muestra el material y los reactivos utilizados para la preparación y análisis de muestras.

Tabla 3.1.1. Material de laboratorio

Material
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Frascos para centrífuga de PPCO con tapón de sellado Nalgene 250 mL ▪ Tubos Falcon 50 mL ▪ Gradilla para tubos Falcon sin faldón ▪ Frasco de laboratorio graduado de rosca ISO de borosilicato de 250 mL ▪ Viales de centelleo de 20 mL ▪ Matraces de 10 mL ▪ Vasos de precipitados de 100 y 250 mL ▪ Jeringa de 5 y 1 mL ▪ Pipetas Pasteur ▪ Tetinas de goma para pipetas ▪ Probeta 25 mL ▪ Capilares de vidrio de 50, 100 y 200 μL ▪ Tapones roscados para viales con septum de silicona/PTFE ▪ Viales para cromatografía 2 mL, boca de rosca ▪ Insertos cónicos microvolumen 250 μL ▪ Caja de plástico congelable para viales ▪ Tapones PTFE/Silicona de SPME ▪ Viales ámbar para SPME de 20 mL ▪ Varillas magnéticas para agitación ▪ Filtros de jeringa de microfibra de vidrio de 25 mm de diámetro y 0,7 μm de tamaño de poro ▪ Fibra SPME (DVB/CAR/PDMS) ▪ Espátula

Tabla 3.1.2. Reactivos

Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Methanol UHPLC 2,5 L ▪ Acetone HPLC GGR 2,5 L ▪ Ethyl Acetate LC-MS 1 L ▪ Aluminum oxide (Al₂O₃) 1 kg ▪ Silica Gel (SiO₂) 1 kg ▪ N-methyl-N-tert-Butyldimethylsilyl- trifluoroacetamide (MTBSTFA 10 x 1mL) ▪ Ibuprofen (IBP) 1G ▪ Naproxen (NPX) 500 MG ▪ Diclofenac Sódico (DCF) 10G ▪ Carbamazepine (CBZ) 100MG ▪ Propranolol (PNL) 1G ▪ Methylparaben (MP) 1G ▪ Etylparaben (EP)1G ▪ Propylparaben (PP) 1G ▪ 4- tert-Octylphenol (OP) 1G ▪ 4-Nonylphenol (NP) 100 MG ▪ Bisphenol A (BPA) 1G ▪ Triclosan (TCS) 1G ▪ Sodium Chloride (NaCl) 2,5 kg

3.2. Métodos analíticos

Lo primero que se realiza es la preparación de disoluciones patrón de 1000 ppm de cada uno de los analitos de interés mencionados anteriormente. Para ello, pesamos 5 mg de cada uno de los compuestos y se añaden 5 mL de MeOH. Posteriormente, añadimos 200 µL de cada uno de los analitos de interés de las disoluciones patrón preparadas anteriormente en un matraz de 10 mL y enrasamos con MeOH o con acetona (solución SS de 20 ppm). Cogemos una alícuota de 1 mL de la solución SS y la llevamos a un matraz de 10 mL enrasando con acetona o con acetato de etilo (disolución SS' de 2 ppm).

Tabla 3.2.1. Contaminantes emergentes, masa y volumen

Analito	Masa (g)	Volumen (mL)
Ibuprofen (IBP)	0,0050	5,0
Naproxen (NPX)	0,0050	5,0
Diclofenac (DCF)	0,0050	5,0
Carbamazepine (CBZ)	0,0050	5,0
Propranolol (PNL)	0,0050	5,0
Methylparaben (MP)	0,0050	5,0
Ethylparaben (EP)	0,0053	5,3
Propylparaben (PP)	0,0055	5,5
4-tert-Octylphenol (OP)	0,0053	5,3
4-Nonylphenol (NP)	0,0060	6,0
Bisphenol A (BPA)	0,0087	8,7
Triclosan (TCS)	0,0050	5,0

Antes de realizar el análisis de los contaminantes emergentes de interés en las muestras de fango, se lleva a cabo un análisis de una muestra de **800 ppb** (en un volumen de 250 μ L) preparada previamente de la siguiente manera:

En un vial de 2 mL para cromatografía, se añaden 100 μ L de la disolución SS' en acetato de etilo, 100 μ L de MTBSTFA (agente derivatizante) y 50 μ L de acetato de etilo. Los viales preparados se llevan a una estufa (70°C) una hora para conseguir la derivatización de nuestros analitos. Posteriormente, se recoge el volumen con ayuda de una pipeta Pasteur, se añade en un inserto cónico de microvolumen que posteriormente se introduce en el vial de 2 mL.

Analizamos esta muestra de **800 ppb** para conocer cómo se encuentra la sensibilidad del equipo de cromatografía ya que dicho equipo es utilizado por diferentes usuarios para analizar compuestos de diferente naturaleza. A continuación, se puede observar un cromatograma de la muestra de 800 ppb.

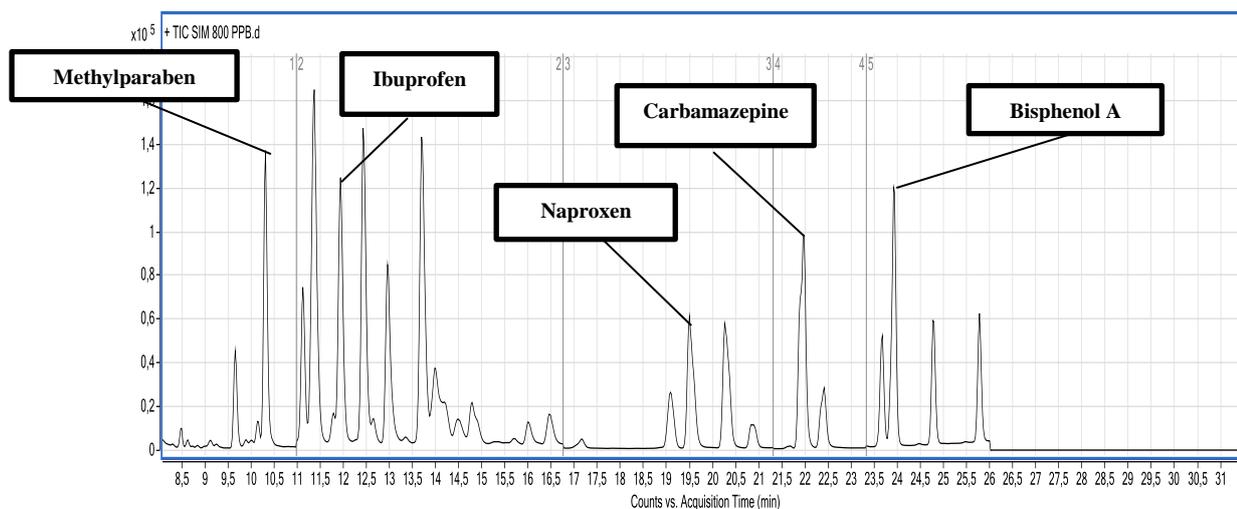


Figura 3.2.2. Cromatograma de muestra 800 ppb

En este cromatograma se pueden observar algunos de los contaminantes emergentes de interés. La muestra preparada de 800 ppb se analiza en el GC-MS mediante inyección directa (LS).

La **Tabla 3.2.2** con las condiciones de GC-MS utilizando inyección directa (LS) se muestra a continuación.

Tabla 3.2.3. Parámetros de GC-MS utilizando LS

▪ GC-LIQ-STD-V2.2

Basic	
Tool	LS 1
Sample Volume	2 µL
Wait for Sistem Ready	At start
Wash Vial Depth	40 mm
Waste Port Depth	10 mm
Bottom Sense	Off
Height From Bottom of Sample Vial	0.5 mm
Cooled Stack	None
Cooled Stack Temperature	20°C
GC Cycle Time	31.6 min

Pre Inyeccion	
Syringe Fill For Wash	80%
Wash Aspirate Flow Rate	5 µL/s
Washes with Solvent 1 (Acetone)	1
Washes with Solvent 2 (Ethyl Acetate)	1

Sample	
Sample Vial Penetration Depth	30 mm
Sample Vial Penetration Speed	50 mm/s
Sample Washes	1
Sample Wash Volume	1 µL
Filling Strokes	4
Filling Strokes Volume	3 µL
Filling Strokes Aspirate Flow Rate	5 µL/s
Delay After Filling Strokes	0.5 s
Sample Post Aspirate Delay	1 µL/s
Air Volume	1 µL
Injection Mode	Normal
Inlet Penetration Depth	45 mm
Inlet Penetration Speed	100 mm/s
Pre Inject Time Delay	0 s
Injection Flow Rate	100 µL/s
Post Inject Time Delay	0 s

Post Inyeccion	
Syringe Fill For Wash	80%
Wash Aspirate Flow Rate	5 µL/s
Washes with Solvent 1 (Acetone)	1

- SSL-Back

Liner: Agilent 5190-2293: 900 µL (Splitless, single taper, ultra inert)

	Setpoint
Heater	250°C
Pressure	17.424 psi
Septum Purge Flow	3 mL/min
Septum Purge Flow Mode	Switched

Mode	Injection Pulse Pressure
Pulsed Splitless	25 psi until 2 min
	Purge Flow to Split Vent
	20 mL/min at 2 min

Oven Temp On
70°C
Equilibration Time
0.25 min
Maximum Oven Temperature
325°C

	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold Time (min)	Run Time (min)
(Initial)		70	3	3
Ramp 1	50	150	0	4.6
Ramp 2	5	220	0	18.6
Ramp 3	10	300	5	31.6

Post Run: 300°C

Post Run Time: 0 min

Single Cuadrupole MS Method Editor	
Tune File	Atune.u
Tune Type	EI
Tune EMV	1894
Solvent Delay	8 min
Adquisition Time	SIM
Start Mass (50.00)	End Mass (850.00)

SIM Time Segments						
Time (min)	Group Name	Number of Ions	Total Dwell Time (ms)	Cycle Time (Hz)	Resolution	Calculated EMV
8.00	1	3	1290	0.7620	Low	2045
10.98	2	18	1278	0.7614	Low	2045
16.76	3	9	1278	0.7656	Low	2045
21.32	4	6	1278	0.7672	Low	2045
23.32	5	3	1290	0.7612	Low	2045

26.00 (Detector off)

Al finalizar el análisis de dicha muestra, se analizan y se estudian los resultados obtenidos. Para ello, comprobamos que se pueden identificar todos los analitos de interés.

Una vez conociendo que las condiciones del equipo son correctas, se analizan las muestras de interés preparadas previamente. Las muestras se analizan a través del método **SPME-CECs-SIM** (fibra SPME (DVB/CAR/PDMS)).

Para la determinación de los contaminantes emergentes en las muestras de fango, primero hay que realizar una etapa de pretratamiento para la preparación de la muestra, en este caso, conlleva varias etapas importantes como pueden ser una etapa de extracción, etapa de filtración, etapa de limpieza, entre otras...

Lo primero que se lleva a cabo es una etapa de **centrifugación** de varias muestras de fango mixto espesado de la EDAR (200 mL aproximadamente de cada una de ellas), las condiciones de trabajo son **10 min x 10000 rpm**. Posteriormente, se recoge el fango centrifugado de cada una de las muestras (sólido) y se realiza una etapa de **liofilización** durante 48-72 horas, nos interesa eliminar todo el contenido de agua de las muestras de fango, el resultado obtenido es fango totalmente seco pero con las características originales.

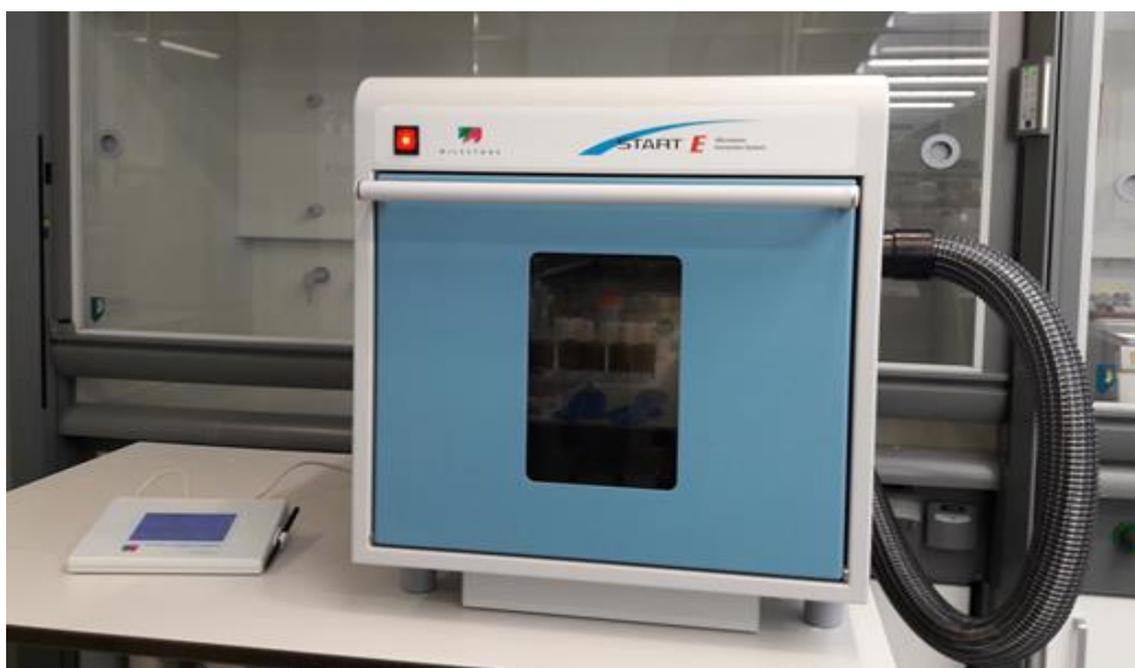
Como la muestra con la que se trabaja es sólida, se comienza pesando 0,8 gramos de la muestra en cuestión y se añade 600 µL de la disolución SS' en acetona de concentración 2 ppm que contiene todos nuestros analitos de interés, se deja evaporar durante la noche y, posteriormente, se lleva a cabo la etapa de **extracción** utilizando la técnica de **extracción asistida por microondas (MAE)** añadiendo 30 mL de agua milliQ a pH 9 (se ajusta el pH con NaOH al 10%) y 5% de MeOH y 100 mg de óxido de aluminio (adsorbente) para una

etapa de limpieza (**clean-up in situ**), seguida de una agitación durante 1 minuto en el vórtex para conseguir una mezcla completa. Todo ello, se realiza en los reactores destinados a utilizarse en el equipo de microondas. Se añade a cada muestra una varilla magnética para que se lleve a cabo la agitación. Las condiciones de trabajo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.2.4. Condiciones de extracción asistida por microondas (MAE)

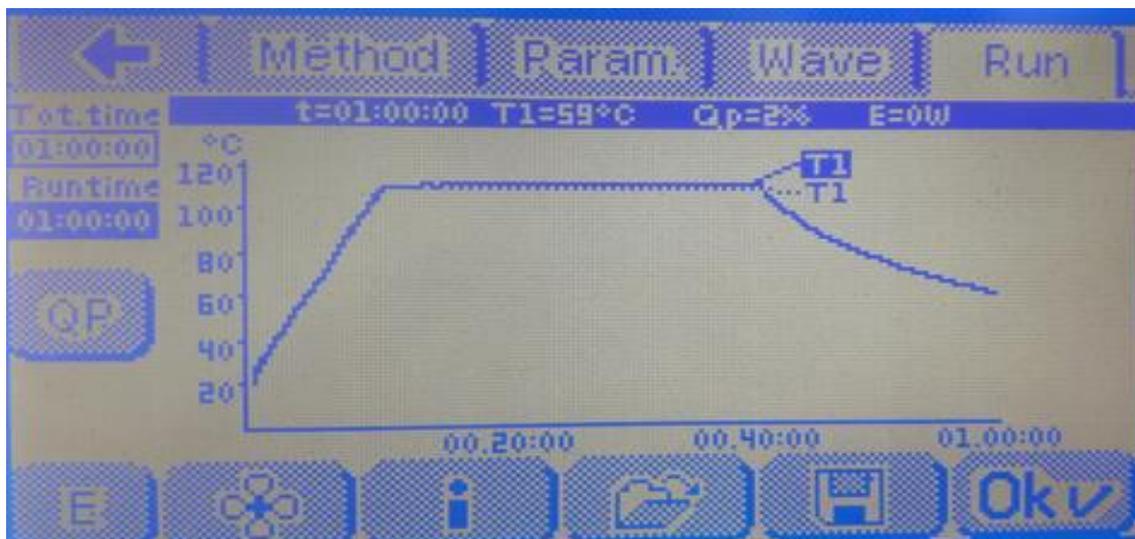
Nº	Tiempo (min)	E (W)	Temperatura (°C)
1	10	500	100
2	30	500	110
3	20		

3.2.5. MILESTONE START E. Microwave Extraction System



Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Valladolid

3.2.6. Representación gráfica de la extracción asistida por microondas (MAE)



A continuación, se deja enfriar durante el tiempo que sea necesario y se pasa el contenido a un tubo Falcon de 50 mL. Se agita de nuevo durante 1 min en el vórtex para que se realice la mezcla de forma completa.

Posteriormente, se realiza la etapa de **centrifugación** a **10000 rpm x 10 min**. Se recoge el sobrenadante y se mide el volumen exacto, se satura el contenido del sobrenadante con **NaCl al 36%** y se ajusta el **pH a 3** con ayuda de diferentes disoluciones de HCl a concentraciones entre 0,1-10%, el pH se mide con ayuda de un pH-metro.

Para finalizar se realiza una etapa de **filtración** con ayuda de filtros de jeringa cuyo tamaño de poro es de 0,7 μm para eliminar la materia sólida en suspensión. Se recogen 17 mL en un vial de **SPME** (viales ámbar 20 mL). Las muestras están preparadas para ser analizadas por GC-MS.

Este procedimiento descrito corresponde a la preparación de una única muestra. Se repite tantas veces como muestras se desean preparar.

- **Análisis de contaminantes emergentes en fase acuosa**

La Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (GC-MS) es la técnica analítica utilizada para determinar la concentración de antiinflamatorios (ibuprofen, naproxen, diclofenac), parabenos (methylparaben, ethylparaben, propylparaben), disruptores endocrinos (bisphenol A, triclosan, 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol)

presentes en las muestras líquidas. Antes de analizar las muestras mediante GC-MS debe aplicarse el procedimiento que se detalla en la Figura 3.2.6.

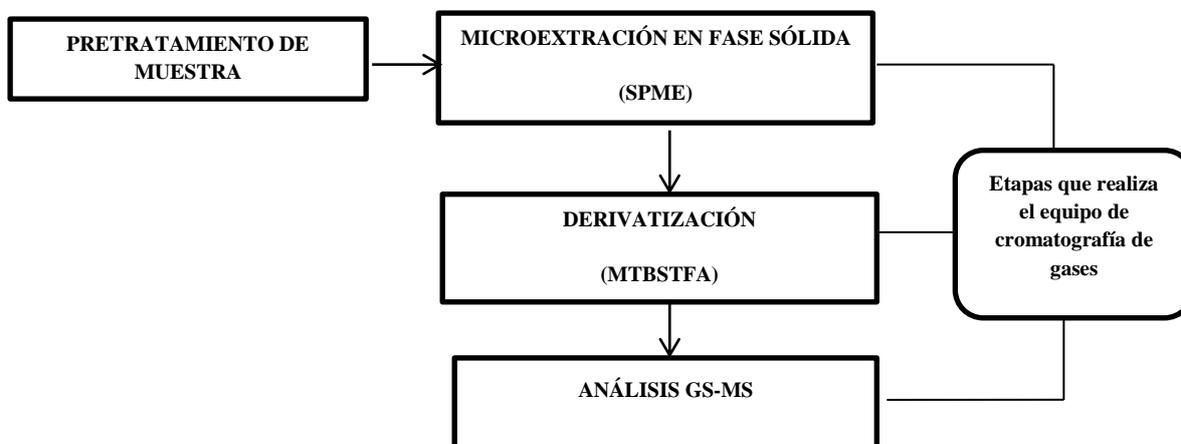


Figura 3.2.7. Procedimiento de análisis de contaminantes emergentes mediante GC-MS.

El procedimiento a seguir se divide en las siguientes etapas:

- **Pretratamiento de la muestra.** Se ha descrito anteriormente comentando detalladamente las etapas que son necesarias.
- **Microextracción en fase sólida (SPME).** Es una técnica que permite extraer compuestos orgánicos de una muestra para su posterior identificación. Se basa en la extracción de los analitos de la muestra mediante una fibra de sílice fundida recubierta de un sorbente, seguida de la desorción de los analitos mediante la temperatura o un disolvente orgánico. Es una técnica que requiere pequeños volúmenes de muestra.
- **Derivatización.** Es un proceso que consiste en modificar químicamente un compuesto para producir un derivado con nuevas propiedades que faciliten o permitan su análisis. Se mejora la volatilidad, estabilidad térmica y la detección del analito. Una de las aplicaciones es la transformación de compuestos no volátiles en derivados volátiles. En nuestro caso, utilizamos como agente derivatizante MTBSTFA.

- **Análisis** de los contaminantes emergentes de interés mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).

El equipo utilizado para llevar a cabo la determinación de los contaminantes emergentes de interés se encuentra en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Escuela Ingenierías Industriales (Doctor Mergelina), Universidad de Valladolid y consiste en:

- Sistema de cromatógrafo de gases 7890B y detector selectivo de masas Agilent Serie 5977A (GC/MSD).
- Detector selectivo de masas: Fuente de impacto electrónico (EI).
- Cromatógrafo de gases. Muestreador automático. Cuadripolo hiperbólico monolítico.
- Detector HED-EM de triple eje con multiplicador de electrones (EM) de larga duración.
- La columna capilar utilizada para llevar a cabo la separación cromatográfica de los compuestos es del tipo HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).
- El gas portador utilizado es helio (He).

3.2.8. Imagen cromatógrafo de gases 7890B



Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Escuela de Ingenierías Industriales. Universidad de Valladolid

Tabla 3.2.9. Parámetros del método SPME-CECs-SIM

- SPME-STD-Custom-Modif.V2.2

Basic	
Tool	SPME 1
Agitator	Agitator 1
Heat Agitator	On
Incubation Time	10 min
Incubation Temperature	50°C
GC Cycle Time	31.6
Conditioning Port	Front Inlet
Fiber Conditioning Station Temperature	270°C

Pre-Desorption	
Conditioning Time	15 min

Derivatizing	
Derivatizing Agent Target	Agitator 1
Derivatizing Agent Location	6
Derivatizing Agent Adsorption Time	45 min
Derivatizing Agent Penetration Depth	45 mm

Sample	
Sample Vial Penetration Depth	60 mm
Sample Vial Penetration Speed	20 mm/s
Sample Extraction Time	90 min
Agitation During Extraction	On
Inlet Penetration Depth	50 mm
Inlet Penetration Speed	100 mm/s
Sample Desorption Time	3 min

Desorption	
Conditioning Time	15 min

Advanced	
Agitator Speed	350 rpm
Agitator On Time	6 s
Agitator Off Time	20 s

- MMI-Front

Liner: Agilent 5190-4048: 35 µL (Straight Ultra Inert Liner for SPME)

	Setpoint
Heater	270°C
Pressure	0.1 psi
Total Flow	20.6 mL/min

	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold Time (min)	Run Time (min)
(Initial)		270	0	31.6

Post Run: 0°C

Post Run Total Flow: 20 mL/min

Mode	Split Ratio	Split Flow
Split	30.586 : 1	19.948 mL/min

- SSL-Back

Liner: Agilent 5190-4048: 35 µL (Straight Ultra Inert Liner for SPME)

	Setpoint
Heater	250°C
Pressure	17.424 psi
Septum Purge Flow	3 mL/min
Septum Purge Flow Mode	Switched

Mode	Injection Pulse Pressure
Pulsed Splitless	25 psi until 3 min
	Purge Flow to Split Vent
	20 mL/min at 3 min

Oven Temp On
70°C
Equilibration Time
0.25 min
Maximum Oven Temperature
325°C

	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold Time (min)	Run Time (min)
(Initial)		70	3	3
Ramp 1	50	150	0	4.6
Ramp 2	5	220	0	18.6
Ramp 3	10	300	5	31.6

Post Run: 300°C

Post Run Time: 0 min

Thermal Aux 2 (MSD Transfer Line)
On
280°C

Single Cuadrupole MS Method Editor	
Tune File	Atune.u
Tune Type	EI
Tune EMV	2041
Solvent Delay	8 min
Adquisition Time	SIM
Start Mass (50.00)	End Mass (850.00)

SIM Time Segments						
Time (min)	Group Name	Number of Ions	Total Dwell Time (ms)	Cycle Time (Hz)	Resolution	Calculated EMV
8.00	1	3	1290	0.7620	Low	2045
10.98	2	15	1278	0.7614	Low	2045
16.76	3	9	1278	0.7656	Low	2045
21.32	4	6	1278	0.7672	Low	2045
23.32	5	3	1290	0.7612	Low	2045

26.00 (Detector off)

La tabla 3.2.10 muestra los contaminantes emergentes objeto de estudio. Los diferentes contaminantes se encuentran distribuidos en diferentes ventanas de adquisición para poder observar mejor cada uno de ellos, cada uno posee un tiempo de retención diferente que permite identificarlo de una manera satisfactoria. Además, se muestran los tres iones más característicos de cada uno de ellos.

