

***“Investigació d’antibiòtics en aigües residuals de la
província de Castelló: detecció, eficiència
d’eliminació en l’EDAR, impacte ambiental i
resistència antimicrobiana”***

**Projecte d’investigació aplicada als recursos
hídrics a la Comunitat Valenciana
Exercici 2021**

**Finançat per la Conselleria d’Agricultura, Desenvolupament
Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica.**

INFORME FINAL, NOVEMBRE 2021

EQUIP DE TREBALL

Felix Hernández Hernández

Catedràtic de Química Analítica, director de l'Institut Universitari de Plaguicides i Aigües (IUPA), investigador responsable del projecte

Elena Pitarch Arquimbau

Professora titular de Química Analítica, coinvestigadora responsable del projecte

Francisco López Benet

Catedràtic de Química Analítica

Lubertus Bijlsma

Investigador postdoctoral, IUPA

Ana María Botero-Coy

investigadora postdoctoral, IUPA

David Fabregat Safont

Investigador postdoctoral, IUPA

Marina Celia Campos Mañas

Investigadora postdoctoral Juan de la Cierva formació, IUPA

Alberto Celma Tirado

Investigador predoctoral, IUPA

Contractades amb càrrec al conveni

Claudia Simarro Gimeno

Elisa Gracia Marín

ÍNDEX

- 1. Objectius i justificació**
- 2. Ús d'antibiòtics a la província de Castelló. Selecció dels compostos objecte d'estudi**
- 3. Presa de mostres**
- 4. Anàlisi quantitativa. Metodologia i resultats obtinguts**
- 5. Cribratge de metabòlits**
- 6. Estimació del consum de fàrmacs mitjançant epidemiologia basada en l'anàlisi d'aigües residuals**
- 7. Eficàcia de l'eliminació de fàrmacs en l'EDAR de Castelló**
- 8. Fase preliminar de l'estudi de resistències a antibiòtics**
- 9. Bibliografia**

Annex 1.- Metodologia analítica per a antibiòtics i altres fàrmacs

1. OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ

La investigació sobre la presència de productes farmacèutics en el medi aquàtic ha anat guanyant interès degut al seu ampli i creixent ús, així com a la seua freqüent detecció en el cicle de l'aigua (*Bellver-Domingo et al., 2019*). Encara que els fàrmacs poden arribar al medi aquàtic a través de diferents vies, la baixa eficàcia d'eliminació de la majoria de les plantes de tractament d'aigües residuals (EDAR) convencionals és una de les raons principals de la seua presència en les aigües superficials receptores a través dels efluents tractats (*Botero-Coy et al., 2018*). Diversos treballs han destacat la necessitat de millorar el tractament aplicat en les EDAR, emprant processos de tractament terciari addicionals (*Sousa et al., 2018*).

La majoria de les investigacions sobre la presència de fàrmacs en el medi aquàtic se centren en els compostos inalterats que, no obstant això, solen representar una xicoteta part de la quantitat total dels compostos excretats en l'orina i femta (*Hernández et al., 2019a*). En els últims anys, l'Institut Universitari de Plaguicides i Aigües (IUPA) de la Universitat Jaume I ha publicat diversos treballs relacionats amb la presència de metabòlits de fàrmacs en aigües superficials i residuals (*Boix et al., 2016; Gracia-Lor et al., 2014; Ibáñez et al., 2017; Fonseca et al., 2020*). La seua determinació és de gran rellevància perquè solen trobar-se un gran nombre de compostos, fins i tot en concentracions superiors a les del fàrmac de partida. Per això, haurien d'incloure's gradualment en els mètodes analítics, perquè a més poden ser tan persistents i/o actius com el compost original i poden tindre efectes negatius en diferents organismes aquàtics. Recentment, el IUPA ha publicat una revisió molt completa sobre la presència de metabòlits de fàrmacs en el medi ambient aquàtic en la zona del Mediterrani espanyol (*Ibáñez et al., 2021*).

La presència d'antibiòtics en el medi ambient és d'especial preocupació, ja que pot conduir al desenvolupament de resistències bacterianes, fet que ja s'ha observat fins i tot en àrees aïllades, com l'Antàrtida (*Hernández et al., 2019b*), i que pot representar un greu problema en la lluita contra algunes malalties (*Posada et al., 2019*). La resistència als antibiòtics és hui una de les majors amenaces per a la salut mundial, la seguretat alimentària i el desenvolupament. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) porta anys promovent un pla global d'actuació per a afrontar la creixent aparició de bacteris resistents als antibiòtics actuals. Aquest pla de vigilància i control no sols s'hauria d'aplicar per a regular la utilització clínica d'antibiòtics en humans i animals, sinó qualsevol altre aspecte mediambiental on hi poden aparéixer bacteris resistents i que podrien ser crucials per a entendre l'impacte de les resistències bacterianes en la salut. Investigacions recents mostren que les EDAR urbanes constitueixen punts crítics per a les

emissions d'antibiòtics, la qual cosa contribueix a l'enriquiment de gens de resistència en ecosistemes d'aigües superficials (Buelow et al., 2020).

La Comissió Europea ha inclòs quatre antibiòtics (amoxicilina, ciprofloxacinaa, sulfametoxazol i trimetoprima) en la Llista d'Observació (Watch List) (European Comission 2020/1161) de substàncies a les quals s'ha de donar seguiment com a part de les polítiques públiques en el tema de l'aigua. L'objectiu és recopilar dades dels estats membres sobre els seus nivells de concentració en les aigües i decidir, en una etapa posterior, si poden considerar-se substàncies prioritàries en el control periòdic de la qualitat de l'aigua. En el cas de les aigües residuals, seria necessari realitzar campanyes periòdiques de seguiment dels nivells de concentració en l'efluent urbà per a obtenir informació sobre el funcionament real de l'EDAR i avaluar l'impacte potencial de l'aigua tractada en el medi aquàtic.

La problemàtica abordada en el present treball és complexa, i respon a la preocupació creixent de la societat actual per l'elevat consum d'antibiòtics i la seua presència habitual en les aigües. La seua identificació i quantificació precisa s'ha convertit en un desafiament per a la química analítica moderna. En aquest sentit, el IUPA té capacitat demostrada, a través de les seues investigacions, publicacions i projectes, per a abordar aquesta problemàtica, tant en el seu vessant purament analític, basat en l'ús d'acoblaments cromatografia/espectrometria de masses, com en els aspectes mediambientals. En els últims anys, els coinvestigadors responsables del present estudi han dirigit projectes d'investigació en els quals s'ha abordat aquesta problemàtica *“Estratègies analítiques per al control de contaminants emergents i avaluació de l'eficiència d'eliminació en processos avançats d'oxidació en aigües residuals”* (Dr. **Félix Hernández**, 2019-2021, MINECO, RTI2018-097417-B-I00) i *“Estratègies analítiques avançades per al control i avaluació de contaminants emergents en aigües de reg”* (Dra. **Elena Pitarch**, 2019-2020, UJI-B2018-55). A més, el IUPA ha participat en un projecte internacional COLCIENCIAS *“Remoció d'antibiòtics i bacteris resistents en aigües residuals hospitalàries emprant tecnologies avançades d'oxidació”* (2019-2021) en col·laboració amb la Universitat d'Antioquia (Medellín, Colòmbia).

L'objectiu principal d'aquest projecte ha sigut **investigar la presència d'antibiòtics seleccionats en les aigües residuals** de l'EDAR de Castelló de la Plana, per a això s'han seleccionat al voltant de vint compostos àmpliament usats Castelló. Per a aquest fi, ha sigut necessari desenvolupar metodologia analítica d'avantguarda capaç de determinar amb fiabilitat nivells de concentració extremadament baixos en les aigües. Per això, un dels objectius del treball ha sigut el **desenvolupament i validació de mètodes avançats per a la determinació quantitativa**

d'antibiòtics en aigües residuals, que puguin ser aplicats en aquest projecte i en futurs estudis relacionats amb aquest tema. Els mètodes desenvolupats estan basats en acoblaments cromatografia líquida-espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS) amb equips de triple quadrupol. Addicionalment, amb la finalitat d'ampliar la informació sobre la presència d'aquests compostos, s'han aplicat **mètodes de garbellat basats en l'ús de LC-HRMS per a identificar possibles metabòlits d'antibiòtics** que també podrien estar presents en les aigües.

Amb les anàlisis realitzades en les aigües d'entrada i eixida de l'EDAR, s'ha pogut estudiar l'eficiència **d'eliminació de la planta per als antibiòtics estudiats**, així com realitzar una **estimació del consum** a través de les dades de concentració i càrregues diàries obtingudes en l'influent urbà (aigua d'entrada, sense tractar), i finalment realitzar una avaluació de l'impacte **ambiental de les aigües d'eixida**, ja tractades.

