



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Estabilidad de contaminantes emergentes en la
obtención de hidrolizados de biomasa algal**

Autora: Zoraida Arnanz Manso

Tutores: Juan José Jiménez Sevilla

Rebeca López Serna

Año 2023

ÍNDICE

1 RESUMEN	3
2 ABSTRACT	4
3 INTRODUCCIÓN	5
3.1 Contaminantes farmacéuticos en aguas residuales.....	5
3.2 Mecanismos de eliminación y transporte de fármacos en sistemas de agua	8
3.2.1 Fotodegradación	8
3.2.2 Hidrólisis.....	10
3.2.3 Adsorción y/o desorción	11
3.2.4 Biodegradación	13
3.3 Métodos basados en microalgas para la eliminación de antibióticos en aguas residuales	14
3.3.1 Inhibición de microalgas en presencia de antibióticos.....	15
3.3.2 Factores que afectan al rendimiento de eliminación de antibióticos por microalgas.....	15
3.4 Mecanismos de eliminación de antibióticos mediante el uso de microalgas.....	18
3.4.1 Adsorción	18
3.4.2 Acumulación	19
3.4.3 Biodegradación	19
3.4.4 Fotodegradación	20
3.4.5 Hidrólisis.....	20
3.5 CE en purines	21
3.5.1 Los productos de medicamentos veterinarios (PVM) y biocidas en el estiércol	21
3.5.2 Antibióticos en dos sistemas de tratamiento de aguas residuales porcinas	29
3.6 Valorización de subproductos	34
3.6.1 Hidrólisis Enzimática	35
3.7 Métodos de análisis	38
3.7.1 Extracción sólido-líquido (SLE)	39

3.7.2	Extracción en fase sólida (SPE).....	39
3.7.3	Análisis Cromatográfico.....	39
3.8	Compuestos estudiados.....	40
4	OBJETIVOS	47
5	EXPERIMENTAL	48
5.1	Materiales, reactivos e instrumentación.....	48
5.2	Preparación de una disolución multipatrón.....	49
5.3	Estabilidad durante la hidrólisis.....	49
5.3.1	Obtención de los hidrolizados enzimáticos.....	49
5.3.2	Obtención de los hidrolizados químicos.....	50
5.3.3	Cuantificación de los contaminantes en los hidrolizados químicos.....	52
5.4	Ensayos de extracción sobre hidrolizados enzimáticos.....	53
5.4.1	Preparación de muestras de biomasa algal liofilizada.....	53
5.4.2	Inyección directa (ID) de las muestras.....	53
5.4.3	Combinación de extracción en fase sólida (SPE) dispersiva con extracción en fase sólida clásica.....	54
5.5	Determinación mediante UHPLC/MS-MS.....	56
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
6.1	Estabilidad de contaminantes emergentes.....	60
6.1.1	Estabilidad en hidrolizados enzimáticos.....	60
6.1.2	Estabilidad en hidrolizados químicos.....	68
6.2	Análisis en presencia de biomasa algal.....	79
7	CONCLUSIONES	83
8	BIBLIOGRAFÍA	84
9	LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	91
9.1	Lista de Tablas.....	91
9.2	Lista de Figuras.....	92

1 RESUMEN

En la actualidad, se está experimentando diferentes configuraciones y tipos de fotobiorreactores con biomasa algal para la depuración de aguas residuales urbanas y ganaderas, en particular de granjas porcinas. Para rentabilizar económicamente el tratamiento se está estudiando la obtención de productos de valor añadido (principalmente proteínas y carbohidratos) mediante procesos de hidrólisis a partir de la biomasa algal crecida en los fotobiorreactores. Dado que las aguas residuales contienen antibióticos de uso veterinario, además de otros contaminantes emergentes, es recomendable conocer la estabilidad de los microcontaminantes acumulados en la biomasa durante los procesos de hidrólisis para evaluar la calidad del producto añadido. Así se ha evaluado la estabilidad de 22 microcontaminantes durante un proceso de hidrólisis enzimática mediante agitación ultrasónica, comprobándose después de una prueba estadística que los microcontaminantes son estables. Se han realizado también hidrólisis químicas a elevada temperatura, en medio ácido y básico. En este caso la mayoría de los microcontaminantes fueron totalmente degradados. Sólo compuestos como danofloxacina y sulfatiazol mostraban estabilidad en este medio. Para los compuestos no degradados se ha determinado su concentración residual mediante un calibrado matriz patrón. Todos los ensayos han sido inyectados en un equipo de cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem.

2 ABSTRACT

Currently, different configurations and types of photobioreactors with algal biomass are being tested for the treatment of urban and livestock wastewater, particularly from pig farms. In order to make the treatment economically profitable, the production of value-added products (mainly proteins and carbohydrates) by hydrolysis processes from the algal biomass grown in the photobioreactors is being studied. Given that wastewater contains antibiotics for veterinary use, as well as other emerging pollutants, it is advisable to know the stability of the micropollutants accumulated in the biomass during the hydrolysis processes in order to evaluate the quality of the added product. Thus, the stability of 22 micropollutants was evaluated during an enzymatic hydrolysis process using ultrasonic agitation, proving after a statistical test that the micropollutants are stable. Chemical hydrolysis has also been carried out at high temperature, in acidic and basic media. In this case most of the micropollutants were completely degraded. Only compounds such as danofloxacin and sulfathiazole showed stability in this medium. For the non-degraded compounds, their residual concentration was determined by matrix standard calibration. All assays were injected in an ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

3 INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes (CE) son aquellos compuestos que se encuentran en el medio ambiente a nivel de trazas, que generalmente no se controlan pero que se sabe o tienen el potencial de provocar efectos adversos para la salud humana y/o ecológica. (Bexfield et al., 2019). Los CE pueden tener origen natural, como hormonas esteroides (estrógenos y testosterona) o ser sustancias antropogénicas como productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCP), esteroides, drogas de abuso, etc. Muchos estudios han demostrado que la presencia de CE es perjudicial al ecosistema, cuyos efectos secundarios incluyen toxicidad, bacterias patógenas resistentes a los antibióticos, genotoxicidad y efectos de alteración endocrina. (Tamura et al., 2017)

3.1 Contaminantes farmacéuticos en aguas residuales

Estos contaminantes farmacéuticos (sustancias antropogénicas) son consumidos tanto por los animales como por el ser humano para apoyar la salud diaria y tratar enfermedades. Tras su consumo pueden llegar al medio acuático directamente a través del vertido de aguas residuales sin tratar en masas de agua, o indirectamente a través de aguas residuales tratadas como consecuencia de su eliminación incompleta en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). En este tipo de depuradas se controla las condiciones de tratamiento (como puede ser el tiempo de residencia hidráulica y la tasa de carga orgánica) y se tienen en cuenta las ambientales (luz solar, temperatura, condiciones redox y pH). En ellas hay varios procesos que controlan la aparición y el destino de los productos farmacéuticos (PF) en los sistemas de agua, incluida la adsorción, fotodegradación, hidrólisis y biodegradación (Figura 1). Sin embargo, la mayor parte de ellos no se pueden eliminar porque son resistentes a la degradación ambiental y debido a sus propiedades fisicoquímicas a largo plazo incluso a bajas concentraciones puede dañar los organismos acuáticos como bacterias, algas, peces y plantas. Esto desencadena su acumulación en los tejidos e inhibición de la proliferación celular.

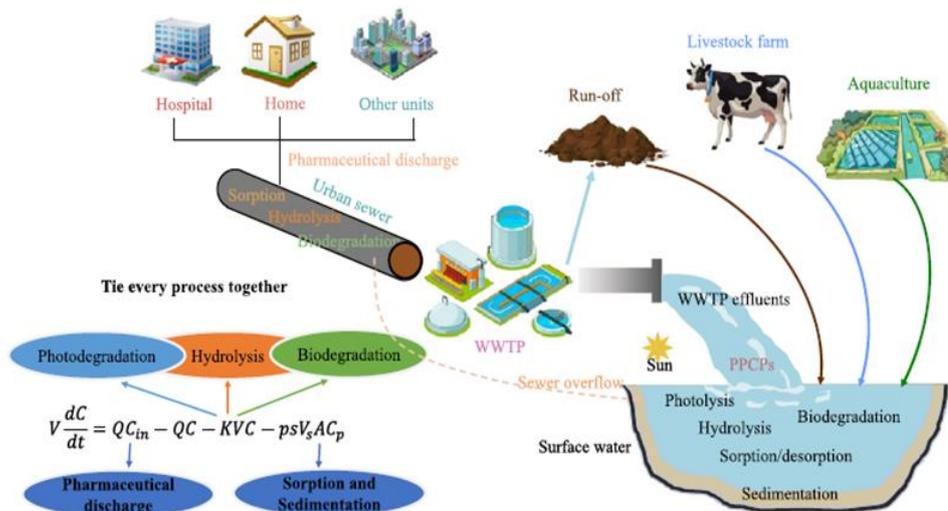


Figura 1: En este esquema se observa que, las aguas residuales domésticas, las industrias y los hospitales son las principales fuentes de productos farmacéuticos para el sistema de alcantarillado urbano.

Una vez que se liberan en el medio ambiente acuático, se someten a una variedad de procesos de transformación y degradación abióticos y bióticos que dan forma al destino de los PF en las aguas. En estos procesos, la fotodegradación, hidrólisis y biodegradación son los mecanismos clave involucrados en la atenuación de estos compuestos (Khan et al., 2020). Además, muchos PF son hidrófobos y tienden a adsorberse en sólidos suspendidos. Por lo tanto, el destino y el transporte de los productos farmacéuticos adsorbidos en los sedimentos están determinados por la dinámica de los sedimentos, incluida la sedimentación, la resuspensión y otros procesos tanto en la infraestructura de alcantarillado como en las aguas naturales. Los sólidos en suspensión, junto con los productos químicos adsorbidos, pueden asentarse en el fondo de alcantarillados o ríos, formando así depósitos de sedimentos contaminados, especialmente durante los periodos de clima seco cuando la velocidad del agua que fluye es baja.

La simulación del comportamiento de los PF en aguas ambientales es la base de la evaluación de riesgos ambientales en escalas espaciales más grandes. Actualmente se han desarrollado modelos lineales simples de PF en sistemas de agua, que asignan factores de producción y reducción para estimar los flujos máxicos en la EDAR. Sin embargo, estos modelos no logran reproducir la dinámica ambiental. Coutu et al.,

2016 desarrolló un modelo estocástico integrado utilizando la tasa de excreción de masa específica de compuesto con un modelo de calidad/transporte de agua para describir su movimiento a través de una red de alcantarillado hasta la entrada de una EDAR.

El ciclo de vida de los PF en aguas ambientales, que a menudo incluye ríos con un largo recorrido o alcantarillas urbanas, se puede dividir en una serie de reactores acoplados y completamente mixtos que presentan un modelo de cascada (Chapra, 2008) (Figura 2). De esta manera, las concentraciones de los productos farmacéuticos en cada reactor de alcance (en una serie de reactores se clasifican en $C_0, C_1, \dots, C_i, \dots, C_{norte}$) se puede representar en función del caudal del río. (Chen et al., 2020)

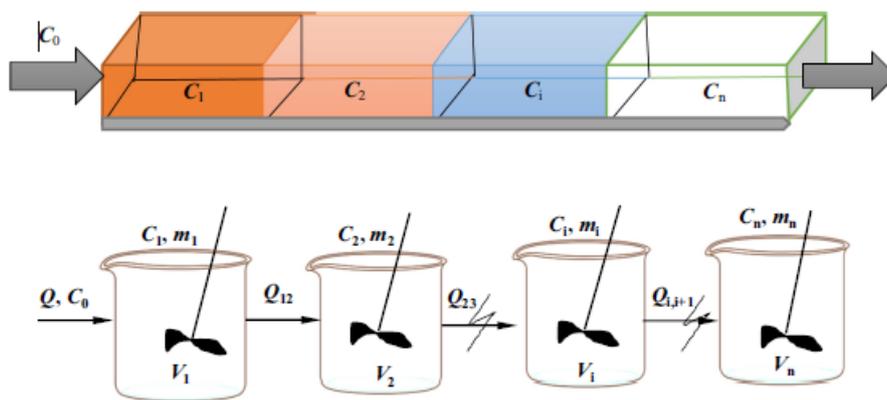


Figura 2: Esquema del modelo farmacéutico en aguas ambientales vistas como una serie de reactores acoplados completamente bien mezclados.

Para cualquier reactor, la ecuación de balance de masa se expresa como (Chapra, 2008; Droppo et al., 2011; Yin et al., 2016):

$$V_i \frac{dC_i}{dt} = Q_{i-1} C_{i-1} - Q_{i-1} C_i - (k_{pi} + k_{bi} + k_{hi}) V_i C_i - v_{si} F_{pi} C_i A_i$$

Donde C_i es la concentración farmacéutica desconocida del reactor expresado en mg/L, C_{i-1} es la concentración conocida en la entrada (influyente) del flujo del reactor vecino en mg/L, V_i es el volumen del reactor en m^3 , A_i es el área del interfaz agua-sedimento del reactor i en m^2 , t es tiempo en s, Q_{i-1} es la constante de entrada del

reactor en m^3/s , v_{si} es la constante de sedimentación que representa la transferencia de masa desde el agua suprayacente a los sedimentos del fondo en el reactor en m/s , k_{pi} , k_{bi} and k_{hi} representa la constante de fotodegradación del primer orden, la constante de biodegradación y constante de hidrólisis en el reactor i y F_{pi} es la fracción del contaminante total que se encuentra en forma de partículas, que se puede determinar mediante la siguiente expresión:

$$F_{pi} = \frac{k_{di}m_i}{1 + k_{di}m_i}$$

Donde k_{di} es el coeficiente de reparto entre las partículas y el agua asociado con los procesos de sorción farmacéutica en el reactor en L/mg y m_i es la concentración de sedimentos en suspensión en el reactor en mg/L .

3.2 Mecanismos de eliminación y transporte de fármacos en sistemas de agua

3.2.1 Fotodegradación

La fotodegradación es un importante proceso de degradación abiótica de los PF impulsado por la radiación solar en el medio ambiente acuático. Estos pueden contener uno o más grupos funcionales químicos, como anillos aromáticos, sistemas p-conjugados, heteroátomos y grupo nitro, fenólicos y naftilo, que pueden absorber la radiación solar (290-800 nm) y son susceptibles a la degradación fotolítica (Fatta-Kassinou et al., 2011). La radiación solar transforma un PF original en otras moléculas al romper los enlaces covalentes, típicamente, la reacción da como resultado compuestos más biodegradables e hidrolizables (Wilkinson et al., 2017). Se puede clasificar en fotodegradación directa (que se produce por la adsorción directa de la radiación solar) y la fotodegradación indirecta (que se produce por la adsorción indirecta de la radiación solar) a través de reacciones con productos intermedios reactivos producidos fotoquímicamente (PPRI)

Los PF pueden degradarse tanto por fotodegradación directa como indirecta. Cualquier cambio en la calidad fisicoquímica del agua afecta a las constantes cinéticas de los procesos fotoquímicos y la eliminación final de los microcontaminantes.

En la Tabla 1 se enumera los coeficientes de fotodegradación en diferentes condiciones ambientales. Estas son significativamente diferentes debido a que dependen de las condiciones ambientales ya existentes, así como el tipo y la estructura del fármaco específico. Las vidas medias asociadas varían de minutos a días comparándolo con las fluoroquinolonas y tetraciclinas respectivamente. Además, en las fluoroquinolonas el tiempo de vida medio es distinguible para aguas dulces como puras. Esto se debe a las características del agua, como el pH y la presencia de constituyentes específicos en el agua dulce como ácido húmico y nitrato. Además, el pH en agua dulce se acerca más al punto isoeléctrico, por lo que se degradaría más fácilmente que en el agua pura. También se observó que la interacción de los constituyentes en el agua dulce causa una absorción competitiva de fotones en diferentes espectros de absorción.

Tabla 1: Coeficientes de fotodegradación de fármacos seleccionados en el medio ambiente

Clase farmacéutica	Compuesto	Condición ambiental	k_p ($\times 10^{-3}$ h^{-1})	Tiempo de vida media	Referencias
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Agua desionizada, luz simulada (0,2 mW/cm ²)	1,8	16 días	Pouliquen et al., 2007
		Agua dulce, luz simulada	5,7	5 días	
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	Agua pura, simulación de luz solar (290-420 nm, 0,83mW/cm ²)	1818	22,9 min	Ge et al., 2010
		Agua dulce, simulación de luz solar	2158	19,3 min	
		Agua dulce, simulación de luz solar en agua dulce (50 mV/cm ²)	19,43	0,04 horas	
	Danofloxacina, enrofloxacina	Agua purificada mili-Q a pH 5,7 y 9, simulación de luz solar	900; 4620; 1823	46,2; 9,0; 22,8 min	Vasconcelos et al., 2009
		Agua pura, simulación de luz solar	1741; 2665	23,9; 15,6 min	Ge et al., 2010
	Agua dulce, simulación de luz solar	2038; 854	20,4; 48,7 min		
Diaminopiridina	Trimetoprima	Simulación de luz solar en efluentes de EDAR (76,5 mW/cm ²)	1,8	3,85 horas	Ryan et al., 2011
		Simulación de luz solar en agua ultrapurificada	0,03	23,1 horas	

3.2.2 Hidrólisis

La hidrólisis se engloba en el mismo grupo que la fotodegradación, a diferencia de que en este proceso afecta a los PF polares. Estas reacciones comúnmente son catalizadas por iones hidrógeno o hidróxido. La hidrólisis depende directamente del pH debido a que las concentraciones de estos iones varían con el pH del agua. Durante la reacción, un grupo hidroxilo reemplaza a otro grupo químico en la molécula. Solo afecta a los grupos funcionales polares ya que, en grupos funcionales como alcanos, alquenos, bencenos, bifenilos, etc., son inertes.

En la Tabla 2 se muestra los coeficientes de hidrólisis de PF seleccionados en el medio ambiente. Aunque los datos relacionados con la estabilidad hidrolítica son limitados, la degradación por hidrólisis es un proceso crítico para ciertos antibióticos que, por lo tanto, son inestables en agua. Las sulfonamidas bajo condiciones ambientales típicas son hidrolíticamente estables y poseen una vida media larga. La hidrólisis de la tilosina se observó a pH 2 pero no a pH 5,7 o 9 debido a que son bases débiles e inestables en soluciones ácidas y la de oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina depende de la temperatura y pH. Por lo contrario, las fluoroquinolonas y la trimetoprima no se degradan.

Tabla 2: Coeficientes de hidrólisis de fármacos seleccionados en el medio ambiente

Clase farmacéutica	Compuesto	Matriz	k_h (h^{-1})	Tiempo de vida medio (días)	Referencias
Tetraciclina	Clortetraciclina	Agua desionizada pH 7 22°C	0,043	0,66	Loftin et al., 2008
	Tetraciclina	Agua desionizada pH 7 22°C	0,0059	4,83	
		Agua desionizada pH 7 22°C	0,016	1,7	
	Oxitetraciclina	Agua desionizada pH 7-8,5	0,00048	59	Pouliquen et al., 2007
		Agua dulce pH 7,0-8,5	0,00056	51	
Sulfonamidas	Sulfatiazol	Agua desionizada pH 7 22°C	N/A	Sin degradación en 21 días	Loftin et al., 2008
Diaminopirimidina	Trimetoprima	Agua desionizada pH 9 22°C	N/A	Sin degradación en 21 días	
Macrólidos	Tilosina	Agua desionizada pH 7 22°C	N/A	Sin degradación en 21 días	
		Agua desionizada pH 2 22°C	> 0,116	< 0,25	
		Agua desionizada pH 11 22°C	0,017	1,6	

3.2.3 Adsorción y/o desorción

Tanto la adsorción como la desorción son los principales responsables de la partición de un PF entre la fase de agua y sedimento, e influye en la biodisponibilidad del compuesto en la biota acuática (Aristilde & Sposito, 2010). Como la mayoría de estos pueden comportarse como ácidos o bases débiles o Zwitteron además de depender de la hidrofobicidad puede ser impulsada por otros procesos de unión, como el intercambio iónico, los puentes de cationes, la formación de complejos superficiales y los enlaces de hidrógeno. Los parámetros de adsorción y velocidad de reacción identificados se pueden incorporar en un marco de modelado conciso para evaluar y predecir perfiles de concentración longitudinales de productos farmacéuticos en los sistemas naturales y artificiales, particularmente cuando se descargan grandes cantidades durante eventos anormales como un brote de virus.

La adsorción es un proceso crítico en el cuál se elimina los PF de la fase acuosa por lo contrario en la desorción se lleva a cabo el desprendimiento de compuestos de partículas (Leal et al., 2013). Esto ocurre en respuesta a cambios de pH, la ionización del adsorbato y las cargas superficiales de la matriz (mineral, arcilloso, suelo). Normalmente se alcanza un estado de equilibrio, con excepción cuando los sedimentos están expuestos a un flujo significativo.

Como se muestra en la ecuación 2, el coeficiente de partición k_d es también un parámetro ampliamente utilizado para cuantificar el proceso de sorción. Este describe la relación de concentración de los compuestos objetivo entre el sedimento y la fase acuosa en equilibrio (Franco & Trapp, 2008). Además, existe el coeficiente de partición de carbono orgánico normalizado (k_{oc}), el cuál describe la proporción de un PF al porcentaje de carbono orgánico presente. Ambos miden la afinidad de una sustancia con sedimentos o biosólidos.

En la Tabla 3 enumero los coeficientes de adsorción de los PF en agua natural que contiene partículas arenosas, arcillosas y en sistemas de agua urbana con biosólidos (lodos activados o digeridos). Aquellos PF con un k_d y k_{oc} alto conlleva una mayor tendencia a dividirse en los sedimentos o biosólidos.

Tabla 3: Coeficientes de adsorción de fármacos seleccionados en el medio ambiente

Clase farmacéutica	Compuesto	Matriz ambiental	K _d (L/kg)	K _{oc} (L/kg)	Referencias
Tetraciclina	Oxitetraciclina	Arena arcillosa	417-1026	42506-93317	Sarmah et al., 2006; Tolls, 2001
		Lodo primario y secundario de EDAR	3020	8160	Thiele-Bruhn, 2003
	Tetraciclina	arcilla, franco arenoso	1147-2370	N.A	Sarmah et al., 2006; Tolls, 2001
	clortetraciclina	franco arcilloso	1280-2386	N.A	Sarmah et al., 2006
	Doxiciclina	franco arenoso	431-11908	N.A	Álvarez-Esmorís et al., 2020
Sulfonamidas	Sulfadiazina	arcilla, fracción arenosa	1,4-2,8	37-125	Sarmah et al., 2006
	Sulfatiazol	franco arenoso	4,9	200	Tolls, 2001
	Sulfadimidina	arena, franco arenoso	0,9-3,5	80-170	Sarmah et al., 2006
Fluoroquinolonas	Enrofloxacina	franco arcilloso	260-5612	16510-99980	Sarmah et al., 2006
		franco arenoso	427	61000	
	Ciprofloxacina	Lodo primario y secundario de EDAR	417	1127	Sarmah et al., 2006; Tolls, 2001
		flurisol céntrico	430	61000	
Diaminopirimidina	Trimetoprima	Lodo secundario de EDAR	208	N.A	Göbel et al., 2005
		Lodo primario y secundario de EDAR	76	205	Göbel et al., 2005
Macrólidos	Tilosina	Arena arcillosa	8,3-128	553-7990	Thiele-Bruhn, 2003
AINE	Diclofenaco	Lodo digerido	18,2-151	159-2630	Carballa et al., 2008
		Suelo agrícola	0,60-1,73	138-359	

3.2.4 Biodegradación

La biodegradación es un proceso biótico que afecta a los PF en el medio ambiente acuático y puede provocar su transformación parcial o total, en cuyo caso pueden volverse recalcitrantes (es decir, y no afectados por la biodegradación). La degradación biológica de los CF puede ser iniciada por el metabolismo humano y animal, así como por microorganismos. Estos microorganismos pueden encontrarse en aguas residuales o EDAR o pueden ocurrir naturalmente en sólidos suspendidos o sedimentos.

Normalmente se observan altas tasas de biodegradación a lo largo de la interfaz agua-sedimento de los cuerpos del agua y en los humedales. La eficacia del proceso depende de numerosos factores ambientales como la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, el pH, el flujo de agua y la salinidad. Los microorganismos como bacterias, hongos, microalgas y protozoos degradan los contaminantes más que los humanos y otros organismos del nivel trófico superior.