Tabla 3.2.10. Analitos de interés. Iones característicos de cada uno de ellos

Analyte	Chemical Name	Acquisition window	t _R (min)	SIM ions, m/z		
1	Methylparaben	1	10,46	209.1	210.1	135.1
2	Ethylparaben	2	11,5	223.1	224.1	151.1
3	Ibuprofen		12,1	263.2	264.2	117.1
4	4-tert-octylphenol		12,64	249	250	320
5	Propylparaben		13,21	237.2	238.2	151.1
7	4- nonylphenol		14,21	263.1	305.1	264.1
8	Propranolol	3	19,31	144.1	215.2	316.2
9	Naproxen		19,78	287.2	185.1	288.2
10	Triclosan		20,51	347	345	200
11	Carbamazepine	4	22,13	193	194	293
12	Diclofenac		22,57	352.1	214.1	354.1
13	Bisphenol A	5	24,08	441	207	442

Un ejemplo de un cromatograma de una muestra obtenida por el método **SPME-CECs-SIM** es el de la muestra 3. En dicho ejemplo, se muestra la identificación de dos contaminantes emergentes como el **propylparaben (PP)** y el **diclofenac (DCF)** con ayuda de sus tres iones más característicos gracias al programa de **Agilent MassHunter Qualitative Analysis**.

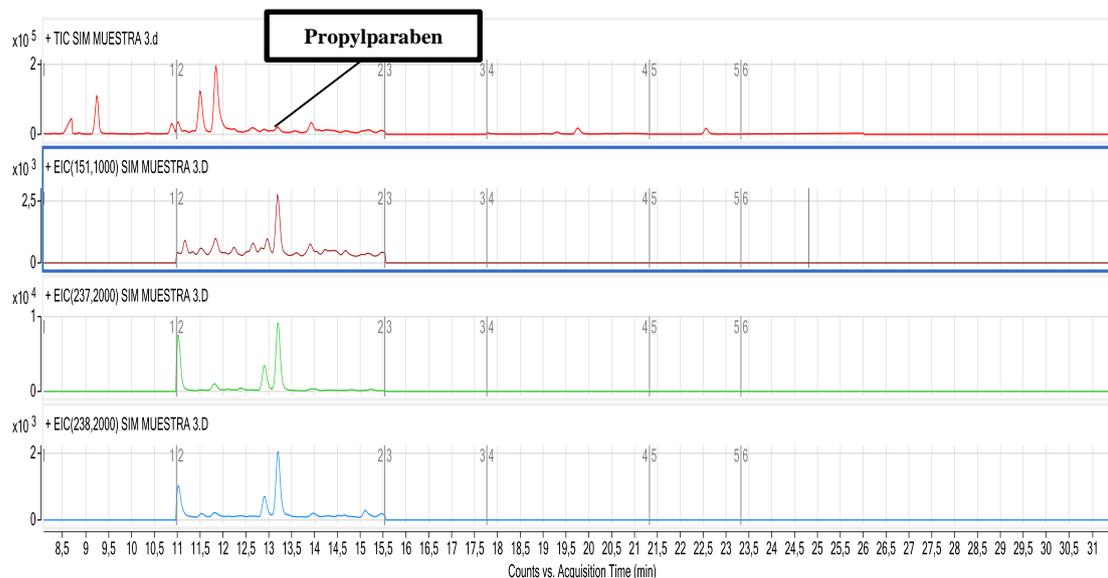


Figura 3.2.11. Cromatograma muestra 3 (PP)

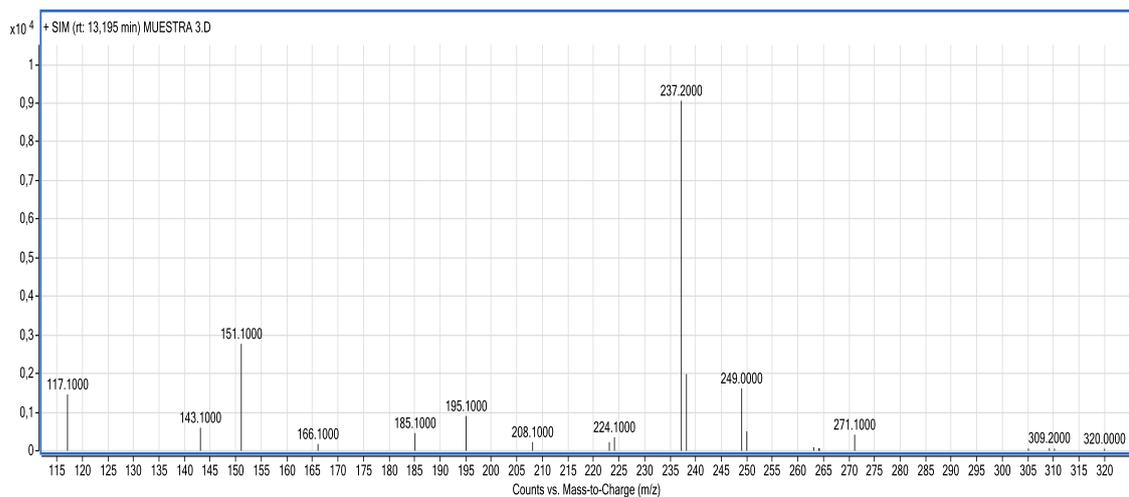


Figura 3.2.11. Espectro de masas del propylparaben (PP)

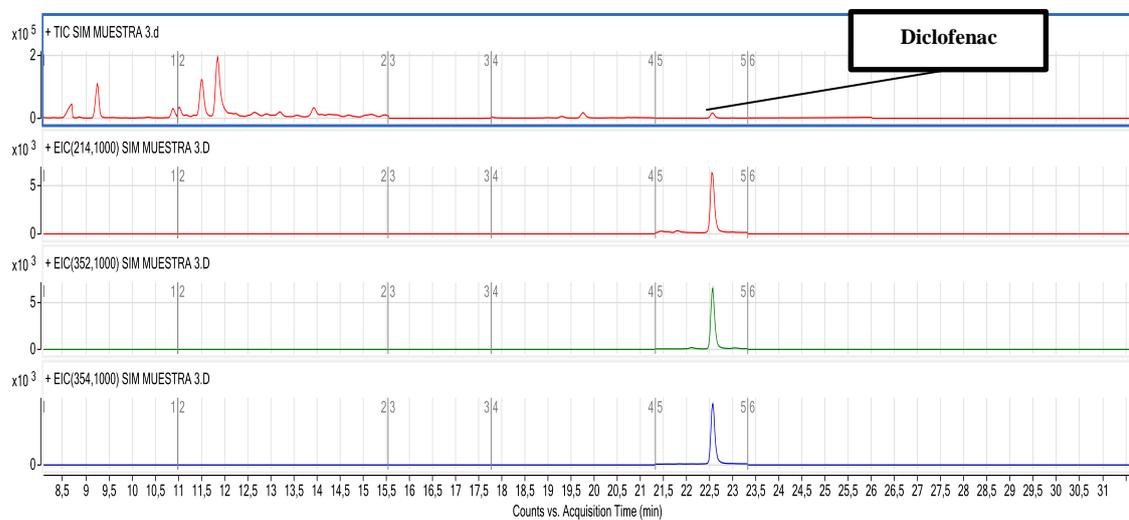


Figura 3.2.12. Cromatograma muestra 3 (DCF)

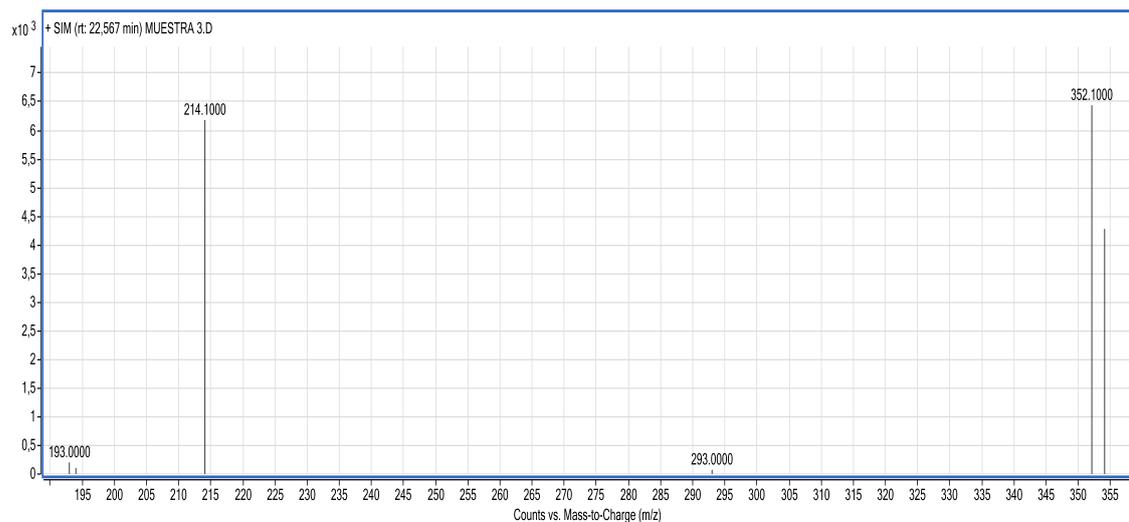


Figura 3.2.13. Espectro de masas del diclofenac (DCF)

3.3. Optimización de los métodos analíticos

Para la aplicación rutinaria del método de análisis es necesaria la optimización de parámetros experimentales (disolvente de extracción, técnica de extracción, adsorbente más adecuado para la etapa de limpieza...), para ello, se programaron diseños experimentales con el fin de conocer los parámetros experimentales que influyen y optimizar su valor.

Se realizaron diferentes secuencias de análisis de un número importante de muestras durante un tiempo prolongado para obtener resultados que nos permitan conocer qué parámetros experimentales influyen en el análisis de los contaminantes.

Cada una de las muestras preparadas para las secuencias estudiadas se exponen en diferentes tablas contenidas en el apartado de **ANEXO I**.

3.3.1. Disolvente de extracción

Se utilizaron dos disolventes diferentes para realizar la extracción. Un disolvente consiste en agua milliQ a pH 9 y un segundo disolvente que consiste en agua milliQ a pH 9 y 5% de MeOH.

Para conocer cuál de los dos es más adecuado para poder identificar mejor los contaminantes emergentes de interés, preparamos, por ejemplo, dos muestras d y e, comparamos los resultados obtenidos, concretamente señal/ruido (S/N) en cada muestra. Una relación S/N alta indica mejores resultados.

A continuación, se describen las condiciones en que se prepararon dichas muestras.

Sample	Freeze-dried sludge mass (g)	SS' stock solution (uL)	Extraction solvent	Extraction solvent volume (mL)	Extraction technique	Cleanup adsorbent / mass (mg)	Filtration method
d	0.8	600	pH 9 water	30	MAE-AQ	SiO ₂ / 500	S
e	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	30	MAE-AQ	SiO ₂ / 500	S

Algunos de los contaminantes emergentes (ibuprofen (IBP), naproxen (NPX) y diclofenac (DCF)) se muestran en los siguientes cromatogramas de las muestras d y e.

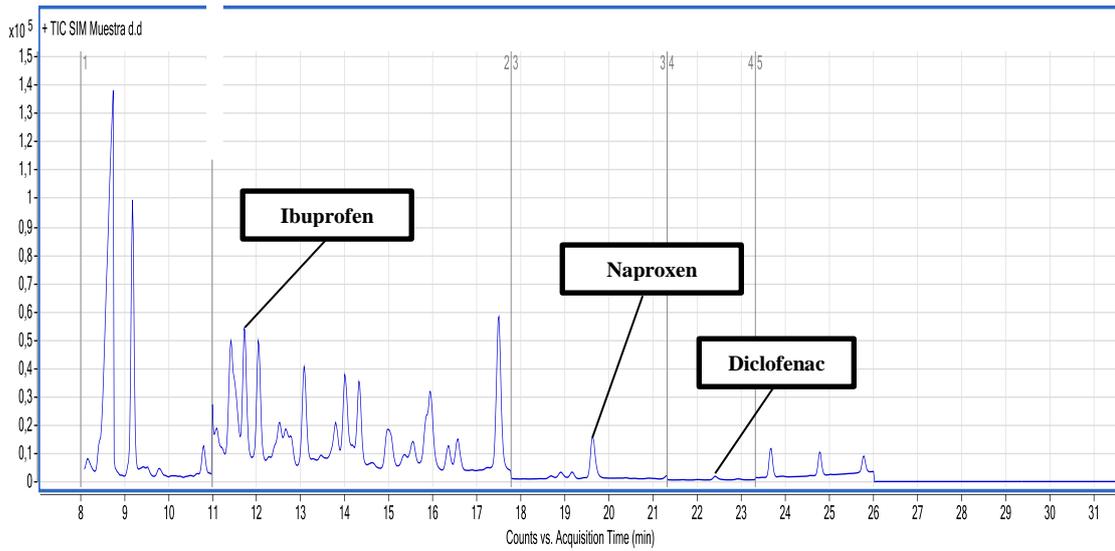


Figura 3.3.1: Cromatograma muestra d

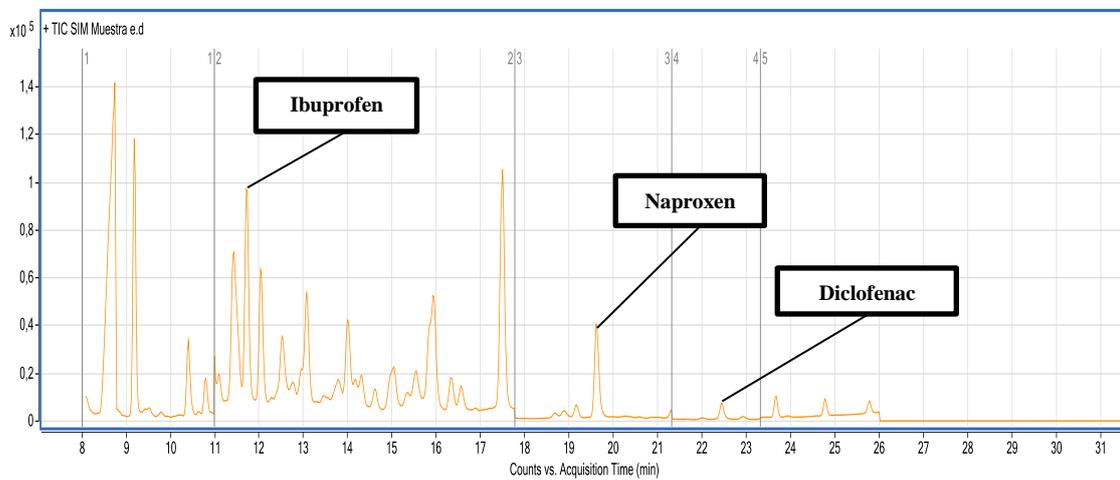


Figura 3.3.2: Cromatograma muestra e

	Muestra d	Muestra e
$\Sigma S/N$ (señal/ruido)	704.6	1115.7

El disolvente de extracción agua milliQ pH 9 y 5% de MeOH ha conseguido un S/N más alto, por lo tanto, el resultado es mejor.

3.3.2. Técnica de extracción

Se estudiaron dos técnicas de extracción: técnica de extracción asistida por microondas (MAE) y técnica de extracción asistida por ultrasonidos (UAE).

Las muestras preparadas para ello son la muestra X y la muestra X'.

Sample	Freeze-dried sludge mass (g)	SS' stock solution (uL)	Extraction solvent	Extraction solvent volume (mL)	Extraction technique	Cleanup adsorbent / mass (mg)	Filtration method
X	-	600	pH 9 water	30	MAE	-	V
X'	-	600	pH 9 water	30	UAE	-	V

Los contaminantes que observamos son el propylparaben (PP), diclofenac (DCF) y naproxen (NPX).

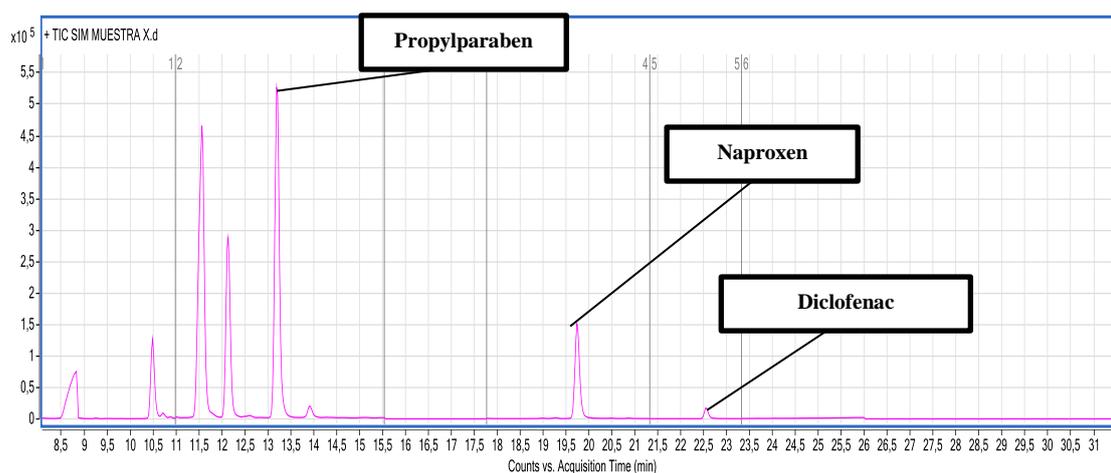


Figura 3.3.3: Cromatograma muestra X

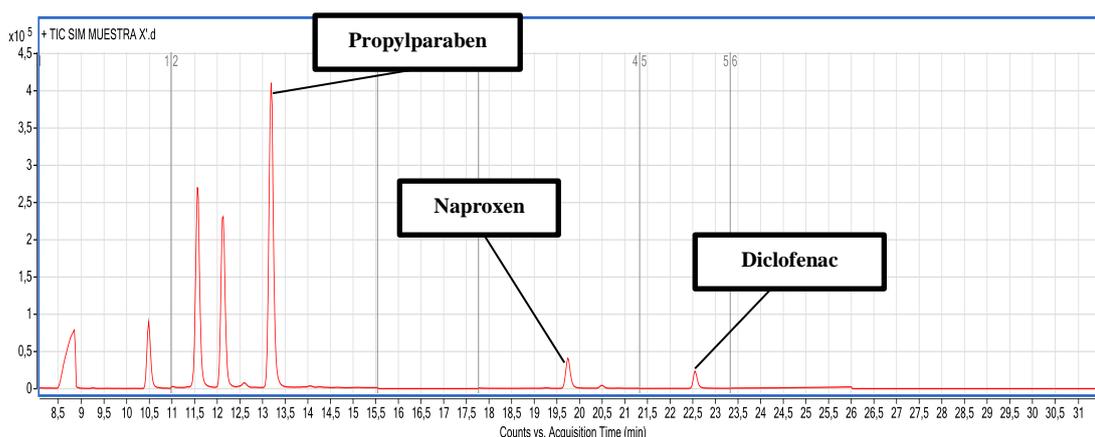


Figura 3.3.4: Cromatograma muestra X'

	Muestra X	Muestra X'
$\Sigma S/N$ (señal/ruido)	67887	35899

La técnica de extracción MAE (extracción asistida por microondas) consigue una mejor relación S/N.

3.3.3. Adsorbente utilizado en la etapa de limpieza (clean-up)

Se estudiaron dos adsorbentes diferentes para la etapa de limpieza: Alúmina básica activa (100°C) o silica gel activo (100°C).

Para ello, preparamos 2 muestras diferentes d y f de la siguiente manera:

Sample	Freeze-dried sludge mass (g)	SS' stock solution (uL)	Extraction solvent	Extraction solvent volume (mL)	Extraction technique	Cleanup adsorbent / mass (mg)	Filtration method
d	0.8	600	pH 9 water	30	MAE-AQ	SiO ₂ / 500	V
f	0.8	600	pH 9 water	30	MAE-AQ	Al ₂ O ₃ / 500	V

Los contaminantes emergentes que se observan son el methylparaben (MP), ethylparaben (EP) y bisphenol A (BPA).

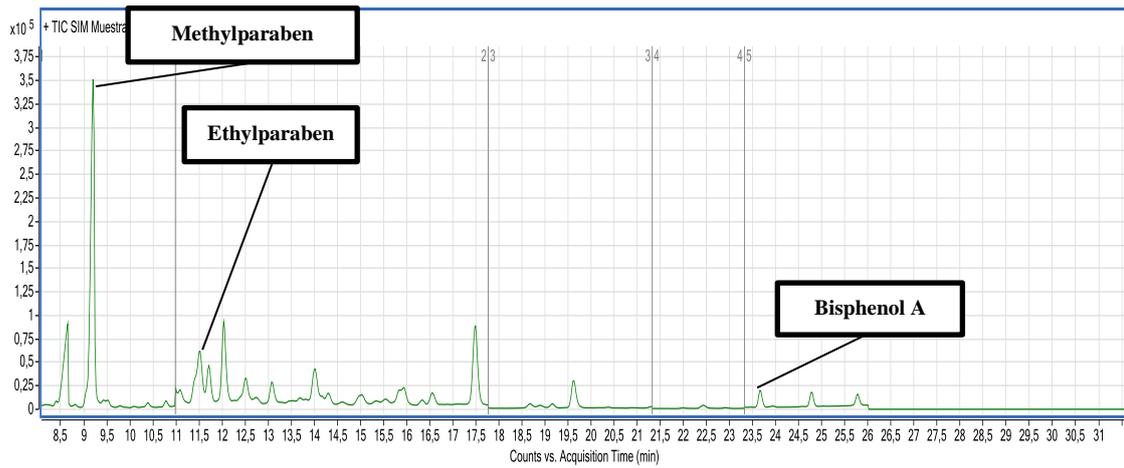


Figura 3.3.5. Cromatograma muestra d

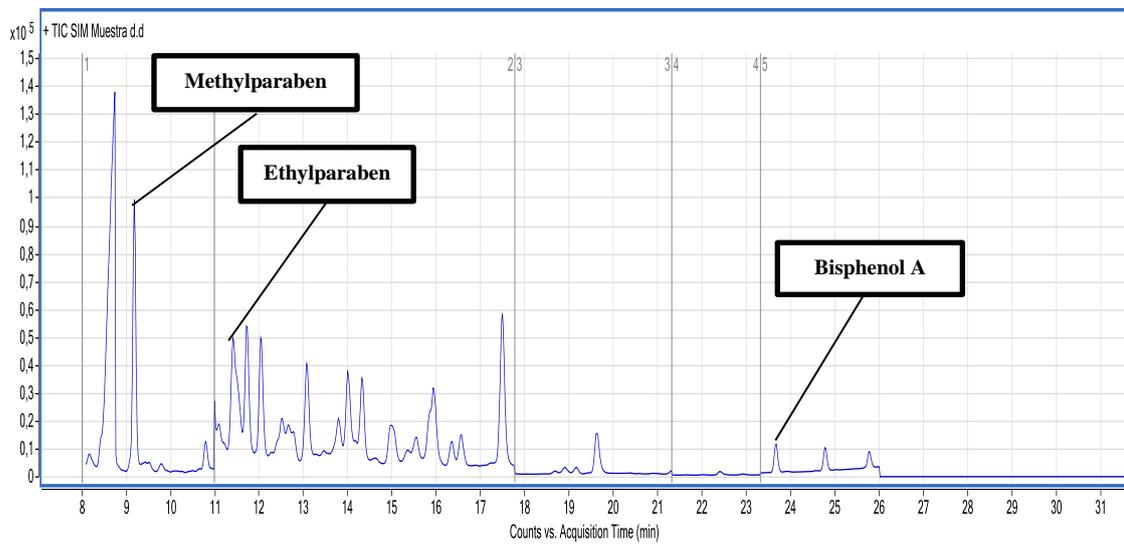


Figura 3.3.6. Cromatograma muestra f

	Muestra d	Muestra f
$\Sigma S/N$ (señal/ruido)	704.6	1365.4

La **alúmina** utilizada como adsorbente en la etapa de limpieza consigue mejores resultados porque el valor de S/N es más alto.