L'estudi realitzat és molt complex, i requereix l'aplicació de mètodes analítics sofisticats, amb la finalitat d'ampliar els treballs a més antibiòtics i metabòlits, a més de realitzar diversos estudis de resistències i avaluacions del risc mediambiental i toxicològic. Es tracta, en suma, d'un projecte global que ha de realitzar-se al llarg de diversos anys per a poder aconseguir conclusions amb suports suficients i concloents. És, per això, una línia d'investigació que involucra diversos investigadors de diferents disciplines i centres d'investigació. En aquest primer any s'han establert les bases inicials de treball i s'ha obtingut una bona imatge de la situació de les aigües residuals de Castelló amb informació relativa als antibiòtics més usats. Les dades trobades en les aigües residuals hauran de correlacionar-se en el futur amb estudis de resistències **antimicrobianes**, que hauran de realitzar-se en col·laboració amb altres centres. L'objectiu final, a llarg termini, és implementar sistemes de vigilància capaços de determinar la prevalença de la resistència de la població, ja que existeix una correlació entre els bacteris circulants en la població i les que arriben a les EDAR. D'aquesta manera, es pretén **establir les bases per a futurs estudis de resistència antimicrobiana en aigües residuals i en el medi ambient**.

Els resultats més rellevants obtinguts en el marc d'aquest treball s'enviaran per a la seua publicació en revistes especialitzades i es presentaran en congrés i reunions científiques, en el marc de la **difusió pública** que ha de tindre tota investigació.

Per a la realització de l'estudi s'ha comptat amb la col·laboració inestimable de FACSA, empresa operadora de l'EDAR de Castelló, que ha subministrat les mostres d'aigua residual i ha facilitat les dades necessàries per als càlculs de càrregues diàries de fàrmacs en les aigües.

2. ÚS D'ANTIBIÒTICS A LA PROVÍNCIA DE CASTELLÓ. SELECCIÓ DELS COMPOSTOS

OBJECTE D'ESTUDI

En la fase inicial del present projecte, es va contactar amb el Departament de Salut de Castelló i amb l'Hospital Nisa Rey Don Jaime de Castelló, a fi de recopilar informació sobre el consum d'antibiòtics i resistències observades, i poder posteriorment correlacionar-la amb l'obtinguda en l'anàlisi de les aigües residuals. Finalment, es van obtenir les dades de consum d'antibiòtics a través del Servei de Farmàcia d'Àrea de Salut del Departament de Salut de Castelló. La informació obtinguda va correspondre a (Taula 2.1):

- Període: any 2000
- Nombre de dosis diàries prescrites (DHD) per mil habitants i dia dels principis actius pertanyents al subgrup J01 ANTIBIÒTICS SISTÈMICS, prescrits en recepta oficial de la Seguretat Social i dispensats en oficines de farmàcia
- Àmbit: receptes prescrites a pacients assignats a les zones bàsiques de salut pertanyents a la ciutat de Castelló

Taula 2.1. Consum de principis actius del subgrup J01 antibiòtics sistèmics durant 2020 (informació facilitada pel Departament de Salut de Castelló)

Grup ATC Nivell 3	Principi actiu	DHD
J01C - ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS, PENICIL·LINES	200029A – AMOXICIL·LINA + CLAVULÀNIC ÀCID	2,8395
J01C - ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS, PENICIL·LINES	108A – AMOXICIL·LINA	1,6304
J01D - ALTRES ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS	828A - CEFUROXIMA	1,3125
J01F - MACRÒLIDS I LINCOSAMIDES (ANTIINFECC. SISTÈMICS)	7019A - AZITROMICINA	0,7915
J01A - TETRACICLINES (ANTIINFECCIOSOS ÚS SISTÈMIC)	1395A - DOXICICLINA	0,6336
J01M - ANTIBACTERIANS DERIVATS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	2049A - CIPROFLOXACINA	0,5939
J01M - ANTIBACTERIANS DERIVATS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	2791A - LEVOFLOXACINA	0,5423
J01F - MACRÒLIDS I LINCOSAMIDES (ANTIINFECC. SISTÈMICS)	967A - CLARITROMICINA	0,4642
J01X - ALTRES ANTIBACTERIANS (ANTIINFECCIOSOS SISTÈMICS)	1599A - FOSFOMICINA	0,3086
J01D - ALTRES ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS	7358A - CEFEDITORÈ	0,2810

J01E - SULFONAMIDES I TRIMETOPRIM (ANTIINFECC. SISTÈMICS)	200127A - COTRIMOXAZOL (SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIM)	0,2518
J01D - ALTRES ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS	2400A - CEFIXIMA	0,1224
J01M - ANTIBACTERIANS DERIVATS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	209A - NORFLOXACINA	0,1095
J01C - ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS, PENICIL·LINES	89A – CLOXACIL·LINA	0,1047
J01C - ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS, PENICIL·LINES	105A – FENOXIMETILPENICIL·LINA	0,0786
J01F - MACRÒLIDS I LINCOSAMIDES (ANTIINFECC. SISTÈMICS)	616A - CLINDAMICINA	0,0695
J01M - ANTIBACTERIANS DERIVATS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	1119A - MOXIFLOXACINA	0,0319
J01X - ALTRES ANTIBACTERIANS (ANTIINFECCIOSOS SISTÈMICS)	86A - NITROFURANTOINA	0,0288
J01A - TETRACICLINAS (ANTIINFECCIOSOS ÚS SISTEMICO)	1971A - MINOCICLINA	0,0245
J01F - MACRÒLIDS I LINCOSAMIDES (ANTIINFECC. SISTÈMICS)	1419A - ERITROMICINA	0,0147
J01F - MACRÒLIDS I LINCOSAMIDES (ANTIINFECC. SISTÈMICS)	1804A - JOSAMICINA	0,0051
J01F - MACRÒLIDS I LINCOSAMIDES (ANTIINFECC. SISTÈMICS)	1434A - ESPIRAMICINA	0,0047
J01D - ALTRES ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS	825A - CEFADROXIL	0,0036
J01X - ALTRES ANTIBACTERIANS (ANTIINFECCIOSOS SISTÈMICS)	1619A – FUSÍDIC ÀCID	0,0031
J01D - ALTRES ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS	192A - CEFALEXINA	0,0027
J01C - ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS, PENICIL·LINES	1006A - AMPICIL·LINA	0,0026
J01D - ALTRES ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS	3276A - CEFACLOR	0,0022
J01F - MACRÒLIDS I LINCOSAMIDES (ANTIINFECC. SISTÈMICS)	2188A - MIDECAMICINA	0,0020
J01G - ANTIBACTERIANS AMINOGLUCÒSIDS (ANTIINFEC.SISTEM)	372A - AMIKACINA	0,0015
J01M - ANTIBACTERIANS DERIVATS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	2223A - OFLOXACINA	0,0012
J01G - ANTIBACTERIANS AMINOGLUCÒSIDS (ANTIINFEC.SISTEM)	1642A - GENTAMICINA	0,0011
J01G - ANTIBACTERIANS AMINOGLUCÒSIDS (ANTIINFEC.SISTEM)	3141A - TOBRAMICINA	0,0008
J01C - ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS, PENICIL·LINES	106A – BENCILPENICIL·LINA	0,0008
J01F - MACRÒLIDS I LINCOSAMIDES (ANTIINFECC. SISTÈMICS)	2225A - ROXITROMICINA	0,0005
J01D - ALTRES ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS	501A - CEFTRIAXONA	0,0005

J01D - ALTRES ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS	3840A - CEFOTAXIMA	0,0002
J01M - ANTIBACTERIANS DERIVATS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	3761A - PIPEMÍDIC ÀCID	0,0002
J01X - ALTRES ANTIBACTERIANS (ANTIINFECCIOSOS SISTÈMICS)	3197A - VANCOMICINA	0,0001
J01D - ALTRES ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS	189A - CEFTAZIDIMA	0,0001
J01C - ANTIBACTERIANS BETALACTÀMICS, PENICIL·LINES	200056A – BENCILPENICIL·LINA (SÒDICA - PROCAÏNA - BENZATINA)	0,0000

Paral·lelament, es va contactar amb una oficina de farmàcia situada en el centre de la ciutat de Castelló per a recopilar informació referent a la venda d'antibiòtics a Castelló (vegeu la **Taula 2.2**).

Taula 2.2. Venda anual (2020) d'antibiòtics dispensats per oficina de farmàcia de Castelló

Compost	Unitats anuals	Percentatge	Tipus d'antibiòtic
Amoxicillin	700	37%	Penicil·lines
Azithromycin	350	19%	Macròlids
Phosphomycin	230	12%	Altres antibacterians
Clarithromycin	100	5%	Macròlids
Ciprofloxacin	100	5%	Quinolones (fluoroquinolones)
Metronidazole	100	5%	Altres antibacterians (derivats imidazòlics)
Cefuroxime	94	5%	Cefalosporines de segona generació
Norfloxacin	94	5%	Quinolones (fluoroquinolones)
Levofloxacin	80	4%	Quinolones (fluoroquinolones)
Moxifloxacin	25	1%	Quinolones (fluoroquinolones)

Sobre la base dels dos llistats anteriors, i tenint en compte les possibilitats analítiques, la bibliografia prèvia i l'experiència del grup d'investigació sobre determinació de fàrmacs en aigües residuals, es va seleccionar un llistat de 19 antibiòtics de diferents famílies (vegeu la **Taula 2.3**). Cal destacar, que quatre d'aquests (amoxicil·lina, ciprofloxacinaa, sulfamethoxazolè i trimethoprima) apareixen en la llista d'observació (*Watch List*) de la UE (Decisió d'execució 2020/1161 de la comissió de 4 d'agost de 2020), la qual inclou un total de 15 contaminants els nivells de concentració dels quals han de ser controlats en aigües superficials pels diferents estats membres.

