

ISBN: 978-84-938046-4-0

## **EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE COMPUESTOS FARMACÉUTICOS EN AGUAS RESIDUALES PROCEDENTES DE ESTACIONES DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES (EDARS) DE LA ISLA DE GRAN CANARIA**

**Cristina AFONSO OLIVARES, Rayco GUEDES ALONSO, Sarah MONTESDEOCA ESPONDA, Zoraida SOSA FERRERA y José Juan SANTANA RODRÍGUEZ**

Departamento de Química. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 35017 Las Palmas de Gran Canaria, España. cristina.afonso@ulpgc.es

### **RESUMEN**

En el presente trabajo se ha realizado la evaluación de la concentración de compuestos farmacéuticos de uso común de diferentes grupos terapéuticos tales como, antibióticos, antiinflamatorios, analgésicos, reguladores lipídicos, betabloqueantes, antidepresivos, estimulantes y antiepilépticos, en aguas procedentes de Estaciones de Depuración de Aguas Residuales (EDARs) de la isla de Gran Canaria, con el fin de poner en conocimiento la situación del problema, siendo ésta un paso previo para su posible regulación y remediación. Debido a las bajas concentraciones en que estos compuestos se encuentran en las aguas residuales, para llevar a cabo el estudio, se utilizaron procesos analíticos basados en un pretratamiento de la muestra utilizando la extracción en fase sólida (SPE) y su posterior determinación por técnicas instrumentales de altas prestaciones, como la cromatografía líquida de alta resolución con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS).

**Palabras clave:** *fármacos, aguas residuales, EDARs, SPE, LC-MS/MS.*

### **ABSTRACT**

In the present work the concentration of pharmaceutical compounds commonly used from different therapeutic groups such as antibiotics, anti-inflammatories, analgesics, lipid regulators, beta blockers, antidepressants, stimulants and antiepileptics has been evaluated, in water from Wastewater Treatments Plants (WWTPs) of the island of Gran Canaria, in order to inform of the problem situation, this being a prerequisite for possible regulation and remediation. These compounds are found in wastewater at low concentrations, for these situation and to conduct the study, it was used an analytical process based on a pretreatment of the sample, used the Solid Phase Extraction (SPE), and subsequent determination by high-performance instrumental techniques as the liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

**Key words:** *pharmaceuticals, wastewater, WWTPs, SPE, LC-MS/MS.*

## INTRODUCCIÓN

A pesar de algunas medidas tomadas en España, como son los puntos de recogida de medicamentos y el sistema de recetas electrónica, con las que se ha podido controlar la eliminación de residuos de productos farmacéuticos y disminuir su uso indiscriminado, no son suficientes para evitar su continua entrada y su amplia dispersión en los diferentes compartimentos ambientales. Las principales fuentes de entrada de productos farmacéuticos en el medio acuático son la excreción después de su uso, la eliminación inadecuada de medicamentos no utilizados y, en mucha menor medida, residuos que se generan durante la producción (Afonso et al., 2012). A través de estos canales llegan a las estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs), las cuales, en su mayoría, no están diseñadas para eliminar este tipo de residuos, incluso, diferentes estudios han demostrado la limitación del uso exclusivo de los tratamientos primarios para descomponer los productos farmacéuticos (Ghoshdastidar et al., 2014) y se hace necesaria la utilización de tratamientos secundarios y terciarios, tales como: osmosis inversa, biorreactor de membrana, procesos de oxidación avanzada, etc. (Luo et al., 2014).

Los fármacos forman parte de la larga lista de contaminantes emergentes (Richardson, 2009), que son aquellos contaminantes que no han sido regulados pero podrán ser candidatos a serlo en un futuro, dependiendo de las investigaciones que se realicen sobre su presencia en el medioambiente y sus posibles efectos sobre la salud. Solo tres de los numerosos fármacos usados ( $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol y diclofenaco) están en proceso de ser incluidos por la Unión Europea en la primera "Watch List".