En la Tabla 4 se muestra los coeficientes de biodegradación de PF seleccionados en el medio ambiente, demostrando que las condiciones ambientales, así como los microorganismos disponibles, tienen una influencia significativa en la tasa de biodegradación, como en los lodos activados (primarios y secundarios de EDAR). Por lo general, se observan tasas más altas en el sistema agua-sedimento y lodos activados que, en el agua puro, debido a los numerosos consorcios microbianos en los sedimentos. La sulfadiazina no se biodegrada en soluciones acuosas con el alga verde, mientras que la mitad de PF se pueden eliminar en 1 o 2 días mediante EDAR. Además, en el agua dulce la tasa de fotodegradación es 100 veces más rápida que la de la biodegradación. Sin embargo, en las aguas ambientales naturales, la tasa de fotodegradación directa cercana a la superficie disminuye rápidamente con el aumento de la profundidad del agua y la turbidez debido a la concentración de sólidos en suspensión, carbono orgánico disuelto y clorofila. Por lo tanto, la magnitud relativa de cada una de sus tasas de estos procesos depende de las diferentes matrices ambientales.

Tabla 4: Coeficientes de biodegradación de fármacos seleccionados en el medio ambiente

Clase farmacéutica	Compuesto	Condición ambiental	k_b ($\times 10^{-3}$ h ⁻¹)	Tiempo de vida media	Referencias
Tetraciclina	Oxitetraciclina	Franco arenoso o arcilloso	1,8-1,6	16-18 días	Blackwell et al., 2005
		Aguas superficiales	0,68-0,62	127 días	Ingerslev & Halling-Sorensen, 2000
Sulfonamidas	Sulfadiazina	Solución acuosa con el alga verde Chlorella vulgaris	/	Sin degradación	Baran et al., 2006
		Lodos secundarios de EDAR	18	1,6 días	Ingerslev & Halling-Sorensen, 2000
	Sulfatiazol	Solución acuosa con el alga verde Chlorella vulgaris	/	Sin degradación	Baran et al., 2006
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	Agua dulce	2,1	378 horas	Baena-Nogueras et al., 2017
Diaminopirimidina	Trimetoprima	Lodos primarios y secundarios de EDAR	N/A	27% degradado	Yu et al., 2011

3.3 Métodos basados en microalgas para la eliminación de antibióticos en aguas residuales

Entre estos procesos de depuración destacan la adsorción, la oxidación avanzada y la fotocátalisis además del uso de microalgas. La eficiencia de eliminación de antibióticos del proceso de adsorción depende en gran medida del adsorbente y este puede ser costoso. La oxidación avanzada y la fotocátalisis pueden ser generalmente efectivas, pero necesitan catalizadores o agentes químicos intensivos y costosos, además de la probable producción de contaminantes secundarios. Sin embargo, el proceso de EDAR con microalgas es un proceso biológico y necesita pocos agentes químicos por lo que puede diseñarse para eliminar de manera efectiva los PF, como los antibióticos.

Recientemente, la tecnología basada en microalgas ha sido ampliamente reportada como un método efectivo para tratar efluentes municipales e industriales, con ventajas como fijación de CO₂, eliminación de contaminantes, ahorro de aporte de nutrientes y potencial de desarrollo de productos derivados de algas. En los últimos años ha habido un aumento en el número de publicaciones relacionadas con los procesos basados en microalgas para la eliminación de antibióticos.

3.3.1 Inhibición de microalgas en presencia de antibióticos

La inhibición de microalgas inducida por antibióticos juega un papel importante. Estos pueden alterar el crecimiento de las algas mediante la inhibición de la síntesis de sustancias químicas como la clorofila-a y los pigmentos y las actividades de enzimas como la catalasa y el superóxido dismutasa. Este efecto se puede cuantificar comúnmente a través de la concentración efectiva máxima EC₅₀, que se define como la concentración de antibiótico a la que se inhibe el 50% del crecimiento de algas. La mayoría poseen valores más altos que las concentraciones en aguas residuales, lo que denota que las microalgas naturalmente poseen buena resistencia. Por ejemplo, las concentraciones de ciprofloxacina y tetraciclina son próximas a 1µg/L en aguas residuales, mientras que los valores para EC₅₀ son 65 mg/L (para *C. mexicana*) y 3,31 mg/L (para *P. subcapitata*) (Tabla 5) respectivamente (Välitalo et al., 2017, Xiong et al., 2018) dependiendo del antibiótico específico y de la especie de la microalga.

Tabla 5: Concentraciones de antibióticos comúnmente presentes en los efluentes de las EDAR y los valores EC₅₀ para esos antibióticos de las especies específicas de algas

Antibióticos	Concentraciones de antibióticos en efluentes de EDAR municipales (mg/L) (ref.)	Valores de EC50 (mg/L), tiempo, especies (ref.)
Ciprofloxacina	1,05 (Välitalo et al., 2017)	65,96 h; <i>C. mexicana</i> (Xiong et al., 2018)
		113; 72h; <i>P. subcapitata</i> (Välitalo et al., 2017)
Enrofloxacin	0,27 (Välitalo et al., 2017)	18,7; 72h; <i>P. subcapitata</i> (Välitalo et al., 2017)
		5,57; 72h; <i>D. subcapicatus</i> (Välitalo et al., 2017)
Tetraciclina	1,40 (Välitalo et al., 2017)	3,31; 72h; <i>P. subcapitata</i> (Välitalo et al., 2017)
Trimetoprima	1,15 (Välitalo et al., 2017)	80,3; 72h; <i>P. subcapitata</i> (Välitalo et al., 2017)

3.3.2 Factores que afectan al rendimiento de eliminación de antibióticos por microalgas

3.3.2.1 Efecto de las especies de algas

La tasa de eliminación de los antibióticos depende en gran medida de las especies de algas. El *Chlorella* es muy eficaz para la eliminación de muchos antibióticos. Dentro de este grupo localizamos *C. vulgaris* el cuál fue más vigoroso para eliminar la enrofloxacin que *S. obliquus*, *Chlamydomonas mexicana*, *Ourococcus multisporus* y *Micractinium resseri* (Xiong et al., 2017b). Sin embargo, la eliminación de ciprofloxacina

por *Chlamydomonas mexicana* se limitó al 13% como se observa también en la trimetropina por *Nannochloris sp.* reducida en un rango del 0 al 10% (Bai & Acharya 2016,2017) (Tabla 6).

3.3.2.2 Efecto de las clases y concentraciones de antibióticos

La eliminación de antibióticos basada en microalgas afecta a la concentración de ellos. Por esta razón, presentan inhibiciones sobre el crecimiento de algas cuando la concentración es cercana o superior al nivel tolerable por las algas. Se esperarían bajas tasas en el momento que las concentraciones estudiadas se expresan en magnitud de varios mg/L a cientos $\mu\text{g/L}$ puedan ser comparables o incluso superiores a las EC_{50} (Tabla 5). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el aumento de la concentración de antibiótico dentro de un cierto rango puede tener poca influencia en su eliminación cuando la concentración está dentro del nivel tolerable por las algas.

De igual modo, afecta en gran medida a las clases de los antibióticos. Sus diferentes tipos, incluso a un nivel de concentración similar, pueden dar como resultado eficiencias de eliminación notablemente anómalo.

3.3.2.3 Efectos de las condiciones de crecimiento de algas

Las condiciones de crecimiento de las microalgas, incluido los nutrientes, el pH, la iluminación, la temperatura, el CO_2 , la concentración, la salinidad, el diseño del fotobiorreactor, el oxígeno disuelto y los inhibidores del crecimiento de algas son fundamentales para la eficacia de la eliminación de antibióticos. (Norvill et al., 2016). Estas son mayoritariamente favorables y además la adicción de nutrientes apropiados puede promover el metabolismo para el crecimiento seguido de un mejor rendimiento en la eliminación de los antibióticos. Por ejemplo, la adicción de 4g/L de acetato de sodio a *Chlamydomonas mexicana* aumentó el triple la eliminación de ciprofloxacina. Adicionalmente el pH puede mediar en la hidrólisis de algunos antibióticos iónicos como ocurre en la Tetraciclina y Trimetoprima.

Tabla 6: Eliminación de antibióticos mediante tecnología basada en microalgas y mecanismos de eliminación

Antibiótico	Tecnología basada en microalgas	Concentración inicial de antibiótico y tasa de eliminación, tiempo de retención hidráulica	Categoría de aguas residuales	Mecanismos de eliminación	Referencia	
	<i>Chlamydomonas mexicana</i>	2 mg/L y 13%, 11días	Bold's Basal Medium	Biodegradación, acumulación y adsorción	Xiong et al., 2017b	
	<i>C. pitschmannii</i>	2 mg/L y 1,6%, 11días				
	<i>Ourococcus multisporus</i>	2 mg/L y 2%, 11días				
	<i>C.vulgaris</i>	2 mg/L y 0, 11días				
Ciprofloxacina	<i>Chlamydomonas mexicana</i>	2 mg/L y 56%, 11días	Bold's Basal Medium + Acetato de sodio (4g/L)	Biodegradación > acumulación y adsorción	Bai & Acharya, 2017	
	<i>Nannochloris sp.</i>	57 ng/L y 100%, 7días	Water from Las Vegas Wash	Fotólisis directa		
	Mezcla de consorcios de algas y bacterias en HRAP	1,31 mg/L y 20,1%, 24h (8h luz solar/16h de oscuridad)	Aguas residuales domésticas reales	Fotodegradación durante el día y adsorción durante la noche		Hom-Diaz et al., 2017
	Mezcla de consorcios de algas y bacterias en HRAP de 1L	1,11 mg/L y 83,8%, 24h		Fotodegradación		
Enrofloxacina	<i>S.obliquus</i>	1 mg/L y 23%, 11días	Bold's Basal Medium	Biodegradación > acumulación y adsorción	Xiong et al., 2017a	
	<i>Chlamydomonas mexicana</i>	1 mg/L y 25%, 11días				
	<i>C.vulgaris</i>	1 mg/L y 26%, 11días				
	<i>Ourococcus multisporus</i>	1 mg/L y 18%, 11días				
	<i>Micractinium resseri</i>	1 mg/L y 20%, 11días				
	Consortios de microalgas de las cinco especies anteriores	1 mg/L y 26%, 11días				Aguas residuales domésticas reales
Tetraciclina	Algas con lodos activados	2 mg/L y 97%, 24h (12h luz y 12h oscuridad)	Water from Las Vegas Wash	Fotodegradación, biodegradación, adsorción e hidrólisis	Norvill et al., 2017	
Trimetoprima	<i>Nannochloris sp.</i>	1,6 ng/L y 11%, 350h	F/2 medium	Biodegradación, fotólisis	Bai & Acharya, 2017	
	<i>Nannochloris sp.</i>	10 µg/L y 0, 14días			Bai & Acharya, 2016	

3.4 Mecanismos de eliminación de antibióticos mediante el uso de microalgas

3.4.1 Adsorción

Es el proceso de eliminación de contaminantes mediante la unión pasiva de estos a un material sólido. (Bai & Acharya, 2016) Se emplea como adsorbentes el biocarbón, carbón activo y nanomateriales siendo las microalgas lo más eficiente. Se puede lograr mediante los grupos funcionales y ensamblajes de polímeros (similares a la celulosa, hemicelulosas y proteínas, etc) en las paredes celulares como un proceso extracelular. Su eficacia viene dada mediante el uso de biomasa de algas muertas para adsorber antibióticos y el rendimiento varía significativamente según su funcionalidad, estructuras e hidrofiliicidad. Generalmente, es deseable cuando el antibiótico es más hidrofóbico que hidrofílico y lleva una carga eléctrica opuesta a la microalga como ocurre en la tetraciclina.

Este proceso se logra principalmente a través de enlaces de hidrógeno, atracción electrostática, partición y efecto hidrofóbico.

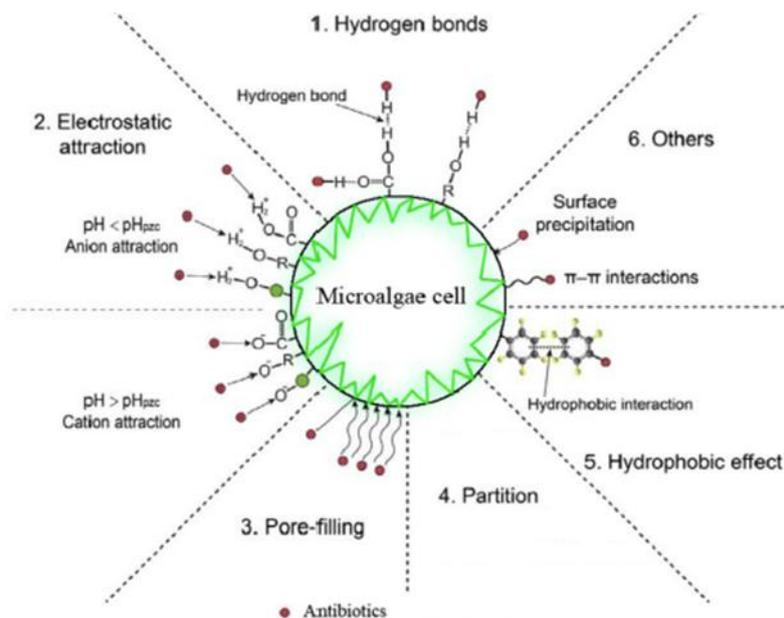


Figura 3: Posibles mecanismos durante la adsorción de antibióticos

3.4.2 Acumulación

A diferencia de la adsorción, este proceso es intracelular. (Bai & Acharya, 2016). Algunos antibióticos pueden atravesar las membranas celulares de las algas y posteriormente ser asimilados por las células. Estos pueden extraerse mediante sonicación junto con una mezcla de diclorometano/metanol (v:v=1:2) (Song et al., 2019). Dentro de este grupo destacan la trimetoprima y doxiciclina.

Otros antibióticos pueden inducir la producción de especies reactivas de oxígeno, que es esencial para controlar el metabolismo celular en concentraciones normales, pero que provocan daños graves en células o finalmente la muerte si se encuentran en exceso (Xiong et al., 2018).

3.4.3 Biodegradación

Describe el proceso de descomposición de los antibióticos por parte de las algas dentro o fuera de las células. Se diferencia los mecanismos intra y extracelulares mediante el análisis de los productos intermedios/finales de los antibióticos en el medio y en la biomasa o mediante el uso de enzimas extraídas de las algas. Se puede clasificar el metabolismo de las algas en degradación co-metabólica y en patrones de degradación metabólica. La degradación co-metabólica utiliza enzimas no específicas para degradar los antibióticos con aporte adicional de carbono y energía, mientras que, en el proceso de degradación metabólica, las algas utilizan antibióticos como únicas fuentes de carbono y energía con enzimas específicas. En particular, durante el co-metabolismo aumentaron la adición de sustratos orgánicos tales como el metanol o el acetato de sodio para promover la biodegradación de la ciprofloxacina. (Xiong et al., 2017b).

Con base en las funcionalidades enzimáticas, la biodegradación de antibióticos puede tratarse como un proceso de catálisis enzimática de dos fases. En la primera fase, estos pueden hidrolizarse, oxidarse o reducirse enzimáticamente a compuestos más hidrófilos pueden ser catalizados por otro grupo de enzimas como las glutatión-S-transferasas para producir moléculas más pequeñas y con menor toxicidad, siendo su

resultado la apertura del anillo epóxido de los antibióticos para proteger contra el daño oxidativo a las células de algas. (Ding et al., 2017)

Independientemente de los diferentes mecanismos de eliminación de antibióticos discutidos anteriormente, la hidrólisis, la ruptura de la cadena lateral, la hidroxilación, la escisión del anillo, la desmetilación, la descarboxilación y la deshidroxilación pueden tener lugar cuando se biodegradan los antibióticos. (Xiong et al., 2018)

3.4.4 Fotodegradación

Incluye la fotodegradación directa de los antibióticos aportada por la luz y su fotodegradación indirecta la cuál es inducida por los compuestos reactivos producidos por las algas en presencia de la luz. La mayoría de los antibióticos residuales en el agua natural se degradan en la fotodegradación indirecta debido a sus peligros potenciales, efectos tóxicos y persistencia. Además, las algas juegan un papel importante en este proceso ya que actúan como fotosensibilizadores, por lo que secretan materia orgánica extracelular (EOM) e inducen la generación de especies activas. (Figura 4).

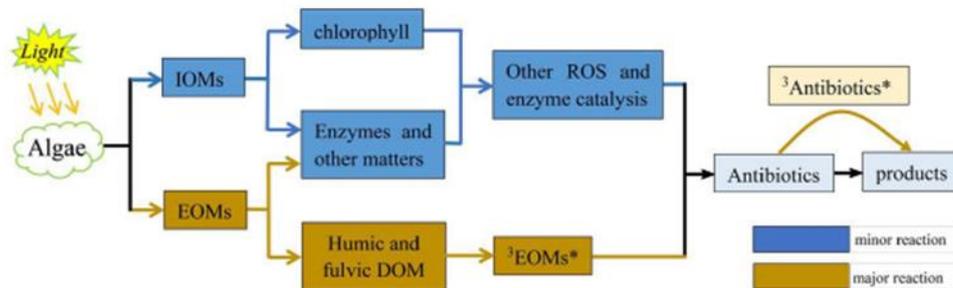


Figura 4: Esquema del mecanismo de degradación de antibióticos en agua que contiene algas con irradiación

3.4.5 Hidrólisis

La descomposición de los antibióticos también se puede lograr por hidrólisis en el medio de crecimiento de las microalgas. Estas reacciones aumentaron la polaridad y la hidrofiliidad de los antibióticos, y, por lo tanto, facilitaron la solubilización de ellos y su posterior biodegradación por parte de las microalgas (Wang et al., 2018).

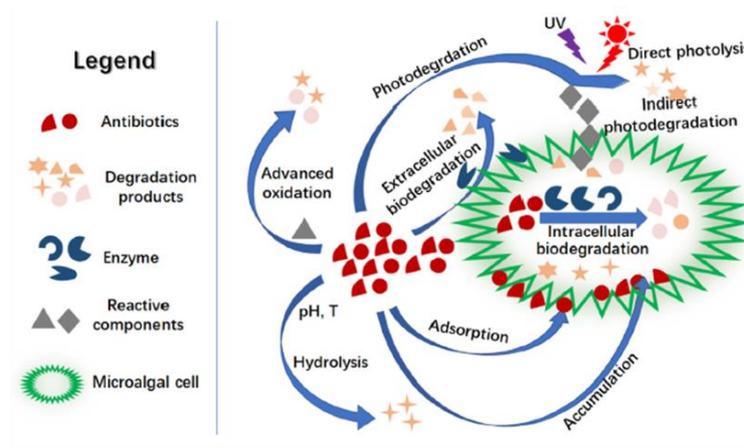


Figura 5: Mecanismos de degradación y desintoxicación de antibióticos por microalgas

3.5 CE en purines

3.5.1 Los productos de medicamentos veterinarios (PVM) y biocidas en el estiércol

La difusión de medicamentos veterinarios (PVM) y biocidas a través del estiércol en áreas agrícolas es perjudicial al medio ambiente ya que contiene materia orgánica, nitrógeno, fósforo inorgánico y metales. Por lo tanto, estos compuestos pueden llegar a ser ingeridos por el ser humano a través de la cadena alimentaria y el ciclo del agua.

Los productos de medicamentos veterinarios (PVM) son excretados por los animales tratados en forma de sustancias originales inalteradas y compuestos metabolizados. Estos excrementos se recogen y se almacenan principalmente como estiércol líquido o sólido en lagunas o se aplica como fertilizantes/abonos en tierras de cultivo y prados (pastizal). En cambio, las biocidas, se utilizan para la desinfección de los establos.

Teniendo en cuenta las condiciones del entorno como puede ser la temperatura de almacenamiento, el contenido de materia seca, el valor del pH, la microbiología basándose en las condiciones aeróbicas o anaeróbicas y la alimentación de los animales, los PVM y los biocidas pueden interferir más o menos en la transformación en el estiércol líquido. La transformación bajo condiciones aeróbicas suele ser más dinámico que en condiciones anaeróbicas, al igual que, la alta temperatura favorece la degradación.

Además, puede ocurrir otros procesos como la volatilización, la sorción y la formación de residuos no extraíbles (NER) que ayudan a la disipación de los principios activos.

Se llevó a cabo un estudio donde se recolectaron datos de PVM y se evaluaron con respecto al origen, las características del estiércol, las concentraciones máximas y mínimas encontradas y el porcentaje de compuestos identificados. Se analizaron muestras de estiércol y se encontraron principios activos, metabolitos y productos de transformación de PVM. La mayoría de las veces, las muestras se analizaron en busca de sulfonamidas, tetraciclinas y fluoroquinolonas. Para la sulfadiazina y la clortetraciclina, se encontraron concentraciones que excedieron las concentraciones ambientales pronosticadas. Sin embargo, en las biocidas se ha trabajado sin obtener aún resultado. Los análisis se realizaron en América del Norte (Canadá), en Europa (Austria, República Checa, Dinamarca, Alemania, Italia, Suiza) y en Asia (China, Japón).

Se calcula las concentraciones ambientales previstas (PEC) evaluando el riesgo ambiental de los PVM (prescindiendo de las concentraciones ambientales medidas (MEC)). Se relaciona con el peso húmedo que se expresa en $\text{mg/kg}_{\text{ww estiércol}}$ y el contenido de nitrógeno. Viene dado de la siguiente forma:

$$PEC_{\text{ww estiércol}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] = \frac{D \times Ad \times Bw \times Fh}{Ns} \times \frac{N_{\text{total}}}{1000}$$

Siendo D la dosis diaria del principio activo ($\text{mg/kg}_{\text{peso corporal día}}$), Ad el número de días del tratamiento (día), Bw el peso corporal del animal ($\text{kg}_{\text{peso corporal}}$), Fh la fracción de rebaño tratado (valor entre 0 y 1), Ns el nitrógeno producido durante el tiempo de almacenamiento (kg N) y N_{total} el contenido de nitrógeno del estiércol específico ($\text{kgN/kg}_{\text{estiércol húmedo}}$).

Los valores predeterminados para Bw, Fh y Ns se conceden en la guía de la EMA, con respecto al tipo del animal (ternera, vaca lechera, bovino de 0 a 1, o más de 2, cerdo destetado, cerdo de engorde, cerda). Lamentablemente, no se puede deducir el tipo del animal exacto, por lo que introducimos para el Bw/N valores del mínimo y del máximo simplificados. Para el ganado, los valores mínimos y máximos de Bw/Ns son 28,33 y 56 $\text{kg}_{\text{peso corporal}} / (\text{kg N})$, respectivamente. En cambio, para los cerdos, estos valores se encuentran entre 34,21 y 37,88 $\text{kg}_{\text{peso corporal}} / (\text{kg N})$. Los valores

predeterminados para D y Ad se indican en el resumen de las características del producto (RCP). El estiércol vacuno líquido posee un N_{total} entre 3,2 y 4,7 g/L, mientras que el porcino oscila entre 2,8 y 6,5 g/L.