Taula 2.3. Llistat d'antibiòtics seleccionats per a dur a terme l'estudi

Classificació		Antibiòtics
Beta-lactams	<i>Penicil·lina</i>	Amoxicillin* Ampicillin Cloxacillin
	<i>Cephalosporina</i>	Cefixime Cefditoren Cefuroxime
Macrolides		Azithromycin Clarithromycin Clindamycin Erythromycin Roxithromycin
Quinolones		Ciprofloxacin* Levofloxacin Moxifloxacin Norfloxacin
Tetracyclines		Doxycycline
Other antibiotics	<i>Sulphonamide</i>	Sulfamethoxazole*
	<i>Diaminopyridine</i>	Trimethoprim*
	<i>Nitroimidazole</i>	Metronidazole

* Antibiòtics inclosos en la llista d'observació (Watch List 2020/1161)

D'altra banda, per a completar el present estudi i aportar informació d'interés sobre la presència de medicaments de diverses famílies en les aigües residuals, es van seleccionar al voltant de 40 fàrmacs sobre la base de la nostra experiència en anàlisi d'aigües residuals de diferents poblacions i països. La **Taula 2.4** mostra els fàrmacs addicionals seleccionats i el seu grup terapèutic corresponent. Com pot observar-se, en aquesta llista s'han inclòs també set antibiòtics, que no apareixen en la **Taula 2.3**, per la qual cosa les anàlisis aportaran informació complementària no sols sobre altres fàrmacs sinó també sobre set antibiòtics més, no inclosos en el mètode per a antibiòtics desenvolupat en el present projecte.

Taula 2.4. Llistat d'altres fàrmacs estudiats en el projecte

Classificació	Compostos
<i>Analgesics</i>	Acetaminophen Tramadol
<i>Anthelmintic agents</i>	Levamisol
<i>Antibiotics</i>	Flumequine Furaltadone Lincomycin Nalidixic acid Oxolinic acid Sulfadiazine Tetracycline
<i>Antidepressants</i>	Venlafaxine
<i>Antiepileptics</i>	Gabapentin Carbamazepine Primidone
<i>Antihypertensives</i>	Enalapril Irbesartan Losartan Valsartan
<i>Antiulcer drugs</i>	Pantoprazole
<i>Benzodiazepines</i>	Alprazolam Lorazepam
<i>Beta-blocker agents</i>	Metoprolol Salbutamol
<i>Contrast medium for X-ray</i>	Iopromide
<i>Hypolipidemic agents</i>	Atorvastatin
<i>Nonsteroidal anti-inflammatory</i>	Diclofenac Phenazone

3. PRESA DE MOSTRES

El present estudi s'ha focalitzat en l'EDAR de Castelló. S'han dut a terme dos mostrejos d'aigua residual d'una setmana, dues vegades al mes, des d'abril fins a juliol de 2021, i d'una sola setmana a l'agost de 2021. En total, es van prendre 36 mostres compostes de 24 hores, que van correspondre a 18 mostres d'aigua d'entrada (recàrrega) i altres 18 d'aigua d'eixida (efluent). El mostreig va ser realitzat per personal de la planta i congelades immediatament en la mateixa planta, a temperatura inferior a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriorment, les mostres van ser recollides mensualment per personal del IUPA i recepcionades en el laboratori en bon estat. En el cas de no poder realitzar les anàlisis immediatament, es van guardar en les instal·lacions del IUPA en congelador a temperatura inferior a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de les anàlisis.

En la **Taula 3.1** s'indiquen les diferents mostres analitzades, les dates de mostreig i els seus codis d'identificació, així com el cabal d'entrada i d'eixida del dia del mostreig.

Taula 3.1. Mostrejos d'aigua residual d'entrada i d'eixida de l'EDAR de Castelló (Abril-Agost 2021)

	Mostres d'entrada a l'EDAR				Mostres d'eixida de l'EDAR			
	Data	Dia	Codi mostra	Cabal d'entrada (m³/d)	Data	Dia	Codi mostra	Cabal d'eixida (m³/d)
Abril	06/04/2021	Dimarts	I-001	33396	07/04/2021	Dimecres	E-002	39336
	07/04/2021	Dimecres	I-002	39336	08/04/2021	Dijous	E-003	37738
	20/04/2021	Dimarts	I-004	38577	21/04/2021	Dimecres	E-005	46301
	21/04/2021	Dimecres	I-005	46301	22/04/2021	Dijous	E-006	40640
Maig	04/05/2021	Dimarts	I-007	38248	05/05/2021	Dimecres	E-008	38254
	05/05/2021	Dimecres	I-008	38254	06/05/2021	Dijous	E-009	42645
	18/05/2021	Dimarts	I-010	38918	19/05/2021	Dimecres	E-011	39286
	19/05/2021	Dimecres	I-011	39285	20/05/2021	Dijous	E-012	39598
Juny	08/06/2021	Dimarts	I-013	36453	09/06/2021	Dimecres	E-014	38188
	09/06/2021	Dimecres	I-014	38188	10/06/2021	Dijous	E-015	39793
	29/06/2021	Dimarts	I-016	36645	30/06/2021	Dimecres	E-017	36645
	30/06/2021	Dimecres	I-017	36645	01/07/2021	Dijous	E-018	37721
Juliol	13/07/2021	Dimarts	I-019	38779	14/07/2021	Dimecres	E-020	37300
	14/07/2021	Dimecres	I-020	37300	15/07/2021	Dijous	E-021	37796

Agost	27/07/2021	Dimarts	I-022	40158	28/07/2021	Dimecres	E-023	38772
	28/07/2021	Dimecres	I-023	38772	29/07/2021	Dijous	E-024	38665
	24/08/2021	Dimarts	I-025	37826	25/08/2021	Dimecres	E-026	41965
	25/08/2021	Dimecres	I-026	41965	26/08/2021	Dijous	E-027	38037

4. ANÀLISI QUANTITATIVA. METODOLOGIA I RESULTATS OBTINGUTS

4.1. Metodologia analítica

Encara que el principal objectiu del present estudi és la determinació d'antibiòtics en mostres d'aigua residuals, s'han considerat també altres fàrmacs amb la finalitat d'aportar informació d'interés sobre la presència de medicaments diversos en les aigües residuals. Amb això, es pretén completar la informació obtinguda per a antibiòtics amb altres fàrmacs, per a donar una visió més realista de la situació actual de les aigües i del comportament d'aquests compostos en les EDAR. Per consegüent, l'anàlisi quantitativa de les mostres s'ha dut a terme mitjançant l'aplicació de dos mètodes analítics, un únicament per a antibiòtics i un altre per a fàrmacs pertanyents a altres grups terapèutics. Les dues metodologies estan basades en la tècnica de cromatografia líquida d'ultra-resolució acoblada a espectrometria de masses en tàndem (UHPLC-MS/MS) amb analitzador de triple quadrupol (QqQ), en manera de treball *Selected Reaction Monitoring* (SRM).

En l'Annex 1 d'aquest Informe, es descriuen els dos mètodes analítics aplicats, així com la validació de les metodologies analítiques.

4.2. Anàlisi de les mostres

En cada seqüència d'anàlisi s'han injectat tant les mostres com els controls de qualitat (QC) entre dues corbes de calibratge, utilitzant les respostes mitjanes dels calibratges per a dur a terme la quantificació dels compostos. Aquesta quantificació s'ha realitzat mitjançant calibratge extern, o mitjançant el mètode de calibratge de patró intern en aquells casos en els quals es disposa de patró intern marcat isotòpicament (ILIS). Per a cada compost, s'ha adquirit una transició de quantificació (Q) i dues transicions de confirmació (q_1 , q_2). S'ha donat com a positiu un compost solament quan s'han complert els criteris de confirmació de la identitat (SANTE/11813/2017). És a dir, quan, a més de coincidir el temps de retenció amb el patró/patró intern, amb una tolerància màxima de ± 0.1 min, almenys una de les relacions d'intensitat (q_1/Q , q_2/Q) es desvia menys del $\pm 30\%$ respecte al patró de referència (com a valor mitjà del calibratge).

Controls de qualitat de les anàlisis

En aquest treball s'ha prestat especial atenció al control de qualitat de les anàlisis amb la finalitat d'assegurar la fiabilitat dels resultats. Els baixos nivells de concentració dels compostos analitzats i la complexitat de la matriu de les mostres, fan que aquest tipus de determinacions siga problemàtic, per la qual cosa el control de qualitat adquireix especial importància. S'ha dut a terme mitjançant l'anàlisi de mostres control (Quality Control, QC), incloses en cada seqüència analítica.

Els QC es van preparar a partir de dues mostres d'aigua analitzades, triades a l'atzar (mostres d'entrada I-001 i I-014; mostres d'eixida E-002 i E-015) a tres nivells de concentració (100, 500 i 5000 ng L⁻¹ per a antibiòtics; 100, 1000 i 5000 ng L⁻¹ per als altres fàrmacs). En el camp de l'anàlisi de residus es consideren acceptables les recuperacions individuals de QCs en el rang entre 60 i 140% (SANTE, 2019). Quan les recuperacions per als QC es van trobar fora d'aquest rang, les concentracions obtingudes es van corregir en funció de la recuperació mitjana de les mostres QC injectades en la seqüència, sempre que s'observara una certa robustesa en els resultats obtinguts per a aquestes recuperacions fora de rang.