3.3.4. Cantidad de adsorbente utilizada en la etapa de limpieza

Se prepararon tres muestras con diferente cantidad de alúmina como adsorbente (100/500/1000) miligramos. Las muestras son I, II y III. El análisis de esta serie de muestras se realizó en el LTI (laboratorio de técnicas instrumentales) de la Universidad de Valladolid porque el cromatógrafo de gases con detector de masas (GC-MS) del Departamento de Ingeniería Química no funcionaba de forma correcta. Como se puede observar en los cromatogramas, hay una ligera modificación de los tiempos de retención de los analitos de interés.

Sample	Freeze-dried sludge mass (g)	SS* stock solution (uL)	Extraction solvent	Extraction solvent volume (mL)	Extraction technique	Cleanup adsorbent / mass (mg)	Filtration method
I	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	30	MAE	Al ₂ O ₃ / 100	S
II	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	30	MAE	Al ₂ O ₃ /500	S
III	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	30	MAE	Al ₂ O ₃ / 1000	S

Los contaminantes emergentes que se pueden observar en los siguientes cromatogramas son el methylparaben (MP), 4-tert-octylphenol (OP) y el triclosan (TCS).

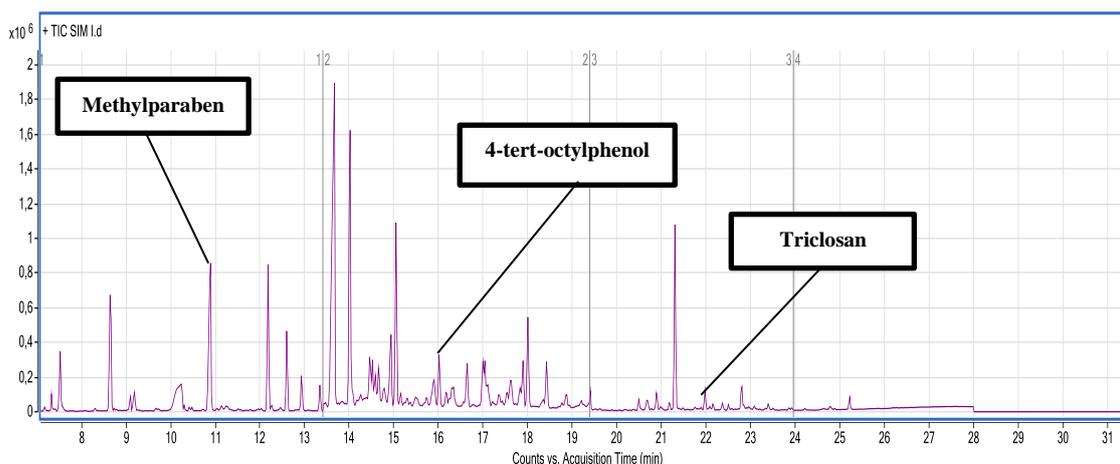


Figura 3.3.7. Cromatograma muestra I

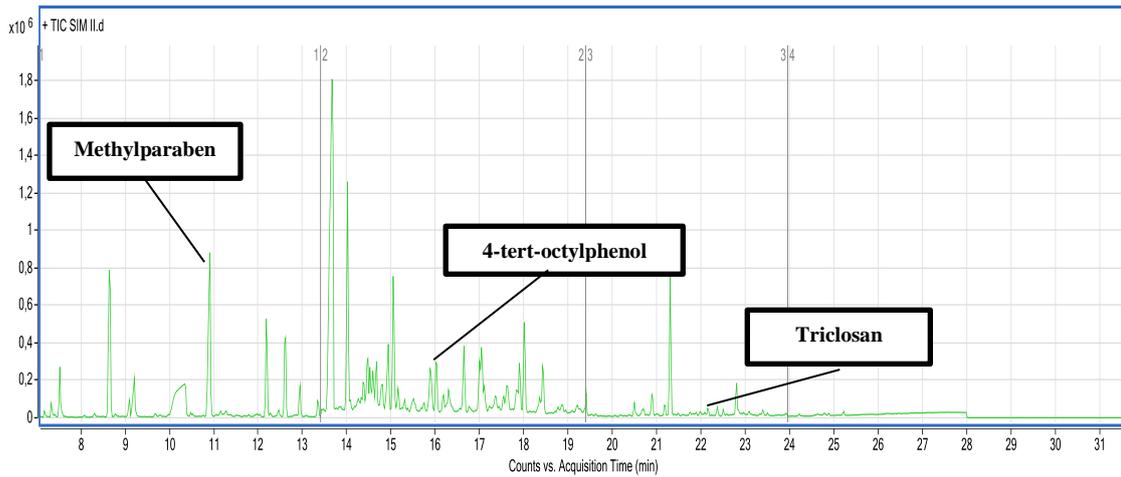


Figura 3.3.8. Cromatograma muestra II

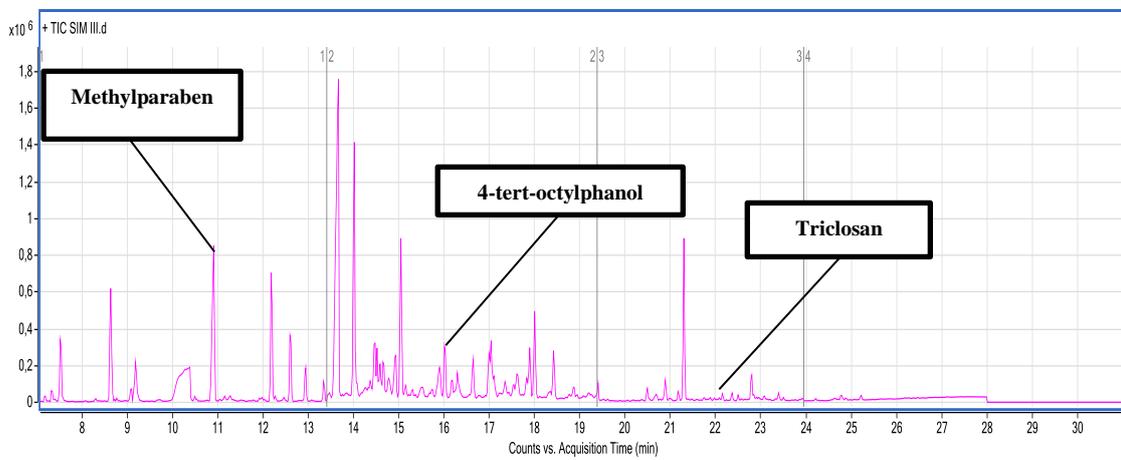


Figura 3.2.22. Cromatograma muestra III

	Muestra I	Muestra II	Muestra III
ΣS/N (señal/ruido)	4824.7	2994.3	3093.1

La cantidad de **100 mg de alúmina** ha conseguido los mejores resultados porque el valor de S/N es el más alto.

3.3.5. Sistemas de filtración

Se utilizaron dos maneras para llevar a cabo la filtración: filtración a vacío (costoso y lento) y utilizando filtros de jeringa de microfibra de vidrio de 25 mm de diámetro y 0,7 μm de tamaño de poro. Se prepararon la muestra VI y la muestra VII.

Sample	Freeze-dried sludge mass (g)	SS' stock solution (uL)	Extraction solvent	Extraction solvent volume (mL)	Extraction technique	Cleanup adsorbent / mass (mg)	Filtration method
VI	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	30	UAE	Al ₂ O ₃ / 100	S
VII	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	30	UAE	Al ₂ O ₃ / 100	V

Los contaminantes emergentes que se pueden observar corresponden al ibuprofen (IBP), ethylparaben (EP) y el naproxen (NPX).

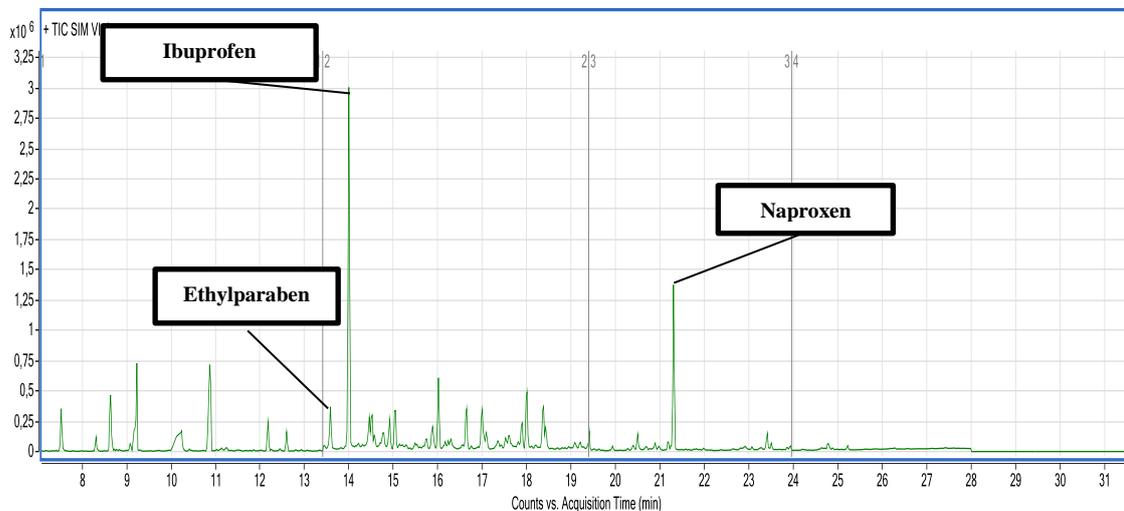


Figura 3.3.9. Cromatograma muestra VI

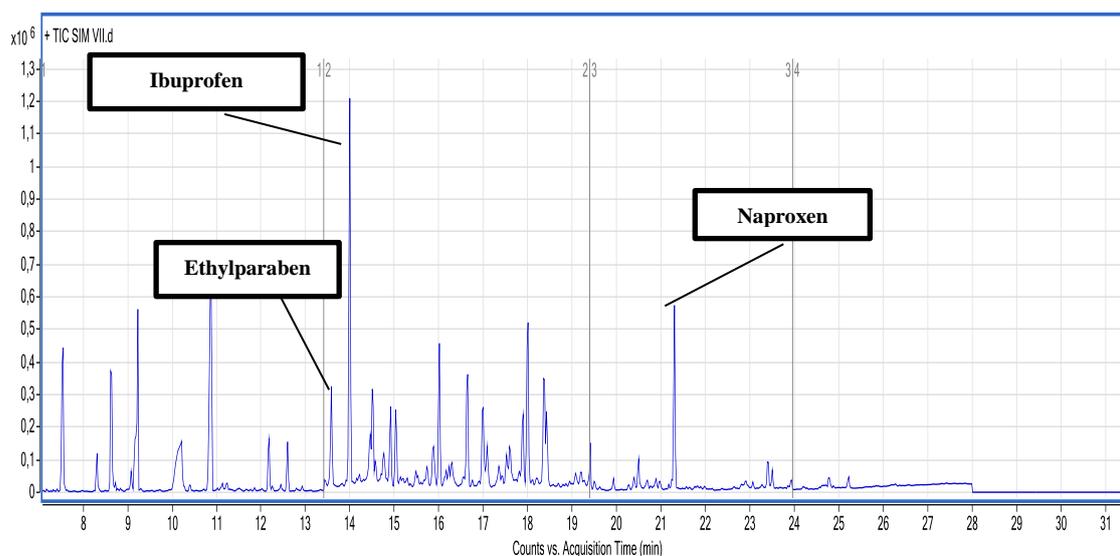


Figura 3.3.10. Cromatograma muestra VII

	Muestra VI	Muestra VII
$\Sigma S/N$ (señal/ruido)	5188.9	3928.6

La etapa de filtración con **filtro de jeringa** consigue mejores resultados que la filtración a vacío porque el valor de S/N es más alto.

Todos los conjuntos de datos analíticos contienen 2 componentes: señal y ruido.

- Señal (S): es la parte de los datos que contiene información sobre las especies químicas de interés. Las señales son con frecuencia proporcionales a la masa o concentración del analito.
- Ruido (N): es la parte de los datos que contiene información extraña. El ruido se origina por varias fuentes en un sistema de medida analítico, como: detectores, fuentes de fotón o factores medioambientales.

La caracterización de la magnitud del ruido (N) es con frecuencia una tarea difícil y puede o no puede ser independiente de la intensidad de la señal.

El ruido degrada la exactitud y la precisión de la señal y, por lo tanto, nuestro conocimiento sobre la cantidad de analito presente.

Si la señal es transitoria, como en el caso de los picos de cromatografía, la señal (S) es mejor estimada como el área o la altura del pico. El área del pico de una señal transitoria es la respuesta integrada y es aproximadamente equivalente al área de un triángulo sombreado superpuesto de un pico de cromatografía.

S = es la señal de la fuerza del analito de interés

N = es la fuerza del blanco (sin analito).

$$\text{SNR} = \text{S/N}$$

Para un estudio de química analítica es mejor un valor bajo de relación S/N a baja concentración. En el caso del cálculo del límite de detección y cuantificación se basa en 3:1 y 10:1 respectivamente. Si se obtiene baja intensidad de señal de ruido, la probabilidad media de detectar los compuestos dirigidos a baja concentración es alta.

Las **conclusiones** obtenidas de los resultados de cada una de las muestras analizadas son las siguientes:

- Disolvente y técnica de extracción: Agua milliQ pH 9 y 5% MeOH / MAE (extracción asistida por microondas).
- Adsorbente y cantidad en la etapa de limpieza (clean-up): Al₂O₃ (alúmina activa 100 °C) /100 mg
- Sistema de filtración: Filtro de jeringa (tamaño de poro 0,7 µm y tamaño del filtro de 0,25 µm).

4. Validación del método y resultados

4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO Y RESULTADOS

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (USP 31-NF 26, Capítulo General <1225> Validación de métodos farmacopeicos).

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado (ICH Guideline Q2A- Text on Validation of Analytical Procedures). (FDA draft guidance- Analytical Procedures and Methods Validation).

La evaluación del método de análisis se realizó teniendo en cuenta la estimación de las características analíticas siguientes:

- Linealidad del método
- Sensibilidad del método
- Precisión del método (% RSD)
- Efecto matriz (ME) (% supresión de la señal para n = 3)
- Recuperación parcial (% PR para n =3)
- Repetibilidad (% RSD para n = 3)
- Límite de detección (LOD, ng/g) en muestras de lodos
- Límite de cuantificación (LOQ, ng/g) en muestras de lodos

El primer parámetro de estudios es la **linealidad de un método analítico** que se define como la su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. Para la evaluación de linealidad debe utilizarse un mínimo de 5 puntos de datos para una evaluación adecuada.

A continuación, se describe la preparación de las muestras necesarias para la observar la linealidad del método de análisis.

Se preparación cuatro tipos de muestras diferentes:

- Las primeras muestras que se prepararon son ocho viales de 2 mL para inyección directa (**muestras D**).

- Las segundas muestras que se prepararon para SPME corresponden a muestras con fango (g), dopadas con diferente volumen de diferentes soluciones en acetona y que sufren pretratamiento de muestras comentado anteriormente (**muestras A**).
- Las terceras muestras que se prepararon para SPME corresponden a muestras sin fango (g), dopadas con diferente volumen de diferentes soluciones en acetona y que sufren pretratamiento de muestras comentado anteriormente (**muestras B**).
- Las últimas muestras que se prepararon para SPME corresponden a muestras sin fango (g), dopadas con diferente volumen de diferentes soluciones en acetona y que no sufren pretratamiento de muestras comentado anteriormente (**muestras C**). Solamente llevan 17 mL de agua milliQ con NaCl al 36% y pH 3.

La preparación de las muestras se realizaron y se analizaron por GC-MS en este orden mencionado anteriormente.

4.1. Inyección directa (LS)

Name	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
[] (ppb, $\mu\text{g L}^{-1}$)	100	200	400	800	1600	3200	4000	8000
$V_{\text{stock solution in acetone}}$ (μL)	50 (T)	100 (T)	200 (T)	100 (SS')	200 (SS')	400 (SS')	50 (SS)	100 (SS)
V_{MTBSTFA} (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100
$V_{\text{ethyl acetate}}$ (μL)	250	250	250	250	250	250	250	250

Algunos de los cromatogramas obtenidos son los siguientes, en ellos se puede observar que la intensidad de la señal es mayor al aumentar la concentración de las muestras preparadas. Se han indicado en cada cromatograma algunos de los contaminantes emergentes.

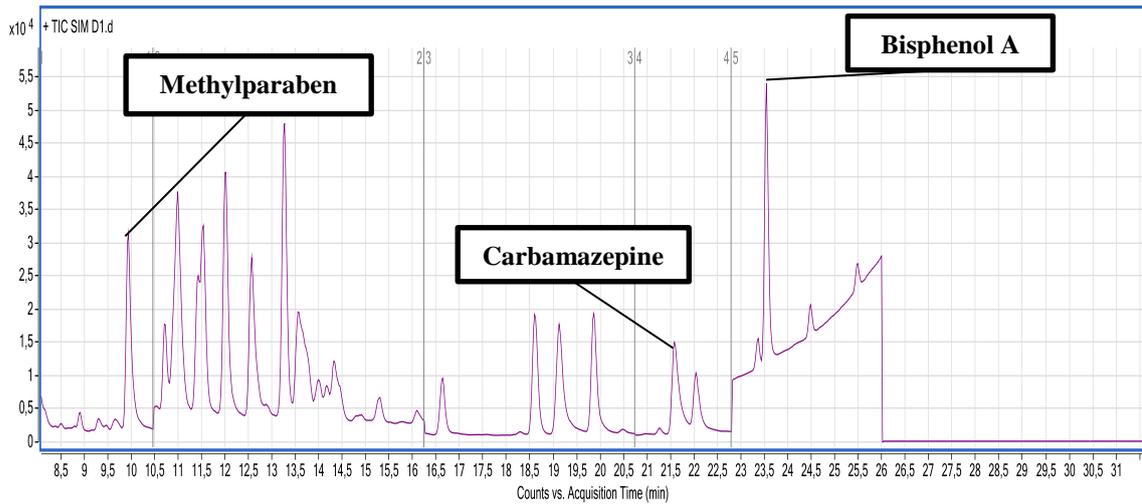


Figura 4.1.1. Cromatograma D1 (100 ppb)

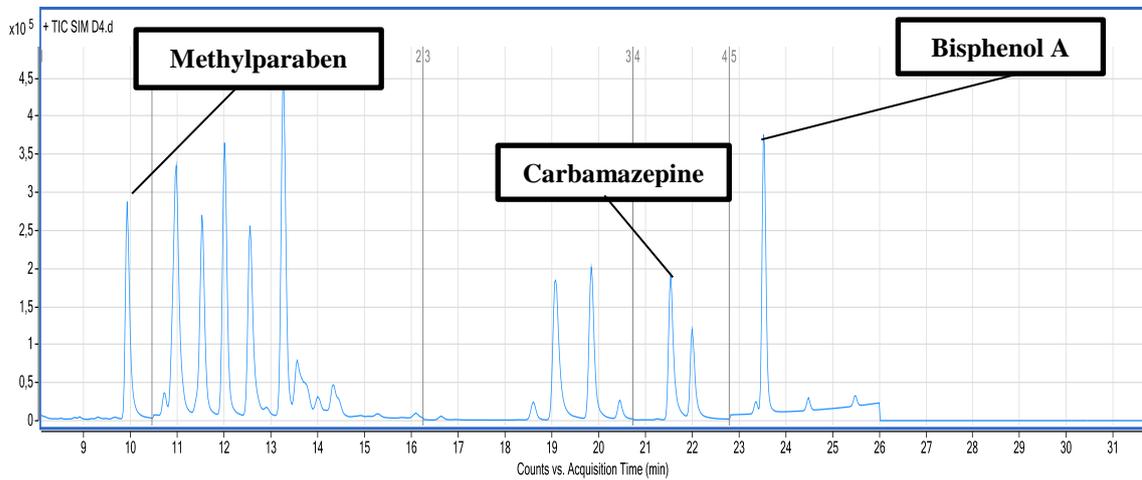


Figura 4.1.2. Cromatograma D4 (800 ppb)