Los datos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Sulfonamidas, Tetraciclinas, Fluoroquinolonas y otros medicamentos veterinarios y sus metabolitos y productos de transformación encontrados en el estiércol

Sustancia	Referencia	Matriz	Origen	Mínimo	Máximo	Unidad	Comentarios o cita del contenido de materia seca	n	n positivo	% positivo
Sulfadiazina	Engels, 2004	estiércol porcino	Alemania (NI)	0,7	235,1	mg/kg (ww)	0,5-16,8% (mean 5%)	344	100	29
	Hamscher et al., 2005	estiércol porcino	Alemania	3,5	11,3	mg/kg (dw)	9,6-9,8%	3	2	67
	Hamscher et al., 2002	estiércol porcino	Alemania (BY)	0,1	5	mg/kg (ww)	0,2-17,3% (mean 3,7%)	380	19	5
	Luo & Zhou, 2010	estiércol porcino y aviar	China	0,16	0,78	mg/kg (dw)	“Estiércol porcino líquido” (ns)	6	2	33
	Jacobsen & Halling-Sørensen, 2006	estiércol porcino	Dinamarca	0,63	2,1	mg/kg (dw)	2,8-13,4%	6	2	33
	Pfeifer et al., 2002	(ns)	Alemania	0,011	0,08	mg/kg (ns)	“Estiércol líquido”(ns)	4	2	50
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino y vacuno	Alemania (NW)	-	0,65	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido y estable”(ns)	34	5	15
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania	0,7	35,3	mg/kg (ww)	0,7-16,11%	176	86	49
	Zhao et al., 2010	estiércol porcino, vacuno y aviar	China	0,02	3,12	mg/kg (dw)	(ns)	143	14	10
Sulfadimidina	Martínez-Carballo et al., 2007	estiércol porcino	Austria	-	<20	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido”(ns)	30	18	60
	Aust et al., 2008	estiércol vacuno	Canada	-	9,99	mg/kg (dw)	24,4-44,4% (mean 37%)	6	4	67
	Burkhardt et al., 2005	estiércol porcino	Suiza	-	14,4	mg/kg (ww)	“En el sobrenadante”(fase acuosa) (ns)	1	1	100
	Christian et al., 2003	estiércol porcino	Alemania	1	1,1	mg/kg (ww)	(ns)	2	2	100
	Christian et al., 2003	estiércol vacuno	Alemania	<0,1	<0,1	mg/kg (ww)	(ns)	2	2	100
	Engels, 2004	estiércol porcino	Alemania(NI)	0,7	167	mg/kg (ww)	0,5-16,8% (mean 5%)	344	183	53
	Hamscher et al., 2005	estiércol porcino	Alemania	-	7,2	mg/kg (dw)	9,6-9,8%	3	1	33

	Pan et al., 2011	estiércol porcino	China	0,011	28,7	mg/kg (dw)	(ns)	126	65	52
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino y vacuno	Alemania (NW)	-	7,04	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido y estable”(ns)	34	6	18
		estiércol porcino	Alemania	0,13	20	mg/kg (dw)	1,2-28%	30	18	60
	Bergmann et al., 2011	estiércol porcino	Alemania (BY)	0,14	1,7	mg/kg (ww)	1-2%	8	8	100
		estiércol porcino	Alemania	0,7	167	mg/kg (ww)	0,7-16,13%	176	85	48
	Zhao et al., 2010	estiércol porcino, vacuno y aviar	China	0,06	6,04	mg/kg (dw)	(ns)	143	17	12
	Haller et al., 2002	estiércol porcino y vacuno	Suiza	0,13	8,7	mg/kg (ww)	1,1-3,7%	6	6	100
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania (BY)	0,05	38	mg/kg (ww)	0,2-17,3% (mean 3,7%)	380	181	48
	Pfeifer et al., 2002	(ns)	Alemania	0,011	0,062	mg/kg (ns)	“Estiércol líquido”(ns)	4	2	50
Sulfametizol	Pan et al., 2011	estiércol porcino	China	0,052	2,422	mg/kg (dw)	(ns)	126	35	28
	Haller et al., 2002	estiércol porcino y vacuno	Suiza	0,1	12,4	mg/kg (ww)	1,1-3,7%	6	4	67
Sulfatiazol	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania (BY)	0,05	0,1	mg/kg (ww)	0,2-17,3% (mean 3,7%)	380	5	1
	Pan et al., 2011	estiércol porcino	China	0,312		mg/kg (dw)	(ns)	126	1	1
	Martínez-Carballo et al., 2007	estiércol porcino	Austria	0,29	29	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido”(ns)	30	22	73
	De Liguoro et al., 2003	estiércol vacuno	Italia	-	19	mg/kg (ns)	“Vertedero”(ns)	1	1	100
Oxitetraciclina	Engels, 2004	estiércol porcino	Alemania (NI)	1,6	136,2	mg/kg (ww)	0,5-16,8% (mean 5%)	344	10	3
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania (BY)	0,1	0,9	mg/kg (ww)	0,2-17,3% (mean 3,7%)	380	16	4
	Jacobsen & Halling-Sørensen, 2006	estiércol porcino	Dinamarca	0,048	1,5	mg/kg (dw)	2,8-13,4%	6	3	50

Tetraciclina	Motoyama et al., 2011	estiércol porcino	Japón	-	0,013	mg/kg (ns)	(ns)	5	1	20
		estiércol vacuno después de la fermentación	Japón	-	0,001	mg/kg (ns)	(ns)	8	1	13
	Pan et al., 2011	estiércol porcino	China	0,044	172,874	mg/kg (dw)	(ns)	126	114	90
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino y vacuno	Alemania (NW)	-	1,49	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido y estable”(ns)	34	5	15
		estiércol porcino	Alemania	0,21	29	mg/kg (dw)	1,2-28%	30	22	73
		estiércol porcino	Alemania	1,6	136,2	mg/kg (ww)	0,7-16,9%	176	9	5
	Zhao et al., 2010	estiércol porcino, vacuno y aviar	China	0,15	59,59	mg/kg (dw)	(ns)	143	50	35
	Karci & Balcioglu, 2009	estiércol vacuno	Turquía	-	0,06	mg/kg (ns)	(ns)	1	1	100
	Martínez-Carballo et al., 2007	estiércol porcino	Austria	0,36	23	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido”(ns)	30	22	73
	Hamscher et al., 2002	estiércol porcino	Alemania	3,22	4	mg/kg (ww)	(ns)	2	2	100
	Hamscher et al., 2005	estiércol porcino	Alemania	14,1	41,2	mg/kg (dw)	9,6-9,8%	3	3	100
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania (BY)	0,1	46	mg/kg (ww)	0,2-17,3% (mean 3,7%)	380	111	29
	Luo & Zhou, 2010	estiércol porcino y aviar	China	0,18	0,84	mg/kg (dw)	“Estiércol porcino líquido” (ns)	6	4	67
	Jacobsen & Halling-Sørensen, 2006	estiércol porcino	Dinamarca	0,091	1,6	mg/kg (dw)	2,8-13,4%	6	5	83
	Motoyama et al., 2011	estiércol porcino	Japón	0,005	0,015	mg/kg (ns)	(ns)	5	3	60
		estiércol vacuno después de la fermentación	Japón	-	0,001	mg/kg (ns)	(ns)	8	2	25
	Pan et al., 2011	estiércol porcino	China	0,037	19,417	mg/kg (dw)	(ns)	126	107	85
Wohde et al., 2016	estiércol porcino y vacuno	Alemania (NW)	-	2,45	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido y estable”(ns)	34	12	35	

		estiércol porcino	Alemania	0,36	23	mg/kg (dw)	1,2-28%	30	22	73
		estiércol porcino	Alemania (NW)	0,6	66	mg/kg (ww)	“Estiércol porcino”(ns)	181	43	24
		estiércol porcino	Alemania	0,9	43,1	mg/kg (ww)	0,7-16,8%	176	87	49
	Engels, 2004	estiércol porcino	Alemania (NI)	0,7	45,7	mg/kg (ww)	0,7-16,8% (mean 5%)	344	152	44
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania (BY)	0,1	0,7	mg/kg (ww)	0,2-17,3% (mean 3,7%)	380	5	1
Doxiciclina	Jacobsen & Halling-Sørensen, 2006	estiércol porcino	Dinamarca	0,55	3,1	mg/kg (dw)	2,8-13,4%	6	6	100
	Tylová et al., 2010	estiércol porcino	República Checa	-	0,99	mg/kg (ns)	“Estiércol porcino líquido”(ns)	5	1	20
	Zhao et al., 2010	estiércol porcino, vacuno y aviar	China	0,23	13,5	mg/kg (dw)	(ns)	143	21	15
Danofloxacin	Wohde et al., 2016	estiércol porcino y vacuno	Alemania (NW)		0,05	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido y estable”(ns)	34	1	3
	Zhao et al., 2010	estiércol porcino, vacuno y aviar	China	0,08	3,06	mg/kg (dw)	(ns)	143	39	27
	Martínez-Carballo et al., 2007	estiércol porcino	Austria	0,13	0,75	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido”(ns)	-	-	-
Enrofloxacin		estiércol porcino y vacuno	Alemania (NW)		0,55	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido y estable”(ns)	34	5	15
		estiércol porcino	Alemania	0,13	0,75	mg/kg (dw)	1,2-28%	30	5	17
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania (BY)	0,05	0,116	mg/kg (ww)	1-2%	5	5	100
		estiércol porcino, vacuno y aviar	China	0,33	1420,76	mg/kg (dw)	(ns)	143	67	47
Marbofloxacin	Wohde et al., 2016	estiércol porcino y vacuno	Alemania (NW)	-	0,05	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido y estable”(ns)	34	3	9
Ciprofloxacina		estiércol porcino	Japón	-	0,006	mg/kg (ns)	(ns)	5	1	20
	Motoyama et al., 2011	estiércol vacuno después de la fermentación	Japón	0,002	0,012	mg/kg (ns)	(ns)	8	4	50

		estiércol porcino y vacuno	Alemania (NW)	-	0,07	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido y estable”(ns)	34	3	9
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania	0,18	0,62	mg/kg (dw)	1,2-28%	30	4	13
		estiércol porcino	Alemania (BY)	0,005	0,028	mg/kg (ww)	1-2%	5	5	100
		estiércol porcino, vacuno y aviar	China	0,49	45,59	mg/kg (dw)	(ns)	143	44	31
Tiamulina	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania (BY)	-	0,5	mg/kg (ww)	0,2-17,3% (mean 3,7%)	380	1	<1
	Pan et al., 2011	estiércol porcino	China	0,076	0,169	mg/kg (dw)	(ns)	126	6	5
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania	-	0,043	mg/kg (ns)	5%	4	1	25
Trimetoprima	Wohde et al., 2016	estiércol porcino y vacuno	Suiza	< 0,1	< 0,1	mg/kg (ww)	1,1-3,7%	6	1	17
		estiércol porcino y vacuno	Alemania (NW)	-	0,05	mg/kg (dw)	“Estiércol líquido y estable”(ns)	34	1	3
Tilosina	De Liguoro et al., 2003	estiércol vacuno	Italia	-	< 0,25	mg/kg (ns)	“Vertedero”(ns)	1	1	100
	Sollic et al., 2014	estiércol porcino	Canada	0,03	0,543	mg/kg (dw)	(ns)	-	-	-
	Wohde et al., 2016	estiércol porcino	Alemania (BY)	0,13	0,32	mg/kg (ww)	1-2%	8	8	100

La oxitetraciclina, tetraciclina, sulfadimidina y sulfadiazina presentan un $PEC_{ww \text{ estiércol}}$ de la misma magnitud:

Tabla 8: Concentraciones ambientales pronosticadas y medidas en el estiércol recogidas en las tablas anteriores ($PEC_{\text{estiércol}}$ y $MEC_{\text{estiércol}}$) de los cuatro PVM monitoreados y encontrados con más frecuencia en el estiércol (líquido).

Principio activo (número de productos registrados)	Especies	Min-Max. PEC_{ww} estiércol (mg/kg _{ww})	MEC_{ww} estiércol más altos (mg/kg _{ww})
Oxitetraciclina	Vacuno	0,49-44,5	-
	Porcino	0,48-182	136,2
Tetraciclina	Vacuno	10,9-72,8	-
	Porcino	31,7-216,6	66
Sulfadimidina	Vacuno	4,4-124,6	-
	Porcino	3,2-254,8	167
Sulfadiazina	Vacuno	1,6-22,3	-
	Porcino	1,0-45,5	235,1

Según este estudio, se analizaron PVM, biocidas y sus productos de transformación mediante cromatografía líquida acoplada preferiblemente a una espectrometría de masas en tándem o espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS/MS o LC-HR-MS) para detección y cuantificación. Además, se utilizaron otras técnicas instrumentales como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) con detección UV-VIS/DAD y cromatografía de gases (GC).

3.5.2 Antibióticos en dos sistemas de tratamiento de aguas residuales porcinas

Los antibióticos se emplean en la industria ganadera como el principal fármaco para prevenir o tratar enfermedades y promover el crecimiento manifestándose en mayor dosis en la producción porcina comercial. No obstante, estos apenas se absorben en el tracto digestivo de los animales debido a que poseen una tasa de metabolización muy baja por lo que la mayoría de ellos son excretados. Se detectan de manera habitual en las muestras de estiércol (formado por heces, orines y paja entre otros) alcanzando concentraciones de hasta 700 mg/kg. Incluso su uso extensivo conmovió la calidad del agua y la seguridad alimentaria ya que se detectaron en las aguas residuales, lodos y estiércol. Por esta razón, se está investigando para eliminarlos en los flujos de

desecho antes de que se liberen en los entornos receptores. Se desarrolla dos sistemas de tratamiento de aguas residuales en las granjas porcinas como la oxidación anaeróbica-aeróbica que se observa según la Figura 6 (granja, A, digestor anaeróbico-A²/O-laguna) por lo contrario en la granja B se desempeña el manto de lodo anaeróbico de flujo ascendente (USAB)-(A/O)² – laguna).

Estos sistemas en ambas granjas evitan la propagación de antibióticos al medio ambiente a través de la descarga de efluentes. Durante el tratamiento de desecho, estos se pueden transformar a través de fotólisis, hidrólisis y biotransformación, dependiendo de la hidrofobicidad y estructura molecular que posean. Las sulfonamidas se eliminan fácilmente debido a que poseen una baja absorción en el lodo debido a su naturaleza hidrofílica, una mejor resistencia a la hidrólisis y una factible degradación en condiciones anaeróbicas (granja A) debido a la presencia de nitrógeno y azufre en sus estructuras moleculares. Por el contrario, las tetraciclinas y fluoroquinolonas ciñen un porcentaje menor. Las tetraciclinas pueden interactuar fuertemente con la materia orgánica natural y los óxidos metálicos mediante intercambio de cationes, la superficie química de coordinación, la partición hidrofóbica de puente y las interacciones donante-aceptor de electrones. Su predominio en el lodo deshidratado indica que la sorción es un importante mecanismo de eliminación acompañado de la hidrólisis y la biodegradación. Sin embargo, las fluoroquinolonas poseen una resistencia a la hidrólisis y acumulación en lodos deshidratados por lo que predomina como mecanismo de remoción la adsorción a lodos y/o flóculos (granja B).

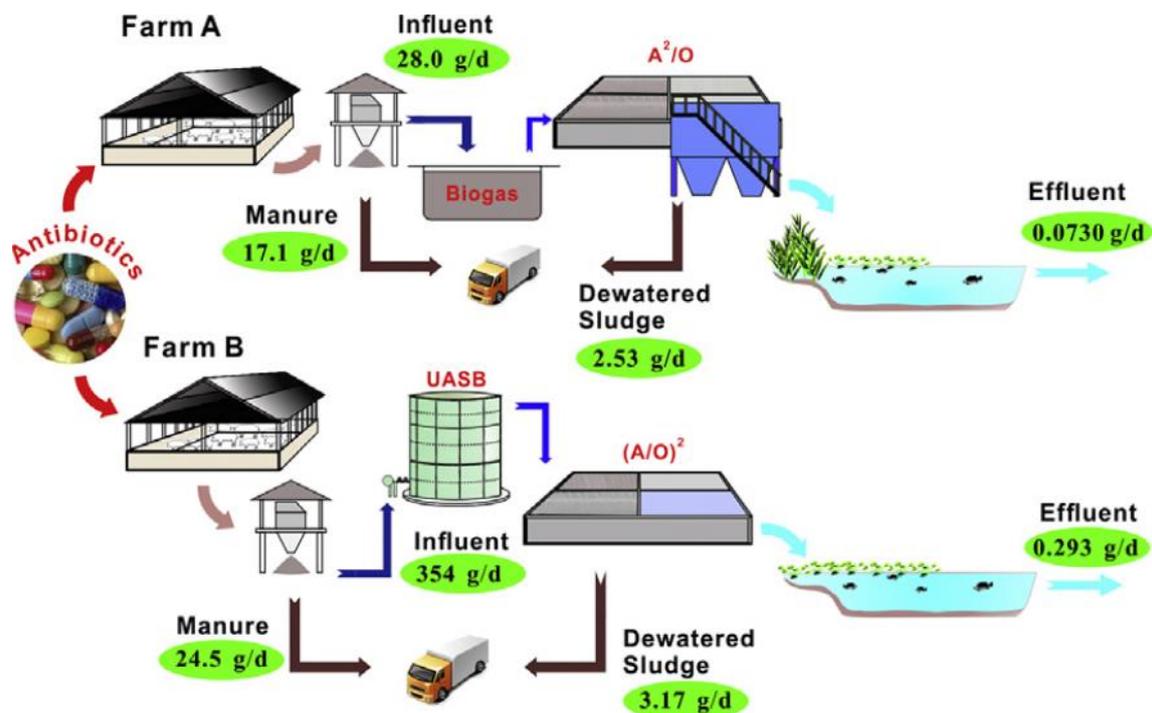


Figura 6: La ocurrencia y el destino de varios antibióticos en dos sistemas de tratamiento de aguas residuales de granjas porcinas a gran escala (Granja A: digestor anaeróbico-A²/O-laguna; Granja B: manto de lodo anaeróbico (UASB)-(A/O)² – laguna)

En la actualidad, se está experimentando con diferentes configuraciones y tipos de fotobiorreactores, que implica el cultivo de biomasa algal para la depuración de aguas residuales agrícolas y urbanas y así eliminar los micro contaminantes peligrosos.

3.5.2.1 Descripción de los diferentes tipos de fotobiorreactores (PBR)

Los fotobiorreactores cerrados (PBR, photo-bioreactors) son una clase de reactores los cuales no interaccionan con el entorno circundante. Estos están disponibles en varios diseños, por ejemplo, elevador de aire, columna de burbujas, placa plana, tanque agitado y tubular. El PBR tubular consta de tubos lineales de vidrio/plástico dentro del biorreactor, mientras que los PBR planos están formados por contenedores rectangulares transparentes. El diseño reciente de los PBR proporciona un cultivo fácil, exposición a la luz y alta producción. El airlift PBR es útil para la producción de biomasa de algas y el tratamiento eficiente de los contaminantes de las aguas residuales. El burbujeo de gas mezcla el cultivo al permitir que el cultivo se mueva entre la parte ascendente y la parte inferior del PBR. A diferencia de los sistemas de estanques

abiertos, los estanques cerrados brindan una mejor regulación sobre los parámetros del sistema (pH, temperatura, aireación, agitación e intensidad de la luz solar), mayor CO₂, eficiencia de transferencia y densidad de cultivo. Hasta la fecha, los PBR se han empleado eficazmente para eliminar varios contaminantes, incluidos nutrientes, antibióticos, micro contaminantes y metales pesados a escala de laboratorio y piloto; sin embargo, los gastos de construcción y mantenimiento de los PBR han restringido su uso a gran escala. El tratamiento basado en biorreactor algal resultó efectivo para los contaminantes de las aguas residuales. (Singh & Sharma, 2012)

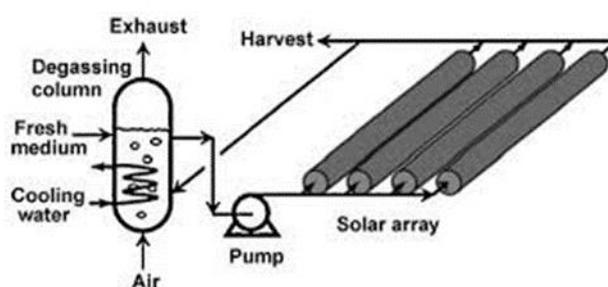


Figura 7: Funcionamiento de un PBR tubular horizontal

3.5.2.2 Nuevas estrategias para eliminar los micro contaminantes peligrosos

Para comprobar la capacidad de supresión de microcontaminantes, se está llevando a cabo un estudio analítico de los residuos influentes y efluentes en los reactores (López-Serna et al., 2019). Además, la biomasa se utilizará como biofertilizante, alimento para animales o para la producción de productos de valor agregado como carbohidratos y proteínas, para lo cual es recomendable determinar las concentraciones de fármacos en la biomasa.

En cuanto a la determinación de microcontaminantes orgánicos en algas (algas, plancton y microalgas), se ha descrito la extracción de compuestos organoclorados, éteres de difenilo polibromados e hidrocarburos de petróleo con una mezcla n-hexano/acetona y otros disolventes de baja polaridad. Asimismo, se han determinado algunos productos farmacéuticos bioacumulados en algas sometiendo la muestra a hidrólisis con NaOH o después del tratamiento con diclorometano/metanol para lograr la lisis celular (proceso de ruptura de la membrana celular de bacterias o células que provoca la salida del material biológico). Por lo contrario, los productos farmacéuticos,

especialmente los antibióticos, son compuestos con una polaridad relativamente alta, de ahí que su extracción a partir de muestras sólidas se suele realizar a través de una agitación con mezclas de disolventes ricas en agua.

Por otro lado, la técnica QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) en la preparación de muestras se aplica tanto en las propiedades fisicoquímicas de los analitos diana como en la naturaleza de las muestras con diferente coherencia y complejidad. Esta destaca por la sencillez del procedimiento y su rapidez, así como el mínimo uso de reactivos y disolventes. Se utiliza parámetros como el disolvente de extracción, la relación disolvente/agua y el adsorbente de limpieza correspondiente a cada caso particular para mejorar el rendimiento del procedimiento de extracción.

Se ha determinado las concentraciones de medicamentos veterinarios en la biomasa de microalgas de fotobiorreactores diseñados por el tratamiento de aguas residuales de cerdos. (Figura 8). Los resultados sugieren que la acumulación de fármacos en la biomasa alga aumenta, en términos generales, a medida que aumenta la concentración de fármacos en el efluente. De la misma manera, se deduce que las drogas lipofílicas tienden a ser más retenidas por las microalgas. Por esta razón, fármacos como sulfadiazina, sulfadimidina y tilosina se observaron exclusivamente en el efluente de algunos ensayos, debido a que los valores de $\log P$ son inferiores a 1, por lo tanto, poseen una mayor afinidad en la fase acuosa. Por lo contrario, en fármacos como ciprofloxacina, enrofloxacina y tiamulina se detectaron exclusivamente en la biomasa de otros ensayos concordando con sus valores altos de $\log P$. (López-Serna et al., 2022)

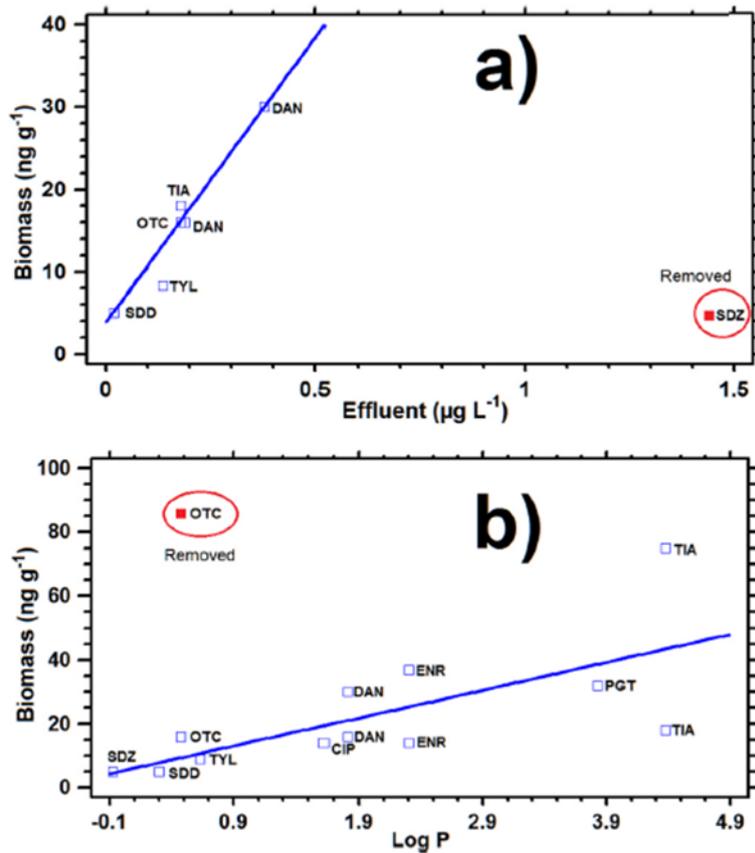


Figura 8: Representación mediante un ajuste lineal las concentraciones encontradas en biomasa frente a: a) concentraciones en el efluente y b) logaritmo del coeficiente de partición, sin considerar los datos encerrados en un círculo.