Les **Taules 4.1 i 4.2** mostren els valors mitjans de recuperació dels QC obtinguts en l'anàlisi d'antibiòtics i d'altres fàrmacs, respectivament, en les aigües residuals d'entrada i d'eixida de l'EDAR.

En el cas dels antibiòtics, en general es van obtindre recuperacions mitjanes satisfactòries amb valors en el rang 60-140%, a excepció de cloxacillin i clindamycin al nivell més baix de fortificació amb recuperacions inferiors al 50%. D'altra banda, en alguns QC, majoritàriament al nivell més baix de concentració (100 ng L⁻¹), no es van poder calcular les recuperacions (azitromycin, clarithromycin, erithromycin, ciprofloxacina i norfloxacina), a conseqüència de l'elevada concentració d'aquests compostos en les mostres "blanc" utilitzades per a la seua preparació. Això va fer que a penes es notara l'addició d'una xicoteta quantitat de patró, i que no poguera, per tant, calcular-se la seua recuperació.

Per a la resta de fàrmacs, les recuperacions mitjanes dels QCs també van ser satisfactòries (entre 60-140%) per a la majoria dels compostos. També en alguns casos (acetaminophen, gabapentin, iopromide, valsartan i venlafaxine), no es van obtindre valors satisfactoris de recuperació, especialment en els QCs més baixos, a causa de l'elevat nivell de concentració trobat en les mostres "blanc".

Tal com s'ha indicat anteriorment, quan les recuperacions dels QC es van trobar fora del rang 60-140%, les concentracions obtingudes es van corregir en funció de la recuperació mitjana de les mostres QC injectades en la seqüència d'anàlisi.

Taula 4.1. Recuperacions mitjanes (%) dels QCs d'antibiòtics en les aigües residuals

	Aigües d'entrada			Aigües d'eixida		
	QC100	QC500	QC5000	QC100	QC500	QC5000
Amoxicillin*	-	120	88	135	110	99
Ampicillin*	-	90	76	73	92	86
Cloxacillin*	60	89	89	<u>36</u>	93	88
Azithromycin*	a	a	72	a	73	91
Clarithromycin*	a	64	83	61	61	108
Clindamycin*	<u>45</u>	63	65	97	95	67
Erythromycin*	a	85	99	70	77	118
Roxithromycin*	b	94	72	b	69	100
Ciprofloxacin*	a	93	102	90	100	69
Levofloxacin*	88	88	100	61	104	91
Moxifloxacin*	77	96	102	79	100	105
Norfloxacin*	a	99	109	86	107	104
Doxycycline*	92	68	84	74	96	80
Sulfamethoxazole*	75	96	87	94	91	82
Trimethoprim*	83	86	84	84	93	72
Metronidazole	65	74	60	121	108	105
Cefditoren	98	114	98	123	113	94
Cefuroxime	62	79	66	131	112	117

En *cursiva* es mostren les recuperacions fora del rang 60-140% acceptat

*Compostos quantificats mitjançant mètode patró intern, en estar disponible l'ILIS corresponent

- Valor no disponible per falta de sensibilitat

a: Presència del compost en el "blanc" utilitzat per a preparar el QC a concentracions altes, la qual cosa impedeix obtenir un valor de recuperació satisfactori

b: Valor de recuperació anòmal, pròxim al 200%

Taula 4.2. Recuperacions mitjanes (%) dels QCs d'altres fàrmacs analitzats en les aigües

	Aigües d'entrada			Aigües d'eixida		
	QC100	QC1000	QC5000	QC100	QC1000	QC5000
Acetaminophen*	a	a	a	97	90	90
Alprazolam	87	91	86	94	90	95
Atorvastatin*	70	84	81	68	76	79
Carbamazepine*	99	98	73	96	85	98
Diclofenac*	118	106	112	101	103	102
Enalapril	89	101	98	99	102	99
Flumequine	88	97	93	88	98	96
Furaltadone	122	119	114	118	116	105
Gabapentin	a	76	106	115	115	116
Iopromide	a	a	90	a	112	97
Irbesartan*	94	107	88	67	101	99
Levamisole*	80	103	117	95	102	118
Lincomycin	92	93	97	92	90	101
Lorazepam	105	104	102	99	105	109
Losartan	103	91	91	107	95	98
Metoprolol	97	117	133	108	130	91
Nalidixic acid	104	105	95	97	99	65
Oxolinic acid	101	103	105	106	96	105
Pantoprazole	93	94	89	95	94	63
Phenazone	118	108	123	104	88	102
Primidone	102	100	96	98	94	98
Salbutamol	62	68	61	111	88	77
Sulfadiazine	121	114	114	117	109	106
Tetracycline*	b	94	97	111	101	100
Tramadol	97	117	133	108	130	91
Valsartan*	a	85	117	102	92	98
Venlafaxine*	93	75	92	a	84	82

*Compostos quantificats mitjançant mètode patró intern, en estar disponible l'ILIS corresponent

a: Presència del compost en el "blanc" utilitzat per a preparar el QC a concentracions altes, la qual cosa impedeix obtenir un valor de recuperació satisfactori

b: Valor de recuperació anòmal, pròxim al 200%

Anàlisi d'aigües residuals d'entrada (recàrrega urbana)

Les 18 mostres de recàrrega es van analitzar mitjançant les dues metodologies descrites en el present informe, una per a la determinació d'antibiòtics i una altra per a la determinació d'altres fàrmacs. Les **Taules 4.3 i 4.4** mostren els resultats obtinguts per a la determinació d'antibiòtics i altres fàrmacs, respectivament, en cadascuna de les mostres d'entrada (recàrrega) recollides en l'EDAR de Castelló.

S'han trobat la majoria dels compostos estudiats (14 de 18 antibiòtics i 24 de 27 de la resta de fàrmacs). Entre els antibiòtics detectats, cal assenyalar azithromycin i ciprofloxacina, que van presentar concentracions en mostres superiors a $1 \mu\text{g L}^{-1}$, sent el valor més alt per a azithromycin en la mostra de juny I-013 ($4.9 \mu\text{g L}^{-1}$). En el cas dels altres fàrmacs, l'analgèsic acetaminophen, l'anticonvulsiu gabapentin, el mitjà de contrast iopromide i l'antihipertensiu valsartan van mostrar concentracions per damunt de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, arribant fins i tot a superar en algun cas el valor de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (acetaminophen en la mostra de juliol I-022, $107 \mu\text{g L}^{-1}$).

Taula 4.3. Concentracions (ng L⁻¹) d'antibiòtics en mostres d'entrada (recàrrega)

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	I-001	I-002	I-004	I-005	I-007	I-008	I-010	I-011	I-013	I-014	I-016	I-017	I-019	I-020	I-022	I-023	I-025	I-026
Amoxicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azithromycin	2928	3562	2512	2428	4578	1978	4478	4562	4895	4345	3012	2078	3878	3912	3795	3312	3295	2695
Clarithromycin	714	825	598	715	855	621	961	971	1005	873	615	517	709	702	603	586	568	653
Clindamycin	6	19	13	-	13	-	13	10	19	8	-	-	5	-	6	-	14	10
Erythromycin	126	156	134	148	196	135	174	159	146	135	122	107	121	129	131	120	136	123
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	1254	1095	675	818	1869	524	1486	1383	1861	1849	766	683	1132	1162	1142	900	1131	1280
Levofloxacin	777	694	480	540	686	377	942	839	1251	922	618	489	789	865	745	541	856	833
Moxifloxacin	270	100	39	20	27	7	23	22	29	34	11	7	16	18	7	13	-	6
Norfloxacin	775	603	332	382	664	243	564	543	732	814	360	293	410	489	557	410	475	525
Doxycycline	-	63	40	31	97	38	97	59	94	61	77	46	48	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	241	369	233	299	378	204	591	545	687	569	311	259	454	556	510	349	518	474
Trimethoprim	98	129	102	130	192	99	215	176	158	165	88	77	165	157	175	126	159	145
Metronidazole	-	5	18	6	29	36	<i>d</i>	8	14	9	8	5	<i>d</i>	-	6	5	-	5
Cefditoren	-	36	41	-	45	43	37	35	36	37	35	32	-	46	41	32	39	-
Cefuroxime	30	28	50	11	25	15	27	20	-	23	26	15	44	32	53	-	-	-

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació (5 ng L⁻¹)

Taula 4.4. Concentracions (ng L⁻¹) d'altres fàrmacs en mostres d'entrada (influyente)