Estos microcontaminantes se presentan comúnmente a niveles trazas, en un rango de concentraciones comprendidos entre  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  hasta  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , sin embargo, su permanente descarga en el medio acuático pueden plantear riesgos potenciales a largo plazo para los organismos acuáticos y terrestres (Fadário et al., 2014). Debido a la persistencia que poseen estos tipos de contaminantes, su presencia en el medio acuático está frecuentemente relacionado con un número de efectos negativos, incluyendo: toxicidad a largo y corto plazo, efectos de disrupción endocrina y microorganismos resistentes a los antibióticos (Luo et al., 2014).

Diversos estudios han evaluado la presencia de compuestos farmacéuticos en diferentes medios acuáticos. Carmona et al., 2014 realiza un trabajo sobre la presencia de estos contaminantes en diferentes matrices que incluyen, aguas superficiales (máxima concentración  $830 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), aguas residuales (concentraciones máximas para influente y efluente  $4374$  y  $753 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente) e incluso, agua potable (hasta  $40 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Las bajas concentraciones encontradas, niveles trazas, se han podido evaluar gracias a los avances en las metodologías analíticas, ya que resulta necesario el uso de métodos analíticos que sean altamente sensibles y selectivos. Existen diversos métodos, pero el más ampliamente utilizado para el análisis de este tipo de compuesto es la cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LC-MS), usando como fuente de ionización la electrospay (ESI). A pesar de la sensibilidad que presentan estos sistemas, además, es necesario un pretratamiento de la muestra para extraer y preconcentrar los analitos, la técnica más usada es la extracción en fase sólida (SPE) (Kaplan 2013).

El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de un total de 16 compuestos farmacéuticos de diferentes grupos terapéuticos en muestras de agua residuales, mediante el monitoreo de dos estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs), con diferentes tratamientos, procedentes de la isla de Gran Canaria. Los compuestos seleccionados, sus aplicaciones y características se han resumido en la Tabla 1. Para poder realizar la evaluación se ha usado una metodología analítica basada en la extracción en fase sólida (SPE) y la cromatografía líquida de alta resolución y ultraresolución con detección por

espectrometría de masas (LC-MS y UHPLC-MS).

Tabla 1. Lista de compuestos farmacéuticos, identificación del grupo terapéutico, valores de  $pK_a$ .

Grupo terapéutico	Compuesto	$pK_a^*$
<b>Antibióticos</b>	Norfloxacin	$0.16 \pm 0.20$
	Ciprofloxacina	$6.43 \pm 0.41$
	Enrofloxacin	$6.43 \pm 0.41$
	Sarafloxacin	$6.17 \pm 0.41$
	Levofloxacin	$5.19 \pm 0.40$
<b>Antiinflamatorios</b>	Ketoprofeno	$4.23 \pm 0.10$
	Naproxeno	$4.84 \pm 0.30$
<b>Analgésico</b>	Metamizol	-
<b>Reguladores lipídicos</b>	Bezafibrato	$3.29 \pm 0.10$
	Ácido clofíbrico	$3.18 \pm 0.10$
<b>Antidepresivo</b>	Fluoxetina	$10.05 \pm 0.10$ (Most Basic)
<b>Anticonvulsivo</b>	Carbamazepina	$13.94 \pm 0.20$
<b>Beta-bloqueante</b>	Atenolol	$13.88 \pm 0.20$
<b>Estimulantes</b>	Paraxantina	$8.50 \pm 0.50$
	Cafeína	$0.52 \pm 0.70$ (Most Basic)
	Nicotina	$8.00 \pm 0.50$ (Most Basic)

\*Base de datos SciFinder.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Todos los compuestos farmacéuticos utilizados en el estudio han sido adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las disoluciones patrón se prepararon disolviendo cada analito en metanol a una concentración de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , y se almacenaron en botes de cristal ámbar a  $4^\circ\text{C}$ . Diariamente se preparaban las disoluciones de trabajo a partir de la anterior. El agua ultrapura se obtenía con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). El metanol de calidades HPLC y LC-MS, el agua de calidad LC-MS, así como el ácido fórmico y el formiato amónico utilizado para ajustar el pH de las fases móviles se obtuvieron de Panreac Química (Barcelona, España). Polyoxyethylene 10 lauryl eter (POLE) fue suministrado por Sigma-Aldrich (Madrid, España) y se preparaba en agua Milli-Q.