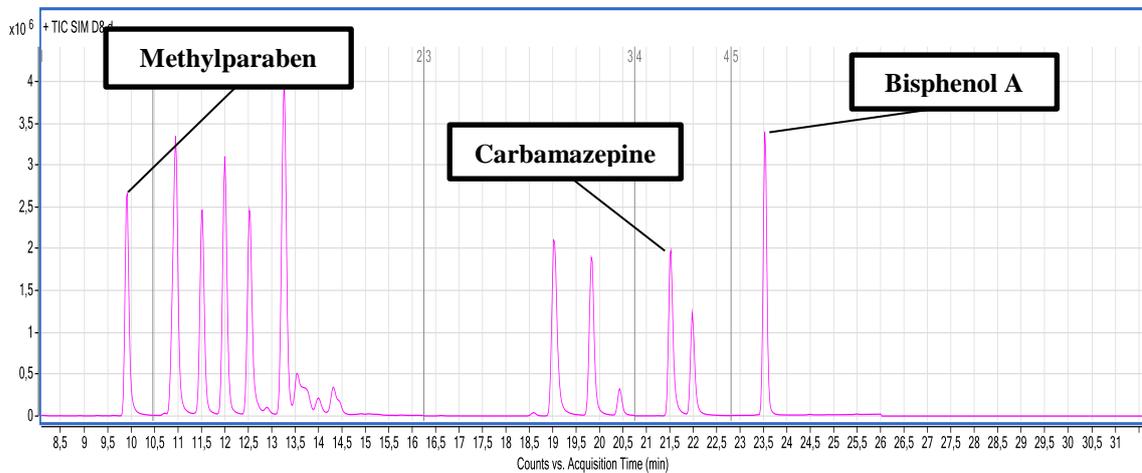
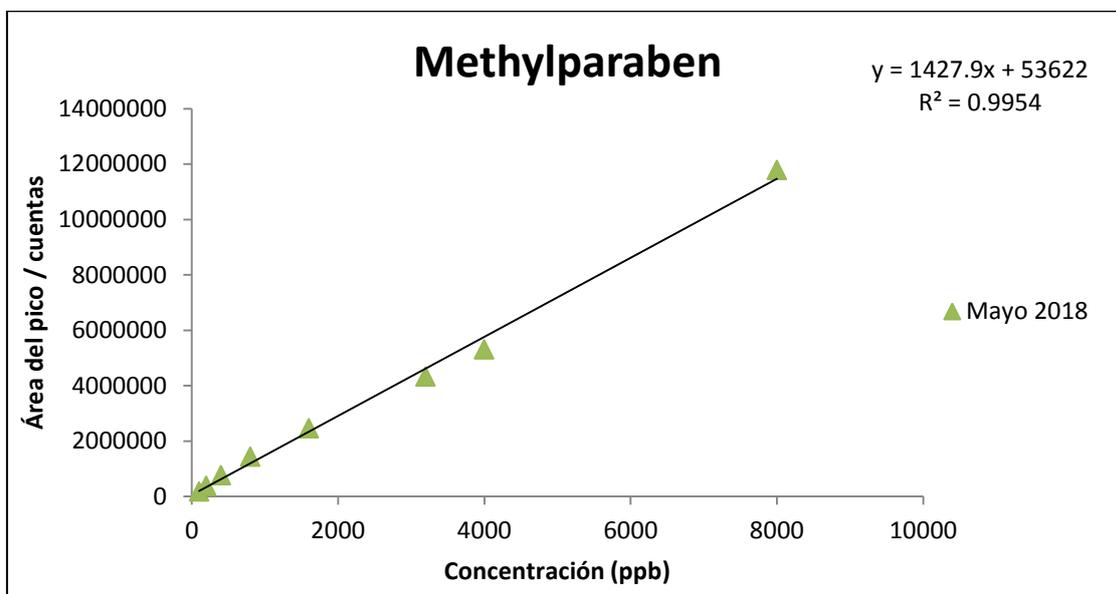
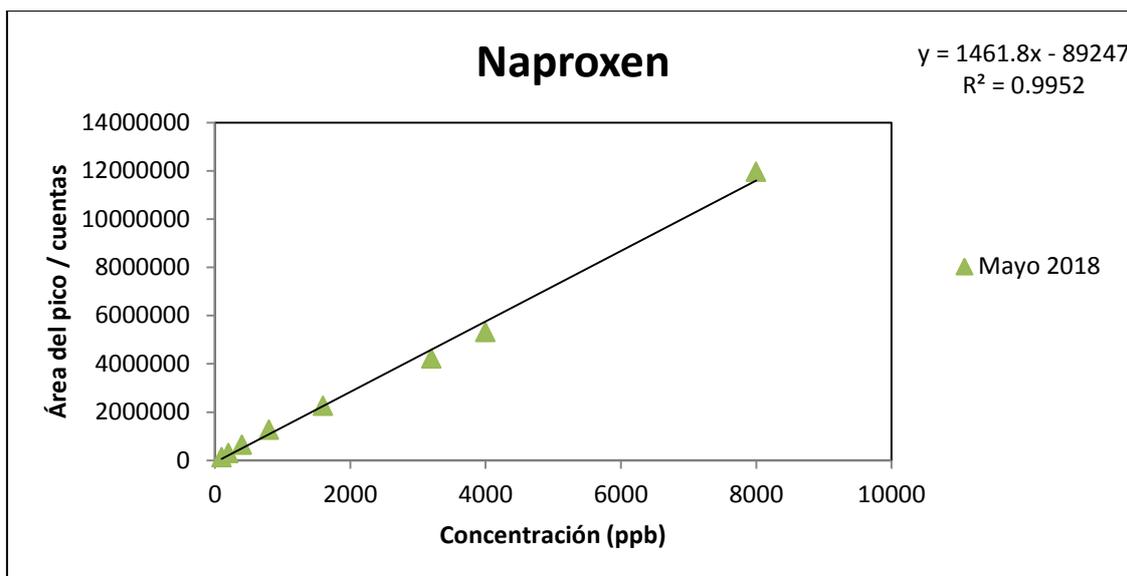


Figura 4.1.3. Cromatograma D8 (8000 ppb)

Se ha realizado un análisis de diferentes concentraciones que nos permiten obtener cromatogramas de cada una de las muestras analizadas. Se ha representado cada una de las líneas de calibrado de los contaminantes emergentes de interés. Gracias a ello, podemos conocer que es posible el análisis de estos analitos a través de la técnica de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). A continuación, mostramos algunos de los contaminantes emergentes como naproxen (NPX) o methylparaben (MP).



4.2. Fibra SPME (DVB/CAR/PDMS)

4.2.1. Preparación de muestras A

Name	Blanco	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
[] (ppb, ng g ⁻¹)	B	B + 31,25	B + 62,5	B + 125	B + 250	B + 500	B + 1000	B + 1250	B + 2500
m sludge (g)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
V _{stock solution in acetone} (μL)	0	50 (T)	100 (T)	200 (T)	100 (SS')	200 (SS')	400 (SS')	50 (SS)	100 (SS)
Pretreatment	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Como se puede observar en esta tabla de muestras, éstas se han preparado pesando una cantidad de muestra sólida de fango (0,8 g), se han dopado con diferente volumen de soluciones T, SS' y SS y, por último, han sufrido pretratamiento.

Algunos de los cromatogramas obtenidos son los siguientes, en ellos se puede observar que la intensidad de la señal es mayor al aumentar la concentración de las muestras preparadas. Se pueden observar algunos de los contaminantes emergentes.

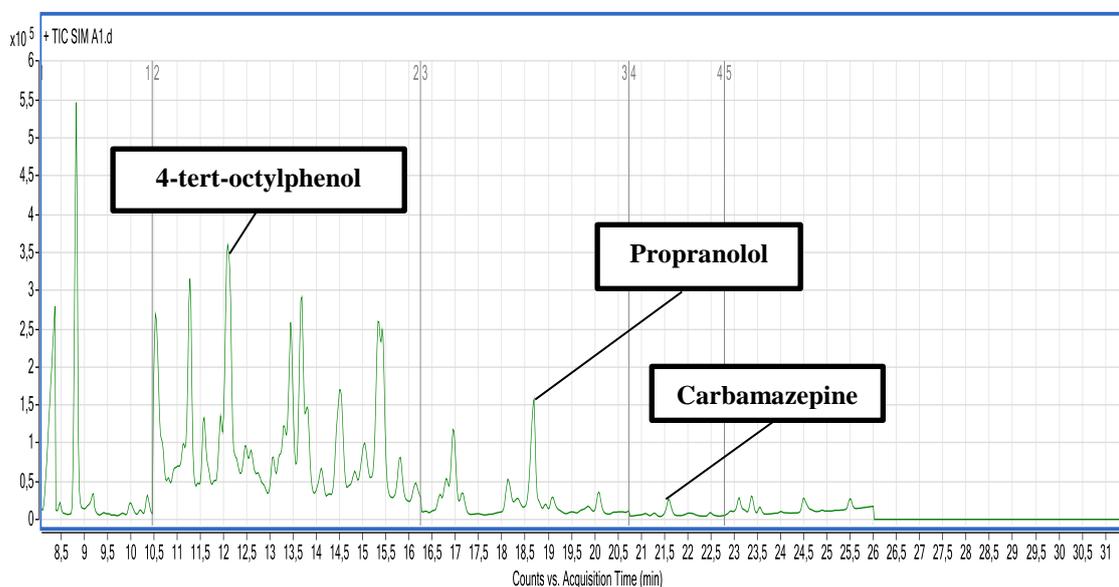


Figura 4.2.1. Cromatograma muestra A1 (B+31,25 ng/g)

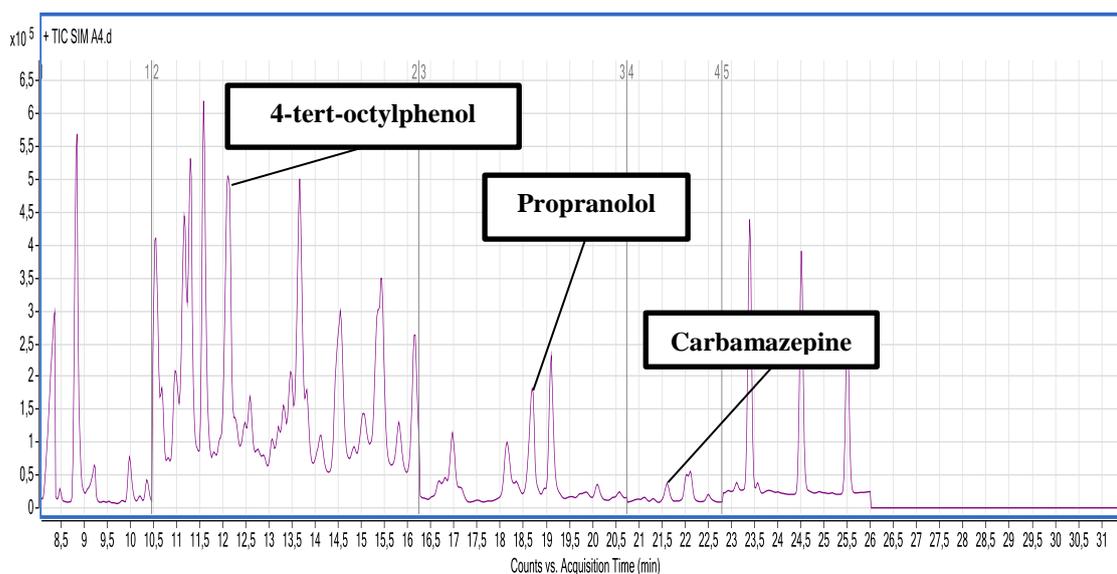


Figura 4.2.2. Cromatograma muestra A4 (B + 250 ng/g)

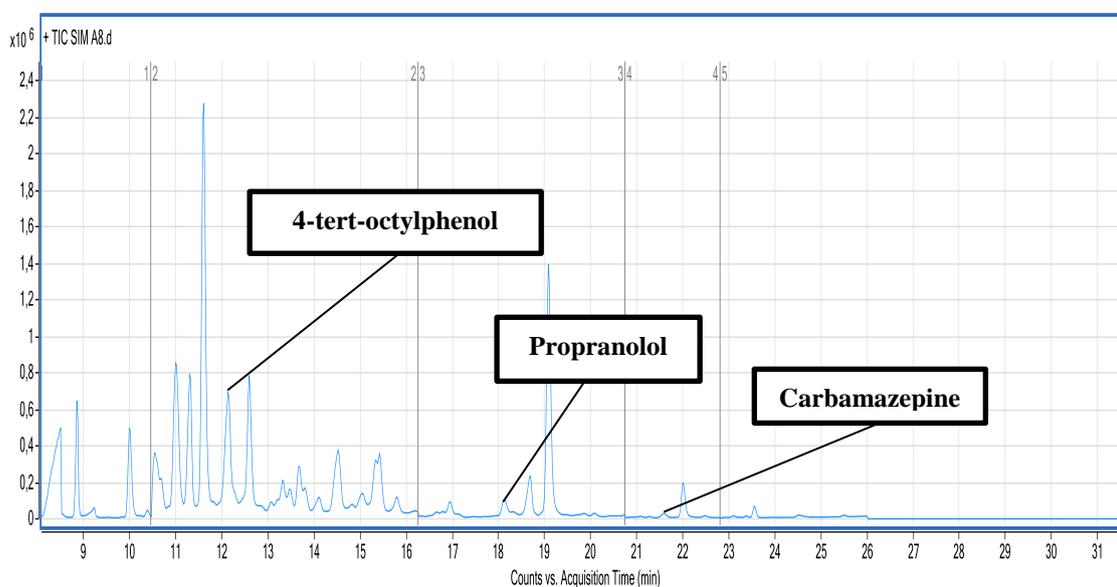


Figura 4.2.3. Cromatograma muestra A8 (B + 2500 ng/g)

4.2.2. Preparación de muestras B

Name	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
[] (ppb, ng g ⁻¹)	31,25	62,5	125	250	500	1000	1250	2500
m sludge (g)	0	0	0	0	0	0	0	0
V _{stock solution in acetone} (uL)	50 (T)	100 (T)	200 (T)	100 (SS')	200 (SS')	400 (SS')	50 (SS)	100 (SS)
Pretreatment	S	S	S	S	S	S	S	S

Estas muestras, se han preparado dopando con diferente volumen de soluciones de T, SS' y SS. Posteriormente, se realiza el pretratamiento mencionado anteriormente. La diferencia con respecto a las muestras de A es que no llevan gramos de fango. Algunos cromatogramas son los siguientes.

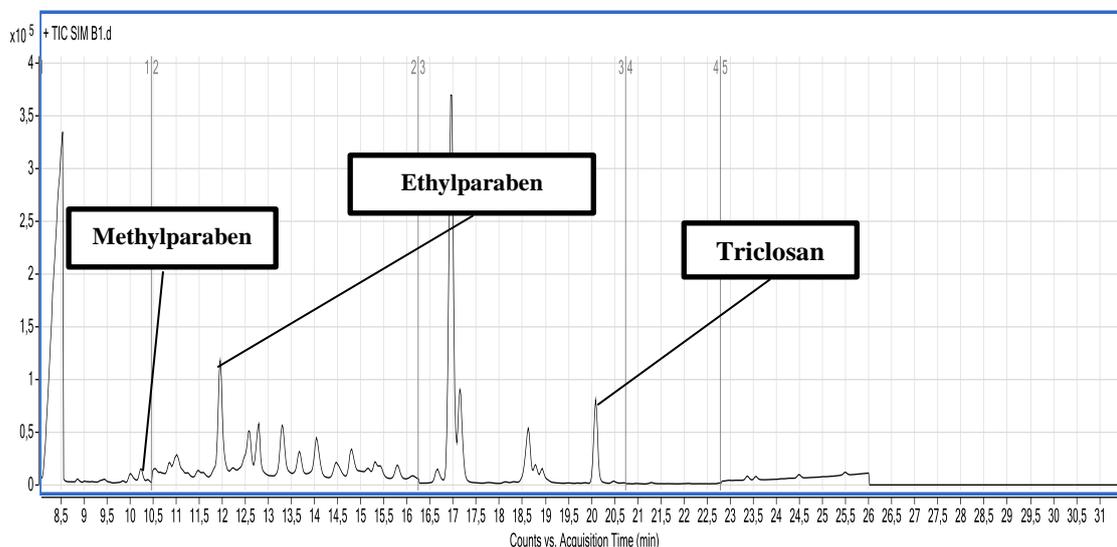


Figura 4.2.4. Cromatograma muestra B1(31.25 ng/g)

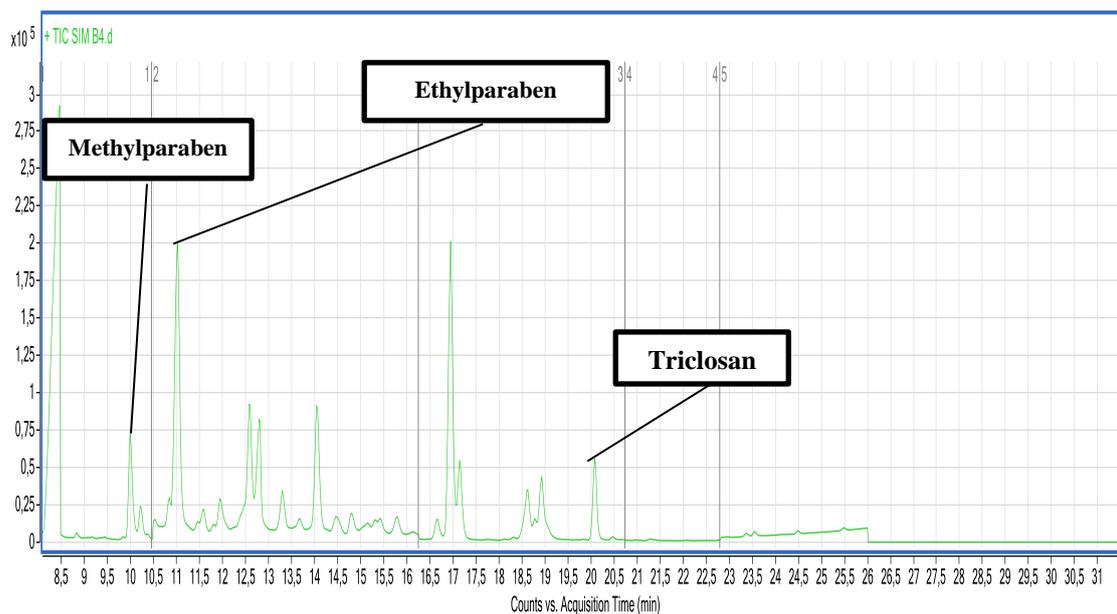


Figura 4.2.5. Cromatograma muestra B4 (250 ng/g)

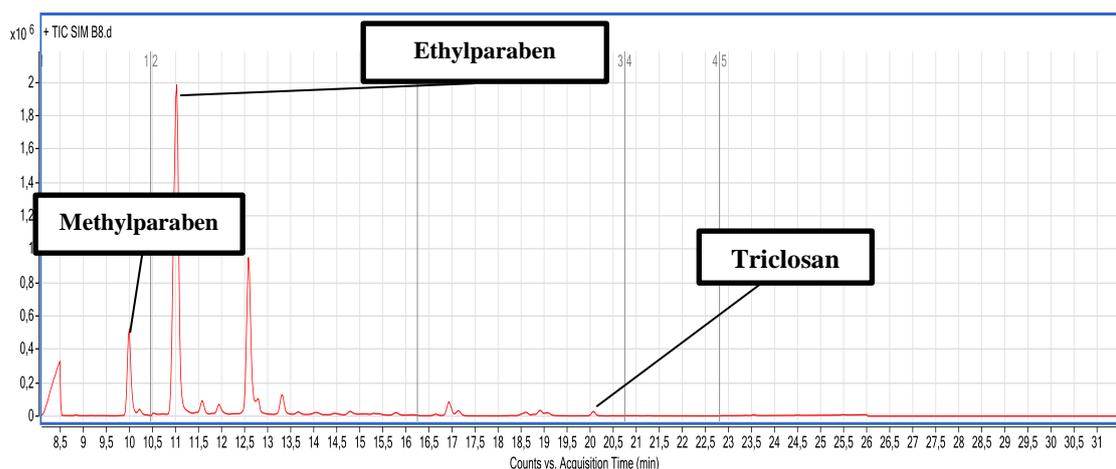


Figura 4.2.6. Cromatograma muestra B8 (2500 ng/g)

4.2.3. Preparación de muestras C

Name	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
[] (ppb, ng g ⁻¹)	31,25	62,5	125	250	500	1000	1250	2500
m sludge (g)	0	0	0	0	0	0	0	0
V _{stock solution in acetone} (uL)	50 (T)	100 (T)	200 (T)	100 (SS')	200 (SS')	400 (SS')	50 (SS)	100 (SS)
Pretreatment	N	N	N	N	N	N	N	N

Estas muestras, se han preparado únicamente dopando con diferente volumen de soluciones de T, SS' y SS. Algunos de los cromatogramas obtenidos son los siguientes, en ellos se puede observar que la intensidad de la señal es mayor al aumentar la concentración de las muestras preparadas.

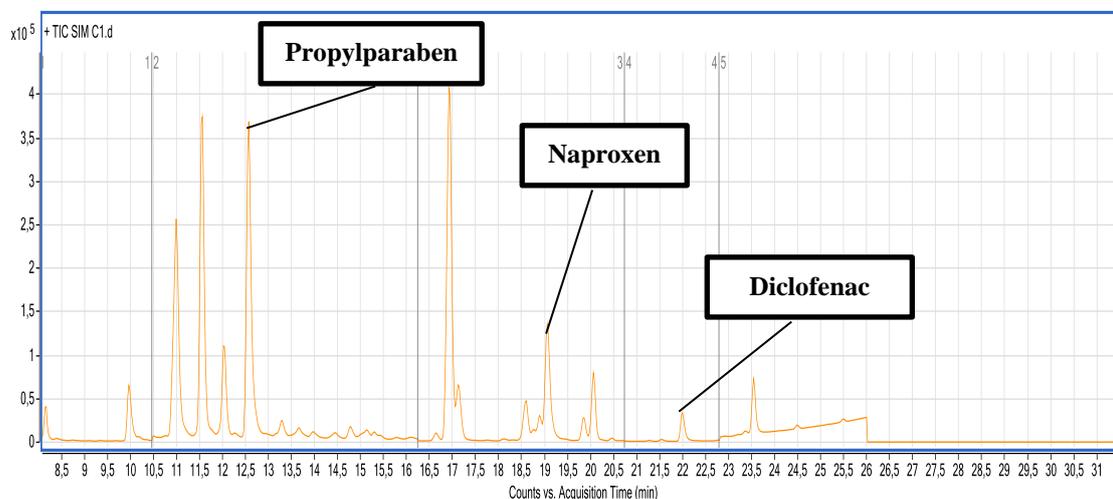


Figura 4.2.7. Cromatograma muestra C1 (31,25 ng/g)

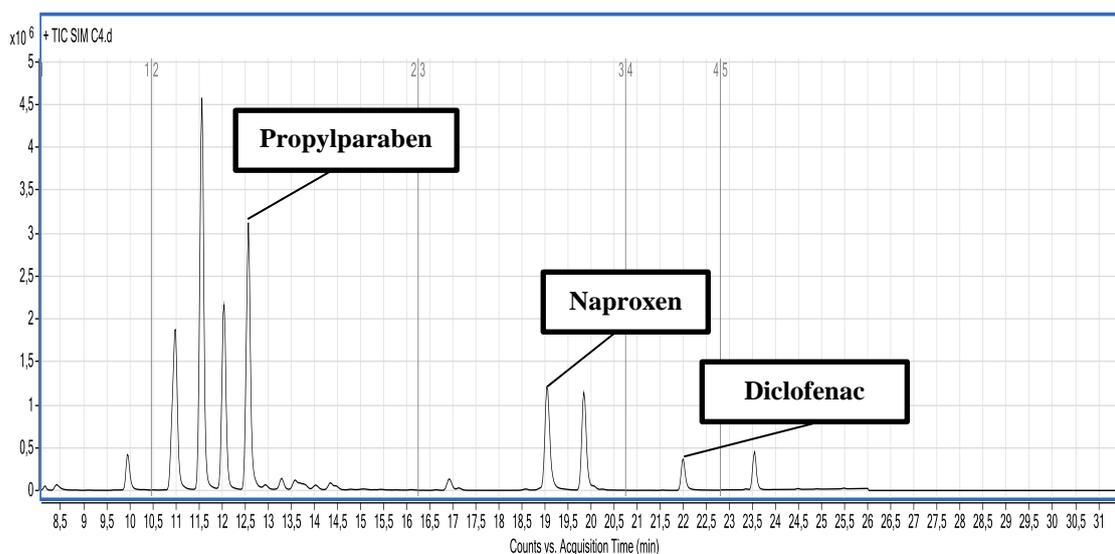


Figura 4.2.8. Cromatograma C4 muestra (250 ng/g)

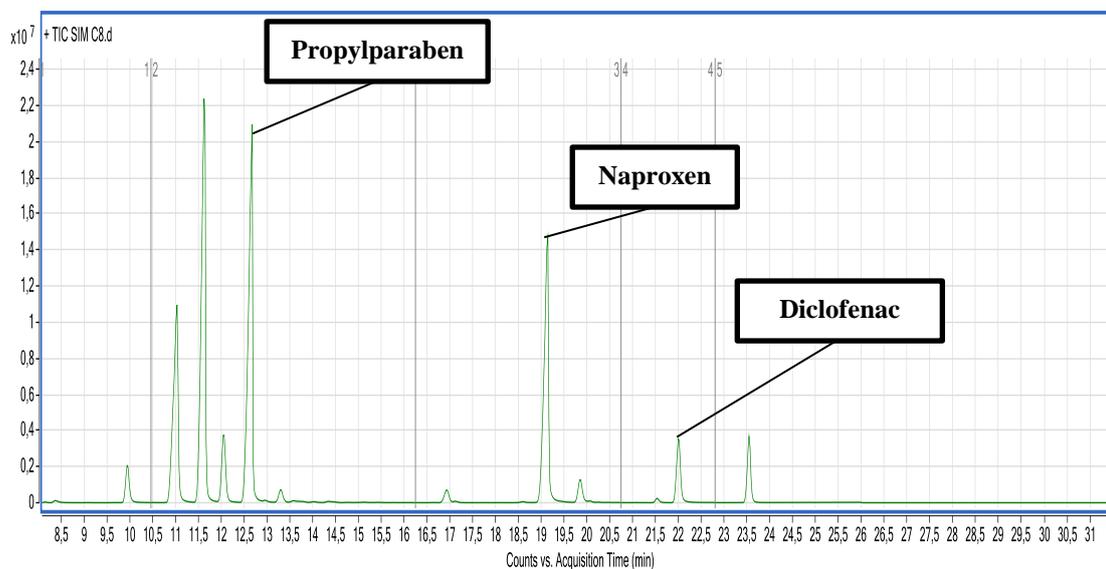


Figura 4.2.9. Cromatograma muestra C8 (2500 ng/g)

4.3. Resultados de la validación del método

Para el análisis de los resultados obtenidos de cada una de las muestras analizadas, comenzamos observando la linealidad del método obtenida al realizar una representación gráfica de cada una de las muestras teniendo en cuenta los analitos de interés.