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	I-001	I-002	I-004	I-005	I-007	I-008	I-010	I-011	I-013	I-014	I-016	I-017	I-019	I-020	I-022	I-023	I-025	I-026
Acetaminophen	38925	73291	31998	64273	95645	64495	60169	55817	74115	40461	28600	22342	38747	77355	107278	62169	66365	75000
Alprazolam	8	10	5	8	9	6	5	5	11	6	7	d	5	9	5	5	6	6
Atorvastatin	370	431	210	304	288	239	292	329	402	251	230	149	206	337	374	275	370	390
Carbamazepine	34	51	15	36	34	31	43	141	53	32	15	10	25	65	74	45	43	63
Diclofenac	1270	1195	502	964	930	748	785	985	1315	863	645	385	491	1016	1244	881	1016	1179
Enalapril	269	359	136	345	304	229	290	285	535	320	206	129	167	407	484	268	504	546
Flumequine	13	12	9	7	7	7	-	7	7	7	6	6	-	6	-	6	-	6
Furaltadone	17	15	11	8	8	10	-	7	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-
Gabapentin	10801	15675	5307	11439	13396	10354	11628	11130	18175	11117	8544	5485	7527	14968	15935	11922	15835	15586
Iopromide	4849	14799	10960	10658	12909	22488	33318	22513	66338	13783	3297	4252	10487	26194	22306	12840	10697	514
Irbesartan	911	1085	390	789	738	576	705	705	1109	722	471	323	482	942	1073	748	929	1111
Levamisole	10	24	16	27	16	27	-	-	7	7	d	d	d	5	7	d	5	7
Lincomycin	-	14	17	-	15	-	-	13	21	15	13	14	-	14	-	-	14	14
Lorazepam	76	86	32	61	99	47	59	58	86	57	49	18	34	78	86	61	79	78
Losartan	394	463	199	336	321	248	292	325	528	283	240	141	236	454	467	367	478	517
Metoprolol	1336	2310	807	1429	1669	1360	1730	1562	2643	1506	1236	854	1125	2270	2361	1631	2055	2485
Nalidixic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	9	11	10	9	12	10	9	9	9	10	9	9	8	9	9	9	9	9
Phenazone	327	333	307	323	317	315	318	315	333	320	311	310	325	336	339	330	356	370
Primidone	64	89	48	83	75	44	66	56	77	61	55	44	57	93	92	71	86	93
Salbutamol	13	16	11	13	13	12	12	14	15	12	12	10	11	13	13	12	14	14
Sulfadiazine	8	10	16	21	12	11	27	27	16	7	9	6	14	16	15	11	16	19
Tetraycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	I-001	I-002	I-004	I-005	I-007	I-008	I-010	I-011	I-013	I-014	I-016	I-017	I-019	I-020	I-022	I-023	I-025	I-026
Tramadol	1753	3031	1059	1876	2190	1785	2271	2050	3468	1977	1622	1120	1476	2978	3097	2141	2696	3261
Valsartan	11352	14480	4772	11846	9805	7424	9554	10533	17862	11105	6596	4547	6235	14289	16701	9809	14255	15990
Venlafaxine	663	1169	394	589	921	641	886	866	1222	719	607	376	549	1186	1162	806	1001	1115

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació (5 ng L⁻¹)

Anàlisi d'aigües residuals d'eixida (efluent)

Les 18 mostres d'efluent, ja tractades en l'EDAR, també es van analitzar mitjançant les dues metodologies descrites en el present informe. Les **Taules 4.5 i 4.6** mostren els resultats obtinguts per a la determinació d'antibiòtics i altres fàrmacs, respectivament, en les mostres d'eixida recollides en l'EDAR de Castelló.

S'ha trobat el mateix nombre de compostos estudiats que en les aigües d'entrada (14 de 18 antibiòtics i 24 de 25 de la resta de fàrmacs), encara que els nivells de concentració són en general més baixos que en la recàrrega. Cal destacar que, dels dos antibiòtics que presentaven les concentracions més altes ($> 1 \mu\text{g L}^{-1}$) en la recàrrega, únicament ciprofloxacina ha rebaixat les seues concentracions per davall d' $1 \mu\text{g L}^{-1}$. En el cas d'azythromycin, els valors de concentració en efluent són similars als de recàrrega, i en totes les mostres es troben per damunt d' $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Entre els altres fàrmacs, d'entre els quatre compostos que van presentar les concentracions més altes en les mostres de recàrrega, cal assenyalar el cas de l'acetaminophen i de gabapentin, ja que les seues concentracions s'han rebaixat dràsticament en les mostres d'efluent.

Cal destacar que en els efluentes analitzats s'han detectat quatre fàrmacs (ciprofloxacina, sulfamethoxazole, trimethoprim i venlafaxine) que estan inclosos en la Llista d'Observació (*Watch List*) de la UE (Decisió d'execució 2020/1161) els nivells de la qual han de ser controlats en aigües superficials. Per contra, amoxicillin, antibiòtic també inclòs en la Llista d'Observació, no s'ha detectat en cap de les aigües d'eixida analitzades.

Taula 4.5. Concentracions (ng L⁻¹) d'antibiòtics en mostres d'eixida (efluent)

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	E-002	E-003	E-005	E-006	E-008	E-009	E-011	E-012	E-014	E-015	E-017	E-018	E-020	E-021	E-023	E-024	E-026	E-027
Amoxicillin*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azithromycin	2840	3110	2720	1800	2640	2690	4180	4010	3520	3480	2560	2890	2420	2720	2490	2910	1580	1800
Clarithromycin	200	214	221	223	197	188	221	203	204	211	169	167	170	171	174	167	170	169
Clindamycin	44	38	36	26	56	58	52	56	93	61	33	38	50	54	36	45	24	31
Erythromycin	140	130	124	97	144	125	147	148	111	113	100	101	97	96	103	100	94	99
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin*	371	271	252	141	415	374	567	511	548	623	538	511	505	509	395	486	296	455
Levofloxacin	414	331	313	143	441	399	582	605	671	670	702	641	685	646	463	560	386	534
Moxifloxacin	108	38	20	7	10	8	9	9	6	13	10	-	9	8	4	6	2	-
Norfloxacin	258	140	138	73	177	180	206	197	218	241	227	201	178	181	156	193	98	160
Doxycycline	26	-	-	-	10	-	10	-	10	32	12	12	10	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole*	34	24	27	15	98	52	67	81	68	66	62	80	173	117	173	99	83	69
Trimethoprim*	131	119	131	77	181	192	176	170	171	185	140	142	102	92	56	67	20	34
Metronidazole	168	163	175	89	219	199	156	173	197	208	141	170	110	118	117	116	61	87
Cefditoren	37	35	33	30	35	-	36	37	40	36	33	48	35	37	35	33	35	-
Cefuroxime	90	79	183	63	84	99	86	91	101	80	112	147	117	81	105	91	34	62

*Antibiòtics inclosos en la llista d'observació (Watch List 2020/1161)

Taula 4.6. Concentracions (ng L⁻¹) d'altres fàrmacs en mostres d'eixida (efluent)

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	E-002	E-003	E-005	E-006	E-008	E-009	E-011	E-012	E-014	E-015	E-017	E-018	E-020	E-021	E-023	E-024	E-026	E-027
Acetaminophen	27	18	68	144	29	29	23	25	23	18	15	25	30	32	150	20	59	319
Alprazolam	11	14	11	3	9	16	8	10	8	10	8	11	13	9	8	9	7	8
Atorvastatin	72	47	34	73	22	22	42	39	14	24	21	16	21	19	16	14	16	16
Carbamazepine	58	77	55	26	49	51	102	165	55	59	41	60	89	54	56	62	50	52
Diclofenac	379	471	415	389	713	432	578	513	349	573	399	652	876	478	500	653	487	491
Enalapril	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	9	-	9	-	-	-	-
Flumequine	6	5	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2
Furaltadone	8	7	5	-	4	-	4	4	-	-	-	-	3	3	3	3	3	-
Gabapentin	472	550	707	346	554	539	1081	853	318	442	494	780	1043	582	605	449	1509	648
Iopromide	9271	16822	8446	4299	11124	11309	21203	17573	11673	15036	5856	9769	12752	8521	6268	5734	679	592
Irbesartan	711	969	729	360	790	695	643	700	514	914	546	855	929	529	488	773	568	534
Levamisole	37	56	50	22	31	32	25	31	21	32	19	25	28	17	15	19	37	39
Lincomycin	6	6	12	10	-	-	-	-	10	11	-	8	10	8	7	7	11	11
Lorazepam	80	114	83	33	74	77	72	73	59	78	60	88	96	56	55	66	50	59
Losartan	204	260	197	125	225	180	217	231	147	232	149	214	282	160	135	146	194	157
Metoprolol	1481	1949	1555	775	1534	1620	1562	1735	1358	1823	1299	1856	2315	1466	1308	1420	1223	1298
Nalidixic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	7	8	8	6	11	8	7	8	10	10	8	10	12	7	7	10	6	6
Phenazone	390	474	400	337	395	515	513	552	691	956	602	846	896	679	373	645	490	645
Primidone	72	122	75	46	72	74	69	77	58	74	67	83	107	76	71	76	70	73
Salbutamol	16	18	14	6	12	14	13	14	13	15	13	15	17	12	12	13	11	12
Sulfadiazine	-	-	d	-	2	2	12	2	-	-	d	-	3	2	-	-	3	-
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	E-002	E-003	E-005	E-006	E-008	E-009	E-011	E-012	E-014	E-015	E-017	E-018	E-020	E-021	E-023	E-024	E-026	E-027
Tramadol	1943	2558	2041	1017	2013	2126	2049	2277	1781	2392	1705	2435	3037	1924	1717	1864	1605	1703
Valsartan	3581	4671	4333	1907	3637	2948	4643	4633	1173	1656	1280	2211	3374	1874	1544	1762	3061	2232
Venlafaxine*	628	750	577	300	531	574	680	749	614	775	552	822	1009	626	548	639	489	519

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació (2 ng L⁻¹)

*Fàrmac inclòs en la llista d'observació (Watch List 2020/1161)

Les **Taules 4.7 i 4.8** mostren les concentracions mitjanes mensuals trobades per a antibiòtics i per a altres fàrmacs, respectivament, tant en les aigües d'entrada com en les d'eixida.