### Recogida de muestras

El muestreo se ha realizado durante dos años con una frecuencia bimensual. Los puntos de toma de muestra estaban ubicados en los efluentes de dos EDARs procedentes de la isla de Gran Canaria. EDAR 1 utiliza un sistema de tratamiento de lodos activos convencional, mientras que EDAR 2 posee un sistema de tratamiento de biorreactor de membrana. Las muestras de agua se recogían en botellas de vidrio ámbar de 2L, que se lavaban previamente con metanol y agua. A continuación, las muestras se filtran a través de filtros de fibra de vidrio y filtros de membrana de  $0,65\mu\text{m}$  y son almacenadas en la oscuridad a  $4^\circ\text{C}$ , realizando el análisis dentro de las 48 horas después de su recogida.

## Instrumentación

Para el análisis de todos los compuestos farmacéuticos de este estudio, excepto el grupo de antibióticos (fluoroquinolonas), se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución con detección por espectrometría de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS) equipado con una interfaz de ionización por electrospray (ESI). Las fases móviles utilizadas fueron agua que contiene ácido fórmico al 0,2 % y 5 mM de formiato amónico a un pH de 2,6 y metanol.

Para el análisis de las fluoroquinolonas se usó la cromatografía líquida de ultraresolución con detección por espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS) con interfaz de ionización por electrospray. Las fases móviles fueron agua, ajustado a un pH de 2,5 con 0,1 % de ácido fórmico (v/v), y metanol. Las columnas cromatográficas utilizadas en todos los casos presentan una fase estacionaria con una estructura C<sub>18</sub>.

Debido a las bajas concentraciones en la que estos compuestos se encuentran en muestras de agua, antes de realizar su determinación es necesario un proceso de extracción, la técnica utilizada ha sido la extracción en fase sólida (SPE). Las condiciones de SPE fueron optimizadas en estudios previos (Afonso et al., 2012, Guedes et al., 2013, Montesdeoca et al., 2012). El cartucho de extracción utilizado para todos los compuestos seleccionados, incluidas las fluoroquinolonas, fue el OASIS HLB (Waters, Spain). Sin embargo, el eluyente es diferente en cada caso, para los antibióticos se realizó la elución con medios micelares, y para los demás fármacos el eluyente usado ha sido el metanol. Las condiciones de extracción permiten un factor de preconcentración en el rango de 200-250 veces.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un monitoreo bimensual con una duración de dos años, cuyo punto de muestreo fueron los efluentes procedentes de dos depuradoras localizadas en la isla de Gran Canaria. Cada muestra de agua depurada se analizó mediante la combinación del proceso de extracción SPE y la cromatografía líquida de alta o de ultra resolución con detección por espectrometría de masas, siguiendo el protocolo de análisis para cada compuesto. Tanto la EDAR 1 (tratamiento de lodos activos, 500 m<sup>3</sup>/día) como la EDAR 2 (tratamiento de biorreactor de membrana, 700 m<sup>3</sup>/día), operan diariamente con similares velocidades de flujo volumétricas de influente de aguas residuales y el tratamiento se realiza en poblaciones con un número de habitantes análogos (5000 habitantes para EDAR 1 y 7000 habitantes para EDAR 2), por lo tanto, puede ser viable la comparación entre los tratamientos de las diferentes depuradoras, a pesar de no tener datos sobre las concentraciones de los mismos compuestos en los influentes.