La validación del método se realizó durante el mes de Abril (hay que tener en cuenta que se llevó a cabo un corte en la columna HP-5MS lo que provocó una modificación en los tiempos de retención de los analitos de interés), también se puede observar en los

resultados obtenidos por inyección directa (LS) una sensibilidad mayor en comparación con el mes de Marzo.

Tabla 4.3.1. Contaminantes emergentes

Analyte	Chemical Name	Acquisition window	t _R (min)	SIM ions, m/z		
1	Methylparaben	1	9.977	209.1	210.1	135.1
2	Ethylparaben	2	11.045	223.1	224.1	151.1
3	Ibuprofen		11.567	263.2	264.2	117.1
4	4-tert-octylphenol		12.065	249	250	320
5	Propylparaben		12.611	237.2	238.2	151.1
7	4- nonylphenol		13.829	263.1	305.1	264.1
8	Propranolol	3	18.677	144.1	215.2	316.2
9	Naproxen		19.149	287.2	185.1	288.2
10	Triclosan		19.895	347	345	200
11	Carbamazepine	4	21.585	193	194	293
12	Diclofenac		22.032	352.1	214.1	354.1
13	Bisphenol A	5	23.573	441	207	442

Tabla 4.3.2. Tabla de los segmentos de tiempo SIM

SIM Time Segments						
Time (min)	Group Name	Number of Ions	Total Dwell Time (ms)	Cycle Time (Hz)	Resolution	Calculated EMV
8.00	1	3	1290	0.7620	Low	2045
10.46	2	15	1278	0.7614	Low	2045
16.25	3	9	1278	0.7656	Low	2045
20.74	4	6	1278	0.7672	Low	2045
22.80	5	3	1290	0.7612	Low	2045

Lo primero que hacemos es el análisis de las muestras por **inyección directa (LS)** que en nuestro caso son las muestras D. Hemos realizado una representación gráfica (ajuste por mínimos cuadrados) comparando los resultados obtenidos durante los meses de Marzo, Abril y Mayo para observar el cambio que se produce en la sensibilidad del equipo.

Los resultados obtenidos se han analizado con el programa de *Agilent MassHunter Quantitative Analysis (for GC)*.

Tenemos varios contaminantes emergentes en la clasificación mencionada al comienzo este trabajo, por ello, se ha tomado un contaminante emergente de cada tipo para poder observar el parámetro de la *linealidad del método*.

- Analgésico / Antiinflamatorio: Naproxen (NPX)

INYECCIÓN DIRECTA (LS) NAPROXEN			
Concentración (ppb)	Respuesta (Marzo 2018)	Respuesta (Abril 2018)	Respuesta (Mayo 2018)
100	14774	76715	126219
200	40663	187548	289888
400	123978	440141	634815
800	186295	907231	1263717
1600	430633	1740355	2250782
3200	838133	4056241	4214826
4000	945953	3573369	5302979
8000	2328384	8206339	11953158

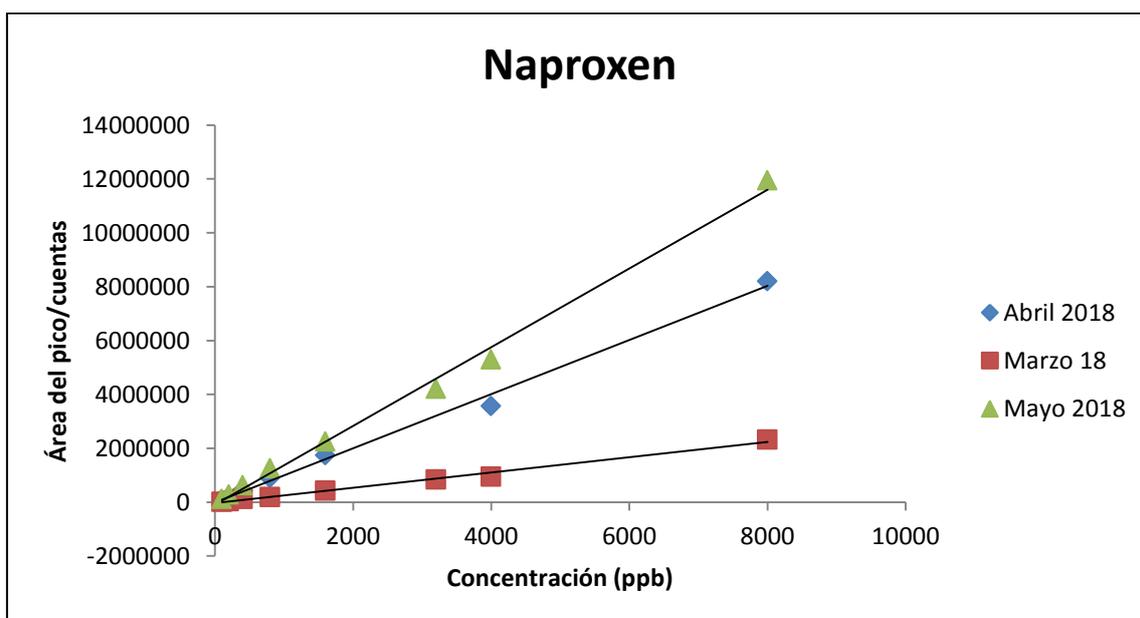


Figura 4.3.3. Curvas de calibrado de naproxen (NPX)

- Neurofármaco: Carbamazepine (CBZ)

INYECCIÓN DIRECTA (LS) CARBAMAZEPINE			
Concentración (ppb)	Respuesta (Marzo 2018)	Respuesta (Abril 2018)	Respuesta (Mayo 2018)
100	19875	68469	126124
200	50957	175759	275142
400	149462	398613	624323
800	182845	756142	1182887
1600	419148	1500053	2158232
3200	931099	606058	3861723
4000	1331186	3143514	4933729
8000	2253420	7271861	10836283

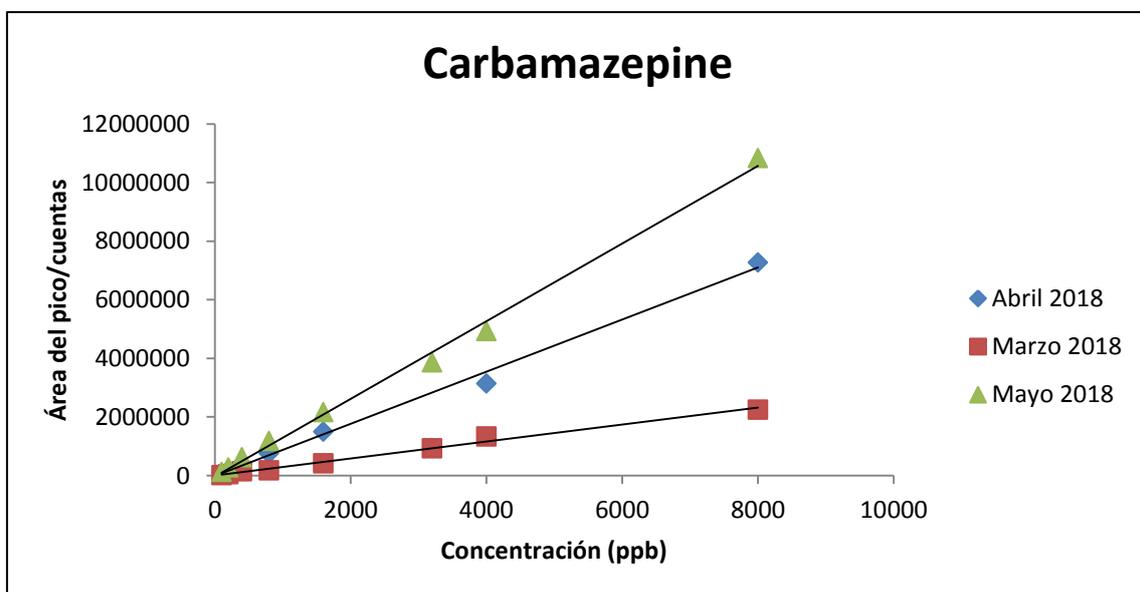


Figura 4.3.4. Curvas de calibrado de carbamazepine (CBZ)

- Antihipertensivos: Propranolol (PNL)

INYECCIÓN DIRECTA (LS) PROPRANOLOL			
Concentración (ppb)	Respuesta (Marzo 2018)	Respuesta (Abril 2018)	Respuesta (Mayo 2018)
100	208	517	6189
200	201	594	6437
400	240	788	7881
800	382	781	7681
1600	437	4359	7599
3200	791	776	8696
4000	362	26490	9801
8000	4335	62939	13523

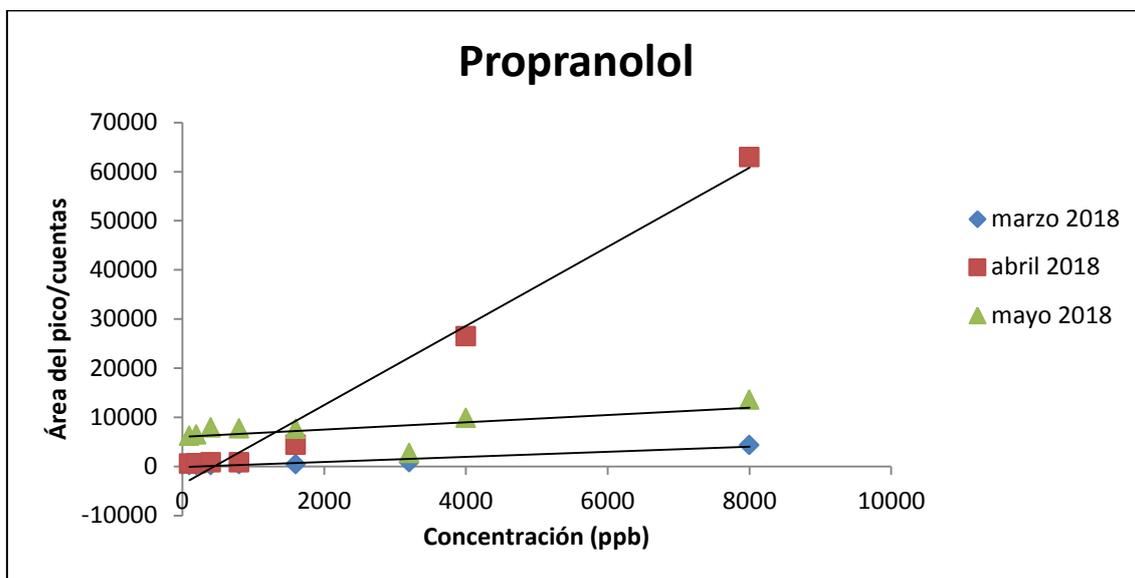


Figura 4.3.5. Curvas de calibrado de propranolol (PNL)

- Parabeno: Propylparaben (PP)

INYECCIÓN DIRECTA (LS) PROPYLPARABEN			
Concentración (ppb)	Respuesta (Marzo 2018)	Respuesta (Abril 2018)	Respuesta (Mayo 2018)
100	17605	101236	147044
200	55138	225451	329371
400	151316	500236	696515
800	227823	954721	1407594
1600	509865	1802340	2535733
3200	1012540	761108	4620344
4000	1268293	3882019	5755821
8000	2644425	8717042	12597503

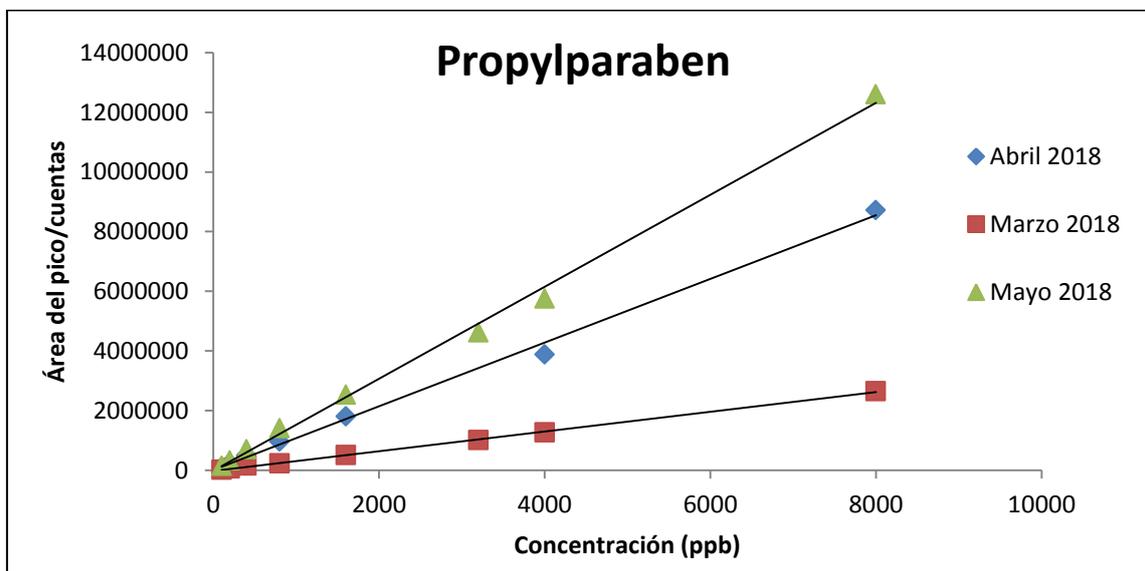


Figura 4.3.6. Curvas de calibrado de propylparaben (PP)

- Disruptor endocrino: Bisphenol A (BPA)

INYECCIÓN DIRECTA (LS) BISPHENOL A			
Concentración (ppb)	Respuesta (Marzo 2018)	Respuesta (Abril 2018)	Respuesta (Mayo 2018)
100	24741	87421	117229
200	69050	192525	241003
400	164686	384678	504502
800	200928	771334	1042115
1600	455161	1376829	1838743
3200	710389	621774	3278677
4000	1314518	3042783	4085410
8000	2432575	6769750	8842959

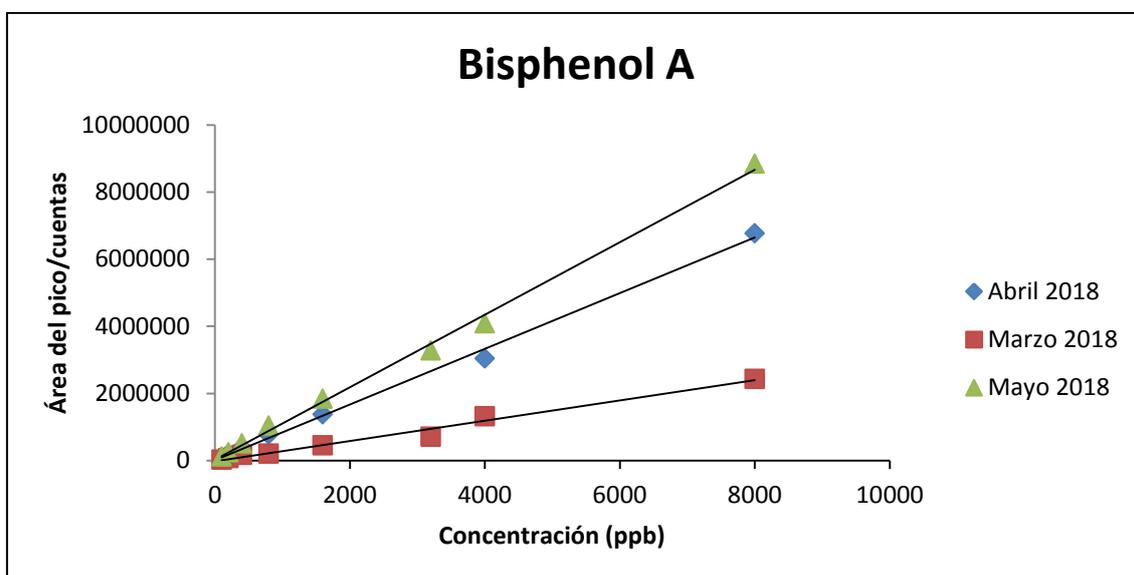


Figura 4.3.7. Curvas de calibrado de bisphenol (BPA)

Se puede observar en todas las representaciones gráficas obtenidas de cada uno de los analitos que la sensibilidad mejora principalmente durante el mes de Abril, a raíz del corte de columna HP-5MS que se produjo a principios del propio mes.

Una vez observado que los resultados obtenidos son correctos, realizamos una representación gráfica (ajuste de mínimos cuadrados) de los contaminantes para observar la linealidad del método. Para llevar a cabo todo esto, preparamos varias muestras de diferente concentración, dopando con diferentes soluciones de T, SS' y SS en acetona mencionadas anteriormente para obtener diferentes concentraciones y los resultados obtenidos son los siguientes:

Para la representación de la línea de calibrado de las muestras de A, es necesario calcular la concentración del blanco. Para ello, realizamos una representación de la respuesta (área del pico) en función del volumen añadido de la solución SS'. Al realizar esta representación, nos permite conocer el volumen equivalente y calcular la concentración del blanco.

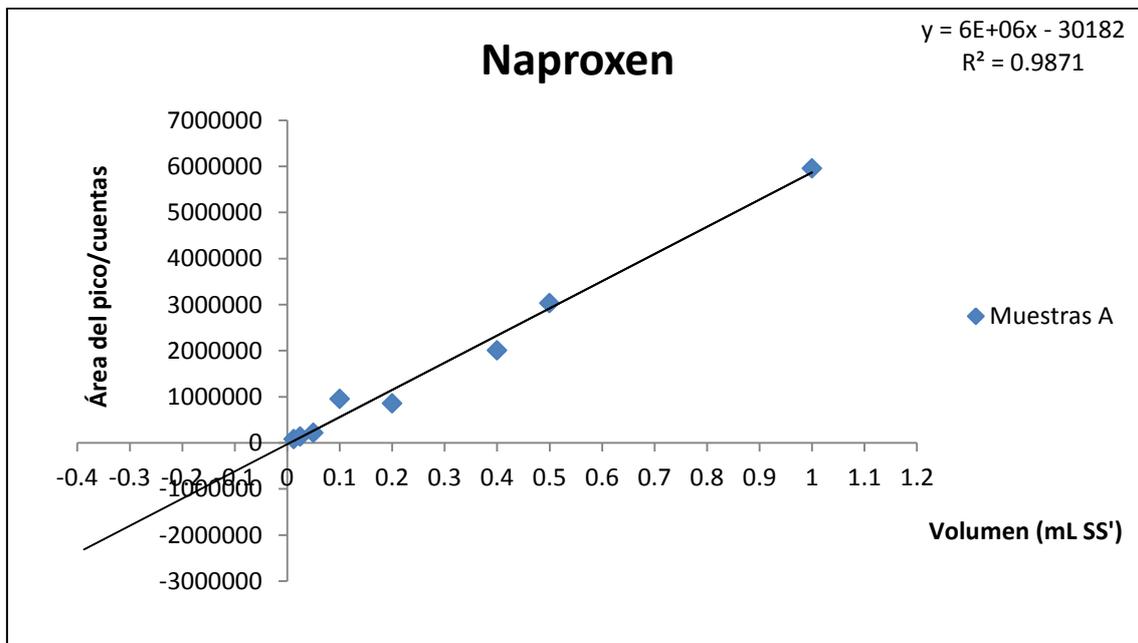
La calibración se realiza por el método de matriz simulada (matrix-matched). El establecimiento de una calibración de matriz simulada necesita una matriz libre de analito que solo es posible cuando los analitos son componentes de muestra con exógenos (por ejemplo, aditivos o contaminantes). Sin embargo, si los analitos son endógenos (por ejemplo, aminoácidos en fluidos biológicos o pigmentos en vegetales), y se ha verificado un efecto de matriz, es necesario aplicar el método de adición estándar, nombrado correctamente como "Calibración de adición estándar" (AC). Este tipo de calibración es la única metodología en la que los resultados no se ven afectados por los errores de matriz sistemáticos, independientemente del tipo y la magnitud del efecto matriz, por lo que permite cuantificar la cantidad de analitos en cualquier tipo de muestras. Su principal desventaja radica en el hecho de que se necesita una calibración para cada muestra, lo que implica una gran cantidad de trabajo en el análisis de rutina. Para evitar este problema, se aplica una nueva función de calibración llamada calibración de matriz corregida "calibración de matriz corregida" (MCC). Es una calibración matemática coincidente con la matriz caracterizada por una curva lineal donde la variable x es la cantidad de analito (en presencia de la matriz) y la variable y es la señal analítica.