Com s'ha indicat anteriorment, les concentracions en l'efluent són, en general, menors que en les mostres de recàrrega, la qual cosa denota una certa eficiència de l'EDAR quant a l'eliminació de fàrmacs, encara que queda lluny de ser completa perquè encara es troben molts fàrmacs i a nivells relativament importants en les aigües tractades. No obstant això, s'observen tres antibiòtics (clindamycin, metronidazole i cefuroxime) i altres sis fàrmacs més (alprazolam, carbamazepine, levamisole, lorazepam, phenazone i primidone) amb concentracions mitjanes mensuals del mateix ordre, i fins i tot majors, en les mostres d'efluent.

Comparant les concentracions mensuals dels productes farmacèutics estudiats tant en les aigües d'entrada com en les d'eixida, no s'observa una tendència clara quant a nivells de concentració, o ús diferencial de fàrmacs en el temps, al llarg dels cinc mesos d'estudi.

Taula 4.7. Concentracions mitjanes (ng L^{-1}) mensuals d'antibiòtics

	Abril		Maig		Juny		Juliol		Agost	
	Entrada	Eixida	Entrada	Eixida	Entrada	Eixida	Entrada	Eixida	Entrada	Eixida
Amoxicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azithromycin	2858	2618	3899	3380	3583	3113	3724	2635	2995	1690
Clarithromycin	713	215	852	202	752	188	650	171	611	169
Clindamycin	13	36	12	56	13	56	6	47	12	27
Erythromycin	141	123	166	141	127	106	125	99	129	97
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	961	259	1315	467	1290	555	1084	474	1206	375
Levofloxacin	623	300	711	506	820	671	735	588	844	460
Moxifloxacin	107	43	20	9	20	10	14	7	6	2
Norfloxacin	523	152	503	190	550	222	467	177	500	129
Doxycycline	45	26	73	10	69	17	48	10	-	-
Sulfamethoxazole	285	25	429	74	457	69	467	140	496	76
Trimethoprim	115	115	170	180	122	159	156	79	152	27
Metronidazole	10	149	24	187	9	179	5	115	5	74
Cefditoren	39	34	40	36	35	39	40	35	-	35
Cefuroxime	30	104	22	90	16	110	43	98	-	48

Taula 4.8. Concentracions mitjanes (ng L^{-1}) mensuals d'altres fàrmacs

	Abril		Maig		Juny		Juliol		Agost	
	Entrada	Eixida	Entrada	Eixida	Entrada	Eixida	Entrada	Eixida	Entrada	Eixida

Acetaminophen	52122	64	69031	27	41380	20	71387	58	70682	189
Alprazolam	8	10	6	11	7	9	6	10	6	8
Atorvastatin	329	57	287	31	258	19	298	17	380	16
Carbamazepine	34	54	62	92	28	54	52	65	53	51
Diclofenac	983	413	862	559	802	493	908	627	1098	489
Enalapril	277	-	277	13	298	9	331	9	525	-
Flumequine	10	4	7	2	7	2	6	2	6	2
Furaltadone	13	7	8	4	-	-	7	3	-	3
Gabapentin	10805	519	11627	757	10830	509	12588	670	15711	1078
Iopromide	10316	9710	22807	15302	21917	10584	17957	8319	5606	636
Irbesartan	794	692	681	707	656	707	811	680	1020	551
Levamisole	19	41	21	30	7	24	6	20	6	38
Lincomycin	16	8	14	-	16	10	14	8	14	11
Lorazepam	64	77	66	74	52	71	65	68	79	55
Losartan	348	196	296	213	298	185	381	181	498	176
Metoprolol	1470	1440	1580	1613	1560	1584	1847	1627	2270	1261
Nalidixic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	10	7	10	9	9	9	9	9	9	6
Phenazone	322	400	316	494	318	774	332	648	363	568
Primidone	71	79	60	73	59	70	78	83	90	72
Salbutamol	13	14	13	13	12	14	13	13	14	11
Sulfadiazine	13	d	19	4	10	d	14	3	18	3
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tramadol	1930	1890	2074	2116	2047	2078	2423	2135	2979	1654
Valsartan	10612	3623	9329	3965	10027	1580	11758	2138	15122	2646
Venlafaxine	704	564	828	633	731	691	926	705	1058	504

d: detectat, no quantificat, concentració inferior al valor límit per a la quantificació (5 ng L⁻¹)

A tall d'exemple, es presenten les **Figures 4.1 i 4.2** corresponents a positius d'antibiòtics trobats en dues mostres del mes d'abril i a positius d'altres fàrmacs en dues mostres del mes de juliol, respectivament.

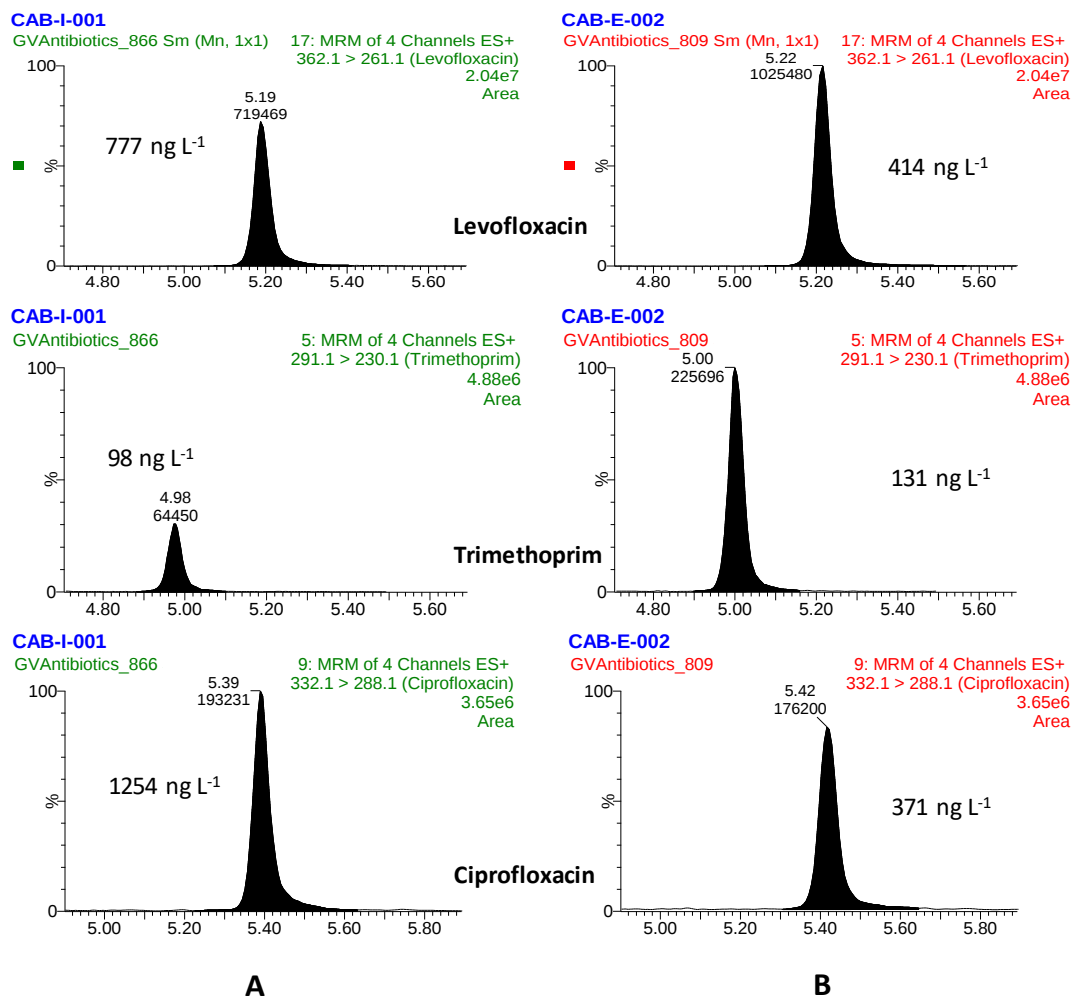


Figura 4.2. Exemples de cromatogrames de mostres positives a antibiòtics: recàrrega I-001 (A) i efluent E-002 (B). Els cromatogrames corresponen a extractes de mostra de recàrrega diluïda x5 i d'efluent diluïda x2.