3.6 Valorización de subproductos

Las microalgas son una materia prima de origen biológico y una excelente fuente de carbohidratos, proteínas y lípidos. En la fotosíntesis, las microalgas consumen CO₂ como fuente de carbono y aprovechan la luz solar como fuente de energía. En las aguas residuales, su tratamiento y valorización conlleva numerosas ventajas tales como la recuperación de nutrientes y el mantenimiento del equilibrio ecológico en los ecosistemas acuáticos. La valorización de la biomasa algal puede ser integral y fraccionada. Podemos distinguir una valorización fraccionada sólida para los lípidos, proteínas y carbohidratos mientras que para los péptidos y monosacáridos se analizaron las líquidas. Por lo tanto, en la valorización fraccionada de proteínas se distinguen los péptidos empleados como bioestimulantes para aplicaciones agrícolas e

industriales o los aminoácidos en la alimentación animal. En la de carbohidratos discernimos los monosacáridos fermentables para la producción de biocombustibles. Y en la lipídica no es rentable debido a que en aguas residuales las microalgas cultivadas poseen un mayor contenido en nutrientes que en lípidos. Los productos obtenidos de la valorización se utilizan para producir biogás y fertilizantes a través de una biometanización (digestión anaeróbica). El primer paso a tener en cuenta en una valorización, denominado pretratamiento, es la disrupción de la pared celular, formada por algas, proteínas y polisacáridos, utilizando como enzimas las proteasas y celulasas. El objetivo de este proceso es maximizar la solubilidad y minimizar la degradación de los componentes. La hidrólisis enzimática es un método de disrupción utilizando como enzimas las proteasas y celulasas. Las proteasas catalizan la ruptura de enlaces péptidos en proteínas y péptidos y se clasifica en función de la posición en la que esté localizada. Podemos distinguir 2 tipos, endo-proteasas y exo-proteasas. Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína, por el contrario, las exoproteasas eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos. (Tacias-Pascacio et al., 2020)

3.6.1 Hidrólisis Enzimática

Se han empleado 3 enzimas comerciales proporcionadas por Novozymes A/S: alcalasa 2,4L, protamex y celulasa (Tabla 9) regulada por unas condiciones óptimas del fabricante (Martín Juárez et al., 2016). La enzima alcalasa es una serina endopeptidasa producida a partir de una cepa de *Bacillus licheniformis* que consiste principalmente en subtilisina A. Ésta es adecuada para la hidrólisis de proteínas y muestra una actividad mínima de 2.4 UA/g. Por su parte, la enzima protamex es una endo y exoproteasa, combinación de cepas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, que presenta una actividad enzimática de 1,7 UA/g⁵⁹, también adecuada para la hidrólisis de proteínas. Por último, la enzima celulasa es una preparación enzimática proveniente de una cepa de hongo denominada *Trichoderma reesei*. Es una celulasa que descompone la celulosa en glucosa y tiene una actividad enzimática de 65 FPU/mL.

Tabla 9: Tipos de enzimas y condiciones de hidrólisis enzimática.

Enzima	pH	Concentración	Tipo	Actividad
Alcalasa 2,4L	8	5:100 v/w biomasa seca	Serina <i>endo-peptidasa</i>	2,4 UA-A/g
Protamex	6,5	1:100 w/w biomasa seca	Serina <i>endo-peptidasa</i>	0,8-1,4 AU-n/g
Celulasa 1,5L	4,8	10 UFP/g carbohidratos	Forma de la celulasa: <i>Trichoderma reesei</i>	65 UFP/mL

Para alcanzar el valor óptimo proporcionado de pH por el fabricante, la protamex y Celulasa añade HCl en cambio en alcalasa se añade NaOH. La alcalasa es conocida como endo-proteasas alcalinas de serina con una gran importancia desde el punto de vista industrial (Tacias-Pascacio et al., 2020). Posee una actividad de 2,4 AU-A/g. Por otro lado, protamex es una mezcla de alcalasea y neutrase, un endo-proteasa con una actividad enzimática de 0,8-1,4 AU-N/g. Éste proporciona una distribución de peso molecular de proteína mayor con respecto a las comentadas. Una vez concluida esta etapa, se centrifuga la biomasa a 4 °C y 10.000 rpm durante 10 min para separar las fracciones sólidas y líquidas.

En un diseño experimental de Taguchi se estudió el efecto de 3 parámetros sobre la obtención de productos de valor añadido: tipo de biomasa (A), tipo de enzima (E) y tiempo de hidrólisis (T) considerando también los efectos de interacción entre ellos (ET, EA y TA) (Martín-Juárez et al., 2019) Se programaron utilizando arreglos ortogonales de los diseños de Taguchi los cuáles estiman los efectos de los factores en la media de respuesta y en la variación. Este diseño experimental permitió probar cada parámetro en tres niveles. Para el tipo de enzima se clasificaron en alcalasea 2,4L (E1), protamex (E2) y celulasa 1,5L(E3) en cambio, para el tiempo de hidrólisis en una hora (T1), tres horas (T2) y cinco horas (T3). Sin embargo, el tipo de biomasa solo se ordenó en dos niveles, biomasa bacteriana-microalgal (A1) y biomasa microalgal cultivada en medio sintético (A2).

El efecto de los parámetros individuales y sus interacciones sobre las diferentes variables de respuesta se estudió mediante un análisis de varianza multifactorial (ANOVA). Las diferencias significativas entre los rendimientos medios obtenidos por

los diferentes niveles se determinaron mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan (considerando un nivel de confianza del 95%).

No se observó la solubilización de lípidos después de la hidrólisis enzimática en todos los experimentos, por lo que no se valorizarían.

Los resultados de solubilización de carbohidratos fueron discretos en todos los experimentos. Cabe destacar que el rendimiento fue mayor para las enzimas celulasas con un % del 23,5 al 38,5 que para las enzimas proteasas con un % del 15,2 al 27,3. En particular, la mayor solubilización de 38,5% se obtuvo en el experimento con la biomasa de bacterias-microalgas (A1), la enzima celulasa (E3) y un tiempo de hidrólisis de cinco horas (T3). Por el contrario, la menor solubilización de carbohidratos del 15,2% se obtuvo con la enzima alcalasa (E1) operando con microalgas cultivadas en medios sintéticos (A2) y un tiempo de hidrólisis de una hora (T1). Este rendimiento mejora ligeramente al aumentar los tiempos de hidrólisis.

El análisis ANOVA demostró que todos los parámetros operativos individuales estudiados tuvieron un efecto significativo en la solubilización de carbohidratos ($p < 0,05$), siendo el tipo de alga (A) el parámetro más importante, seguido del tipo de enzima (E) y el tiempo de hidrólisis (T) (con un 31% y 11,7% respectivamente). La prueba de rangos múltiples de Duncan confirmó con un nivel de confianza del 95% que existían diferencias significativas entre las dos biomásas.

El mayor rendimiento de recuperación coincidió con el experimento de mayor solubilización (38,5%) denominado biomasa A1, enzima celulasa con un tiempo de hidrólisis de cinco horas.

En cuanto a la obtención de proteínas, como cabe esperar las enzimas proteasas obtuvieron resultados con rendimientos mayores con un % del 26,2 al 64,9 que para las enzimas celulasas con un % del 13,1 al 18,8. Gracias al SEM se observó un mayor grado de rugosidad y daño a las paredes celulares en la biomasa de bacterias-microalgas (A1) que microalgas cultivadas en medios sintéticos (A2), sin producirse la lisis celular.

En particular, la mayor solubilización de 64,9% se obtuvo en el experimento con las microalgas cultivadas en medios sintéticos (A2), la enzima alcalasa (E1) y un tiempo de

hidrólisis de cinco horas (T3). Por el contrario, la menor solubilización de proteínas del 13,1% se obtuvo con la enzima celulasa (E3) operando con la biomasa de bacterias-microalgas (A1) y un tiempo de hidrólisis de una hora (T1). Estos mayores rendimientos en A2 que en A1 pueden deberse a la estructura de la pared celular y al tipo de proteínas ocasionado por las distintas condiciones de crecimiento.

El análisis ANOVA demostró que todos los parámetros operativos individuales estudiados tuvieron un efecto significativo en la solubilización de proteínas ($p=0$), siendo el tipo de enzima (E) el parámetro más importante, representando el 59,6% de la contribución, seguido del tipo de alga (A) y el tiempo de hidrólisis (T) (con un 15,9% y 5% respectivamente). La prueba de rangos múltiples de Duncan confirmó con un nivel de confianza del 95% que existían diferencias significativas entre las biomásas.

La recuperación de los péptidos fue más baja que la solubilidad de las proteínas, esto se debe a una cierta degradación. Para la biomasa de microalgas cultivadas en medios sintéticos (A2) fue de 32,4%, 13,7% y 5,3% a alcalasa (E1), protamex (E2) y celulasa (E3) respectivamente. En cambio, para biomasa de bacterias-microalgas (A1) fue de 34,2%, 19,6% y 6,6% a alcalasa (E1), protamex (E2) y celulasa (E3) respectivamente.

Estos resultados mostraron la efectividad de la hidrólisis enzimática con proteasas para la extracción de proteínas con un tratamiento suave ocasionando las pérdidas mínimas, incluso en el mayor tiempo cuando se superpone a la biomasa de bacterias-microalgas cultivadas en aguas residuales de cerdos (P). (Rojo et al., 2021).

3.7 Métodos de análisis

Para la determinación de CE en muestras como el purín, se distingue principalmente dos etapas: el tratamiento de la muestra, el cuál abarca la mayor parte del proceso, seguido del análisis cromatográfico, buscando condiciones que permitan analizar compuestos de distintas propiedades químicas en la misma muestra.

En la primera etapa, se diferencia a su vez dos procesos en el caso de muestras sólidas, uno primero de extracción sólido-líquido (SLE) asistida generalmente por

ultrasonidos para solubilizar los analitos de interés y a continuación otro proceso de limpieza-concentración a través de una extracción en fase sólida (SPE). (Pérez-Lemus et al., 2019)

3.7.1 Extracción sólido-líquido (SLE)

No se debe excluir este proceso inicial del tratamiento de muestra sólidas ya que los analitos que se van a determinar se encuentran generalmente en concentraciones a nivel de trazas en matrices complejas.

En el caso de muestras líquidas solo se lleva a cabo la limpieza y concentración de las muestras.

3.7.2 Extracción en fase sólida (SPE)

En este proceso se suele usar como sorbente los cartuchos de fase inversa Oasis HLB permitiendo la extracción de compuestos ácidos, básicos y neutros en diferentes matrices. La SPE consta de 5 etapas (Afonso-Olivares et al., 2017):

- Activación del cartucho: consiste en la solvatación de los puntos activos con MeOH y equilibración del sorbente con agua ultrapura.
- Elución de la muestra: se hace pasar la muestra por los cartuchos para retener los analitos de interés y eliminar los compuestos extraídos de la matriz.
- Lavado del cartucho: se eliminan posibles interferentes que hayan podido quedar retenidos junto con los analitos.
- Elución: se deposita un disolvente en el cartucho para minimizar la interacción analito-adsorbente y arrastrar los analitos de interés.
- Evaporización/preconcentración: se denomina etapa de preconcentración. Consiste en eliminar el eluyente a través de una corriente de gas inerte, seguido de una redisolución con metanol y otra evaporización posterior.

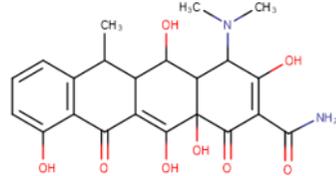
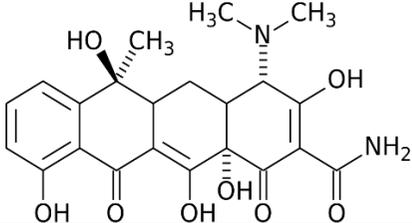
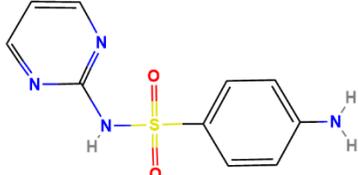
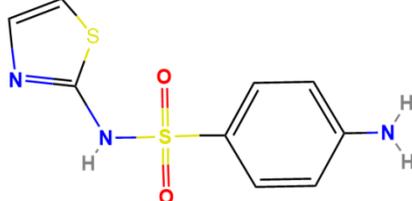
3.7.3 Análisis Cromatográfico

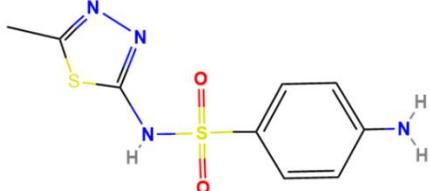
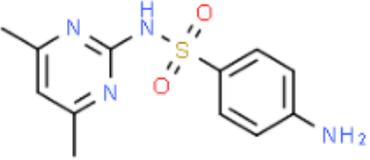
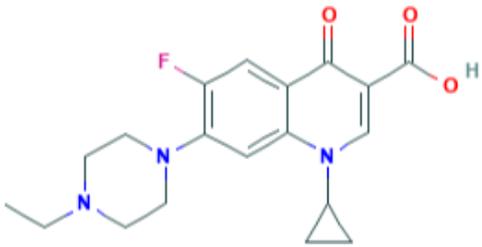
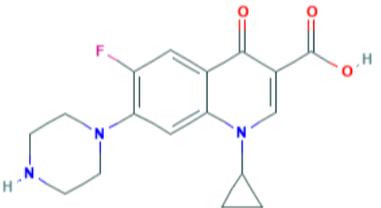
Se realiza mediante UHPLC en fase inversa, con columnas de ODS, y con fases móviles H₂O/metanol ó H₂O/acetonitrilo en modo gradiente. Como detector se utiliza un equipo de espectrometría de masas (MS/MS), generalmente con analizador QqQ. Se emplea UHPLC en vez de HPLC debido a que mejora la eficacia de separación, obteniéndose picos más estrechos y límites de detección ligeramente inferiores. Sin embargo, al aumentar la presión del sistema, se debe utilizar bombas especialmente adaptadas para ello. (Wang et al., 2019).

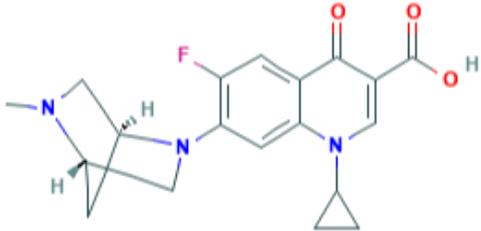
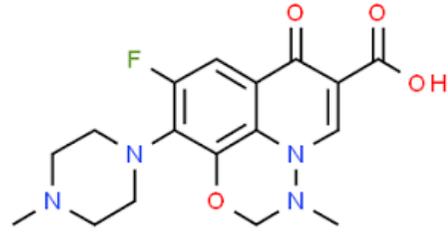
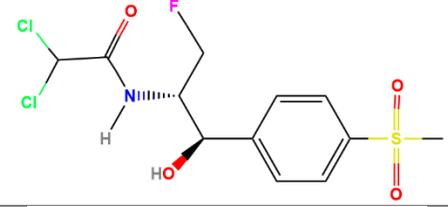
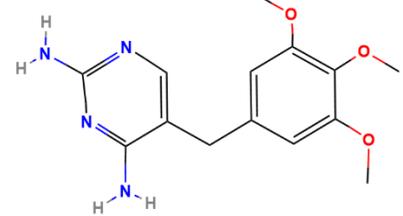
3.8 Compuestos estudiados

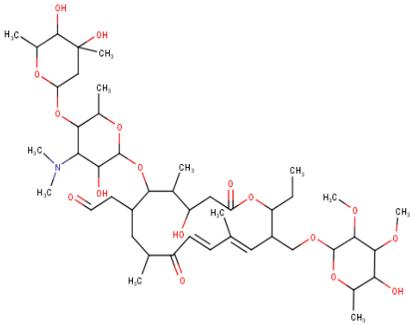
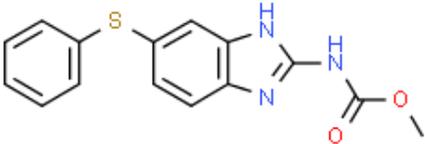
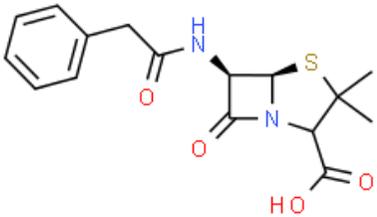
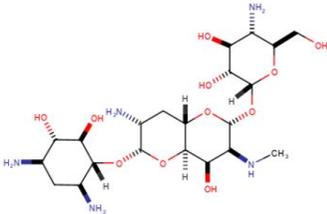
En la Tabla 10 se realiza una clasificación de los 25 CE estudiados agrupados por categorías terapéuticas y familias. Además, en esta tabla se muestra su correspondiente fórmula molecular, estructura y peso molecular. Básicamente se trata de antibióticos muy utilizados en la ganadería porcina, y de uso autorizado por la legislación.

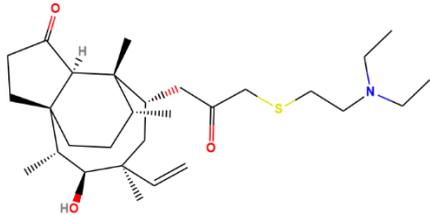
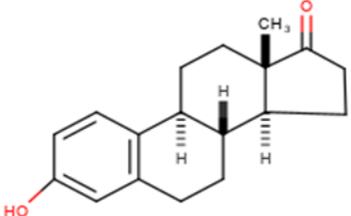
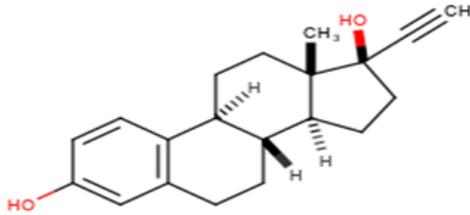
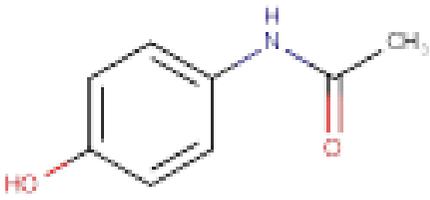
Tabla 10: Los 25CE estudiados en este trabajo

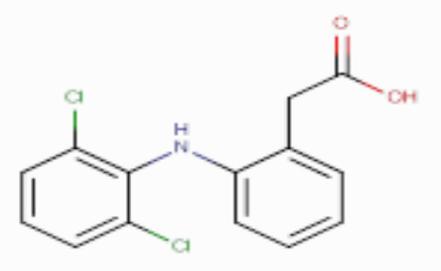
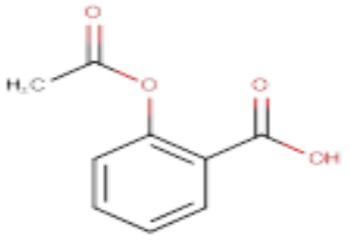
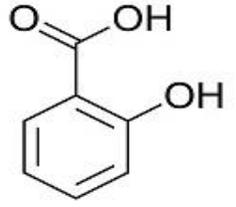
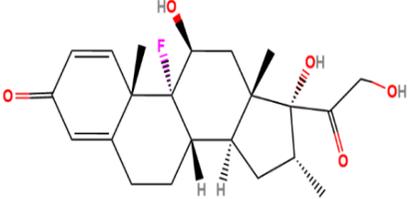
Clasificación Terapéutica	Familia	Analitos	PM (g/mol)	Fórmula Molecular	Estructura
Antibióticos	Tetraciclinas	Doxiciclina	444,43	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	
		Tetraciclina	444,43	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	
	Sulfonamidas	Sulfadiazina	250,28	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	
	Sulfatiazol	255.32	$C_9H_9N_3O_2S_2$		

	Sulfametizol	270.33	$C_9H_{10}N_4O_2S_2$	
	Sulfadimidina	278.33	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	
Fluoroquinolonas	Enrofloxacina	359.39	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	
	Ciprofloxacina	331.34	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	

	Danofloxacin	357.38	$C_{19}H_{20}FN_3O_3$	
	Marbofloxacin	362.36	$C_{17}H_{19}FN_4O_4$	
	Florfenicol	361.37	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	
Diaminopirimidinas	Trimetoprima	290.32	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	

Macrólidos	Tilosina	916.1	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	
Fenólicos	Fenbendazol	299.35	$C_{15}H_{13}N_3O_2S$	
β -Lactámicos	Pencilin G	334.39	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	
Aminoglucósidos	Apramicina	539.58	$C_{21}H_{41}N_5O_{11}$	

	Pleuromutilinas	Tiamulina	493.74	$C_{28}H_{47}NO_4S$	
Hormonas	Hormonas naturales	Estrona	270.37	$C_{18}H_{22}O_2$	
	Hormonas sintéticas	17- α Etilnilstradiol	296.4	$C_{20}H_{24}O_2$	
Analgésicos	Analgésicos	Acetaminofeno	151.16	$C_8H_9NO_2$	

AINE (Anti-inflamatorios no esteroides)	Diclofenaco	296.15	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	
Salicilatos (Subfamilia AINE)	Ácido acetilsalicílico	180.16	$C_9H_8O_4$	
	Ácido Salicílico	138.12	$C_7H_6O_3$	
Corticoesteroide	Dexametasona	392.46	$C_{22}H_{29}FO_5$	

4 OBJETIVOS

- Conocer la estabilidad de determinados principios activos veterinarios durante el proceso de hidrólisis enzimática propuesto para la obtención de proteínas a partir de biomasa algal.
- Conocer la estabilidad de determinados principios activos veterinarios durante los procesos de hidrólisis química propuestos para la obtención de proteínas a partir de biomasa algal.
- Evaluar la influencia de la matriz del medio enzimático y químico en la cuantificación de los analitos mediante espectrometría de masas
- Ensayar nuevos métodos de análisis para determinar los contaminantes emergentes mencionados en hidrolizados enzimáticos de biomasa algal.

5 EXPERIMENTAL

El tratamiento de muestra se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto de Procesos Sostenibles (ISP) en la Universidad de Valladolid.

5.1 Materiales, reactivos e instrumentación

Tabla 11: Materiales y reactivos empleados

Material	Reactivos
Agujas estériles para jeringas y evaporador	Acetona, Labbox
Bala de nitrógeno seco	Acetonitrilo pureza HPLC (ACN), Labbox
Bomba de vacío	Ácido Acético glacial (HAcO), Labbox
Capilares volumétricos de 100-200 μ L	Ácido Clorhídrico 2M, Labbox
Cartuchos Oasis HLB de 3mL y 60 mg de relleno	Ácido Fórmico grado HPLC, Labbox
Embudo pesasustancias de borosilicato de vidrio	AEDT, sal disódica, Sigma-Aldrich
Filtros Captiva de 0,22 μ m de tamaño de poro	Agua miliQ, Waters
Filtros de jeringa de 0,22 μ m y 0,45 μ m de tamaño de poro de PTFE hidrófobo, no estériles	Agua tipo II, Waters
Jeringas desechables de plástico de 2mL	Carbón activo en polvo, Labbox
Matraces aforados de 10,25,100 y 250 mL	Cloruro de sodio, Labbox
Micropipetas de 100	Gel de sílice, Labbox
Pipetas Pasteur de vidrio	Hidróxido de sodio, Labbox
Tapones roscados para tubos SPE y viales cromatográficos	Metanol (MeOH) pureza HPLC, Labbox
Tubos Falcon de 50mL de polietileno	Nitrógeno seco, Linde-gas PSA, Scharlab
	Patrones de los contaminantes emergentes, pureza cromatográfica (Sigma-Aldrich)
	Sodio acetato trihidratado (NaAcO), Labbox

En la Tabla 12 se acogen los equipos instrumentales utilizados

Tabla 12: Equipos empleados

Equipos
Purificador de agua ultrapura (MiliQ), Milli-Q Advantage A10 de Merck Millipore de la marca Waters Chromatography
Balanza analítica, Mettler Toledo
Bomba de vacío
Centrífuga, Thermo Cientific Legent RT+
Cromatografía/espectrometría de masas en tándem: - UHPLC ExionLC AD con inyector automático Espectrómetro de masas SCIEX 6500+
Evaporador de nitrógeno, Organomation N-Evap 11250
Manifold de extracción en fase sólida
Mezclador Vortex, Thermo Cientific
pH-metro, Crison
Ultrasonidos, Sonorex Digitex Bandelin

5.2 Preparación de una disolución multipatrón

A partir de disoluciones individuales de 1000 mg/L de cada uno de los 25 CE a estudiar, se prepara una disolución de 20 mg/L (ss) tomando 200µL de cada disolución madre y se vierte a un matraz aforado de 10 mL enrasándose con MeOH.