Tabla 4.3.8. Volúmenes equivalentes y concentraciones del blanco

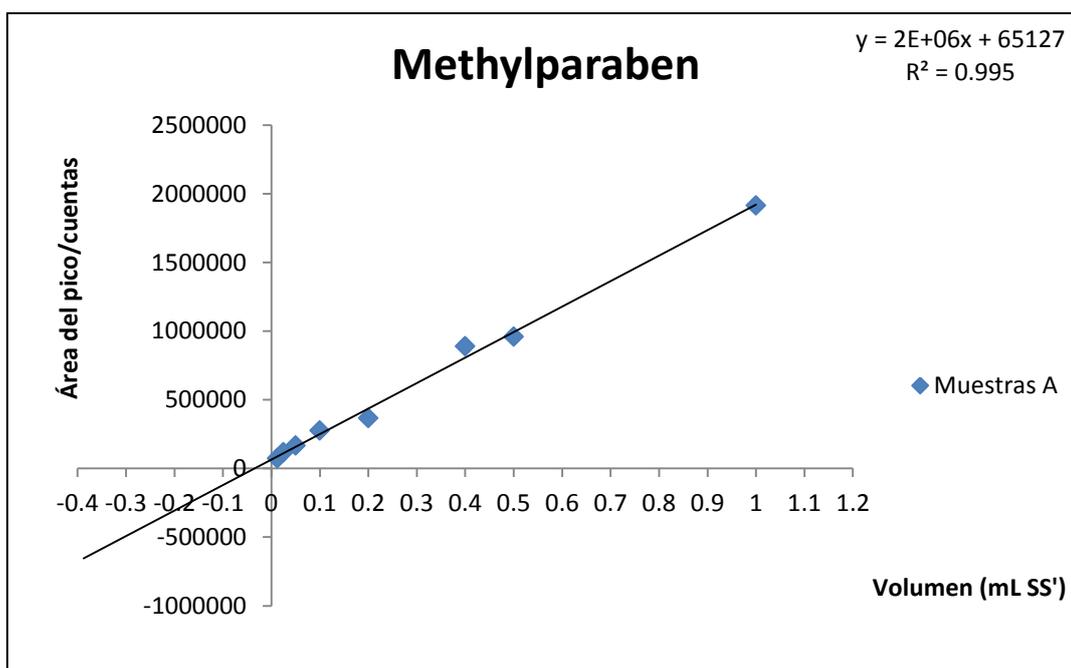
Contaminante emergente (CE)	Volumen equivalente (V_{eq} /mL)	Concentración del blanco (ng/g)
Methylparaben (MP)	-0.0325	81.25
Ethylparaben (EP)	-0.0070	17.5
Ibuprofen (IBP)	-0.05	125
4-tert-octylphenol (OP)	-0.276	690
Propylparaben (PP)	0	0
4-nonylphenol (NP)	-0.245	612,5
Naproxen (NPX)	0	0
Triclosan (TCS)	-1.387	3467.5
Carbamazepine (CBZ)	-0.713	1782,5
Diclofenac (DCF)	-0.034	54,4
Bisphenol A (BPA)	-0.186	465

Las representaciones gráficas de algunos contaminantes emergentes son las siguientes:

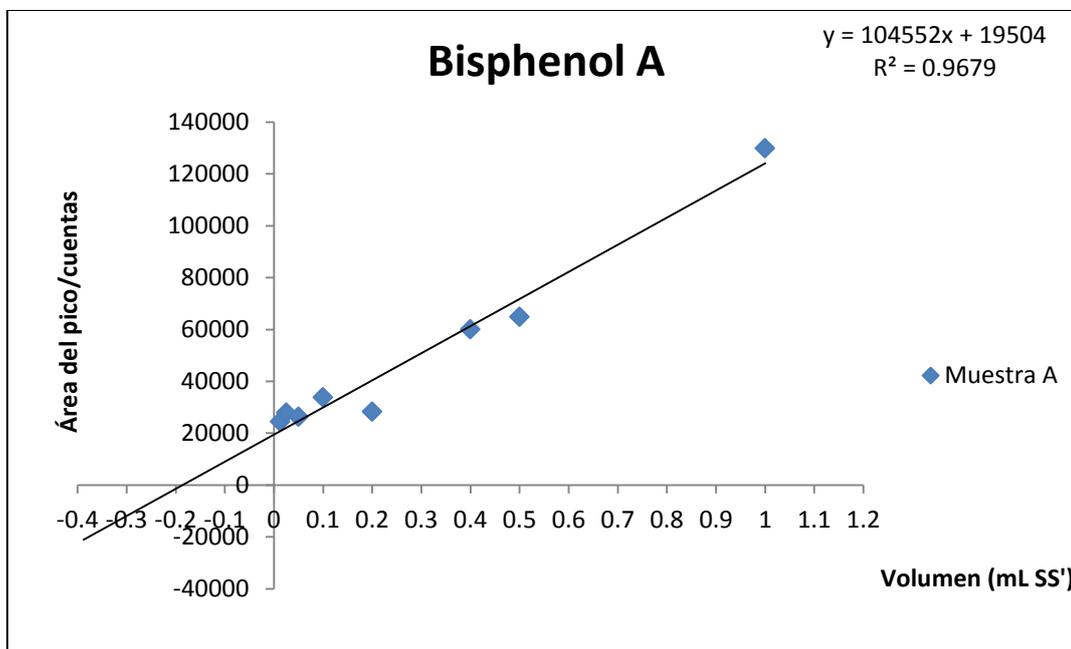
- Analgésico/antiinflamatorio: Naproxen (NPX)



- Parabeno: Methylparaben (MP)



- Disruptor endocrino: Bisphenol A (BPA)



Una vez conocida la concentración del blanco ($[]_{\text{blanco}}$), podemos calcular la concentración experimental de cada una de las concentraciones de las muestras preparadas de tipo A para cada uno de los contaminantes emergentes. Los resultados se encuentran en la tabla 6.1.4.

$$[]_{\text{exp}} = []_{\text{dopada}} + []_{\text{blanco}}$$

Tabla 4.3.9. Concentraciones experimentales

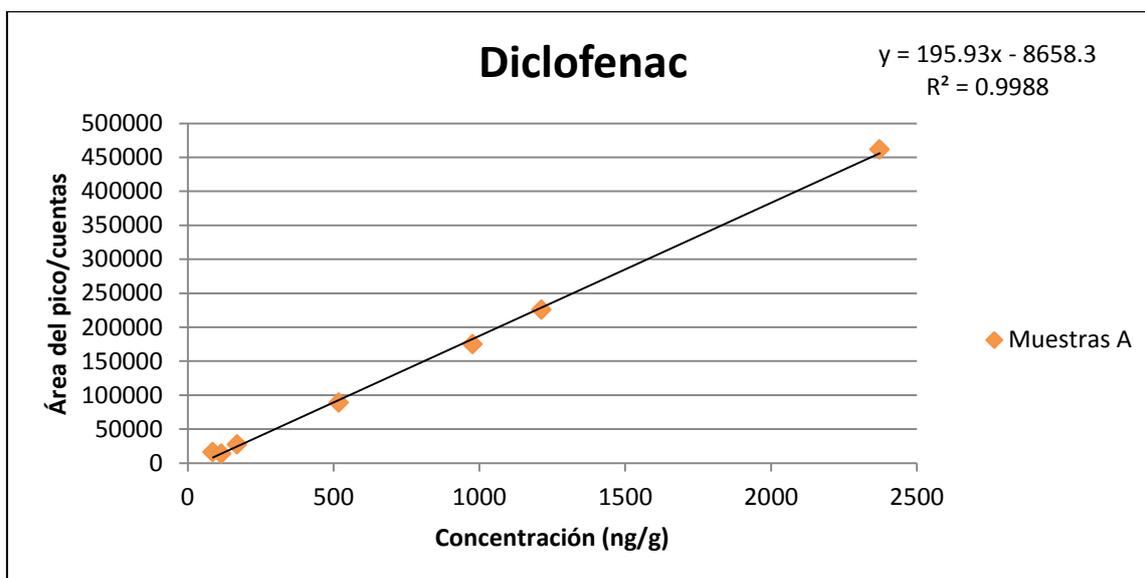
CE	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Methylparaben	112	144	206	329	580	1072	1326	2572
Ethylparaben	48	79	138	258	501	979	1225	2433
Ibuprofen	155	186	247	368	613	1096	1345	2566
4-tert-octylphenol	720	752	811	931	1173	1651	1898	3106
Propylparaben	31	62	124	248	498	991	1245	2491
4-nonylphenol	326	357	418	541	788	1276	1528	2761
Naproxen	31	62	124	248	498	991	1245	2491
Triclosan	3499	3529	3592	3715	3966	4459	4713	5958
Carbamazepine	1813	1841	1906	2028	2276	2764	3015	4248
Diclofenac	83	116	170	285	518	977	1213	2373
Bisphenol A	496	527	588	711	958	1446	1698	2931

A continuación, se muestran las curvas de calibrado (CC) de algunos contaminantes emergentes.

- **Muestras A** que contienen 0,8 gramos de fango, dopadas con diferentes concentraciones de soluciones de T, SS' y SS en acetona y dichas muestras sufren pretratamiento (etapa de extracción, limpieza, centrifugación, limpieza...).

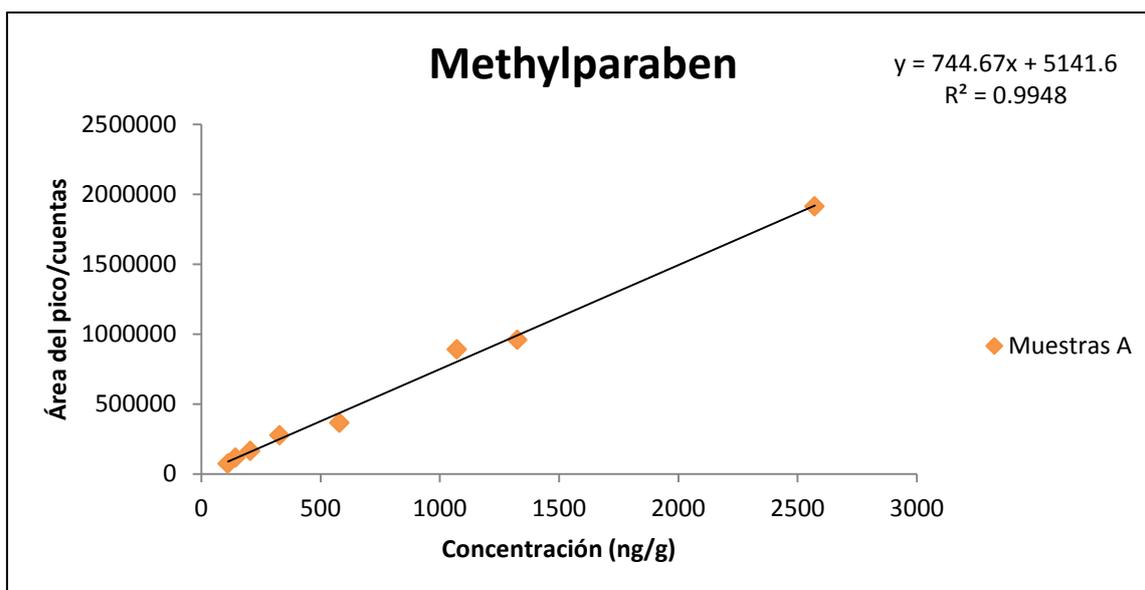
- Analgésico / antiinflamatorio: Diclofenac (DCF)

Diclofenac (DCF)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Respuesta (área de pico)	16013	13687	27081	114000	88976	174688	225601	461751
Concentración experimental (ng/g)	83	116	170	285	518	977	1213	2373



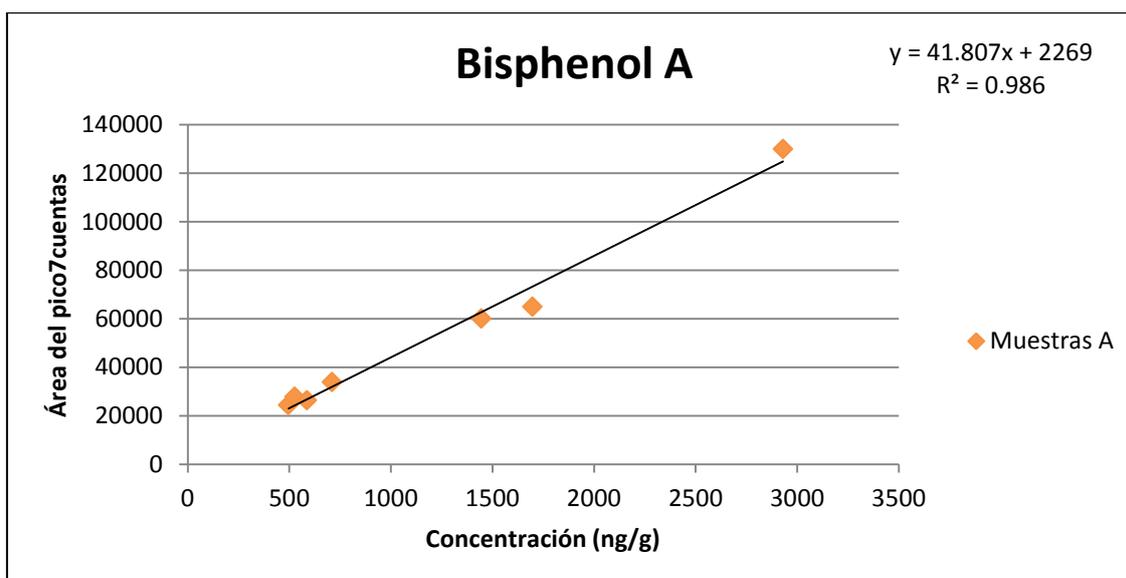
- Parabeno: Methylparaben (MP)

Methylparaben (MP)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Respuesta (área de pico)	73203	117959	165872	275918	366689	890529	959296	1913631
Concentración experimental (ng/g)	112	144	206	329	580	1072	1326	2572



- Disruptor endocrino: Bisphenol A (BPA)

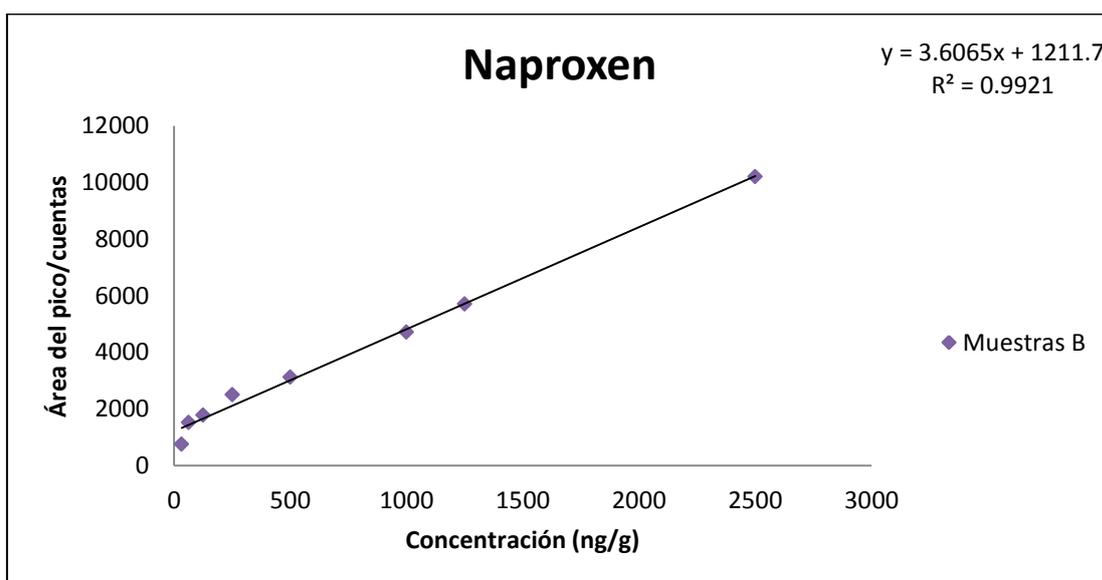
Bisphenol A (BPA)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Respuesta (área de pico)	24376	27813	26287	33766	28263	60019	64837	129835
Concentración experimental (ng/g)	496	527	588	711	958	1446	1698	2931



En general, las curvas de calibrado (CC) se pueden considerar correctas teniendo en cuenta que se trabaja con una matriz realmente compleja (fango). Como hemos comentado, el efecto que produce la matriz conlleva que afecte a los resultados que hemos obtenido. Únicamente hay un contaminante emergente que no hemos podido conseguir una curva de calibrado (propranolol), es posible que no se consiga una adecuada extracción con la fibra, por lo tanto, no podemos analizarlo adecuadamente.

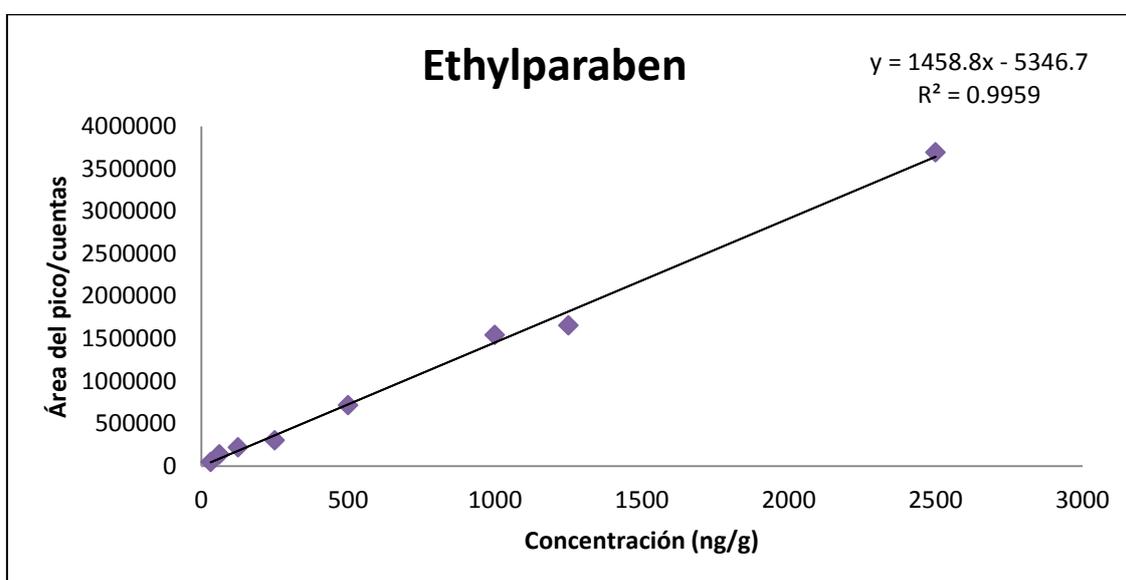
- **Muestras B** que no contienen fango (g) pero se encuentran dopadas con diferentes concentraciones de soluciones T, SS' y SS en acetona. Además, dichas muestras sufren pretratamiento (etapa de extracción, limpieza, centrifugación, limpieza...).
- Analgésico / antiinflamatorio: Naproxen (NPX)

Naproxen (NPX)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
Respuesta (área de pico)	451	1527	1777	10711	2098	74517	75413	77789
Concentración experimental (ng/g)	31.25	62.5	125	250	500	1000	1250	2500



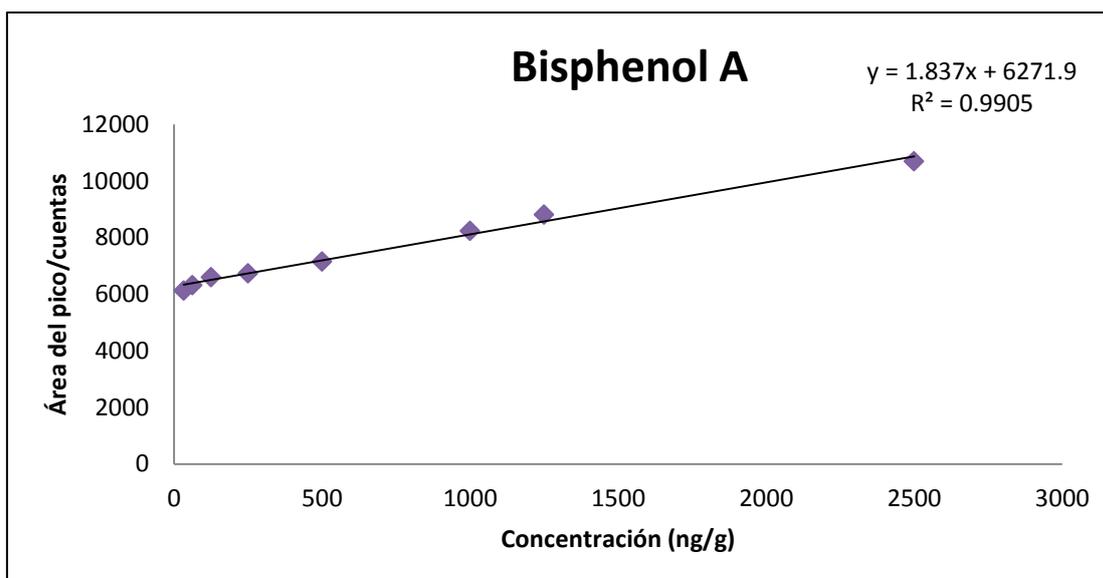
- Parabeno: Ethylparaben (EP)

Ethylparaben (EP)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
Respuesta (área de pico)	46865	133863	217587	299748	714740	1539791	1655695	3692814
Concentración experimental (ng/g)	31.25	62.5	125	250	500	1000	1250	2500



- Disruptor endocrino: Bisphenol A (BPA)

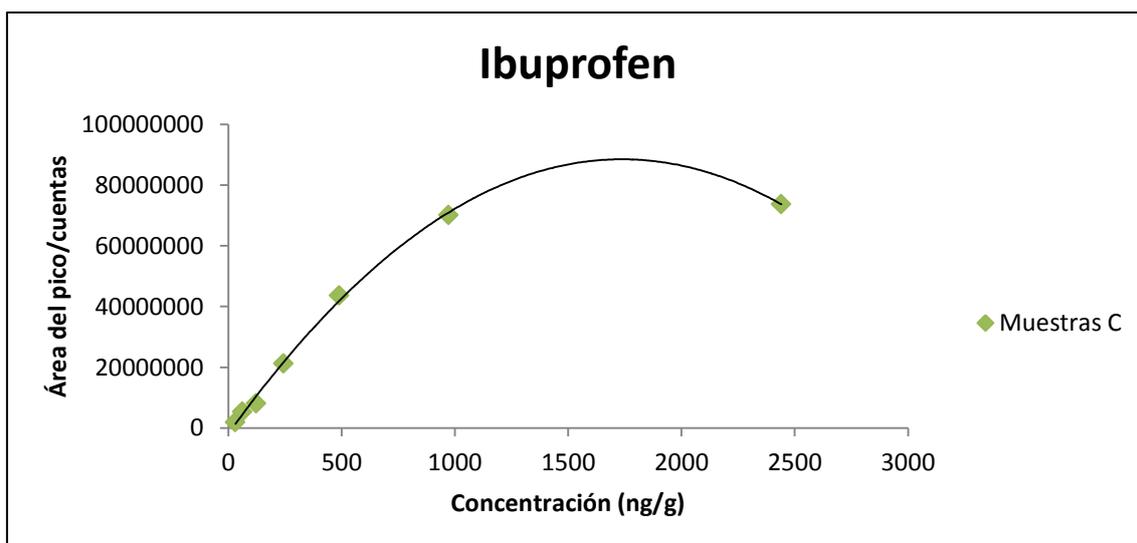
Bisphenol A (BPA)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
Respuesta (área de pico)	46865	133863	217587	299748	714740	1539791	1655695	3692814
Concentración experimental (ng/g)	31.25	62.5	125	250	500	1000	1250	2500



- **Muestras C** que no contienen fango (g) pero que se encuentran dopadas con diferentes concentraciones de soluciones T, SS' y SS en acetona. Además, dichas muestras no sufren pretratamiento. Contienen 17 mL filtrados de agua milliQ con NaCl al 36% y pH 3. Algunos ejemplos se muestran a continuación.