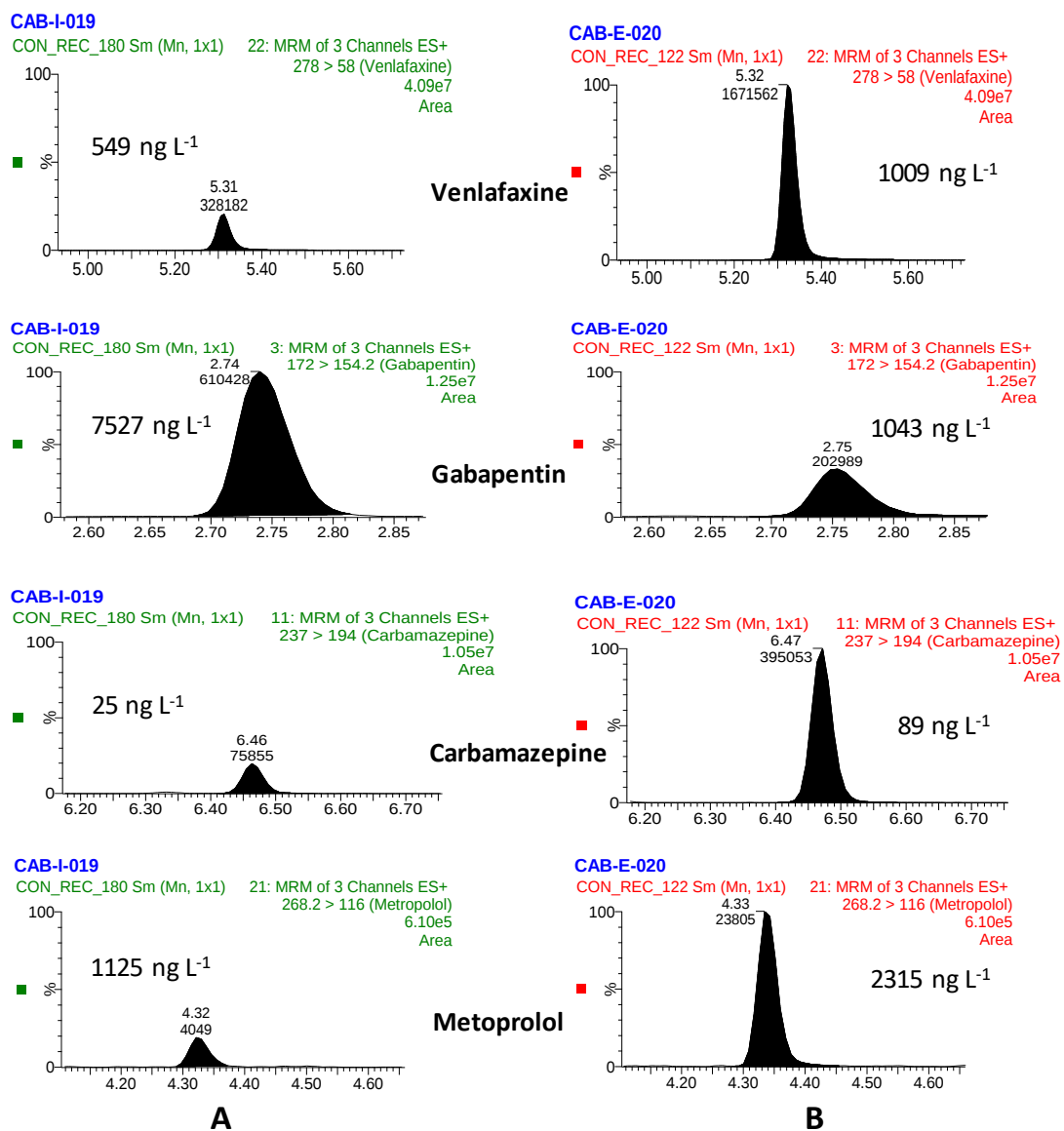


Figura 4.2. Exemples de cromatogrames de mostres positives a altres fàrmacs: recàrrega I-019 (A) i efluent E-020 (B). Els cromatogrames corresponen a extractes de mostra de recàrrega diluïda x5 i d'efluent diluïda x2.

5. CRIBRATGE DE METABÒLITS

Els mètodes analítics publicats en la literatura científica per a la determinació d'antibiòtics en aigües permeten la quantificació d'un nombre limitat de compostos, a nivells de concentració molt baixos, amb alta fiabilitat quant a les concentracions reportades i la identitat del compost detectat. Es tracta de mètodes "target" desenvolupats per a uns pocs antibiòtics seleccionats, però no permeten obtenir informació sobre els seus metabòlits o altres fàrmacs que puguin també ser presents en les aigües. Per a tindre una visió més completa sobre la presència de compostos amb activitat antimicrobiana és necessari complementar aquests mètodes quantitius amb un **cribratge ampli (garbellat) que permeta identificar altres antibiòtics o metabòlits que pogueren estar també presents en les aigües**.

Actualment, la tècnica d'elecció per als mètodes quantitius és LC-MS/MS (vegeu l'apartat anterior), mentre que per al cribratge s'utilitzen **mètodes basats en cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses d'alta resolució (LC-HRMS)**. En aquest apartat s'indica la metodologia aplicada pel nostre grup de treball per al cribratge de metabòlits dels antibiòtics objecte d'estudi mitjançant LC-HRMS. Les anàlisis es van emportar sobre una mescla homogeneïtzada de les mostres de recàrrega preses al maig i juny (IWW May-Jun), d'una banda, i al juliol i agost (IWW Jul-Ago), d'altra banda. El mateix procediment es va utilitzar per a les mostres d'efluent (EWW May-Jun, EWW Jul-Ago).

Metodologia analítica

Preparació de les mostres

Es van prendre 50 ml de mostra i es van diluir x 2 amb aigua ultrapura, passant-los posteriorment per un cartutx Oasi HLB (200 mg, Waters), prèviament condicionat amb un volum de metà, i un volum d'aigua ultrapura, grau HPLC. A continuació, es va assecat el cartutx passant aire i es va eluir amb 10 ml de metanol. L'eluat es va evaporar a sequedat sota un corrent suau de nitrogen a 40 °C i es va reconstituir en un volum final de 0.5 ml metanol:aigua (20:80, v/v) (factor de pre-concentració en el procés SPE x100). Finalment, es van injectar 10 µL en el sistema UHPLC-IMS-HRMS.

Instrumentació

Les anàlisis de cribratge es van dur a terme amb un equip de cromatografia líquida Waters Acquity I-Class UPLC (Waters Corp., Milford, DT., USA) acoblat a un sistema d'espectrometria de

massa d'alta resolució Vion IMS QTOF (Waters Corp., Wilmslow, Manchester, UK), usant ionització per electroesprai (ESI), i operant tant en manera positiva com negatiu.

La separació cromatogràfica es va realitzar amb una columna Cortecs C18 2.1 x 100 mm, 2.7 µm fused-core (Waters Corp., Wexford, Ireland), mantinguda a 40 °C. Es va aplicar un gradient d'elució a un flux de 0.3 ml/min, amb aigua (A) i metanol (B), tots dos al 0.01% àcid fòrmic: 10% B a 0.0 min, 90% B a 14.0 min, 99% B a 14.1 min, 99% B a 16.0 min, 10% B a 16.1 min, amb un temps total de 18 min. El volum d'injecció va ser 10 µL.

Els paràmetres d'ionització de la font ESI van ser els següents: 1.0 kV de voltatge de capil·lar en manera positiva i 1.5 kV en negatiu, 30 V de voltatge de con en totes dues maneres, temperatura de la font 120 °C, temperatura de desolvatació 650 °C, flux de gas de desolvatació 1.200 L/h, i flux de gas de con 250 L/h. La cel·la de mobilitat iònica (IMS) de tipus *Travelling Wave* (TWIMS) es va configurar amb una velocitat d'ona de 250 m/s, i una altura d'ona variable aplicant una rampa de 20 a 50 V. Es va utilitzar nitrogen ($\geq 99.999\%$) com a gas de deriva en la cel·la d'IMS. La resolució del TOF va ser de 36.000 ~FWHM en manera positiva (mesurament per a la massa m/z 556), i de 38.000 FWHM en negatiu (m/z 554). El calibratge de l'instrument es va realitzar seguint les indicacions del fabricant, usant en aquest cas la solució de calibratge "Major Mix IMS/TOF calibration" (Waters Corp.). Per a assegurar una correcta exactitud de massa, es va mesurar de manera contínua durant tot el temps d'anàlisi una solució de leucina encefalina preparada a 50 µg/L en aigua:acetonitrilo 50:50 acidificada amb 0.01% d'àcid fòrmic. Es va utilitzar nitrogen ($\geq 99.999\%$) com a gas de col·lisió per a realitzar la fragmentació dels compostos (CID, *collision induced dissociation*). Es van adquirir dues funcions de tipus full-range de manera seqüencial: una funció a baixa energia de col·lisió (LI, *low energy*) usant 6 eV d'energia de col·lisió, i una funció a alta energia de col·lisió (HE, *high energy*) usant una rampa d'energia de col·lisió de 28-56 eV. Totes dues funcions es van adquirir en el rang de massa m/z 50-1000, amb un temps d'escaneig de 0.3 s. Les dades es van adquirir i van processar amb el sistema informàtic UNIFI v1.9 (Waters Corp.).