Con este multipatrón se dopará las muestras en cada uno de los ensayos y se prepararán las líneas de calibrado.

5.3 Estabilidad durante la hidrólisis

5.3.1 Obtención de los hidrolizados enzimáticos

En primer lugar, se prepara el medio, para ello se añade 0,5g de la enzima Promatax previamente pesado en la balanza analítica con la ayuda de un embudo pesasustancias, en un matraz aforado enrasándose con agua miliQ.

A continuación, se procede a preparar 3 ensayos enzimáticos, cada uno de ellos con condiciones diferentes, y con una repetividad de n=5.

En el primer ensayo, se dopa 5 mL del medio con 400 µL del multipatrón ss, se introduce en un ultrasonido de baño (Figura 9) durante 1 hora para simular el proceso

de hidrólisis. Se diluye 1:5 en un matraz aforado de 25mL enrasándose con agua miliQ y se congela en un congelador de -20°C hasta el día de inyección.

En el segundo ensayo, se procede de forma similar a la anterior, pero sin realizar el proceso de hidrólisis, de esta forma se dispone de los analitos en la matriz de muestra para comparar los resultados de la muestra sin hidrolizar con aquellos de la muestra hidrolizada.

En el tercer ensayo, se añade 5 mL de agua miliQ en un matraz aforado de 25mL, sin añadir la enzima, se dopa con 400 µL del multipatrón ss, se diluye 1:5 enrasándose con agua miliQ y se congela hasta el día de inyección en 2 viales de 24,5mL para muestras. De esta forma se podrá estudiar la influencia de la matriz (enzima proteasa) en el análisis.

Finalmente, se filtra cada muestra sobre un filtro de 0,22µm de tamaño de poro de PTFE hidrófobo, vertiéndose a los viales cromatográficos ámbar de 2mL para inyectarlos directamente al UHPLC/MS, sin olvidarnos de una previa agitación mediante vortex.



Figura 9: Baño de ultrasonidos empleado para la hidrólisis enzimática

5.3.2 Obtención de los hidrolizados químicos

En este caso se procede a realizar 5 ensayos distintos para conocer las estabildades de los contaminantes en los procesos de hidrólisis en medio ácido y básico. Los ensayos se realizan por quintuplicado.

En el primer ensayo, se dopa 5 mL de NaOH 2M se dopa con 100 µL del multipatrón ss, se introduce en el AutoClave a 120°C durante 1hora. Posteriormente se vierte en un

matraz aforado de 10 mL enrasándose con ácido acético 4M, y finalmente se congela en un congelador de -20°C hasta el día de inyección.

En el segundo ensayo, se dopa 5 ml de NaOH 2M con 100 µL del multipatrón ss y se deja reposar a temperatura ambiente 1 hora. Posteriormente se vierte en un matraz aforado de 10 mL enrasándose con ácido acético 4M, y se congela en un congela a -20°C hasta el día de su análisis. Comparando con los resultados del ensayo anterior se puede conocer la influencia del calentamiento en la estabilidad de los contaminantes.

En el tercer y cuarto ensayo se procede de forma similar al primer y segundo ensayo, pero dopando ahora HCl 2 M para simular una hidrólisis en medio ácido y enrasando con acetato sódico 4 M para neutralizar el medio.

En el quinto ensayo, se dopa 5mL de agua miliQ con 100 µL del multipatrón ss, y se enrasa con una disolución reguladora HAcO/NaACO 4M y NaCl 2M en un matraz de 10 mL. Se congela en un congelador de -20°C hasta el día de su inyección. Esa disolución servirá para conocer la influencia de la matriz ácida, o alcalina, en el análisis de los contaminantes.

Antes de la inyección en UHPLC-MS/MS los ensayos se filtran sobre un filtro de 0,22µm de tamaño de poro de PTFE hidrófobo, vertiéndose a los viales cromatográficos ámbar de 2mL.



Figura 10: Autoclave empleado para la hidrólisis química a la alta temperatura y presión que puede soportar el equipo

5.3.3 Cuantificación de los contaminantes en los hidrolizados químicos

La cuantificación de los contaminantes en las muestras hidrolizadas en el autoclave debe realizarse mediante una línea de calibrado preparada en el mismo medio que las muestras para evitar errores de cuantificación debido al funcionamiento de la fuente de iones electrospray del espectrómetro de masas. Para ello se ha diseñado la siguiente estrategia.

Inicialmente, con porciones de las muestras del primer y tercer ensayo (tratamiento con HCl y NaOH 2 M en autoclave) se prepara un composite o mezcla tomando 2,5 mL de cada uno de los ensayos similares. Seguidamente se prepara 11 patrones de calibración a partir de alícuotas de 1 mL del composite y añadiendo un volumen característico del multipatrón ss antes de diluir a un volumen fijo (10 mL) como se observa en la Tabla 13, enrasándose con agua miliQ en matraces aforados de 10mL. Se incluyen también dos blancos en los que no se dopa el composite. Mediante un calibrado adiciones patrón se calcula la concentración de analito en el composite.

Tabla 13: Línea de calibrado para los hidrolizados químicos en el primer ensayo y el tercero.

Nombre	Blanco 1	Blanco 2	Pat 1	Pat 2	Pat 3	Pat 4	Pat 5	Pat 6	Pat 7	Pat 8	Pat 9	Pat 10	Pat 11
C_{pat} (ppm)	-	-	2	2	2	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,05	0,05
V_{multi}pat (μL)	-	-	600	500	400	300	200	400	300	200	100	200	50
V_{comp} (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V_{final} (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Los patrones se guardan a -20°C hasta el día de inyección y como habitualmente se filtra sobre 0,22μm antes del análisis mediante UHPLC/MS-MS.

La línea de calibrado en matriz similar a la de las muestras se construye representando el área de pico frente a la concentración total de cada patrón, siendo esta concentración total la suma de la concentración del composite (determinada mediante un método de adiciones patrón con los puntos de la Tabla 13) y la concentración con que se ha dopado cada punto.

5.4 Ensayos de extracción sobre hidrolizados enzimáticos

Los ensayos de estabilidad descritos se han realizado simulando un proceso de hidrólisis, sin presencia de biomasa algal. El motivo es que los hidrolizados de biomasa liberan cantidades significativas de proteínas/péptidos y carbohidratos que disminuyen considerablemente las áreas de pico de los contaminantes emergentes como consecuencia de su influencia en la interfase electrospray (“efecto matriz”), aumentando los límites de detección y cuantificación hasta cantidades que hacen inviable la aplicación de los métodos de análisis habituales para su determinación en muestras líquidas ensayados en trabajos anteriores (Calvo Tejo, 2021). La precipitación de las proteínas tampoco es una opción viable (Portela Monge, 2023). A continuación, se describen nuevos ensayos para la posible determinación analítica de los contaminantes emergentes considerados en este trabajo en hidrolizados enzimáticos ricos en proteína.

5.4.1 Preparación de muestras de biomasa algal liofilizada

Inicialmente, se lleva a cabo una hidrólisis enzimática, para ello se mezclan 5g de una biomasa algal liofilizada (80% humedad), 0,5g de la enzima Protamax y 100 mL de agua miliQ en un vaso precipitado de 250mL. Se introduce en un baño de ultrasonidos (Figura 9) durante 1hora para calentar el medio, mejorar el contacto, y realizar la hidrólisis. Se vierte en 4 tubos Falcon de 50 mL. Se centrifuga la mezcla resultante durante 10 min a 7800 rpm. Se junta el sobrenadante centrifugado y se dopa con 100µL del multipatrón de 2 mg/L obtenido a partir del multipatrón ss con una correspondiente dilución 1:10. Los ensayos se hacen por duplicado.

5.4.2 Inyección directa (ID) de las muestras

Estos ensayos se fundamentan en una extracción en fase sólida dispersiva con la que se pretende eliminar la matriz. En los ensayos de inyección directa se mezclan 4 mL de muestra de hidrolizado dopado con 5 mg, 10 mg y 20 mg de carbón en polvo, 150 mg y 75 mg de PSA, y 150 mg y 75 mg silica (SiO₂) respectivamente, todos ellos con una

previa activación, consistente en un calentamiento a 105 °C y a posteriori guardado en el desecador. La mezcla se agita manualmente durante 1 minuto y se filtra con ayuda de un filtro de jeringa de 0,45 μ m de tamaño de poro de Nylon para separar la fase sólida. La fase líquida se congela hasta el día de la inyección y entonces se filtra con ayuda de un filtro de jeringa de 0,22 μ m de tamaño de poro de PTFE hidrófobo.

5.4.3 Combinación de extracción en fase sólida (SPE) dispersiva con extracción en fase sólida clásica

En este caso se ha realizado una extracción en fase sólida dispersiva mezclando 2 mL de hidrolizado enzimático dopado con diferentes adsorbentes, se ha centrifugado para separar el adsorbente y después se ha realizado una extracción en fase sólida clásica. Los adsorbentes usados han sido carbón activo (5 y 10 mg) y PSA (10 mg). Después de una agitación manual (1 min) se separa la fase líquida mediante filtración sobre un filtro de 0,45 μ m de tamaño de poro. A continuación, se procede con la etapa de limpieza o 'clean-up' mediante SPE (Figura 11).



Figura 11: Equipo empleado para la SPE

- 1) Activación del relleno: se añade 3mL de MeOH a cada cartucho y se deja que el líquido pase a través de cartucho por gravedad (sin vacío).
- 2) Equilibración del sorbente: se añade 3mL de agua miliQ a cada cartucho, dejando que el líquido pase a través del cartucho por gravedad.
- 3) Elución de la muestra:

Se eluye la muestra después de la SPE dispersiva con la ayuda del sistema de vacío, para retener los analitos de interés sobre el relleno.

Lavado del cartucho: se añade 2mL de agua miliQ por las paredes de cada cartucho para que eluya el líquido por gravedad.

- 4) Secado del cartucho: se conecta el sistema de vacío durante aproximadamente 20 minutos para forzar el paso de aire.
- 5) Se congela los cartuchos hasta el día que se vayan a eluir los compuestos
- 6) Elución de los analitos: se añade 2 mL de acetonitrilo ó metanol. El proceso se repite añadiendo otros 2 mL de disolvente.
- 7) Evaporación del extracto: Se evapora el disolvente recogido sobre tubos de vidrio en un evaporador bajo corriente de nitrógeno (Figura 12) hasta sequedad.



Figura 12: Evaporador bajo corriente de nitrógeno

- 8) Redisolución del extracto con MeOH y transferencia al vial de inyección: se vierte en el tubo de vidrio seco 0,5 mL de MeOH. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se recoge el líquido del tubo y se hace resbalar por las paredes de los tubos 6 veces para que se redissuelva todo el contenido. Tras estas 6 redisoluciones, se vierte ese líquido a un vial de inyección de 2 mL. Este proceso se repite dos veces más con otros 0,5 mL de MeOH cada vez.

- 9) Evaporización de los viales: se evapora de nuevo utilizando el mismo procedimiento hasta sequedad.
- 10) Se congela los viales con los extractos secos hasta el día de la inyección.
- 11) Redisolución en fase móvil: el día que se inyecten las muestras, se añade 1 mL de fase móvil 95:5 H₂O/MeOH. Se agita bien con vortex para la solubilización del residuo seco. Se recoge el contenido del vial con una jeringa acoplada a una aguja, se retira la aguja de jeringa y se coloca un filtro de 0,22µm de tamaño de poro de PTFE. Se hace pasar el líquido a través del filtro y se lleva a un vial ámbar de 2 mL, el cual se inyecta en el UHPLC-MS/MS.

Finalmente, se lleva a cabo la determinación cromatográfica de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) empleado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid:



Figura 13: Equipo empleado en la determinación cromatográfica UHPLC-MS/MS

5.5 Determinación mediante UHPLC/MS-MS

- Separación cromatográfica: Para determinar la concentración de los analitos a estudiar, se utiliza una columna Phenomenex de octadecilsilano Kinetex EVO-C18 (2,1mm×50mm, tamaño de partícula 1,7µm). La fase móvil consiste en una mezcla H₂O/MeOH (95:5) al 0,1% en ácido fórmico en modo gradiente para realizar la separación. El porcentaje de MeOH inicial comienza siendo del 5% durante 1 minuto, tras el cual se aumenta hasta un 95% en MeOH durante 2 minutos, y después se mantiene constante durante 3 minutos. Transcurridos estos 5 minutos, se reduce el porcentaje de MeOH al 5%, para reequilibrar el

sistema, durante 4 minutos, antes de la inyección de una nueva muestra, en volúmenes de inyección de 10 μ l. El flujo de la fase móvil es de 0,5 mL/min, a una temperatura de operación de 40°C.

- Detección cromatográfica: Para monitorizar y cuantificar los analitos estudiados en los extractos se emplea un sistema de espectrometría de masas con una fuente de ionización tipo electrospray (ESI), tanto en modo positivo como negativo, en la cual se va a formar un aerosol donde están tanto los analitos como el disolvente. Sobre el capilar de ionización se aplica un potencial eléctrico. A su vez, está entrando un gas de secado (nitrógeno) que va a eliminar el disolvente. Las condiciones de trabajo en la fuente ESI fueron las siguientes:
 - Flujo de N₂ (gas de nebulización): 45 unidades
 - Capilar de ionización o voltaje del electrodo: 4500V
 - Gas cortina (N₂): 35 unidades
 - Gas de secado: 45 unidades
 - Temperatura del gas de secado: 400°C

Como analizador se emplea el triple cuadrupolo (QqQ) Sciex 6500+, en el cual se separan los iones en función de su relación masa/carga (m/z) empleando un ultra alto vacío para evitar colisiones entre los iones de analitos y otras partículas gaseosas. En el primer cuadrupolo (Q) se selecciona el pseudoión molecular de cada compuesto, que se fragmenta en el segundo cuadrupolo (q) mediante una energía de colisión aplicada por el gas N₂ en condiciones de alta energía. Esto permite monitorizar dos de las transiciones (ión padre-fragmento) que son característicos de cada compuesto, siendo normalmente la primera transición la más intensa y, por ello la utilizada para cuantificar. La segunda transición sirve para comprobar que se está integrando el pico correcto (selectividad) ya que debe aparecer al mismo tiempo de retención que la primera transición.

Como último elemento se encuentra el detector, que permite detectar el ión de interés proporcionando una señal eléctrica proporcional a la concentración del compuesto. Para la adquisición de datos se ha empleado el software SciexOS.

- Parámetros de análisis y esquema del sistema: Se muestra en la Tabla 14 los diferentes parámetros de operación óptimos para cada compuesto como son la masa del pseudoión molecular (Q1), la masa del fragmento (Q3), el potencial de entrada al espectrómetro de masas (DP), la energía de colisión para la fragmentación al pseudoión molecular (EC) y el potencial de salida de la celda de colisión (CXP) que focaliza los iones antes de su entrada al Q3. El voltaje EP para la colimación inicial de los iones se ha mantenido constante a 10V y el tiempo de observación para cada transición ha sido de 7ms. Asimismo, estos parámetros se observan en la Figura 14.

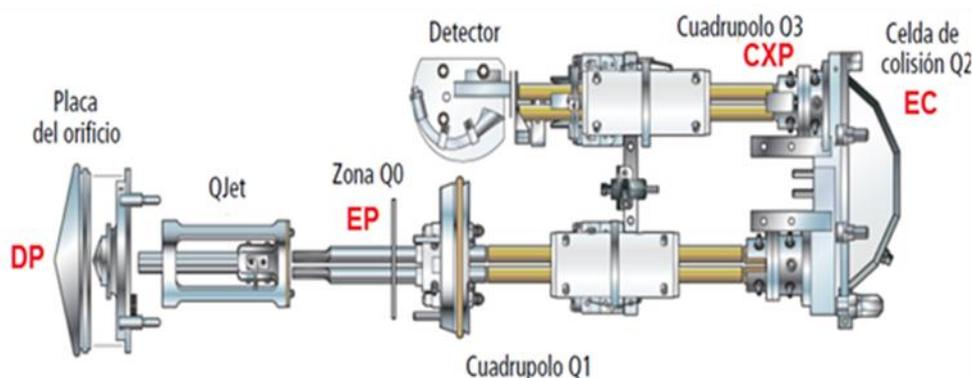


Figura 14: Esquema del Sistema de espectrometría de masas en tándem

Tabla 14: Parámetros de análisis del espectrómetro de masas para cada analito

RT (min)	Compuesto	Q1	Q3	DP (V)	EC (V)	CXP (V)
4,16	Doxiciclina 1	445,00	427,9	111	27	34
	Doxiciclina 2		410,1		37	36
3,18	Tetraciclina 1	444,95	410	51	27	32
5,80	Tetraciclina 2		427,1		19	
1,16	Sulfadiazina 1	251,00	155,9	71	23	20
	Sulfadiazina 2		108		31	12

1,52	Sulfatiazol 1	255,96	155,9	96	21	8
	Sulfatiazol 2		108,1		33	12
3,44	Sulfametizol 1	270,94	156	31	21	10
	Sulfametizol 2		108,1		35	12
3,54	Sulfadimidina 1	278,98	186	86	25	22
	Sulfadimidina 2		124,1		33	6
3,74	Enrofloxacina 1	359,98	341,9	91	29	38
	Enrofloxacina 2		316		33	
3,58	Ciprofloxacina 1	332,02	313,9	31	29	38
	Ciprofloxacina 2		231,1		57	16
3,72	Danofloxacina 1	357,95	340,1	86	33	24
	Danofloxacina 2		314,1		27	38
2,39	Marbofloxacina 1	362,98	319,9	66	23	24
	Marbofloxacina 2		205		25	
3,84	Florfenicol 1	357,83	339,9	66	13	24
	Florfenicol 2		241		25	14
1,80	Trimetoprima 1	291,02	230,1	51	33	18
	Trimetoprima 2		261,1		35	16
4,48	Tilosina 1	916,22	174,1	156	43	36
	Tilosina 2		772,3		51	10
4,90	Fenbendazol 1	299,97	268,1	96	29	22
	Fenbendazol 2		159		49	10
4,18	Pencilin G 1	334,93	160	111	23	18
	Pencilin G 2		176		19	16
3,44	Apramicina 1	271	156	50	20	19
8,53	Apramicina 2		180		40	
4,38	Tiamulina 1	494,10	192,2	51	29	10
	Tiamulina 2		119		59	12

4,94	Estrona 1	271,10	253,3	101	19	10
	Estrona 2		133,1		35	12
5,28	17- α Etinilstradiol 1	297,08	107	81	33	12
	17- α Etinilstradiol 2		77,1		71	79
0,90	Acetaminofeno 1	151,96	110	61	23	16
	Acetaminofeno 2		108,9		55	14
5,15	Diclofenaco 1	293,91	250	-10	-18	-7
	Diclofenaco 2		214,1		-28	-9
5,76	Ácido acetilsalicílico 1	181,07	160,9	71	17	14
5,12	Ácido acetilsalicílico 2		125,1		19	16
4,15	Ácido Salicílico 1	136,89	93	-40	-22	-15
6,94	Ácido Salicílico 2		94,7		-38	-33
4,78	Dexametasona 1	392,93	355,1	41	19	20
	Dexametasona 2		147		39	10

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estabilidad de contaminantes emergentes

6.1.1 Estabilidad en hidrolizados enzimáticos

Se ha estudiado la estabilidad de determinados principios activos veterinarios durante el proceso de hidrólisis enzimática siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.3.1. Todos los ensayos realizados poseen una concentración de 1500 $\mu\text{g/L}$.

Por esta razón, se visualiza los cromatogramas a través del programa SciexOS, en el cuál se integra y se extrae los valores que nos interesa de ellos, tales como el área o la relación señal/ruido (S/N).

Con ello, se compara la primera y la segunda transición de cada CE. Como resultado, en la primera transición donde la relación S/N es más intensa se lleva a cabo la cuantificación de los compuestos detectados. Por lo contrario, la segunda transición se visualiza para confirmar si la identidad del analito es fiable. Además, debe dar resultados iguales.

A continuación, se muestra en las Figuras 15 y 16 un ejemplo de cromatogramas para la monitorización de la ciprofloxacina en su primera y segunda transición:

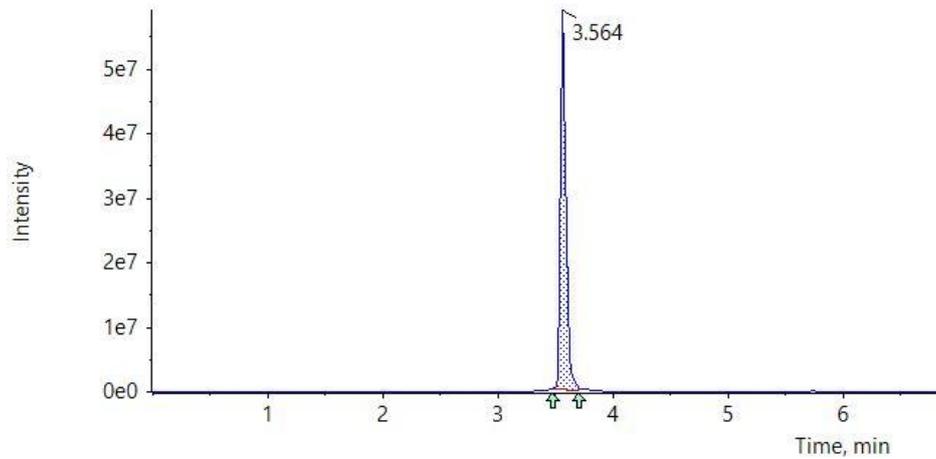


Figura 15: Cromatograma obtenido en la primera transición de ciprofloxacina en el análisis de la hidrólisis enzimática

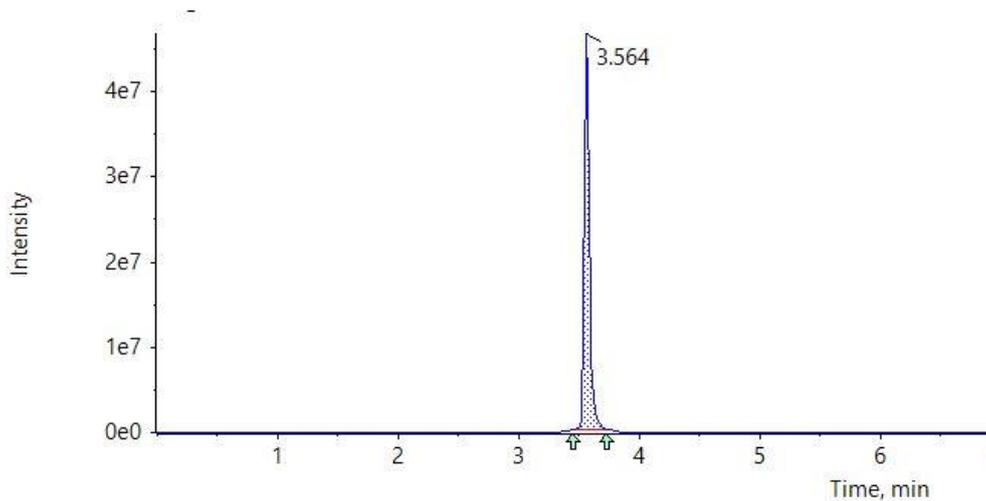


Figura 16: Cromatograma obtenido en la segunda transición de ciprofloxacina en el análisis de la hidrólisis enzimática.

Finalmente, en la Tabla 15 se recoge las áreas de pico integradas, el análisis de varianza de un factor (ANOVA) en la que se compara estadísticamente, y de forma global, los resultados obtenidos al inyectar el analito en agua, en medio enzimático sin hidrólisis y en medio enzimático después de la hidrólisis. También se evalúa mediante una prueba t de Student para 2 muestras, suponiendo que las varianzas son iguales o desiguales según corresponda, la influencia del medio enzimático en la cuantificación mediante espectrometría de masas, al comparar los valores medios en la inyección del patrón en agua y en la inyección del medio enzimático sin realizar la hidrólisis. Si la diferencia es significativa se calcula el porcentaje de disminución de la señal (llamada comúnmente efecto matriz) que se origina en presencia de la enzima. De la misma forma se evalúa mediante otra prueba de t si las áreas de pico obtenidas en el medio enzimático, con y sin hidrólisis, son diferentes para conocer si los contaminantes emergentes son estables o no en el tratamiento al que se sometería la biomasa algal. Cuando las áreas de pico son significativamente diferentes (nivel de confianza 95%, $p < 0.05$) se calcula el porcentaje de degradación del compuesto debido a la hidrólisis. Los ensayos se realizan por quintuplicado ($n=5$) y se calcula la precisión (repetitividad) de los mismos mediante el cálculo del coeficiente de variación.