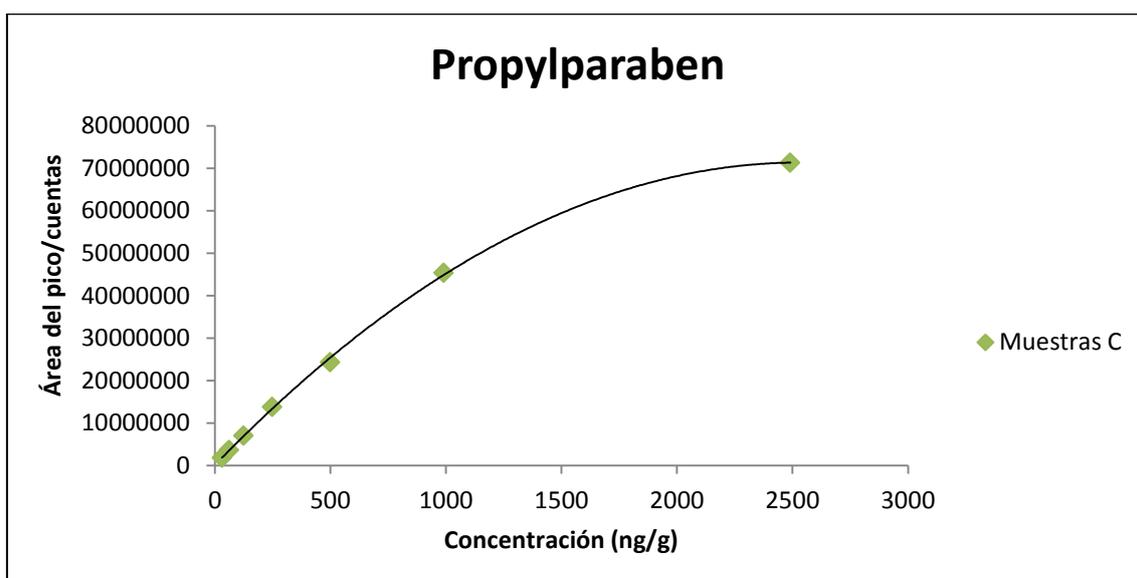
- Analgésico / Antiinflamatorio: Ibuprofen (IBP)

Ibuprofen (IBP)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Respuesta (área del pico)	1897119	5409922	8152711	21242841	43678998	70212104	68028562	73698938
Concentración (ng/g)	30	61	122	243	488	971	1220	2441



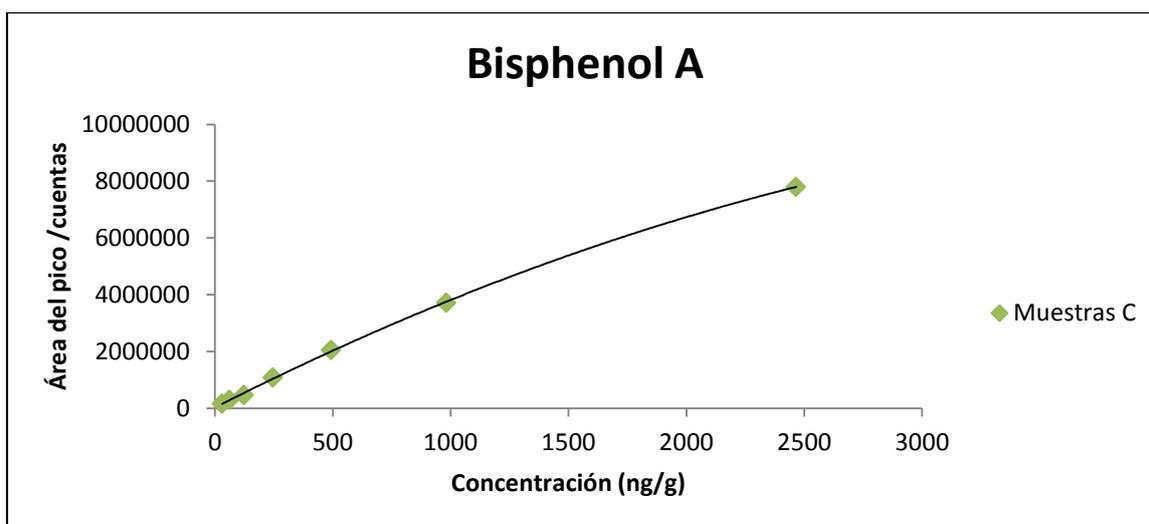
- Parabeno: Propylparaben (PP)

Propylparaben (PP)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Respuesta (área del pico)	1816690	3579041	7003284	13781479	24311463	45373802	47360475	71272169
Concentración (ng/g)	31	62	124	248	498	991	1245	2491



- Disruptor endocrino: Bisphenol A (BPA)

Bisphenol A (BPA)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Respuesta (área del pico)	153758	292252	466734	1081799	2048310	3715264	4046148	7002005
Concentración (ng/g)	31	62	123	246	493	981	1233	2466



La **precisión** es otro parámetro a tener en cuenta y se define como el grado de coincidencia entre los resultados de las muestras individuales de una muestra homogénea. La precisión se expresa como **Desviación Estándar Relativa (RSD)**. La precisión del método debe incluir todas las fuentes de variación desde la preparación de la muestra hasta el redondeo del resultado final de la muestra. La precisión se expresa a través de la ecuación (1).

$$\text{RSD \%} = \frac{\sigma}{\mu} 100 \quad [1]$$

RSD: desviación estándar relativa

σ = Desviación estándar de la población

μ = media aritmética de la población

Se exponen las muestras (réplicas) que se han preparado para el estudio de la precisión del método.

Name	Blank	CC-5A	CC-5B	CC-5C	CC-7A	CC-7B	CC-7C
[] (ppb, ng g ⁻¹)	B	B + 1000	B + 1000	B + 1000	B + 5000	B + 5000	B + 5000
m sludge (g)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
V _{stock solution in acetone} (uL)	0	400 (SS')	400 (SS')	400 (SS')	200 (SS)	200 (SS)	200 (SS)
Pretreatment	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Otro de los parámetros mencionados anteriormente corresponde al *efecto matriz (ME)*. El efecto matriz consiste en una disminución o en un aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes. En otras palabras, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta instrumental.

A la hora de aplicar un método analítico, el efecto matriz se traduce en una diferencia de sensibilidad del mismo cuando se prepara un calibrado en un disolvente frente a uno preparado en el mismo entorno de la muestra. Cabe destacar que el efecto matriz es un efecto indeterminado de las especies que rodean a la muestra que afectan a la sensibilidad, cuando el efecto de una especie es determinado (y aditivo) se habla de interferencia.

A continuación, se exponen las muestras preparadas (réplicas) para estudiar el efecto matriz en nuestras muestras.

Name	ME-5A	ME-5B	ME-5C	ME-7A	ME-7B	ME-7C
[] (ppb, ng g ⁻¹)	1000	1000	1000	5000	5000	5000
m sludge (g)	0	0	0	0	0	0
V _{stock solution in acetone} (uL)	400 (SS')	400 (SS')	400 (SS')	200 (SS)	200 (SS)	200 (SS)
Pretreatment	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Para evaluar el efecto matriz (ME), lo hacemos como porcentaje de supresión o mejora de la señal a través de la ecuación (2).

$$\text{Supresión de la señal (\%)} = 100 - \left(\frac{(\text{área de la matriz} - \text{área del blanco}) \times 100}{\text{área del disolvente}} \right) \quad [2]$$

Otro de los parámetros a estudiar es la *recuperación (PR)* que se mide como la cantidad del analito recuperada en la porción de muestra o muestra adicionada cuando ésta es conducida a través del método analítico completo, y que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo. Se expresa en términos de porcentaje. Las réplicas preparadas (3) para estudiar este parámetro se muestran a continuación.

Name	PR-5A	PR-5B	PR-5C	PR-7A	PR-7B	PR-7C
[] (ppb, ng g-1)	1000	1000	1000	5000	5000	5000
m sludge (g)	0	0	0	0	0	0
V stock solution in acetone (µL)	400 (SS')	400 (SS')	400 (SS')	200 (SS)	200 (SS)	200 (SS)
Pretreatment	N	N	N	N	N	N

La recuperación parcial (medida de la eficacia del proceso de extracción) para cada uno de los contaminantes emergentes se estableció comparando la respuesta del área de los analitos extraídos con los no extraídos. Para calcular la recuperación parcial utilizamos la ecuación (3):

$$PR (\%) = \frac{\text{Área analitos extraídos}}{\text{Área analitos no extraídos}} 100 \quad [3]$$

La *repetibilidad* es uno de los parámetros que también nos interesa estudiar y se define como la coincidencia dentro de un corto periodo para el mismo analista con la misma instrumentación. Las réplicas (n=3) preparadas para el estudio de la repetibilidad intra-diaria e inter-diaria se muestran a continuación.

Name	Rep-5A	Rep-5B	Rep-5C	Rep-7A	Rep-7B	Rep-7C
[] (ppb, ng g-1)	B+1000	B+1000	B+1000	B+5000	B+5000	B+5000
m sludge (g)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
V stock solution in acetone (µL)	400 (SS')	400 (SS')	400 (SS')	200 (SS)	200 (SS)	200 (SS)
Pretreatment	Y	Y	Y	Y	Y	Y

La repetibilidad intra-diaria se realiza de forma continua en el transcurso del día y la repetibilidad inter-diaria se realiza de forma continua en el transcurso de diferentes días. Se calcula como **desviación estándar relativa (%RSD)**, como en la ecuación (4).

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\sigma}{\mu} 100 \quad [4]$$

RSD: desviación estándar relativa

σ = Desviación estándar de la población

μ = media aritmética de la población

Con todo lo mencionado anteriormente, en la siguiente tabla se observan todos los valores obtenidos de los parámetros estudiados.

Tabla 4.3.10. Resultados de los parámetros estudiados

	Contaminantes emergentes (CE)	Precisión (RSD%) (n = 3)		Efecto matriz (ME%) (n = 3)		Recuperación parcial (PR%) (n=3)		Repetibilidad (n=3) (Intra-día %)		Repetibilidad (n= 3) (Inter-día%)	
Parabenos	Methylparaben (MP)	9	12	33	35	40	40	5	7	21	12
	Ethylparaben (EP)	10	9	89	67	44	12	24	39	47	32
	Propylparaben (PP)	6	7	98	97	45	36	12	8	5	18
Disruptores endocrinos	4-tert-octylphenol (OP)	6	18	106	101	28	48	20	43	16	34
	4-nonylphenol (NP)	36	23	111	43	198	31	2	22	135	108
	Bisphenol A (BPA)	14	27	101	99	67	33	28	13	104	39
	Triclosan (TCS)	17	19	116	102	231	411	6	26	27	4
Analgésico/ Antiinflamatorio	Naproxen (NPX)	9	22	96	96	61	21	1	21	68	6
	Ibuprofen (IBP)	13	14	78	100	82	63	19	8	20	2
	Diclofenac (DCF)	11	32	99	100	89	57	4	30	19	1
Neurofármaco	Carbamazepine (CBZ)	10	60	96	86	24	41	3	1	138	66
Hipertensivo	Propranolol (PNL)	7	20	98	97	66	22	15	18	69	6

El **límite de detección (LOD)** es una característica de las pruebas límite y se define como la menor cantidad de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones del experimento indicadas. Así las pruebas de límite que confirman simplemente que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un cierto nivel (*USP 31 <1225>*).

La ICH cuando hay ruido de fondo recomienda que el cálculo del límite de detección puede realizarse con un valor con el cual la relación entre señal y ruido (S/R) es 2:1 ó 3:1.

Para el cálculo del límite de detección se puede realizar de diferentes maneras:

- La determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas.

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \sigma}{m} \quad [5]$$

σ = desviación estándar de la respuesta

m = pendiente de la curva de calibración para linealidad

- El cálculo puede realizarse con un valor en el que la relación entre señal y ruido (S/R) es 3:1.

$$\text{LOD} = \frac{3 * []}{S/N} \quad [6]$$

[] = concentración del analito (ng/g)

S/N = relación señal y ruido

El *límite de cuantificación (LOQ)* se define como la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas (USP31 <1225>).

Al igual que para el límite de detección, el límite de cuantificación se puede calcular de diferentes maneras.

- La determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas.

$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{m} \quad [7]$$

σ = desviación estándar de la respuesta

m = pendiente de la curva de calibración para linealidad

- El cálculo puede realizarse con un valor en el que la relación entre señal y ruido (S/R) es 10:1.

$$\text{LOQ} = \frac{10 * []}{S/N} \quad [8]$$

[] = concentración del analito (ng/g)

S/N = relación señal y ruido

A continuación, se muestran los límites de detección y cuantificación calculados con las **ecuaciones (6) y (8)**. Los resultados obtenidos son bastante aceptables porque los valores obtenidos para la mayoría de los contaminantes emergentes se encuentran igual o por debajo de 100 ng/g.

Tabla 4.3.11. Resultados de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

	Contaminantes emergentes	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Parabenos	Methylparaben (MP)	11	28
	Ethylparaben (EP)	31	104
	Propylparaben (PP)	19	65
Disruptores endocrinos	4-tert-octylphenol (OP)	209	843
	4-nonylphenol (NP)	162	541
	Bisphenol A (BPA)	30	100
	Triclosan (TCS)	16	54
Analgésico/ Antiinflamatorio	Naproxen (NPX)	2	6
	Ibuprofen (IBP)	9	30
	Diclofenac (DCF)	11	36
Neurofármaco	Carbamazepine (CBZ)	177	589
Antihipertensivo	Propranolol (PNL)	No se puede detectar	No se puede cuantificar

Observando los resultados obtenidos de cada contaminante emergente de interés, uno de ellos, el propranolol (PNL), no se ha podido analizar con el método analítico desarrollado. Es un compuesto que se puede analizar por cromatografía de gases (inyección directa) pero a la hora de poder extraerlo con la fibra, no se ha conseguido de manera satisfactoria. La conclusión a la que hemos llegado es que con este método desarrollado no se puede detectar y cuantificar de forma adecuada.

Para finalizar estudiamos **el efecto memoria** “carry over” que encontramos en el análisis de toda la secuencia de muestras.

Este concepto es conocido como el efecto de arrastre, efecto que se traslada de una condición experimental a otra. Algunos resultados de contaminantes se muestran en la siguiente tabla 4.3.4.

Tabla 4.3.12. Resultados del efecto memoria

Contaminante emergente	Área muestra C8	Área muestra NaCl	Respuesta (Área NaCl*100/área C8)
Ibuprofen (IBP)	73698938	199333	0.3
Propylparaben (PP)	71272169	89932	0.1
Naproxen (NPX)	62054104	47715	0.1
Triclosan (TCS)	3131503	12683	0.4
Diclofenac (DCF)	9042656	5142	0.1
Promedio			0.4

Como se puede observar en los resultados obtenidos, al realizar el análisis de esta secuencia de muestras C, el valor promedio debe encontrarse por debajo del 5% y en este caso, tenemos un promedio por debajo de ese porcentaje (0.4%).

5. Aplicaciones

5. APLICACIONES

5.1. Aplicaciones del método analítico a muestras reales

Una vez desarrollado y validado el método de análisis de contaminantes emergentes en muestras de fango mixto espesado (sólido), aplicamos dicho método a muestras reales como pueden ser aquellas muestras de fango que han sufrido un proceso de hidrólisis térmica.

La hidrólisis térmica es el pre-tratamiento que supera la principal limitación de los procesos de digestión anaerobia: la etapa de hidrólisis. Todo ello, resulta en una materia orgánica más biodegradable que genera una mayor cantidad de biogás. Al mismo tiempo, reduce el volumen de lodos y el coste asociado a su manejo. El biosólido resultante es de alta calidad y puede ser utilizado como fertilizante en la producción de alimentos.

Una ventaja importante del proceso de hidrólisis térmica es la mejora en la calidad microbiológica del lodo, variable que determina las posibilidades de uso y valorización posterior. Aunque la digestión anaeróbica permite reducir considerablemente la presencia de agentes patógenos en el lodo, no los elimina completamente. Sin embargo, en la hidrólisis térmica sí se consigue la esterilización completa del lodo secundario, eliminando la presencia de las bacterias E. Coli y Salmonella. La eficiencia de eliminación durante el proceso de los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) es considerable. Los porcentajes de eliminación de estos contaminantes se sitúan entre un 82-100% para la mayoría de compuestos.

Las condiciones de hidrólisis térmica son: $T^a = 180^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Conociendo que la matriz siempre es diferente en cada muestra que queremos analizar, es necesario, realizar de nuevo una calibración del método de análisis. Las muestras a preparar son las siguientes:

Name	A1	A2	A3	A4	A5	A6
[] (ppb, ng g ⁻¹)	B + 31,25	B + 62,5	B + 125	B + 250	B + 500	B + 1000
m sludge (g)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
V _{stock solution in acetone} (μL)	50 (T)	100 (T)	200 (T)	100 (SS')	200 (SS')	400 (SS')
Pretreatment	S	S	S	S	S	S

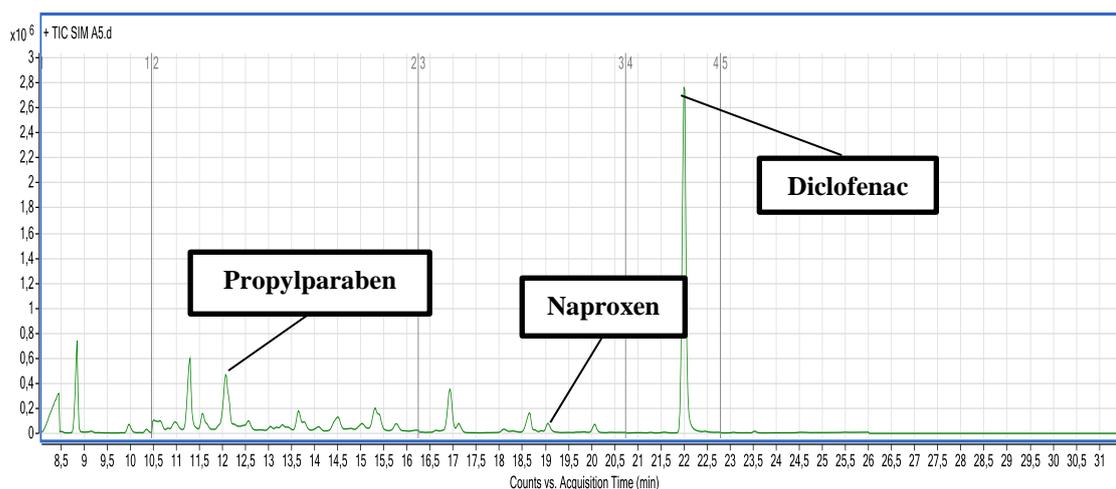


Figura 5.1.1. Cromatograma de la muestra A5 (B + 500 ng/g)

Una vez obtenidas las muestras necesarias para la curva de calibrado (CC), preparamos 3 tipos de muestras de fango mixto espesado (muestras F) y 3 muestras que han sufrido hidrólisis térmica (muestras H). Ninguna de estas muestras que se preparan se encuentran dopadas.

Name	F1	F2	F3
[] (ppb, ng g ⁻¹)	B	B	B
m sludge (g)	0,8	0,8	0,8
Pretreatment	S	S	S

Name	H1	H2	H3
[] (ppb, ng g ⁻¹)	B	B	B
m sludge (g)	0,8	0,8	0,8
Pretreatment	S	S	S

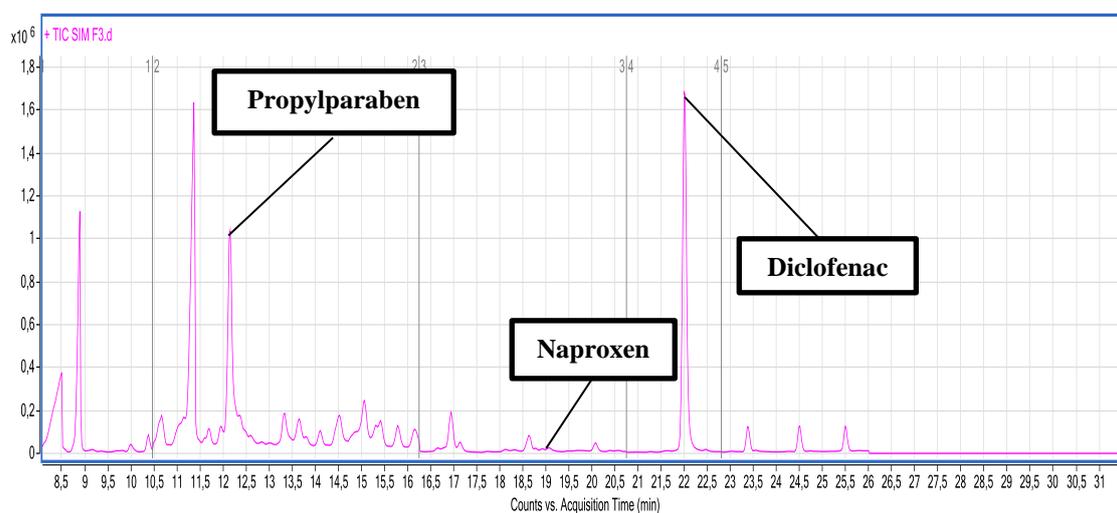


Figura 5.1.2. Cromatograma de la muestra F3

Para el caso de las muestras H (hidrólisis térmica), utilizamos el programa *Agilent MassHunter Qualitative Analysis (for GC)* para identificar alguno de los contaminantes emergentes gracias a 3 de los iones característicos de dichos compuestos.

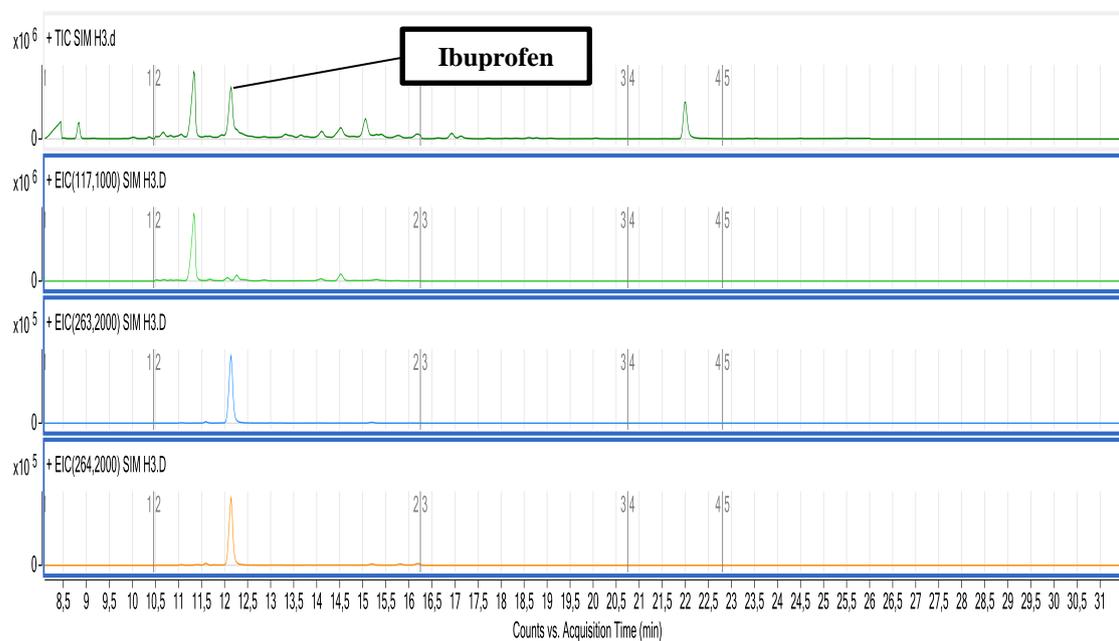


Figura 5.1.3. Cromatograma de la muestra H3

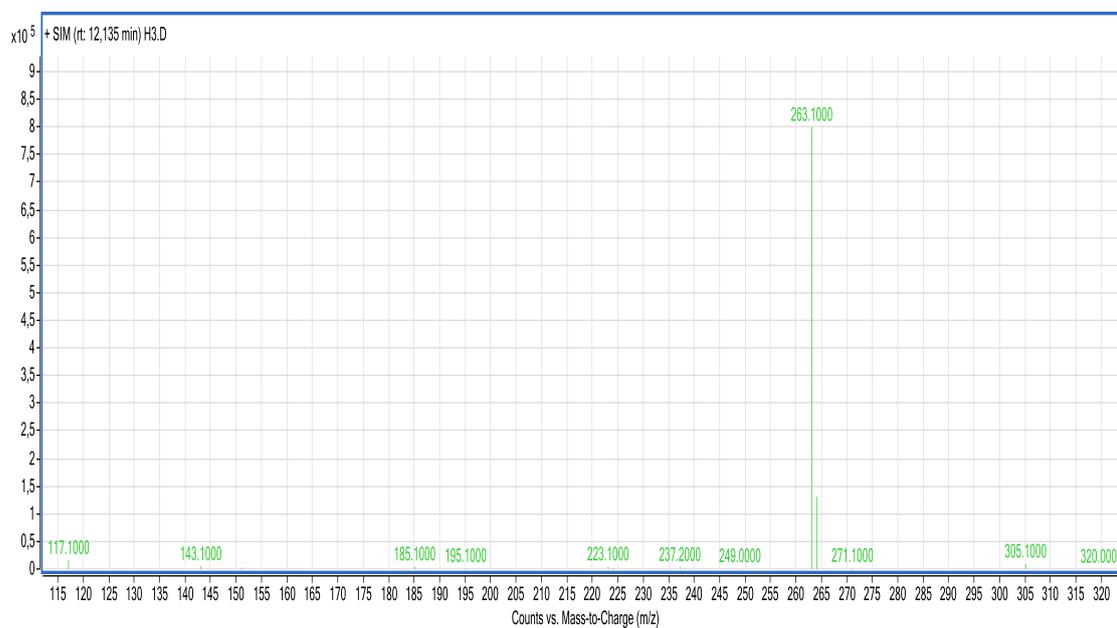


Figura 5.1.4. Espectro de masas del ibuprofen (IBP)