Los resultados medios obtenidos se resumen en la Tabla 2 en la cual se muestra el rango de concentraciones que se han podido determinar de cada compuesto con las desviaciones estándar relativas correspondientes al análisis por triplicado de cada muestra (ng·L<sup>-1</sup>) para cada una de las depuradas estudiadas, además, se incluyen los límites de detección (LOD) para cada compuesto.

Podemos observar que, en términos generales, se ha encontrado la presencia de todos los compuestos escogidos para este estudio, excepto la enrofloxacin, sarafloxacin y fluoxetina, que no fueron determinados o se encontraban por debajo de los límites de detección en todas las muestras analizadas durante el periodo de muestreo. Sólo la carbamazepina fue encontrada en todas las muestras de ambas depuradoras en el rango de concentraciones 18,9-974,5 ng·L<sup>-1</sup>, y el ketoprofeno se detectó en todas las muestras de la EDAR 1. Es importante destacar las altas concentraciones de paraxantina encontradas en la

mayoría de muestras de la EDAR 1 cuyo máximo de concentración fue  $58,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las altas concentraciones detectadas de paraxantina podrían ser explicadas por el hecho de que se trata de un metabolito de la cafeína que es excretado por el cuerpo humano.

Tabla 2. Rango de concentraciones ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) determinados en las aguas procedentes de los efluentes de las EDARs estudiadas.

Compuesto	LOD <sup>b</sup> ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Rango de concentración $\pm$ RSD ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	
		EDAR 1	EDAR 2
Norfloxacin	8,5	<LOD – $2366,0 \pm 149,8$	<LOD – $2249,4 \pm 279,8$
Ciprofloxacina	8,6	<LOD – $20321,3 \pm 1806,7$	<LOD – $259,2 \pm 87,7$
Enrofloxacin	5,3	<LOD	<LOD
Sarafloxacin	11,1	<LOD	<LOD
Levofloxacin	9,1	<LOD – $7206,3 \pm 319,9$	<LOD – $14154,2 \pm 916,5$
Ketoprofeno	2,4	$69,1 \pm 11,7$ – $1360,5 \pm 30,3$	<LOD – $381,3 \pm 50,2$
Naproxeno	0,6	<LOD – $1069,1 \pm 97,9$	<LOD – $220,3 \pm 21,3$
Metamizol	6,3	<LOD – $6782,3 \pm 508,0$	<LOD – $8250,1 \pm 186,5$
Bezafibrato	2,9	<LOD – $18850,7 \pm 3257,4$	<LOD – $18680,3 \pm 803,3$
Ácido clofíbrico	10,7	<LOD – $282,8 \pm 6,2$	<LOD – $258,7 \pm 24,5$
Fluoxetina	97,4	<LOD	<LOD
Carbamazepina	0,3	$18,9 \pm 0,1$ – $505,0 \pm 12,4$	$70,1 \pm 6,7$ – $974,5 \pm 37,2$
Atenolol	7,9	<LOD – $2498,2 \pm 27,5$	<LOD – $237,3 \pm 40,4$
Paraxantina	2,2	<LOD – $58691,1 \pm 5693,0$	<LOD – $2249,8 \pm 172,8$
Cafeína	6,8	<LOD – $4307,9 \pm 870,6$	<LOD – $1106,6 \pm 125,5$
Nicotina	6,5	<LOD – $981,4 \pm 12,6$	<LOD – $531,1 \pm 14,2$

a n=3; RSD: *Relative Standar Desviation* (Desviación Estándar Relativa).

b LOD: *Limit of detection* (Límite de detección)

Comparando ambas depuradoras, las concentraciones de fármacos detectadas en la estación depuradora que opera con un tratamiento de biorreactor de membrana (EDAR 2) son, de manera general (excepto para levofloxacin, metamizol y carbamazepina), más bajas que las encontradas con la depuradora que opera de manera tradicional con la técnica de lodos activos. Sin embargo, hay compuestos que se mantienen más constantes en ambas depuradoras, como es el caso de norfloxacina, bezafibrato y ácido clofíbrico, por lo que no les influye el sistema de tratamiento.