De los 25 CE analizados, no se detectó respuesta en los cromatogramas de los ensayos para penicilina G, ácido acetilsalicílico y 17- α -etinilstradiol, lo que sugiere que este método de análisis no es apropiado para estos compuestos. No se mencionarán ya estos compuestos.

Para dexametasona, fenbendazol, florfenicol, oxitetraciclina, marbofloxacina, enrofloxacina, sulfadiazina, sulfatiazol, tiamulina, trimetoprima, tilosina, acetaminofeno y ácido salicílico se observó que influye significativamente la matriz. La presencia de la enzima origina una disminución del área de pico en los cromatogramas, con porcentajes de disminución que varían entre 9,8 y 23,5%, excepto para la tilosina, en la que esta origina un aumento de la señal con un 26%. Todos los contaminantes emergentes detectados fueron estables durante el proceso de hidrólisis enzimática. La repetitividad de los ensayos de hidrólisis varió entre un 4 y 16% ($n=5$).

Tabla 15: Hidrolisis enzimática. Resultados obtenidos del ANOVA y de las Prueba de t para cada CE (n=5)

Compuesto	Área			Repetibilidad (%)			ANOVA	Prueba t, Efecto Matriz		Prueba t, Estabilidad		
	Agua	Hidrolizado	Matriz	Agua	Hidrolizado	Matriz	p	p	Disminución de señal (%)	p	% degradación	
Ciprofloxacina	1	1,9·10 ⁸	1,99·10 ⁸	1,94·10 ⁸								
	2	1,86·10 ⁸	1,70·10 ⁸	2,18·10 ⁸								
	3	2,01·10 ⁸	1,75·10 ⁸	2,23·10 ⁸	10	9,8	9,4	**	**	0	**	-
	4	1,53·10 ⁸	2,16·10 ⁸	2,24·10 ⁸								
	5	1,93·10 ⁸	1,97·10 ⁸	1,81·10 ⁸								
Dexametasona	1	1,43·10 ⁶	1,21·10 ⁶	1,19·10 ⁶								
	2	1,36·10 ⁶	9,86·10 ⁵	1,01·10 ⁶								
	3	1,33·10 ⁶	1,45·10 ⁶	1,06·10 ⁶	5,2	15,9	17,5	**	0,035	19,3	**	-
	4	1,24·10 ⁶	1,37·10 ⁶	1,32·10 ⁶								
	5	1,33·10 ⁶	1,08·10 ⁶	8,18·10 ⁵								
Doxiciclina	1	5,65·10 ⁷	5,91·10 ⁷	5,37·10 ⁷								
	2	4,86·10 ⁷	5,26·10 ⁷	6,80·10 ⁷								
	3	5,54·10 ⁷	5,26·10 ⁷	6,39·10 ⁷	9,4	10,9	28,6	**	**	0	**	-
	4	4,49·10 ⁷	6,72·10 ⁷	7,30·10 ⁷								
	5	5,34·10 ⁷	5,43·10 ⁷	3,11·10 ⁷								
Danofloxacina	1	2,29·10 ⁸	2,24·10 ⁸	2,58·10 ⁸								
	2	2,24·10 ⁸	2,04·10 ⁸	2,78·10 ⁸	7,0	9,3	14,8	**	**	0	**	-
	3	2,39·10 ⁸	2,25·10 ⁸	1,91·10 ⁸								

	4	1,99·10 ⁸	2,63·10 ⁸	2,75·10 ⁸								
	5	2,33·10 ⁸	2,35·10 ⁸	2,29·10 ⁸								
	1	4,50·10 ⁸	3,59·10 ⁸	3,58·10 ⁸								
	2	4,51·10 ⁸	3,68·10 ⁸	3,25·10 ⁸								
Fenbendazol	3	4,21·10 ⁸	3,30·10 ⁸	3,42·10 ⁸	3,2	6,2	4,4	<0,0001	<0,0001	23,5	**	-
	4	4,33·10 ⁸	3,40·10 ⁸	3,21·10 ⁸								
	5	4,54·10 ⁸	3,86·10 ⁸	3,41·10 ⁸								
	1	1,43·10 ⁷	1,13·10 ⁷	1,14·10 ⁷								
	2	1,37·10 ⁷	1,34·10 ⁷	1,12·10 ⁷								
Florfenicol	3	1,52·10 ⁷	9,86·10 ⁷	1,37·10 ⁷	4,7	11,6	10,8	**	0,030	12,4	**	-
	4	1,36·10 ⁷	1,24·10 ⁷	1,39·10 ⁷								
	5	1,38·10 ⁷	1,11·10 ⁷	1,14·10 ⁷								
	1	5,33·10 ⁷	4,02·10 ⁷	4,15·10 ⁷								
	2	5,27·10 ⁷	3,64·10 ⁷	5,19·10 ⁷								
Oxitetraciclina	3	5,14·10 ⁷	3,74·10 ⁷	4,72·10 ⁷	3,5	14,7	18,6	0,013	0,026	22,9	**	-
	4	4,89·10 ⁷	5,17·10 ⁷	4,68·10 ⁷								
	5	5,29·10 ⁷	4,29·10 ⁷	3,11·10 ⁷								
	1	3,43·10 ⁸	2,95·10 ⁸	2,93·10 ⁸								
	2	3,52·10 ⁸	2,76·10 ⁸	3,29·10 ⁸								
Sulfadimidina	3	3,47·10 ⁸	2,83·10 ⁸	3,42·10 ⁸	2,8	6,1	7,9	0,0038	**	0	**	-
	4	3,34·10 ⁸	3,22·10 ⁸	3,41·10 ⁸								
	5	3,60·10 ⁸	3,04·10 ⁸	2,91·10 ⁸								
	1	1,04·10 ⁸	8,26·10 ⁷	8,26·10 ⁷								
Marbofloxacina	2	9,70·10 ⁷	6,61·10 ⁷	8,45·10 ⁷	3,6	13,7	8,5	0,0024	0,0042	14,4	**	-

	3	$9,75 \cdot 10^7$	$6,92 \cdot 10^7$	$8,84 \cdot 10^7$								
	4	$9,51 \cdot 10^7$	$9,24 \cdot 10^7$	$9,40 \cdot 10^7$								
	5	$1,02 \cdot 10^8$	$7,58 \cdot 10^7$	$7,45 \cdot 10^7$								
	1	$1,54 \cdot 10^8$	$1,21 \cdot 10^8$	$1,23 \cdot 10^8$								
	2	$1,52 \cdot 10^8$	$1,19 \cdot 10^8$	$1,40 \cdot 10^8$								
Enrofloxacin	3	$1,55 \cdot 10^8$	$1,33 \cdot 10^8$	$1,45 \cdot 10^8$	1,9	6,3	8,3	0,0001	0,0069	14,6	**	-
	4	$1,48 \cdot 10^8$	$1,12 \cdot 10^8$	$1,23 \cdot 10^8$								
	5	$1,56 \cdot 10^8$	$1,22 \cdot 10^8$	$1,23 \cdot 10^8$								
	1	$1,05 \cdot 10^8$	$8,59 \cdot 10^7$	$7,76 \cdot 10^7$								
	2	$9,13 \cdot 10^7$	$7,40 \cdot 10^7$	$8,63 \cdot 10^7$								
Sulfadiazina	3	$9,25 \cdot 10^7$	$7,46 \cdot 10^7$	$8,73 \cdot 10^7$	5,8	9,5	10,4	0,011	0,012	15,2	**	-
	4	$9,83 \cdot 10^7$	$8,78 \cdot 10^7$	$9,19 \cdot 10^7$								
	5	$1,01 \cdot 10^8$	$9,10 \cdot 10^7$	$7,04 \cdot 10^7$								
	1	$1,65 \cdot 10^8$	$1,26 \cdot 10^8$	$1,28 \cdot 10^8$								
	2	$1,49 \cdot 10^8$	$1,20 \cdot 10^8$	$1,50 \cdot 10^8$								
Sulfametizol	3	$1,65 \cdot 10^8$	$1,17 \cdot 10^8$	$1,61 \cdot 10^8$	4,7	7,7	13,1	0,012	**	0	**	-
	4	$1,52 \cdot 10^8$	$1,37 \cdot 10^8$	$1,57 \cdot 10^8$								
	5	$1,55 \cdot 10^8$	$1,38 \cdot 10^8$	$1,18 \cdot 10^8$								
	1	$1,73 \cdot 10^8$	$1,51 \cdot 10^8$	$1,33 \cdot 10^8$								
	2	$1,64 \cdot 10^8$	$1,31 \cdot 10^8$	$1,49 \cdot 10^8$								
Sulfatiazol	3	$1,62 \cdot 10^8$	$1,37 \cdot 10^8$	$1,43 \cdot 10^8$	4,8	9,0	9,9	0,0065	0,0027	18	**	-
	4	$1,52 \cdot 10^8$	$1,64 \cdot 10^8$	$1,19 \cdot 10^8$								
	5	$1,61 \cdot 10^8$	$1,51 \cdot 10^8$	$1,21 \cdot 10^8$								
Tiamulina	1	$1,92 \cdot 10^8$	$1,61 \cdot 10^8$	$1,33 \cdot 10^8$	6,8	9,4	13,3	0,018	0,011	18,9	**	-

	2	$1,61 \cdot 10^8$	$1,61 \cdot 10^8$	$1,29 \cdot 10^8$								
	3	$1,61 \cdot 10^8$	$1,61 \cdot 10^8$	$1,50 \cdot 10^8$								
	4	$1,61 \cdot 10^8$	$1,61 \cdot 10^8$	$1,68 \cdot 10^8$								
	5	$1,61 \cdot 10^8$	$1,61 \cdot 10^8$	$1,21 \cdot 10^8$								
Trimetoprima	1	$4,25 \cdot 10^8$	$3,66 \cdot 10^8$	$3,68 \cdot 10^8$								
	2	$3,99 \cdot 10^8$	$3,25 \cdot 10^8$	$3,56 \cdot 10^8$								
	3	$4,16 \cdot 10^8$	$3,23 \cdot 10^8$	$3,86 \cdot 10^8$	3	8	5,6	0,0019	0,0056	9,8	**	-
	4	$4,20 \cdot 10^8$	$3,89 \cdot 10^8$	$3,98 \cdot 10^8$								
	5	$3,99 \cdot 10^8$	$3,44 \cdot 10^8$	$3,48 \cdot 10^8$								
Tetraciclina	1	$9,14 \cdot 10^7$	$6,72 \cdot 10^7$	$7,52 \cdot 10^7$								
	2	$8,10 \cdot 10^7$	$6,58 \cdot 10^7$	$8,47 \cdot 10^7$								
	3	$7,97 \cdot 10^7$	$6,07 \cdot 10^7$	$9,04 \cdot 10^7$	7,1	14,7	17,3	**	**	0	**	-
	4	$7,93 \cdot 10^7$	$8,78 \cdot 10^7$	$8,85 \cdot 10^7$								
	5	$9,02 \cdot 10^7$	$7,12 \cdot 10^7$	$5,71 \cdot 10^7$								
Tilosina	1	$8,99 \cdot 10^6$	$1,10 \cdot 10^7$	$1,63 \cdot 10^7$								
	2	$1,27 \cdot 10^7$	$1,16 \cdot 10^7$	$1,35 \cdot 10^7$								
	3	$9,48 \cdot 10^6$	$1,27 \cdot 10^7$	$1,32 \cdot 10^7$	17,8	15,2	11,5	**	0,032	-26,6	**	-
	4	$1,32 \cdot 10^7$	$1,55 \cdot 10^7$	$1,38 \cdot 10^7$								
	5	$9,98 \cdot 10^6$	$1,10 \cdot 10^7$	$1,20 \cdot 10^7$								
Acetaminofeno	1	$1,84 \cdot 10^8$	$1,52 \cdot 10^8$	$1,30 \cdot 10^8$								
	2	$1,72 \cdot 10^8$	$1,22 \cdot 10^8$	$1,56 \cdot 10^8$								
	3	$1,66 \cdot 10^8$	$1,52 \cdot 10^8$	$1,45 \cdot 10^8$	5	8,5	12	0,0011	0,0003	20,8	**	-
	4	$1,79 \cdot 10^8$	$1,42 \cdot 10^8$	$1,56 \cdot 10^8$								
	5	$1,88 \cdot 10^8$	$1,47 \cdot 10^8$	$1,18 \cdot 10^8$								

Apramicina	1	6,07·10 ⁷	5,50·10 ⁷	4,84·10 ⁷								
	2	5,91·10 ⁷	4,59·10 ⁷	5,59·10 ⁷								
	3	6,32·10 ⁷	4,50·10 ⁷	6,26·10 ⁷	5,5	12,5	11	**	**	0	**	-
	4	5,54·10 ⁷	5,99·10 ⁷	5,98·10 ⁷								
	5	6,34·10 ⁷	5,56·10 ⁷	5,02·10 ⁷								
Ácido Salicílico	1	8,03·10 ⁷	6,21·10 ⁷	6,13·10 ⁷								
	2	7,46·10 ⁷	5,44·10 ⁷	6,09·10 ⁷								
	3	7,88·10 ⁷	5,14·10 ⁷	7,03·10 ⁷	6	12,9	13,6	0,0022	0,014	17,9	**	-
	4	7,48·10 ⁷	6,96·10 ⁷	7,70·10 ⁷								
	5	8,61·10 ⁷	5,39·10 ⁷	5,46·10 ⁷								
Diclofenaco	1	2,92·10 ⁷	2,45·10 ⁷	2,64·10 ⁷								
	2	3,26·10 ⁷	2,40·10 ⁷	3,05·10 ⁷								
	3	3,22·10 ⁷	2,28·10 ⁷	3,01·10 ⁷	6,2	6,7	15,1	0,016	**	0	**	-
	4	2,82·10 ⁷	2,73·10 ⁷	2,85·10 ⁷								
	5	3,09·10 ⁷	2,43·10 ⁷	2,04·10 ⁷								
Estrona	1	2,78·10 ⁷	1,96·10 ⁷	1,48·10 ⁷								
	2	2,66·10 ⁷	1,75·10 ⁷	2,77·10 ⁷								
	3	2,44·10 ⁷	1,80·10 ⁷	1,94·10 ⁷	6	7,4	17,7	0,0002	**	0	**	-
	4	2,49·10 ⁷	1,76·10 ⁷	2,24·10 ⁷								
	5	2,77·10 ⁷	1,59·10 ⁷	1,70·10 ⁷								

p: nivel de significación; **: *p*>0,05 no hay diferencia significativa; -:son estables

6.1.2 Estabilidad en hidrolizados químicos

Se ha estudiado también la estabilidad de determinados principios activos veterinarios durante el proceso de hidrólisis químico siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.3.2. Se lleva a cabo un procedimiento similar al del apartado anterior. Estos ensayos poseen una concentración de 400 µg/L.

En esta Tabla 16 se recoge las áreas integradas para los hidrolizados ácidos y básicos, el análisis de varianza de un factor (ANOVA) para saber si existe una diferencia global entre las áreas de pico de los diferentes ensayos, y los resultados de tres pruebas de t. Mediante las pruebas de t se ha establecido estadísticamente si existe efecto matriz al comparar las áreas de pico de los analitos inyectadas en agua y el medio de referencia (disolución reguladora acético/acetato), si existe degradación en medio ácido (comparación áreas en medio ácido con y medio de referencia sin hidrólisis) y en medio básico (comparación áreas en medio básico con y medio de referencia sin hidrólisis).

Cuando se comparan las áreas de pico obtenidas después de la hidrólisis química con las áreas de pico del medio ácido o básico correspondiente, sin hacer la hidrólisis, se comprueba que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en diversos casos, lo que indica que la hidrólisis degrada esos compuestos. Ocurre esto para fenbendazol, dexametasona, florfenicol, oxitetraciclina, sulfadimidina, marbofloxacina, sulfametizol, tilosina y tetraciclina. Sin embargo, para doxiciclina y tiamulina solo se degrada en medio básico.

Por otra parte, se observa también que la matriz de referencia disminuye las áreas de pico de los compuestos con respecto a la inyección de disoluciones de esos compuestos en agua. En este caso, la disminución de la señal por el denominado efecto matriz varía entre 20 y 99%.

Tabla 16: Hidrólisis química. Resultados obtenidos del ANOVA y en las pruebas de t para cada CE (n=5)

Compuesto	Área				Repetibilidad (%)				ANOVA	Prueba t, Efecto Matriz		Prueba t, Estabilidad				
	Agua	Matriz	Medio Ácido	Medio Básico	Agua	Matriz	Medio Ácido	Medio Básico	p	p	Disminución de señal %	Medio Ácido		Medio Básico		
												p	% degradación	p	% degradación	
Ciprofloxacina	1	1,39·10 ⁸	8,74·10 ⁷	5,18·10 ⁷	6,38·10 ⁷											
	2	1,66·10 ⁸	9,38·10 ⁷	5,58·10 ⁷	6,25·10 ⁷											
	3	1,47·10 ⁸	8,57·10 ⁷	5,63·10 ⁷	7,25·10 ⁷	8,2	5,2	4,2	8,4	<0,0001	<0,0001	41,2	<0,0001	37,8	<0,0001	27,1
	4	1,36·10 ⁸	8,90·10 ⁷	5,60·10 ⁷	5,79·10 ⁷											
	5	1,55·10 ⁸	8,13·10 ⁷	5,19·10 ⁷	6,20·10 ⁷											
Dexametasona	1	1,15·10 ⁶	3,83·10 ⁵	-	-											
	2	1,61·10 ⁶	3,52·10 ⁵	-	-											
	3	1,43·10 ⁶	3,11·10 ⁵	-	-	13,8	9,4	-	-	<0,0001	<0,0001	76,4	-	100	-	100
	4	1,31·10 ⁶	3,13·10 ⁵	-	-											
	5	1,60·10 ⁶	3,17·10 ⁵	-	-											
Doxiciclina	1	-	1,85·10 ⁷	4,23·10 ⁶	-											
	2	-	5,01·10 ⁷	6,44·10 ⁶	-											
	3	-	1,91·10 ⁷	3,29·10 ⁶	-	-	12,8	29,9	-	<0,0001	-	0	<0,0001	72,9	-	100
	4	-	1,45·10 ⁷	3,83·10 ⁶	-											
	5	-	1,63·10 ⁷	6,22·10 ⁶	-											
Danofloxacina	1	1,26·10 ⁸	1,37·10 ⁸	1,26·10 ⁸	1,39·10 ⁸	12,2	7,2	20,6	24,9	**	**	0	**	-	**	-
	2	1,55·10 ⁸	1,52·10 ⁸	1,50·10 ⁸	2,13·10 ⁸											

	3	1,59·10 ⁸	1,30·10 ⁸	1,06·10 ⁸	1,29·10 ⁸											
	4	1,49·10 ⁸	1,28·10 ⁸	1,59·10 ⁸	1,28·10 ⁸											
	5	1,78·10 ⁸	1,33·10 ⁸	9,85·10 ⁷	1,29·10 ⁸											
Fenbendazol	1	3,31·10 ⁸	2,67·10 ⁸	-	-											
	2	4,09·10 ⁸	2,88·10 ⁸	-	-											
	3	3,65·10 ⁸	3,02·10 ⁸	-	-	9,3	6,1	-	-	<0,0001	0,003	20	-	100	-	100
	4	3,32·10 ⁸	2,86·10 ⁸	-	-											
	5	3,86·10 ⁸	3,15·10 ⁸	-	-											
Florfenicol	1	1,67·10 ⁷	3,82·10 ⁶	-	-											
	2	1,46·10 ⁷	4,25·10 ⁶	-	-											
	3	1,48·10 ⁷	4,17·10 ⁶	-	-	7,1	6,1	-	-	<0,0001	<0,0001	75	-	100	-	100
	4	1,70·10 ⁷	3,65·10 ⁶	-	-											
	5	1,65·10 ⁷	4,00·10 ⁶	-	-											
Oxitetraciclina	1	5,82·10 ⁷	1,70·10 ⁷	-	-											
	2	5,67·10 ⁷	1,88·10 ⁷	-	-											
	3	5,71·10 ⁷	1,69·10 ⁷	-	-	5,8	5,1	-	-	<0,0001	<0,0001	71,2	-	100	-	100
	4	6,37·10 ⁷	1,68·10 ⁷	-	-											
	5	6,36·10 ⁷	1,68·10 ⁷	-	-											
Sulfadimidina	1	3,51·10 ⁸	9,59·10 ⁷	-	-											
	2	3,49·10 ⁸	9,83·10 ⁷	-	-											
	3	3,21·10 ⁸	9,40·10 ⁷	-	-	4,9	4,1	-	-	<0,0001	<0,0001	72,8	-	100	-	100
	4	3,60·10 ⁸	9,80·10 ⁷	-	-											
	5	3,66·10 ⁸	8,88·10 ⁷	-	-											
Marbofloxacina	1	1,16·10 ⁸	6,17·10 ⁷	-	-	2,5	3,9	-	-	<0,0001	<0,0001	49,8	-	100	-	100
	2	1,22·10 ⁸	6,40·10 ⁷	-	-											

	3	1,19·10 ⁸	5,80·10 ⁷	-	-											
	4	1,22·10 ⁸	5,94·10 ⁷	-	-											
	5	1,24·10 ⁸	5,92·10 ⁷	-	-											
	1	1,34·10 ⁸	7,29·10 ⁷	5,96·10 ⁷	7,22·10 ⁷											
	2	1,36·10 ⁸	8,07·10 ⁷	6,33·10 ⁷	6,65·10 ⁷											
Enrofloxacin	3	1,33·10 ⁸	7,75·10 ⁷	6,08·10 ⁷	6,25·10 ⁷	2,6	4,2	4	5,8	<0,0001	<0,0001	42,6	<0,0001	21,6	0,003	12,5
	4	1,27·10 ⁸	7,72·10 ⁷	5,92·10 ⁷	6,38·10 ⁷											
	5	1,35·10 ⁸	7,36·10 ⁷	5,68·10 ⁷	6,90·10 ⁷											
	1	9,56·10 ⁷	4,51·10 ⁷	4,51·10 ⁶	-											
	2	8,91·10 ⁷	4,85·10 ⁷	4,85·10 ⁶	-											
Sulfadiazina	3	9,60·10 ⁷	4,15·10 ⁷	4,15·10 ⁶	-	6,7	6,2	4	-	<0,0001	<0,0001	52,3	-	87,7	-	100
	4	1,07·10 ⁸	4,80·10 ⁷	4,80·10 ⁶	-											
	5	9,55·10 ⁷	4,74·10 ⁷	4,74·10 ⁶	-											
	1	1,51·10 ⁸	2,94·10 ⁷	-	-											
	2	1,49·10 ⁸	3,12·10 ⁷	-	-											
Sulfametizol	3	1,40·10 ⁸	2,99·10 ⁷	-	-	5,5	2,5	-	-	<0,0001	<0,0001	80,1	-	100	-	100
	4	1,60·10 ⁸	3,09·10 ⁷	-	-											
	5	1,60·10 ⁸	2,99·10 ⁷	-	-											
	1	1,04·10 ⁷	3,07·10 ⁶	-	-											
	2	9,48·10 ⁶	2,87·10 ⁶	-	-											
Tilosina	3	1,04·10 ⁷	3,36·10 ⁶	-	-	8,6	13	-	-	<0,0001	<0,0001	65,4	-	100	-	100
	4	9,66·10 ⁶	4,01·10 ⁶	-	-											
	5	8,39·10 ⁶	3,42·10 ⁶	-	-											
	1	1,64·10 ⁸	2,65·10 ⁷	2,67·10 ⁷	2,27·10 ⁷	7,3	1,9	4,7	10,4	**	<0,0001	84,5	**	-	**	-
Sulfatiazol	2	1,68·10 ⁸	2,69·10 ⁷	2,69·10 ⁷	2,86·10 ⁷											