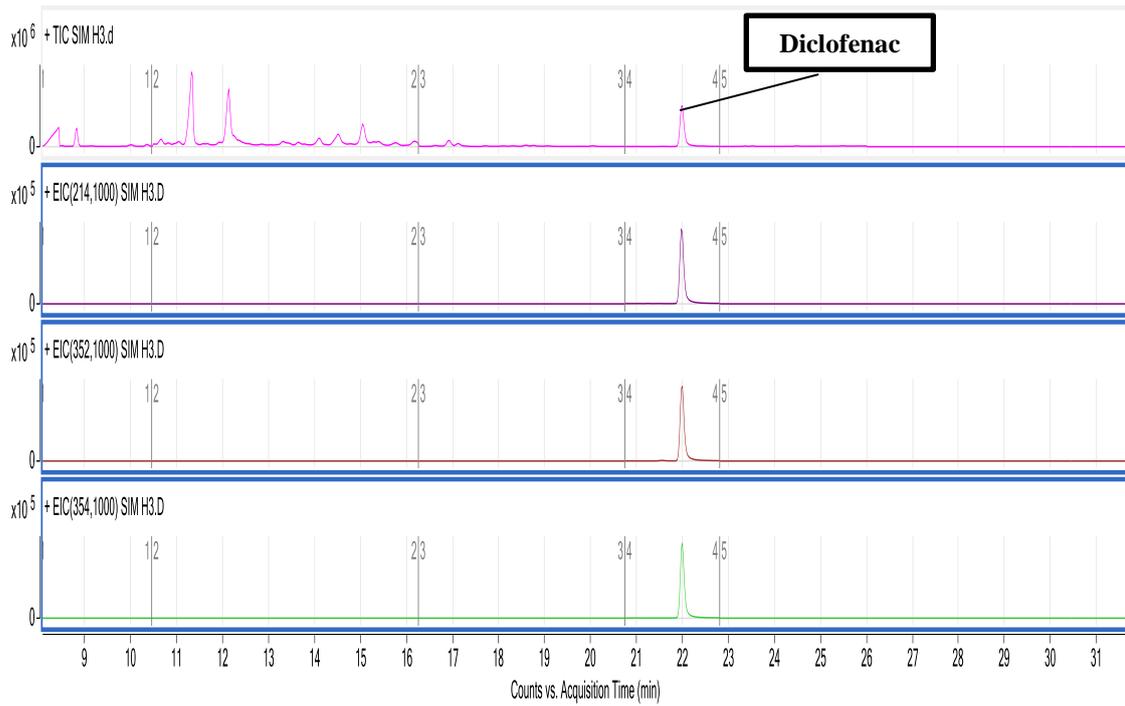


Figura 5.1.5. Cromatograma de la muestra H3

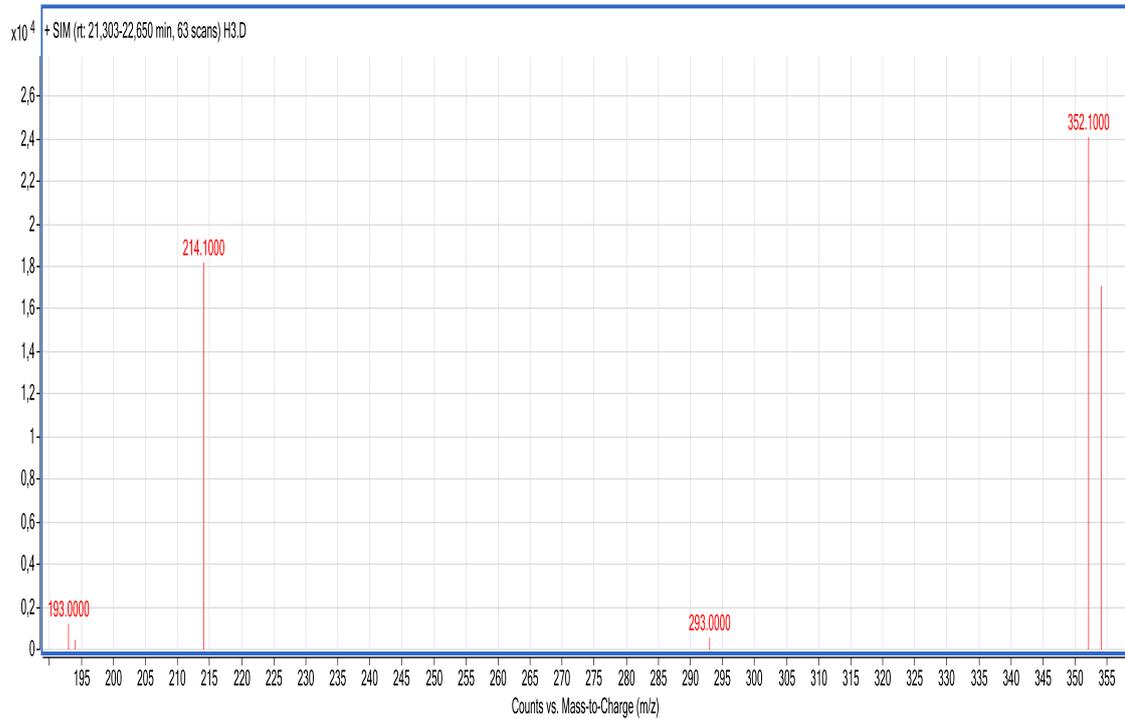
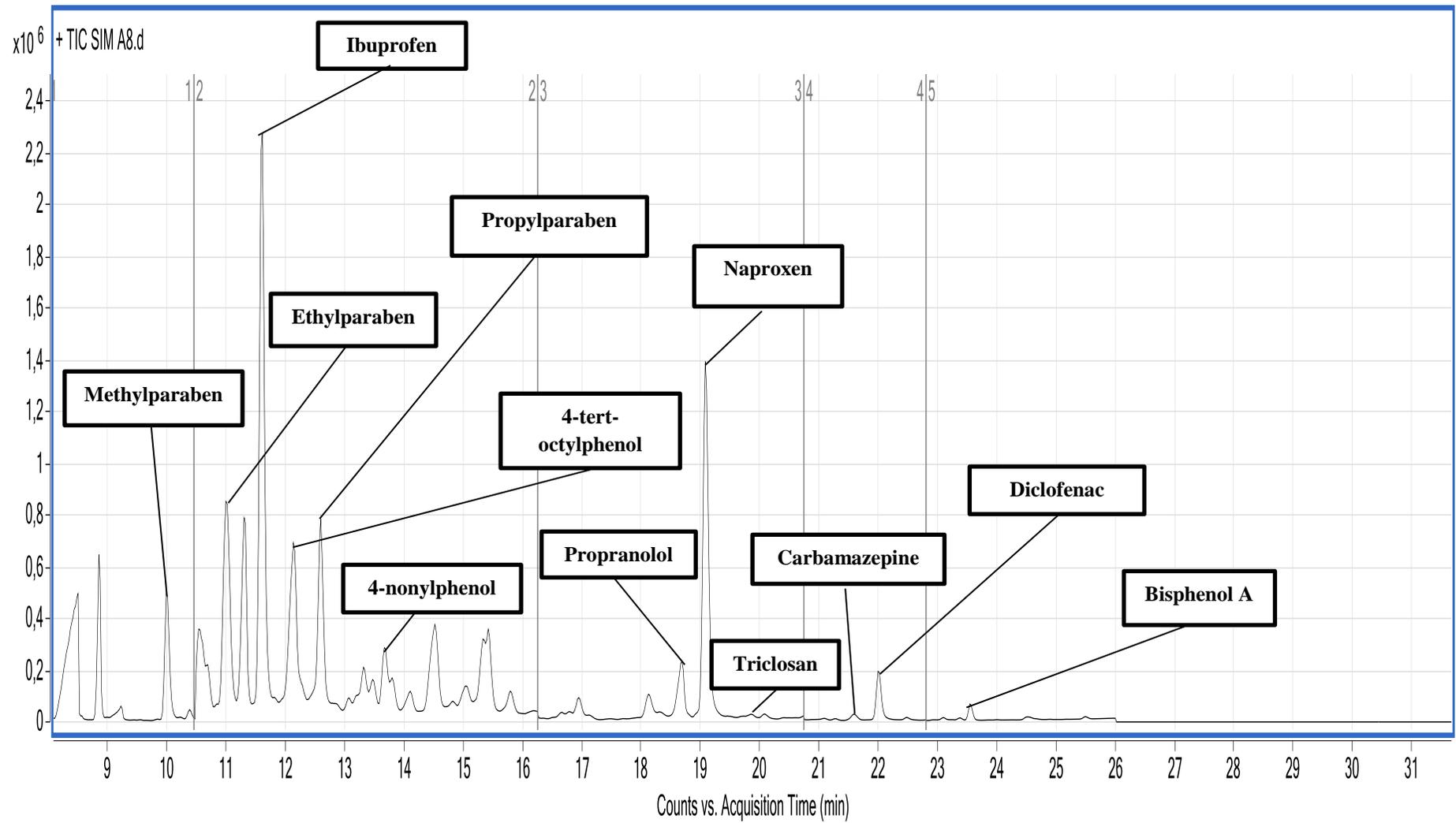


Figura 5.1.6. Espectro de masas del diclofenac (DCF)

Figura 5.1.7. Cromatograma con todos los contaminantes emergentes identificados



6. Resumen y conclusiones

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

6.1. Resumen

Hay un creciente interés sobre los contaminantes emergentes (CE), compuestos con varios orígenes y naturaleza química. Su presencia en el medio ambiente o las consecuencias de dicha presencia no se han tenido en cuenta plenamente hasta hace relativamente poco tiempo, pudiendo causar problemas ambientales y riesgos para la salud. Estos compuestos se propagan en el medio ambiente y se han detectado en aguas subterráneas e incluso en el agua potable. Son compuestos de los que relativamente se conoce poco en cuanto a su presencia, impacto y tratamiento. En la mayoría de los casos, son contaminantes no regulados, pero pueden ser candidatos a una regulación futura dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de control con respecto a su incidencia, siendo susceptibles de investigación.

6.2. Conclusiones

Las conclusiones a las que hemos llegado son las siguientes:

1. Se ha puesto a punto, optimizado y validado un método analítico para identificar y cuantificar once contaminantes emergentes: Methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), ibuprofen (IBP), naproxen (NPX), diclofenac (DCF), carbamazepine (CBZ), 4-tert-octylphenol (OP), 4-nonylphenol (NP), triclosan (TCS) y bisphenol A (BPA).

En el caso del propranolol (PNL), solamente es posible su identificación, mientras que genera problemas para poder cuantificarlo, aunque se puede analizar con la técnica de GC-MS por inyección directa (LS), no se consigue una buena extracción del mismo con la fibra.

2. Teniendo en cuenta las curvas de calibrado obtenidas de las muestras C (muestras sin fango, que se encuentran dopadas y sin pretratamiento), podemos observar que el rango de linealidad se encuentra entre 31,25 y 1000 ng/g. A partir de este valor la gráfica empieza a curvarse hasta llegar a la concentración de 2500 ng/g, alcanzando entonces la saturación de la señal.

En cuanto a los resultados obtenidos del estudio de los demás parámetros, como los correspondientes a la precisión del método analítico (%RSD) deben encontrarse por debajo del 20% y en la mayoría de los casos se pueden cumplir, excepto en algún contaminante emergente (4-nonylphenol (NP) o carbamazepine (CBZ)). En cuanto a los valores de efecto matriz (ME) son muy variados, el intervalo en que se encuentran los valores es 33-116% y con respecto a la recuperación parcial (PR) tenemos valores que oscilan entre 28 y 90%. Los resultados de la repetibilidad (%RSD) se encuentran en la mayoría de los casos por debajo del 20%.

3. El método propuesto alcanza límites de detección (LOD) por debajo de 50 ng/g y de cuantificación (LOQ) inferiores a 100 ng/g para 8 de los contaminantes emergentes. Estos valores son importantes dado que estos compuestos se encuentran en concentraciones realmente muy bajas en este tipo de muestras.

En el caso del propranolol (PNL) no se ha podido detectar ni cuantificar apropiadamente, mientras que para 4-tert-octylphenol (OP), 4-nonylphenol (NP) y carbamazepine (CBZ) el método no se ha podido validar pues no se alcanzan los parámetros de calidad impuestos. Estos contaminantes emergentes se pueden analizar por cromatografía de gases pero la extracción con la fibra no es adecuada para obtener resultados aceptables para las concentraciones en que aparecen en nuestras muestras.

4. La aplicación del método analítico a muestras reales de fango mixto espesado genera buenos resultados. En el caso de las muestras sometidas a hidrólisis térmica (180°C; 30 min), es posible identificar alguno de los contaminantes emergentes de interés, pero es difícil su cuantificación ya que sus concentraciones se encuentran por debajo del LOQ.

5. Este método analítico desarrollado para análisis de contaminantes emergentes en lodos de Estaciones de Depuradoras de Aguas Residuales es adecuado porque nos ha permitido poder detectar y cuantificar casi el 70% de los contaminantes emergentes de interés en concentraciones realmente muy bajas del orden de ppb e incluso de ppt.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFIA

- Barceló, D. & López de Alda, M.J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas Ambientales-CSIC (Barcelona)
- Bedner, M., Maccrehan, W.A. (2006). *Environmental Science and Technology* 40, 516.
- Bledzka, D.; Gromadzinska, J.; Wasowicz, W. (2014). “Parabens. From environmental studies to human health”. *Environ. Int.* 67, 27
- Boehm, E.E.; Maddox, D.N. (1973). “Recent applications for preservatives of pharmaceuticals”. *Manuf. Chem. Aerosol News.* 43, 21
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R. & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239 (1-3), 229-246
- Carballa, M., Omil, F., Ternes, T., Lema, J.M., (2007). Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, 41, 2139-2150
- Comisión Europea, (2012). Proposal for a Directive amending the WFD and EQSD (COM (2011)876)
- Cuadros-Rodríguez, L., Bagur-González, M.G., Sánchez-Viñas, M., Antonio González-Casado, A., Gómez-Sáez, A.M. (2007). Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *Journal of Chromatography A*, 1158, 33-4
- Daniel, J.W. (1986) “Metabolic aspects of antioxidants and preservatives”. *Xenobiotica.* 16, 107

- Daughton, C.G. and Ternes, T.A., (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 6, 907-38
- Daughton, Christian. (2004) Non-regulated water contaminants: emerging research. *En: Environ Impact Asses Rev.* Vol. 24, 711-32
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann,P., (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 442-448
- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, of 23 October 2000, establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Commun.*L327, 22.12.2000, pp. 01-72
- Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council, of 16 December 2008, on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Comm.* L348, 24.12.2008, pp. 84-97
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council, of 12 August 2013, amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off. J. Eur. Union* L226, 24.8.2013, pp. 01-17
- Fent, K., Weston, A., Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *En: Aquat Toxicol.*, 76, 122-159
- Giger, W., Brunner, P.H. & Schaffner, C. (1984). 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from non-ionic surfactants. *Science*, 225, 623–625

- Gros, M., Petrovic, M. & Barcelo, D. (2007). Waste water treatment plants as a path way for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (north east Spain). *Environ. Toxicol. Chem.*, 26 (8).1553-1562
- Jackson, J. & Sutton, R. (2008). Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban waste water, Oakland, CA. *Sci. Total Environ.*, 405, 153-160
- Jelic, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2009). Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Talanta* 80, 363-371
- Kolpin, Dana *et al.* Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. En: *Environmental Science and Technology*. 2002. Vol. 36. p.1202-1211
- Kümmerer, Klaus. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources da review. En: *Chemosphere*, 45, 957-969
- Liebert, NA. (1984). "Final report on the safety assesment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben". *J. Am: Coll Toxicol.* 3, 2097
- Lyche, J.L., Nourizadeh-Lillabadi, R., Karlsson, C., Stavik, B., Berg, V., Skare, J.U., et al. (2011). Natural mixtures of POPs affected body weight regulation and insulin signaling. *Aquat. Toxicol.*, 102, 197-204
- Marugan, R. van Grieken, A.E. Cassano, O.M. Alfano, (2008) *Appl. Catal. B- Environ.* 85, 48-60. (2008)
- Pal, A., Gin, K.Y. & Reinhard, M. (2010). Impact of emerging organic contaminants on fresh water resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science Total Environment.*, 408 (24), 6062-6069

- Parades, L., (2013). Eliminación de compuestos farmacéuticos y de cuidado personal (CFCPs) en efluentes anaerobios empleando sistemas biológicos de filtración/adsorción. Universidad de Santiago de Compostela
- Pombo, M., Castro, L. (2002). Unidad de Endocrinología Pediátrica, Crecimiento y Adolescencia. Departamento de Pediatría. Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. XXVII Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica. Gac Sanit. 16: 250-6.
- Pouillot, A.; Polla, B.S.; Polla, AS. (2006). “Conservateurs en cosmetology mise au point sur les parabenes”. J. Mèd. Esthèt. Chir. Dermatol. 33, 187
- Roig, J., (2014) Eliminación de contaminantes emergentes mediante Humedales Artificiales como sistema alternativo o complementario a un tratamiento de aguas convencional. Universidad Politécnica de Valencia
- Soni, M.G.; Carabin, I.G.; Burdock, G.A. (2005). “Safety assessment of esters of p-hidroxybenzoic acid (parabens)”. Food Chem. Toxicol. 43, 985
- Validación de métodos analíticos (2002). Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. Anexo 3, informe 36
- Virkutyte, J., Varma, R.S. & Jegatheesan, V. (2010). Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater, IWA Publishing, London
- Watanabe, N.; *et al.* (2010). Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manure forage fields. En: Environmental Science and Technology. Vol. 44. p. 6591-6600

8. Anexos

8. ANEXOS

8.1. Anexo I

Para poder realizar de forma correcta la identificación y análisis de los contaminantes emergentes de interés, ha sido necesario realizar varias pruebas estudiando condiciones diferentes para conocer cuáles son las correctas y conseguir la mejor identificación y análisis de dichos contaminantes de interés.

A continuación, se indican todas las pruebas que se han llevado a cabo, indicando las muestras que se han preparado en cada caso.

- **Round 1**

Este serie de muestras que se preparan sirven para conocer cuál es la mejor técnica de extracción de los analitos comparando las técnicas MAE (extracción asistida por microondas) y UAE (extracción asistida por ultrasonidos). También, utilizamos dos disolventes de extracción con una pequeña variación que es un 5% de MeOH, y una etapa de limpieza (clean-up) utilizando diferentes tipos de adsorbente.

Sample	Freeze-dried sludge mass (g)	SS' stock solution (uL)	Extraction solvent	Extraction technique	Clean-up adsorbent / mass (mg)
1	0.8	600	pH 9 water	MAE	-
2	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	MAE	Al ₂ O ₃ /100
3	0.8	600	pH 9 water	MAE	SiO ₂ /100
4	0.8	600	pH 9 water	MAE	C ₁₈ /100
5	0.8	600	pH 9 water	UAE	-
6	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	UAE	Al ₂ O ₃ /100
7	0.8	600	pH 9 water	UAE	SiO ₂ /100
8	0.8	600	pH 9 water	UAE	C ₁₈ /100
9	0.8	600	pH 9 water	UAE	Hexano (5 mL)
10	0.8	600	pH 9 water	UAE	Hexano (5 mL)
1'	0.8	600	pH 9 water	UAE	SiO ₂ /100

- **Round 2**

En esta ronda de preparación de muestras, estudiando los resultados obtenidos en **round 1**, decidimos modificar uno de los parámetros a estudio, utilizar como adsorbente en la etapa de limpieza, la alúmina (Al_2O_3). Lo que hacemos es variar la cantidad de adsorbente utilizado. El resto de las comparaciones se mantienen como en el caso anterior.

Sample	Freeze-dried sludge mass (g)	SS' stock solution (uL)	Extraction solvent	Extraction technique	Clean-up adsorbent / mass (mg)	In-situ cleanup?
A	0.8	600	pH 9 water	MAE	-	-
B	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	MAE	-	-
C	0.8	600	pH 9 water	MAE	Al_2O_3 / 500	No
D	0.8	600	pH 9 water	MAE	Al_2O_3 / 100	Yes
X	-	600	pH 9 water	MAE	-	-
B'	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	UAE	-	-
C'	0.8	600	pH 9 water	UAE	Al_2O_3 / 500	No
D'	0.8	600	pH 9 water	UAE	Al_2O_3 / 100	Yes
X'	-		pH 9 water	UAE	-	-

- **Round 3**

En este caso, seguimos trabajando modificando el tipo y las cantidades de adsorbente para la etapa de limpieza. Trabajamos con alúmina (Al_2O_3), silicagel (SiO_2) y hexano.

Sample	Freeze-dried sludge mass (g)	SS' stock solution (uL)	Extracti on solvent	Extraction technique	# cycles	Clean-up adsorbent / mass (mg)	In-situ cleanup?	Filtration method
y	-	600	-	-	-	-	-	v
0	0.8	-	pH 9 water	MAE	2	SiO_2 / 500	Yes	v
a	0.8	600	pH 9 water	MAE	2	SiO_2 / 500	Yes	v
b	0.8	600	5% MeOH/ pH 9 water	MAE	2	SiO_2 / 500	Yes	v
c	0.8	600	pH 9 water	MAE	2	Al_2O_3 / 500	Yes	v
d	0.8	600	pH 9 water	MAE	1	SiO_2 / 500	Yes	v
e	0.8	600	5% MeOH/ pH 9 water	MAE	1	SiO_2 / 500	Yes	v
f	0.8	600	pH 9 water	MAE	1	Al_2O_3 / 500	Yes	v
g	0.8	600	pH 9 water	MAE	1	Hex / 5 mL	No	v
h	0.8	600	pH 9 water	MAE	1	Hex / 2x5 mL	No	v
i	0.8	600	pH 9 water	MAE	1	SiO_2 / 100	Yes	v
j	0.8	600	pH 9 water	MAE	1	SiO_2 / 500	No	v
k	0.8	600	pH 9 water	UAE	2	SiO_2 / 500	Yes	v

- **Round 4**

En esta serie de preparación de muestras, la etapa de filtración se realiza en la mayoría de los casos con filtros de jeringa (0,7 μm tamaño de poro y 25 mm de diámetro). El resto de las condiciones son semejantes a los casos anteriores.

Las muestras se analizaron en el LTI (laboratorio de técnicas instrumentales) de la Universidad de Valladolid.

Sample	Freeze-dried sludge mass (g)	SS' stock solution (uL)	Extraction solvent	Extraction technique	# cycles	Cleanup adsorbent /mass (mg)	In-situ cleanup?	Filtration method
I	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	MAE	1	Al ₂ O ₃ / 100	Y	S
II	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	MAE	1	Al ₂ O ₃ / 500	Y	S
III	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	MAE	1	Al ₂ O ₃ / 1000	Y	S
IV	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	MAE	1	Al ₂ O ₃ / 100	N	S
V	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	UAE	2	Al ₂ O ₃ / 100	Y	S
VI	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	UAE	2	Al ₂ O ₃ / 100	Y	S
VII	0.8	600	5% MeOH/pH 9 water	UAE	2	Al ₂ O ₃ / 100	Y	V
Sludge solid phase	0.8	-	5% MeOH/pH 9 water	UAE	2	Al ₂ O ₃ / 100	Y	S