En un análisis global, las concentraciones de los diferentes fármacos en estudio no siguen ningún patrón de comportamiento para ninguna de las dos depuradoras estudiadas, obteniendo resultados, para mucho de ellos, muy variables durante todo el periodo de muestreo. A pesar de ello, se puede observar que en la técnica de biorreactor de membrana se han determinado menos compuestos que en la técnica de lodos activos.

## CONCLUSIONES

Se ha realizado el estudio de la presencia de cinco fluoroquinolonas (levofloxacin, norfloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacin y sarafloxacin) y once compuestos

farmacéuticos de uso común (ketoprofeno, naproxeno, metamizol, bezafibrato, ácido clofíbrico, fluoxetina, carbamacepina, atenolol, paraxantina, cafeína y nicotina) en muestras de aguas residuales procedentes de dos estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs) de la isla de Gran Canaria. Las muestras de efluentes de aguas residuales fueron recogidas cada dos meses durante dos años. Durante el periodo de monitoreo, existía la presencia en concentraciones muy variables de todos los compuestos, excepto enrofloxacina, sarafloxacina y fluoxetina, además, sólo la carbamacepina fue encontrada en todas las muestras analizadas de ambas depuradoras, y el ketoprofeno en todas las muestras de la EDAR 1. Los resultados muestran que la eliminación de los compuestos analizados es incompleta y, a pesar de no tener datos procedentes de los influentes, el tratamiento por biorreactor de membrana nos muestra concentraciones más bajas para la mayoría de los compuestos que en el tratamiento de lodos activos.

Los resultados obtenidos en este monitoreo pueden ser útiles para poner en conocimientos a los diferentes órganos de regulación, con el propósito de que en futuras reglamentaciones sea incluida una lista de productos farmacéuticos en el seguimiento de la calidad de las aguas.

## AGRADECIMIENTOS

La autora Cristina Afonso Olivares agradece al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la ayuda concedida del programa de Formación del Profesorado Universitario en la convocatoria de 2013.

## REFERENCIAS

- Afonso-Olivares, C.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J. (2012). *Analysis of antiinflammatory, analgesic, stimulant and antidepressant drugs in purified water from wastewater treatment plants using SPE-LC tandem mass spectrometry*. Journal of Environmental Science and Health A 47: 887–895.
- Carmona, E.; Andreu, V.; Picó, Y. (2014). *Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: from waste to drinking water*. Science of the Total Environment 484: 53-63.
- Fadário, V.M.; Dias, M.; Costa, A.C.S.; Alves, M.S. (2014). *Environmental contamination by fluoroquinolones*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science 50: 41-54
- Ghoshdastidar, A.J.; Fox, S.; Tong, A.Z. (2014). *The presence of the top prescribed pharmaceuticals in treated sewage effluents and receiving Waters in Southwest Nova Scotia, Canada*. Environmental Science and Pollution Research DOI 10.1007/s11356-014-3400-z.
- Guedes-Alonso, R.; Afonso-Olivares, C.; Montesdeoca-Esponda, S.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J. (2013) *An assessment of the concentrations of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plants on the island of Gran Canaria (Spain)*. SpringerPlus 2: 1-8.
- Kaplan, S. (2013). *Review: Pharmacological pollution in water*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 43: 1074-1116.
- Luo, Y.; Guo, W.; Ngo, H.H.; Nghiem, L.D.; Hai, F.I.; Zhang, J.; Liang, S.; Wang, X.C. (2014). *A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment*. Science of the Total Environment 473-474: 619-641.
- Montesdeoca-Esponda, S.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J. (2012) *Comparison of solid*

*phase extraction using micellar desorption combined with LC-FD and LCMS/MS in the determination of antibiotic fluoroquinolone residues in sewage samples.* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 35: 2081-2096.

Richardson, S.D. (2009). *Water analysis: emerging contaminants and current issues.* Analytical Chemistry 81: 4645-4677.