	3	1,64·10 ⁸	2,77·10 ⁷	2,62·10 ⁷	2,55·10 ⁷											
	4	1,84·10 ⁸	2,73·10 ⁷	2,45·10 ⁷	2,44·10 ⁷											
	5	1,92·10 ⁸	2,65·10 ⁷	2,44·10 ⁷	2,90·10 ⁷											
	1	9,23·10 ⁷	7,53·10 ⁷	3,55·10 ⁶	-											
	2	9,90·10 ⁷	7,82·10 ⁷	4,96·10 ⁶	-											
Tiamulina	3	1,02·10 ⁸	7,58·10 ⁷	6,07·10 ⁶	-	11,7	3,2	19,8	-	<0,0001	0,007	26,9	<0,0001	93,1	-	100
	4	1,24·10 ⁸	7,16·10 ⁷	5,98·10 ⁶	-											
	5	9,81·10 ⁷	7,54·10 ⁷	5,53·10 ⁶	-											
	1	4,30·10 ⁸	2,12·10 ⁸	1,41·10 ⁸	2,48·10 ⁸											
	2	4,53·10 ⁸	2,28·10 ⁸	1,49·10 ⁸	2,33·10 ⁸											
Trimetoprima	3	4,31·10 ⁸	2,16·10 ⁸	1,40·10 ⁸	2,32·10 ⁸	2,1	3,2	6,4	23,7	0,002	<0,0001	50,8	<0,0001	36,3	**	-
	4	4,42·10 ⁸	2,14·10 ⁸	1,34·10 ⁸	2,40·10 ⁸											
	5	4,38·10 ⁸	2,10·10 ⁸	1,25·10 ⁸	1,25·10 ⁸											
	1	9,55·10 ⁷	1,42·10 ⁷	-	-											
	2	8,56·10 ⁷	1,50·10 ⁷	-	-											
Tetraciclina	3	9,55·10 ⁷	1,47·10 ⁷	-	-	5,3	5,4	-	-	<0,0001	0,002	84,5	-	100	-	100
	4	9,88·10 ⁷	1,34·10 ⁷	-	-											
	5	9,39·10 ⁷	1,55·10 ⁷	-	-											
	1	4,38·10 ⁸	1,11·10 ⁷	-	-											
	2	4,38·10 ⁸	1,24·10 ⁷	-	-											
Acetaminofeno	3	4,38·10 ⁸	1,22·10 ⁷	-	-	3,8	4,4	-	-	<0,0001	<0,0001	93,2	-	100	-	100
	4	4,38·10 ⁸	1,16·10 ⁷	-	-											
	5	4,38·10 ⁸	1,19·10 ⁷	-	-											
	1	5,79·10 ⁷	2,02·10 ⁷	1,16·10 ⁷	1,81·10 ⁷	6,2	2,8	1,8	7,7	0,0003	<0,0001	67,1	**	-	0,001	15,9
Apramicina	2	6,61·10 ⁷	2,15·10 ⁷	1,13·10 ⁷	1,78·10 ⁷											

	3	5,93·10 ⁷	2,00·10 ⁷	1,16·10 ⁷	1,74·10 ⁷											
	4	6,51·10 ⁷	2,08·10 ⁷	1,16·10 ⁷	1,51·10 ⁷											
	5	6,55·10 ⁷	2,07·10 ⁷	1,12·10 ⁷	1,84·10 ⁷											
	1	7,89·10 ⁷	4,96·10 ⁷	4,22·10 ⁷	4,89·10 ⁷											
	2	7,57·10 ⁷	5,18·10 ⁷	4,41·10 ⁷	4,86·10 ⁷											
Ácido Salicílico	3	7,58·10 ⁷	5,08·10 ⁷	4,01·10 ⁷	4,95·10 ⁷	2,3	5,3	5,1	6,3	0,0022	<0,0001	36,8	0,002	14	**	-
	4	7,76·10 ⁷	4,71·10 ⁷	4,43·10 ⁷	5,17·10 ⁷											
	5	7,96·10 ⁷	4,56·10 ⁷	3,98·10 ⁷	4,34·10 ⁷											
	1	3,13·10 ⁷	9,16·10 ⁶	-	9,40·10 ⁶											
	2	3,21·10 ⁷	9,04·10 ⁶	-	9,52·10 ⁶											
Diclofenaco	3	3,19·10 ⁷	9,31·10 ⁶	-	9,32·10 ⁶	3,1	4,9	-	0,8	<0,0001	<0,0001	99	-	100	**	-
	4	3,40·10 ⁷	9,45·10 ⁶	-	9,44·10 ⁶											
	5	3,19·10 ⁷	1,02·10 ⁷	-	9,41·10 ⁶											
	1	2,73·10 ⁷	9,21·10 ⁶	4,23·10 ⁶	9,35·10 ⁶											
	2	3,28·10 ⁷	8,92·10 ⁶	5,22·10 ⁶	9,33·10 ⁶											
Estrona	3	3,26·10 ⁷	8,09·10 ⁶	3,81·10 ⁶	9,08·10 ⁶	9	9,8	12,7	1,2	<0,0001	<0,0001	85	<0,0001	45,9	**	-
	4	2,78·10 ⁷	8,94·10 ⁶	5,05·10 ⁶	9,22·10 ⁶											
	5	3,22·10 ⁷	7,19·10 ⁶	4,59·10 ⁶	9,17·10 ⁶											

p: nivel de significación; **: *p*>0,05 no hay diferencia significativa; -: sin datos

6.1.2.1 Cuantificación de los residuos. Porcentaje de degradación.

El estudio de estabilidad permite estimar el porcentaje de degradación de los compuestos en función de las áreas de pico, pero este porcentaje se ha calculado de forma fidedigna a partir de la medida de las concentraciones finales en las muestras sometidas a hidrólisis dado que se conoce la concentración inicial de los compuestos en los ensayos. La cuantificación se ha hecho mediante el calibrado matriz patrón de acuerdo con lo indicado en el apartado 5.3.3.

La matriz de las muestras debe ser similar a la matriz de los patrones con los que se construye el calibrado. Para ello se representa el área de pico determinada en el composite de muestras frente a la concentración de patrón añadida expresado en $\mu\text{g/L}$. Mediante un calibrado adiciones patrón (MAP) se cuantifica el presente en el composite. A continuación, se lleva a cabo el calibrado matriz-patrón (MP) para la cuantificación de los residuos. En este calibrado, se representa el área de pico frente a la concentración total en la muestra, entendiendo como tal la suma de la concentración de droga propia del composite y de la concentración añadida al dopar cada alícuota. La cuantificación de droga en cada ensayo individual se cuantifica mediante este calibrado matriz-patrón. Se considera parámetros de validación básicos tales como el rango lineal, coeficiente de determinación (R^2), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), sensibilidad. La sensibilidad se define como la pendiente del intervalo lineal, es decir, el cambio en la respuesta obtenida (área de pico) frente al cambio en el estímulo (concentración total de la muestra). El ajuste lineal se demuestra a través del coeficiente de determinación (R^2), el cuál varía de 0 a 1. Se consigue mejor ajuste cuando el valor sea lo más próximo a 1 debido a que el porcentaje de varianza de datos es mayor. El rango lineal se define como el intervalo de concentraciones para las que se ha demostrado que el método sigue un comportamiento lineal, es decir, cuando la señal (área de pico) es proporcional a la concentración. Este rango lineal se considera habitualmente desde la concentración mínima que se puede determinar (LOQ) hasta el límite superior de concentración en el que se mantiene la relación de linealidad, si bien en este trabajo se ha verificado la

linealidad desde concentraciones habitualmente superiores ya que se han obtenido LOQs por debajo de las concentraciones de dopado ensayadas.

El LOD es la cantidad mínima de compuesto que proporciona una señal perfectamente diferenciable del ruido de fondo, mientras que el LOQ es la cantidad mínima de compuesto que se puede determinar con exactitud, y se calculan comúnmente como 3 o 10 veces la relación S/N, respectivamente. Esta relación S/N ha sido calculado por el software en los cromatogramas de extractos de muestras dopadas con pequeñas concentraciones. Los datos correspondientes a estos parámetros se recogen en las Tablas 17 y 18.

En la Figura 17 correspondiente a un cromatograma iónico total (TIC) se observan 8 compuestos de los 25 CE cuantificados, coincidiendo con aquellos con degradación residual. El resto de los compuestos poseen señales más pequeñas y sólo se percibirían en el cromatograma de iones extraído.

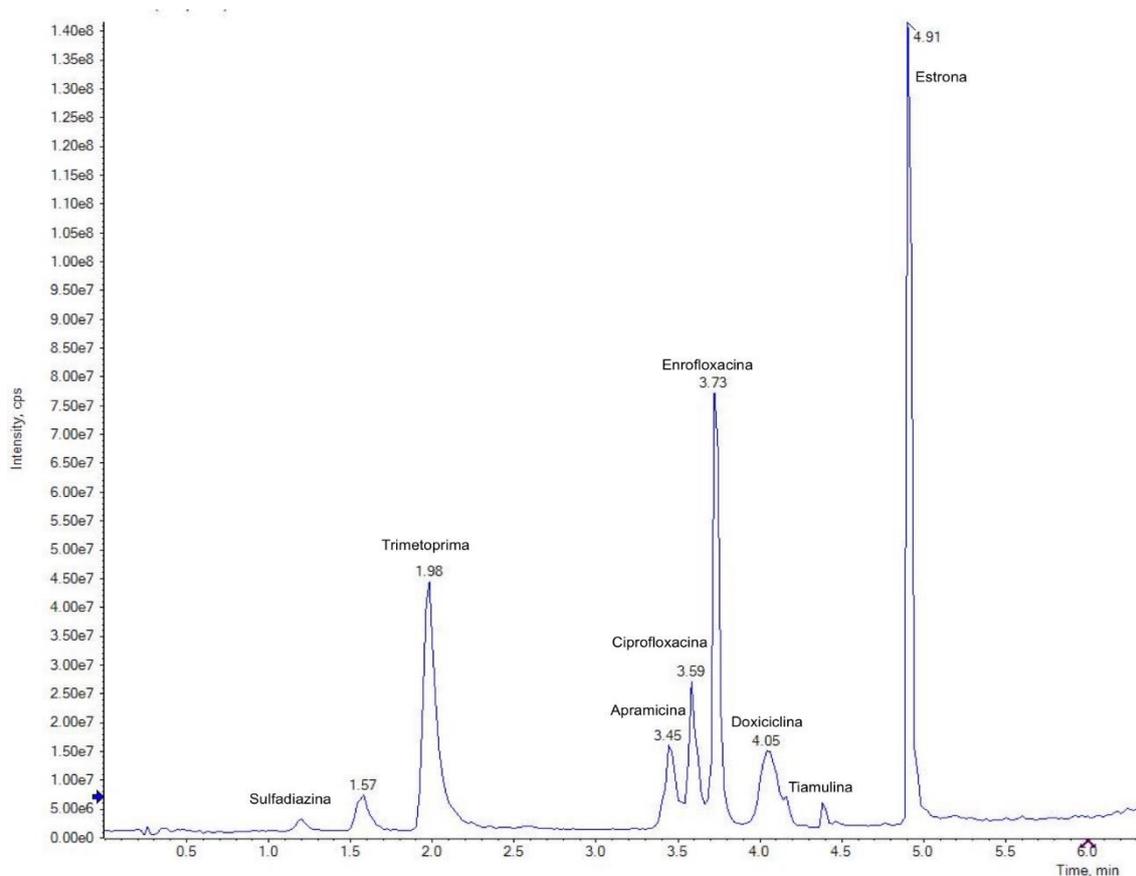


Figura 17: TIC mostrando algunos de los compuestos cuantificados

Tabla 17: Parámetros de validación obtenidos mediante MAP y MP en hidrolizados ácidos para los compuestos en los que se ha hecho la cuantificación

MEDIO ÁCIDO										
Compuesto	Calibrado Matriz Patrón (MP)					Calibrado Adiciones Patrón (MAP)				
	Ordenada	Pendiente	R ²	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Intervalo lineal (µg/L)	Ordenada	Pendiente	R ²	C _{composite} (µg/L)
Trimetoprima	1,65·10 ⁶	2,05·10 ⁶	0,9984	0,1	0,3	13,2-132,9	2,67·10 ⁷	2,06·10 ⁶	0,9984	12,9
Apramicina	-8,7·10 ³	2,6·10 ⁵	0,9924	0,3	0,8	16,9-56,6	4,32·10 ⁶	2,60·10 ⁵	0,9932	16,6
Estrona	-2,06·10 ⁴	1,11·10 ⁵	0,9871	2	6	14,1-93,9	1,53·10 ⁶	1,11·10 ⁵	0,9881	13,9
Ciprofloxacina	-2,92·10 ⁵	5,62·10 ⁵	0,9964	0,4	1,2	14,9-134,9	8,34·10 ⁶	5,59·10 ⁵	0,997	14,9
Doxiciclina	-4,46·10 ³	2,24·10 ³	0,9825	1,5	4,6	8-63	6,34·10 ³	2,14·10 ³	0,9772	3
Enrofloxacina	3,31·10 ⁵	2,43·10 ⁵	0,9597	0,4	1,4	20,3-115,3	3,78·10 ⁶	2,47·10 ⁵	0,9688	15,3
Sulfadiazina	-5,39·10 ⁴	1,57·10 ⁵	0,9921	0,3	0,9	7,7-127,5	1,17·10 ⁶	1,57·10 ⁵	0,993	7,5
Tiamulina	-2,44·10 ⁵	9,58·10 ⁵	0,9891	0,1	0,2	0,4-20,2	1,80·10 ⁵	9,41·10 ⁵	0,9907	0,2

Tabla 18: Parámetros de validación obtenidos mediante MAP y MP en hidrolizados básicos para los compuestos en los que se ha hecho la cuantificación.

MEDIO BÁSICO										
Compuesto	Calibrado Matriz Patrón (MP)					Calibrado Adiciones Patrón (MAP)				
	Ordenada	Pendiente	R ²	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Intervalo lineal (µg/L)	Ordenada	Pendiente	R ²	C _{composite} (µg/L)
Trimetoprima	2,91·10 ⁶	2,29·10 ⁶	0,9415	0,1	0,3	18,9-38,7	4,44·10 ⁷	2,38·10 ⁶	0,9549	18,7
Apramicina	2,84·10 ⁴	5,67·10 ⁴	0,9188	0,3	1	19,6-39,4	1,11·10 ⁶	5,75·10 ⁴	0,9323	19,4
Estrona	-3,95·10 ⁴	6,68·10 ⁴	0,9769	0,7	2,5	13,4-133,2	8,74·10 ⁵	6,63·10 ⁴	0,9775	13,2
Ciprofloxacina	-2,10·10 ⁶	7,31·10 ⁵	0,998	0,4	1,2	20,9-130,9	7,77·10 ⁶	7,10·10 ⁵	0,9962	10,9
Enrofloxacina	6,84·10 ⁴	3,39·10 ⁵	0,9768	0,3	1,1	13,2-132,9	4,38·10 ⁶	3,39·10 ⁵	0,9799	12,9

A continuación, se representa gráficamente en la Figura 18 la línea de calibrado de adiciones patrón (MAP) de la ciprofloxacina en medio ácido con su consecutivo calibrado Matriz-Patrón (MP) en la Figura 19.

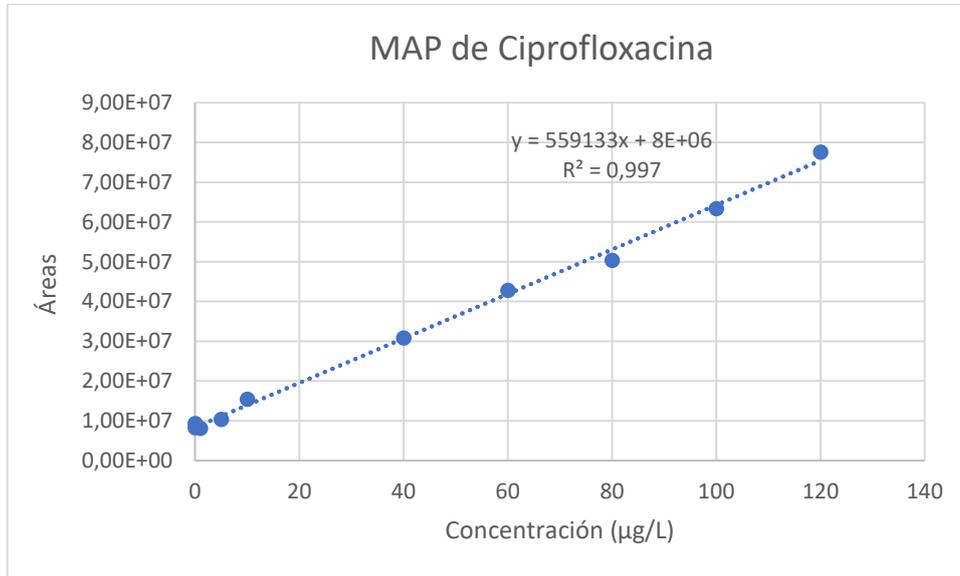


Figura 18: Calibrado Adiciones Patrón (MAP) para la Ciprofloxacina en medio ácido

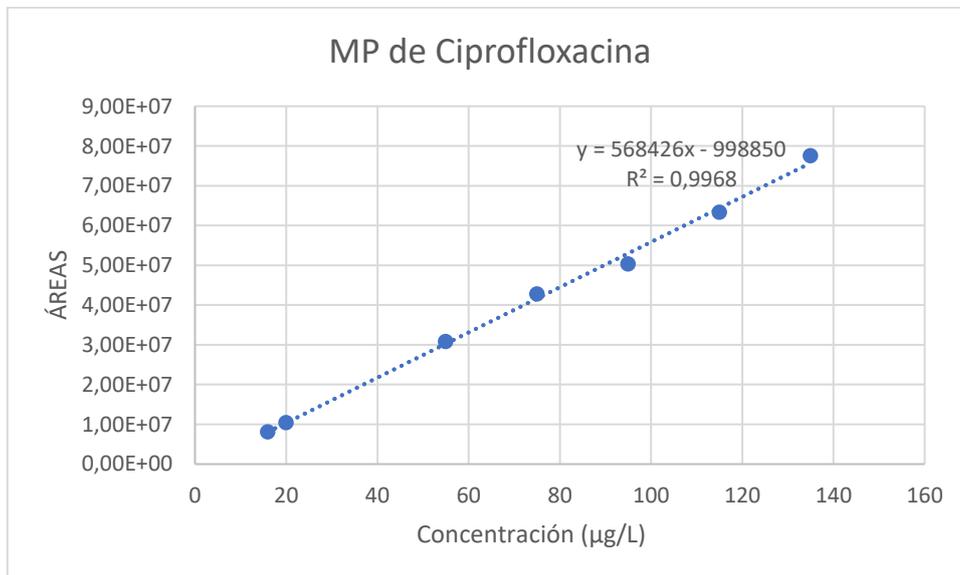


Figura 19: Calibrado Matriz-Patrón (MP) para la Ciprofloxacina en medio ácido

Obteniendo las concentraciones mediante el calibrado matriz patrón se calcula después el % de degradación de cada compuesto tanto en medio ácido como en básico y en cada una de las 5 réplicas. Se calcula así el porcentaje medio de degradación y la repetitividad, expresada como porcentaje de la desviación estándar relativa (DER). Se obtendrá un mayor % DER cuando más dispersos estén los valores siempre. El % de degradación es una medida cuantitativa que proporciona información sobre el grado de deterioro o descomposición del compuesto en estudio en comparación con su estado original. Un mayor porcentaje de degradación implica un mayor nivel de transformación del compuesto. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 19.

Tabla 19: Porcentaje de degradación de los CE para aquellos cuya degradación no ha sido total en los ensayos en medio ácido y básico, y precisión del resultado (DER%,n=5)

Compuesto	Medio Ácido		Medio Básico	
	Degradación (%)	Precisión (%)	Degradación (%)	Precisión (%)
Trimetoprima	47,9	8	-	-
Apramicina	-	-	2,3	18
Estrona	32,5	8	-	-
Ciprofloxacina	22,7	10	13,0	9
Doxiciclina	71,7	10	-	-
Enrofloxacin	16,5	4	18,7	8
Sulfadiazina	46,2	14	-	-
Tiamulina	94,6	10	98,1	9

-: sin degradación debido a que $p > 0,05$ y no hay diferencia significativa

Como se puede comprobar al trabajar en un rango lineal de respuesta, se lleva a cabo una proporcionalidad directa entre áreas de pico y concentraciones, por lo que los porcentajes de degradación deberían ser similares, contando con un error experimental del $\pm 10-15\%$, salvo la sulfadiazina, cuya diferencia es mayor asumiendo que el área no rige esta proporción.

Los porcentajes de degradación calculados con concentraciones son más fiables, aunque el error experimental quizá sea mayor porque al hacer el calibrado hay más operaciones analíticas.

6.2 Análisis en presencia de biomasa algal

En este capítulo se hacen pruebas rápidas de posibles nuevos métodos de análisis para determinar los contaminantes emergentes mencionados en hidrolizados enzimáticos de biomasa algal basándonos en el protocolo descrito en el apartado 5.4.

En las Figuras 20,21 y 22 se muestran las áreas de pico obtenidas de los CE en los ensayos de extracción en fase sólida (SPE), inyección directa después de añadir un adsorbente (ID) y extracción en fase sólida después de añadir un adsorbente (SPE/ID).

En la extracción en fase sólida (SPE) se contempla mejores resultados en los ensayos eluidos con ACN que MeOH salvo tiamulina, florfenicol, ácido acetilsalicílico y 17- α etinilstradiol. Asimismo, los ensayos de carbón activo para florfenicol y ácido acetilsalicílico son preferibles que para tiamulina, 17- α etinilstradiol y ciprofloxacina. La diferente cantidad de adsorbente no modifica sustancialmente los resultados obtenidos.

En la inyección directa (ID), usando C activo como adsorbente se obtienen mejores resultados usando 5 mg para trimetoprima y sulfamidas, y con 20 mg para florfenicol. Con PSA es preferible el uso de 150 mg para ácido acetilsalicílico y de 75 mg para dexametasona. La utilización de sílice es similar a la utilización de PSA. No se puede elegir un adsorbente como el más adecuado.

En el caso de la extracción en fase sólida, la elución de los extractos con metanol parece proporcionar áreas de pico algo más pequeñas en general con respecto al uso de acetonitrilo como eluyente. Al añadir un adsorbente para llevar a cabo la extracción en fase sólida dispersiva parece que el PSA mejora la señal de varios compuestos, sin observar tampoco diferencias claras cuando se ensayan diferentes cantidades de adsorbentes.

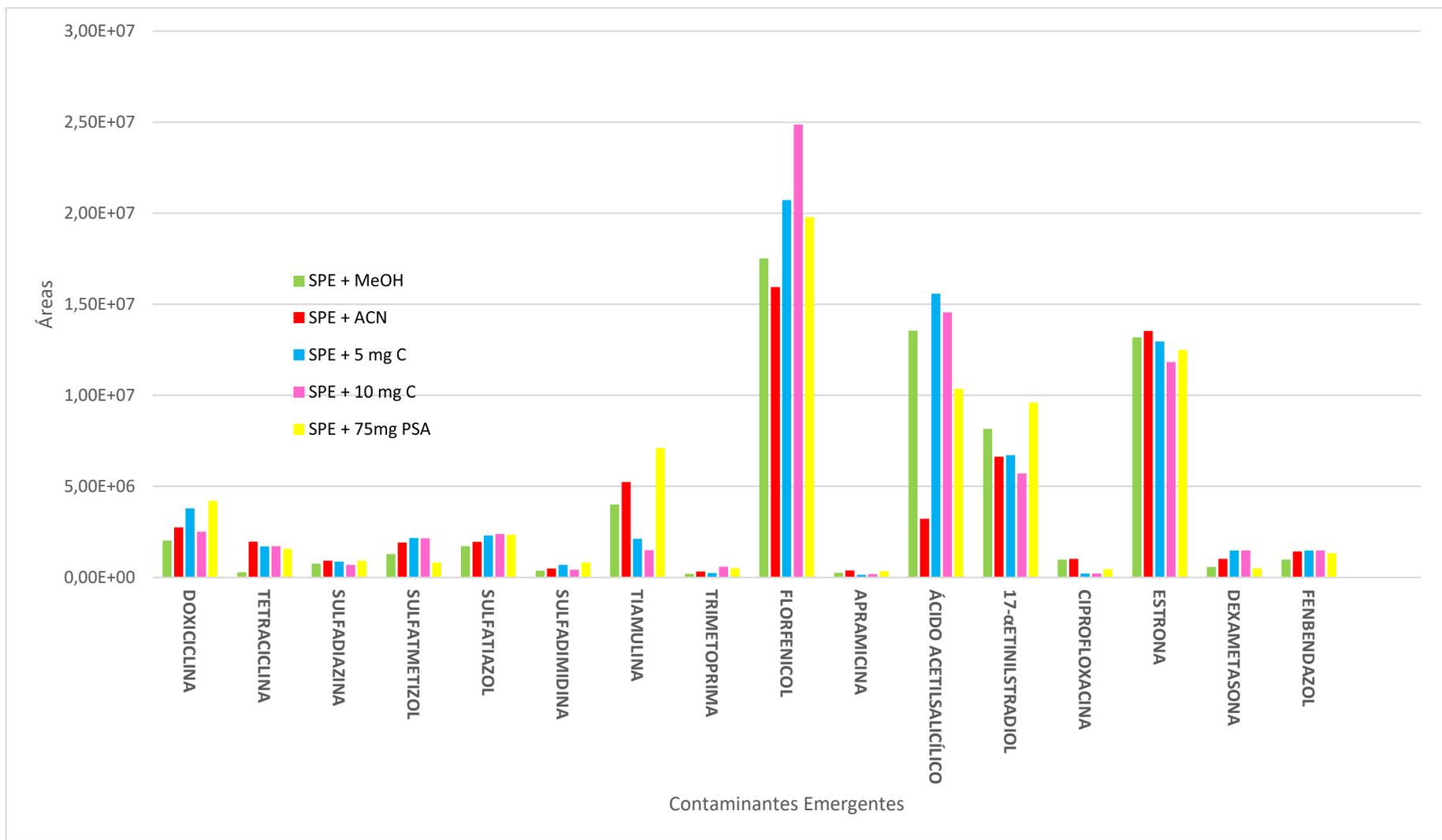


Figura 20: Gráfico de barras donde se observa las áreas resultantes de los CE en la extracción en fase sólida (SPE)

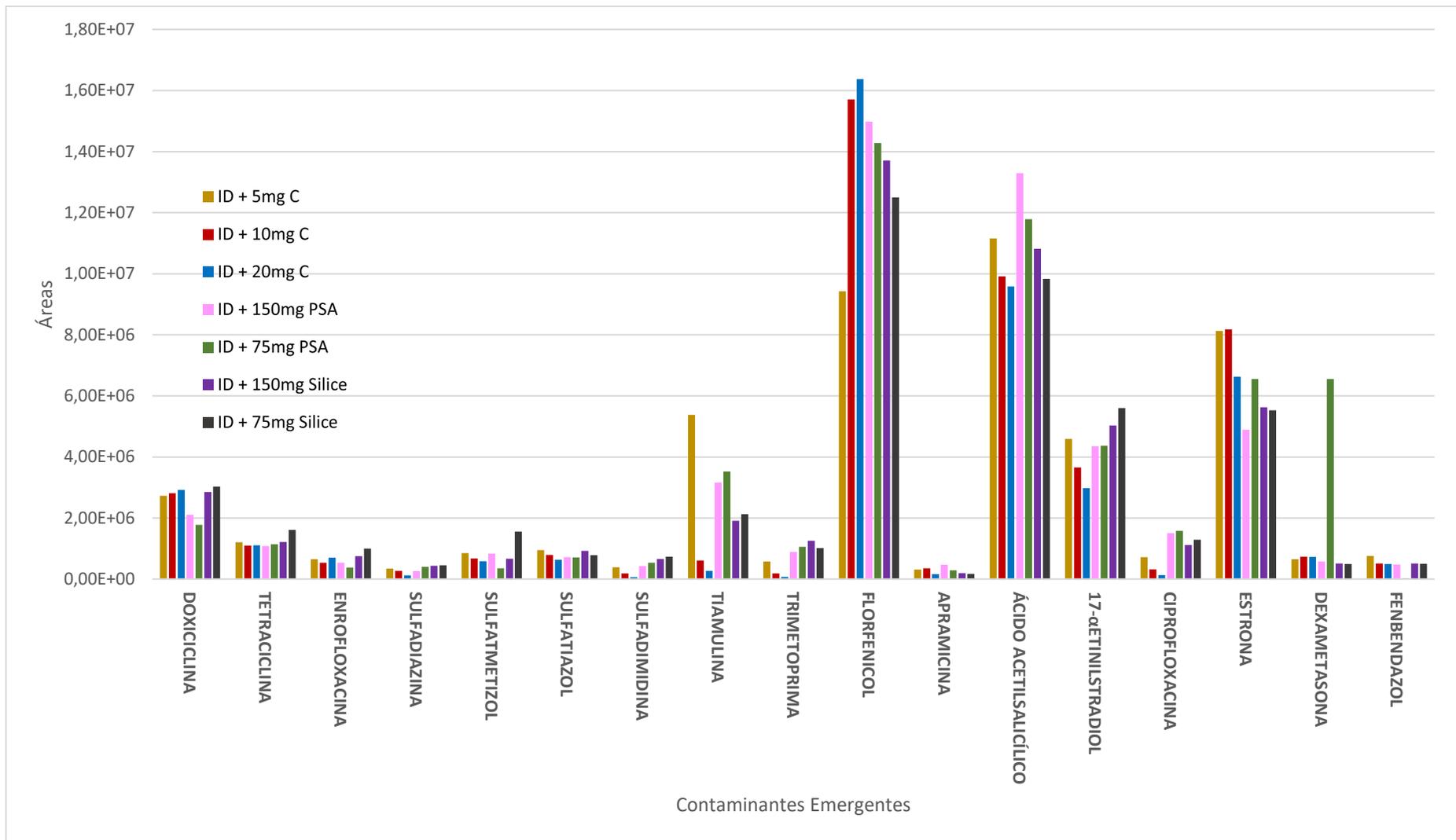


Figura 21: Gráfico de barras donde se observa las áreas resultantes de los CE en la inyección directa (ID)

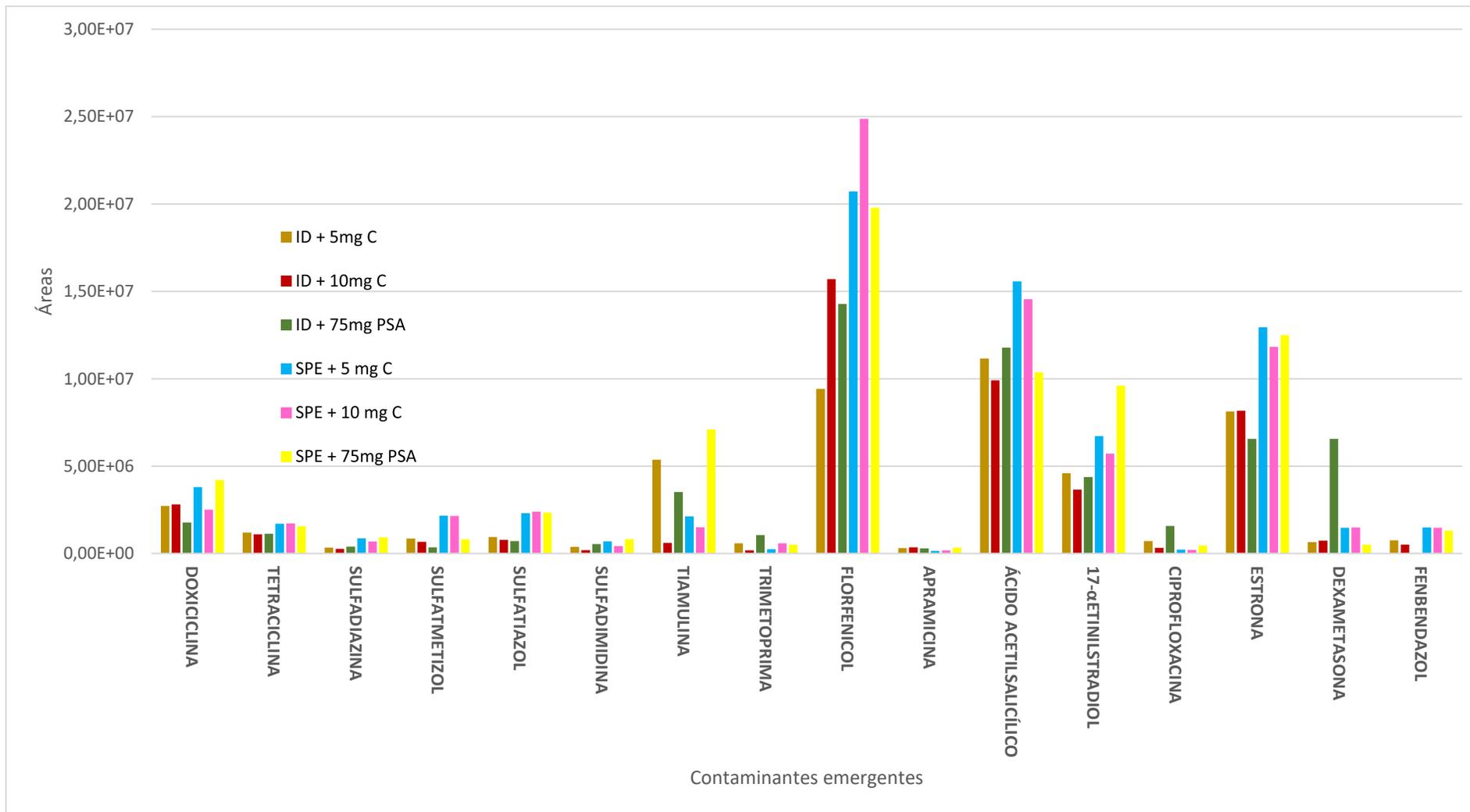


Figura 22: Gráfico de barras donde se observa las áreas resultantes de los CE comparando SPE con ID

7 CONCLUSIONES

- Los contaminantes emergentes son estables durante el proceso de hidrólisis enzimática con la enzima comercial Protamax, calentado el medio con ultrasonidos durante 1 hora. El efecto matriz origina una disminución de la señal que varía entre 9,8 y 35%, excepto para la tilosina, en la que esta origina un aumento de la señal con un 26%.
- Fenbendazol, dexametasona, florfenicol, oxitetraciclina, sulfadimidina, marbofloxacin, sulfametizol, tilosina y tetraciclina son degradados completamente mediante una hidrólisis química a 120°C, tanto en medio ácido como básico. Sin embargo, para doxiciclina y tiamulina solo se degrada en medio básico.
- En los casos de degradación química parcial, los porcentajes de degradación calculados en función de áreas de pico son básicamente similares a los porcentajes de degradación calculados en función de las concentraciones residuales medidas.
- Se ha comprobado que la matriz en que se hacen los análisis disminuye la señal analítica en porcentajes que varían entre 20 y 99% con respecto a la inyección de los compuestos disueltos en agua, por lo que una calibración matriz-patrón es necesaria para su cuantificación.
- Los ensayos para analizar los contaminantes emergentes en hidrolizados enzimáticos de biomasa algal mediante su inyección directa después de efectuar una extracción en fase sólida dispersiva no muestran grandes diferencias en función del tipo y cantidad de adsorbente ensayado.
- En los ensayos para analizar los contaminantes en hidrolizados enzimáticos mediante una extracción en fase sólida parece recomendable eluir los extractos con acetonitrilo en vez de metanol. En la elución de los extractos con metanol la limpieza previa con PSA parece mejorar las áreas de pico de muchos contaminantes.

- En general la extracción en fase sólida parece más recomendable que la inyección directa para el análisis de los contaminantes emergentes en hidrolizados enzimáticos, atendiendo a las mayores áreas de pico.

8 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Afonso-Olivares, C., Čadková, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., & Nováková, L. (2017). Simplified solid-phase extraction procedure combined with liquid chromatography tandem–mass spectrometry for multiresidue assessment of pharmaceutical compounds in environmental liquid samples. *Journal of Chromatography A*, 1487, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.059>
- 2) Álvarez-Esmorís, C., Conde-Cid, M., Fernández-Calviño, D., Fernández-Sanjurjo, M. J., Núñez-Delgado, A., Álvarez-Rodríguez, E., & Arias-Estévez, M. (2020). Adsorption-desorption of doxycycline in agricultural soils: Batch and stirred-flow-chamber experiments. *Environmental Research*, 186, 109565. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109565>
- 3) Aristilde, L., & Sposito, G. (2010). Binding of ciprofloxacin by humic substances: A molecular dynamics study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1), 90–98. <https://doi.org/10.1002/etc.19>
- 4) Aust, M.-O., Godlinski, F., Travis, G. R., Hao, X., McAllister, T. A., Leinweber, P., & Thiele-Bruhn, S. (2008). Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 156(3), 1243–1251. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.03.011>
- 5) Baena-Nogueras, R. M., González-Mazo, E., & Lara-Martín, P. A. (2017). Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters:

- Photolysis vs biodegradation. *Science of The Total Environment*, 590–591, 643–654.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.015>
- 6) Bai, X., & Acharya, K. (2016). Removal of trimethoprim, sulfamethoxazole, and triclosan by the green alga *Nannochloris* sp. *Journal of Hazardous Materials*, 315, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.067>
 - 7) Bai, X., & Acharya, K. (2017). Algae-mediated removal of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from Lake Mead water. *Science of The Total Environment*, 581–582, 734–740. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.192>
 - 8) Baena-Nogueras, R. M., González-Mazo, E., & Lara-Martín, P. A. (2017). Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: Photolysis vs biodegradation. *Science of The Total Environment*, 590–591, 643–654.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.015>
 - 9) Baran, W., Sochacka, J., & Wardas, W. (2006). Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions. *Chemosphere*, 65(8), 1295–1299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.040>
 - 10) Bergmann, A., Fohrmann, R., & Weber, F.-A. (2011). *Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln*. UBA-Texte 66/2011.
 - 11) Blackwell, P. A., Boxall, A. B. A., Kay, P., & Noble, H. (2005). Evaluation of a Lower Tier Exposure Assessment Model for Veterinary Medicines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2192–2201.
<https://doi.org/10.1021/jf049527b>
 - 12) Burkhardt, M., Stamm, C., Waul, C., Singer, H., & Müller, S. (2005). Surface Runoff and Transport of Sulfonamide Antibiotics and Tracers on Manured Grassland. *Journal of Environmental Quality*, 34(4), 1363–1371.
<https://doi.org/10.2134/jeq2004.0261>

- 13) Calvo Tejo, A. P. (2021). *Análisis de contaminantes emergentes en productos de valorización procedentes de biomasa algal* [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Valladolid. Facultad de Ciencias.
- 14) Carballa, M., Fink, G., Omil, F., Lema, J. M., & Ternes, T. (2008). Determination of the solid–water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water Research*, 42(1), 287–295.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.012>
- 15) Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., & Goldbach, H. E. (2003). Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 31(1), 36–44.
<https://doi.org/10.1002/aheh.200390014>
- 16) De Liguoro, M., Cibir, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B., & Montesissa, C. (2003). Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: Evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*, 52(1), 203–212.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00284-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00284-4)
- 17) Engels, H. (2004). *Verhalten von ausgewählten Tetrazyklinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdünger und in Böden* [DoctoralThesis]. <https://doi.org/10.53846/goediss-1979>
- 18) Haller, M. Y., Müller, S. R., McArdell, C. S., Alder, A. C., & Suter, M. J. F. (2002). Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 952(1–2), 111–120. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)00083-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)00083-3)
- 19) Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H., & Nau, H. (2005). Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid

manure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(4), 861–868.

<https://doi.org/10.1897/04-182r.1>

- 20) Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., & Nau, H. (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(7), 1509–1518. <https://doi.org/10.1021/ac015588m>
- 21) Jacobsen, A. M., & Halling-Sørensen, B. (2006). Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(5), 1164–1174. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0261-9>
- 22) Karci, A., & Balcioğlu, I. A. (2009). Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *The Science of the Total Environment*, 407(16), 4652–4664. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.047>
- 23) López-Serna, R., Posadas, E., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2019). Removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater in novel algal-bacterial photobioreactors. *Science of The Total Environment*, 662, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.206>
- 24) López-Serna, R., Bolado, S., Irusta, R., & Jiménez, J. J. (2022). Determination of veterinary drugs in microalgae biomass from photobioreactors fed with piggery wastewater. *Chemosphere*, 287, 132076. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132076>
- 25) Lorenzo-Hernando, A., Ruiz-Vegas, J., Vega-Alegre, M., & Bolado-Rodríguez, S. (2019). Recovery of proteins from biomass grown in pig manure microalgae-based

- treatment plants by alkaline hydrolysis and acidic precipitation. *Bioresource Technology*, 273, 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.068>
- 26) Luo, Y., & Zhou, Q. (2010). Simultaneous Analysis of Selected Typical Antibiotics in Manure by Microwave-Assisted Extraction and LC–MS n. *Chromatographia*, 71, 217–223. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1438-8>
- 27) Martín Juárez, J., Lorenzo Hernando, A., Muñoz Torre, R., Blanco Lanza, S., & Bolado Rodríguez, S. (2016). Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 218, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.087>
- 28) Martín-Juárez, J., Vega-Alegre, M., Riol-Pastor, E., Muñoz-Torre, R., & Bolado-Rodríguez, S. (2019). Optimisation of the production of fermentable monosaccharides from algal biomass grown in photobioreactors treating wastewater. *Bioresource Technology*, 281, 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.082>
- 29) Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., & Gans, O. (2007). Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 148(2), 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.035>
- 30) Motoyama, M., Nakagawa, S., Tanoue, R., Sato, Y., Nomiya, K., & Shinohara, R. (2011). Residues of pharmaceutical products in recycled organic manure produced from sewage sludge and solid waste from livestock and relationship to their fermentation level. *Chemosphere*, 84(4), 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.048>

- 31) Pan, X., Qiang, Z., Ben, W., & Chen, M. (2011). Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Chemosphere*, 84(5), 695–700.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.022>
- 32) Pérez-Lemus, N., López-Serna, R., Pérez-Elvira, S. I., & Barrado, E. (2019). Analytical methodologies for the determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage sludge: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 1083, 19–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.044>
- 33) Pfeifer, T., Tuerk, J., Bester, K., & Spiteller, M. (2002). Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 16(7), 663–669. <https://doi.org/10.1002/rcm.624>
- 34) Portela Monge, C. (2023). *Método de análisis de contaminantes emergentes en hidrolizados líquidos de biomasa algal ricos en proteína* [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Valladolid. Facultad de Ciencias.
- 35) ¿Qué es la lisis celular? - Glosario de ciencias | Ambientech. (n.d.). *Ambientech: Ciencias, Salud y Medio ambiente. Educación Secundaria*. Retrieved 14 April 2023, from <https://ambientech.org/lisis>
- 36) Rojo, E. M., Piedra, I., González, A. M., Vega, M., & Bolado, S. (2021). Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 335, 125256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125256>
- 37) Singh, R. N., & Sharma, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2347–2353. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>

- 38) Sollicec, M., Massé, D., & Sauvé, S. (2014). Analysis of trimethoprim, lincomycin, sulfadoxin and tylosin in swine manure using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 128, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.023>
- 39) Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E.-H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143–2196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>
- 40) Tylová, T., Olsovská, J., Novák, P., & Flieger, M. (2010). High-throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection. *Chemosphere*, 78(4), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.020>
- 41) Wang, Z., Wang, X., Tian, H., Wei, Q., Liu, B., Bao, G., Liao, M., Peng, J., Huang, X., & Wang, L. (2019). High through-put determination of 28 veterinary antibiotic residues in swine wastewater by one-step dispersive solid phase extraction sample cleanup coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 230, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.047>
- 42) Wohde, M., Berkner, S., Junker, T., Konradi, S., Schwarz, L., & Düring, R.-A. (2016). Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: A literature review. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0091-8>
- 43) Zhao, L., Dong, Y. H., & Wang, H. (2010). Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *The Science of the Total Environment*, 408(5), 1069–1075. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.014>

9 LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

9.1 Lista de Tablas

Tabla	Título
1	Coeficientes de fotodegradación de fármacos seleccionados en el medio ambiente
2	Coeficientes de hidrólisis de fármacos seleccionados en el medio ambiente
3	Coeficientes de adsorción de fármacos seleccionados en el medio ambiente
4	Coeficientes de biodegradación de fármacos seleccionados en el medio ambiente
5	Concentraciones de antibióticos comúnmente presentes en los efluentes de las EDAR y los valores EC ₅₀ para esos antibióticos de las especies específicas de algas
6	Eliminación de antibióticos mediante tecnología basada en microalgas y mecanismos de eliminación
7	Sulfonamidas, Tetraciclinas, Fluoroquinolonas y otros medicamentos veterinarios y sus metabolitos y productos de transformación encontrados en el estiércol
8	Concentraciones ambientales pronosticadas y medidas en el estiércol recogidas en las tablas anteriores (PEC _{estiércol} y MEC _{estiércol}) de los cuatro PVM monitoreados y encontrados con más frecuencia en el estiércol (líquido)
9	Tipos de enzimas y condiciones de hidrólisis enzimática
10	Los 25CE estudiados en este trabajo
11	Materiales y reactivos empleados
12	Equipos empleados
13	Línea de calibrado para los hidrolizados químicos en el primer ensayo y el tercero
14	Parámetros de análisis del espectrómetro de masas para cada analito
15	Hidrólisis Enzimática. Resultados obtenidos del ANOVA y en las pruebas de t para cada CE (n=5)
16	Hidrólisis Química. Resultados obtenidos del ANOVA y en las pruebas de t para cada CE (n=5)
17	Parámetros de validación obtenidos mediante MAP y MP en hidrolizados ácidos para los compuestos en los que se ha hecho la cuantificación
18	Parámetros de validación obtenidos mediante MAP y MP en hidrolizados básicos para los compuestos en los que se ha hecho la cuantificación
19	Porcentaje de degradación de los CE para aquellos cuya degradación no ha sido total en los ensayos en medio ácido y básico y precisión del resultado (DER%,n=5)

9.2 Lista de Figuras

Figuras	Título
1	En este esquema se observa que, las aguas residuales domésticas, las industrias y los hospitales son las principales fuentes de productos farmacéuticos para el sistema de alcantarillado urbano
2	Esquema del modelo farmacéutico en aguas ambientales vistas como una serie de reactores acoplados completamente bien mezclados
3	Posibles mecanismos durante la adsorción de antibióticos
4	Esquema del mecanismo de degradación de antibióticos en agua que contiene algas con irradiación
5	Mecanismos de degradación y desintoxicación de antibióticos por microalgas
6	La ocurrencia y el destino de varios antibióticos en dos sistemas de tratamiento de aguas residuales de granjas porcinas a gran escala (Granja A: digestor anaeróbico-A ² /O-laguna; Granja B: manto de lodo anaeróbico de flujo ascendente (USAB)-(A/O) ² – laguna)
7	Funcionamiento de un PBR tubular horizontal
8	Representación mediante un ajuste lineal las concentraciones encontradas en biomasa frente a: a) concentraciones en el efluente y b) logaritmo del coeficiente de partición, sin considerar los datos encerrados en un círculo
9	Baño de ultrasonidos empleado para la hidrólisis enzimática
10	Autoclave empleado para la hidrólisis química a la alta temperatura y presión que puede soportar el equipo
11	Equipo empleado para la SPE
12	Evaporador bajo corriente de nitrógeno
13	Equipo empleado en la determinación cromatográfica UHPLC-MS/MS
14	Esquema del Sistema de espectrometría de masas en tándem
15	Cromatograma obtenido en la primera transición de ciprofloxacina en el análisis de la hidrólisis enzimática
16	Cromatograma obtenido en la segunda transición de ciprofloxacina en el análisis de la hidrólisis enzimática.
17	TIC mostrando algunos de los compuestos cuantificados
18	Calibrado Adiciones Patrón (MAP) para la Ciprofloxacina en medio ácido
19	Calibrado Matriz-Patrón (MP) para la Ciprofloxacina en medio ácido
20	Gráfico de barras donde se observa las áreas resultantes de los CE en la extracción en fase sólida (SPE)
21	Gráfico de barras donde se observa las áreas resultantes de los CE en la inyección directa (ID)
22	Gráfico de barras donde se observa las áreas resultantes de los CE comparando SPE con ID