Base de dades usada per a la cerca de metabòlits

Es va preparar una base de dades en el nostre laboratori amb la finalitat de realitzar la cerca de metabòlits dels antibiòtics estudiats en aquest treball. Per a això, es va realitzar una cerca bibliogràfica de metabòlits reportats en diferents bases de dades en línia d'accés lliure (<https://go.drugbank.com/>, <https://www.pharmgkb.org/>) per als antibiòtics inclosos en l'estudi. A més, la base de dades es va completar amb les estructures de potencials metabòlits no reportats per als antibiòtics estructuralment similars a uns altres amb biotransformacions reportades, i es van obtenir un total de 50 metabòlits que es van incloure en la base de dades.

Processament de dades

Un compost detectat en les aigües es va considerar completament identificat (Nivell 1 de confiança (Celma et al., 2020) quan es va observar en la mostra la molècula protonada i almenys un ió fragment, tots dos amb errors de massa menors de 5 ppm. A més, el temps de retenció cromatogràfic hauria de diferenciar-se en menys de 0.1 min de l'observat per al patró de referència i el paràmetre de mobilitat iònica (CCS) hauria de tindre un error menor de 2% respecte al d'aquest patró de referència. Per tant, aquest nivell de confiança, que permet una identificació inequívoca del metabòlit, és només possible quan es disposa del patró de referència, la qual cosa no és habitual. Per a la majoria de metabòlits, no estava disponible el patró de referència, però no obstant això es va disposar d'informació sobre la massa exacta dels seus ions fragment gràcies a treballs previs realitzats pel nostre grup d'investigació (Boix et al., 2016), per la qual cosa aquesta informació es va poder incloure en la base de dades.

Com s'ha indicat, per a la majoria de metabòlits i TPs reportats en la bibliografia, no hi ha patrons de referència analítics disponibles comercialment. En aquest cas, els compostos es van identificar temptativament sobre la base de la fragmentació en massa exacta observada i la seua justificació sobre la base de l'estructura de la molècula. Per a augmentar la confiança en la identificació, els ions fragment observats per al suposat metabòlit es van comparar amb els de l'antibiòtic original, ja que molts metabòlits i productes de transformació presenten normalment rutes de fragmentació similars a la molècula original. Addicionalment, la fragmentació observada també es va comparar amb la descrita en la bibliografia per a aquests compostos. En aquest cas, per a considerar un compost com temptativament identificat (Nivell 2, Celma et al., 2020), la fragmentació es va justificar sobre la base de l'estructura del compost, sent alguns dels ions fragment comuns amb la molècula original o havent-se reportat prèviament en bibliografia. En tots els casos, l'error de massa de la molècula protonada i dels ions fragment utilitzats per a la identificació temptativa ha de ser menor de 5 ppm. En el cas que no hi haja informació reportada sobre la fragmentació del compost, i els ions fragment no coincideixen amb els del

compost original, si aquests es poden justificar sobre la base de l'estructura proposada per al metabòlit, el compost es considera identificat a Nivell 3.

Metabòlits identificats en les mostres d'aigua residual

3-desmethyl trimethoprim (Nivell 2)

El trimethoprim es metabolitza per via oxidativa en diferents compostos, sent més abundants els originats per desmetilació en la posició 3' i 4', representant aproximadament el 65% i 25% del total de metabòlits, respectivament (*Goldman et al., 2015*). En el cas d'administració oral, entre el 50 i el 60% del trimethoprim s'excreta en orina en unes 24 hores, sent el compost inalterat al voltant del 80% del total excretat (*FDA Approved Drug Products: Trimethoprim oral tablets, accessed September 28, 2021*).

La identificació d'aquest metabòlit es va realitzar sobre la base de la presència de dos fragments comuns amb el trimethoprim, observats a m/z 261 i 123, els quals serveixen per a establir la posició de la desmetilació en anell aromàtic (**Taula 5.1, Figura 5.11**). No obstant això, no es pot conèixer quin grup methoxy s'ha desmetilat, ja que la fragmentació seria equivalent en tots els casos. Es proposa el 3-desmethyl sobre la base de la informació metabòlica reportada, que indica que aquest és el metabòlit majoritari (*Goldman et al., 2015*).

Taula 5. 1. Dades MS per a 3-desmethyl trimethoprim.

Ió	m/z	Composició elemental	Error de massa (ppm)	Error de massa (mDa)	Observat per al compost original
$[M+H]^+$	277.12826	$C_{13}H_{17}N_4O_3^+$	-4.5	-1.3	-
Fragment 1	261.09872	$C_{12}H_{13}N_4O_3^+$	1.4	0.4	Si
Fragment 2	123.06649	$C_5H_7N_4^+$	6.6	0.8	Si

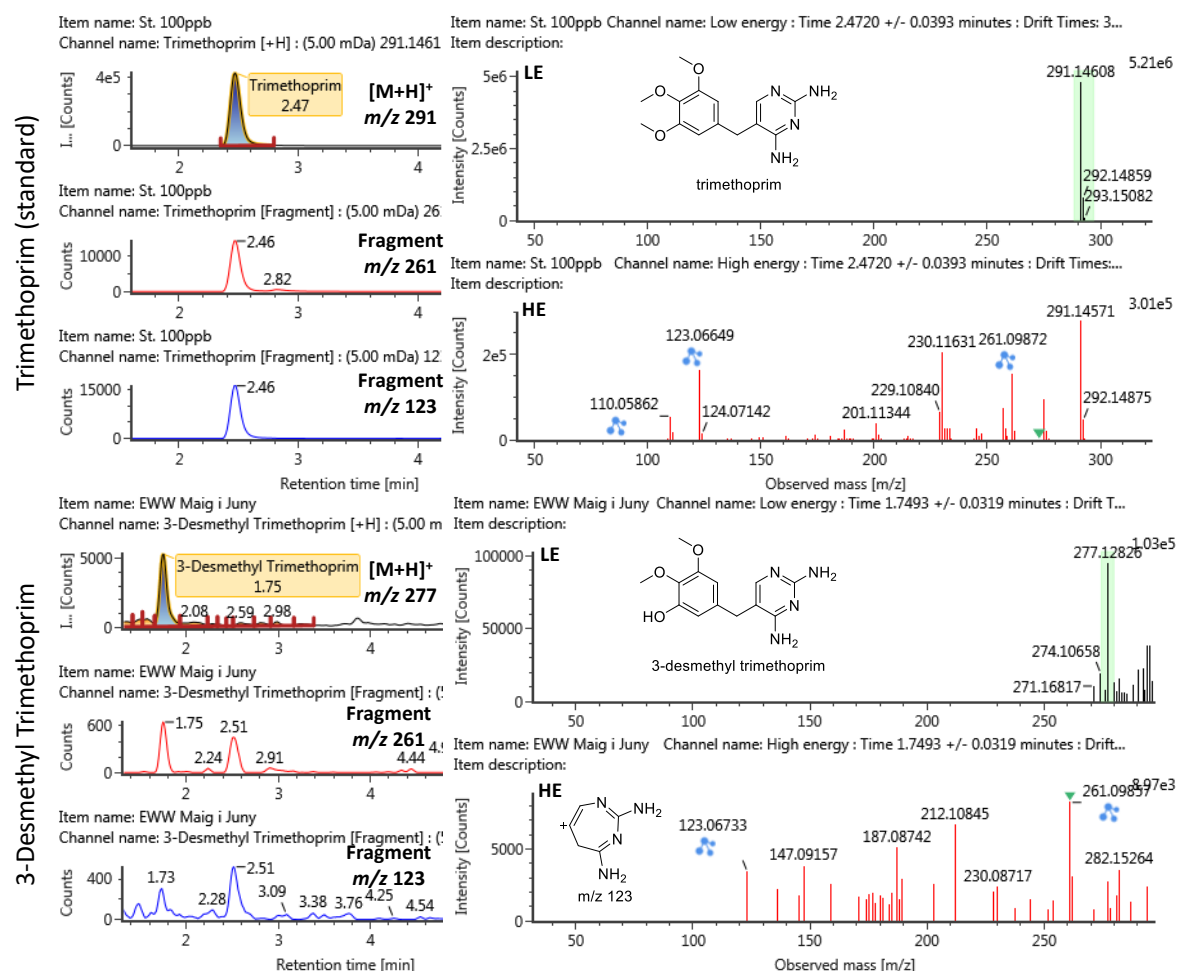


Figura 5. 1. Comparació de la fragmentació d'un patró de trimethoprim i del 3-demethyl trimethoprim detectat en una mostra real (dreta). També es mostren els cromatogrames d'ió extret per a la molècula protonada i per als ions fragment diagnòstic (esquerra)

Clindamycin sulfoxide (Nivell 2)

L'antibiòtic clindamycin es metabolitza principalment per via hepàtica a través de la CYP3A4 i, en menor mesura, la CYP3A5. (FDA Approved Drug Products: Cleocin (clindamycin hydrochloride) oral capsules , accessed September 28, 2021). S'han reportat dos metabòlits inactius: un metabòlit d'oxidació (clindamycin sulfoxide), i un *N-desmetil* metabòlit (N-desmethyl clindamycin) [5]. Aproximadament el 10% de la clindamycin s'excreta en l'orina i un 3.6% en la femta, sent la resta excretada com a metabòlits inactius (FDA Approved Drug Products: Cleocin (clindamycin hydrochloride) oral capsules, accessed September 28, 2021).

La identificació d'aquest metabòlit es va realitzar sobre la base de la presència de dos ions fragment compartits amb la clindamycin, amb m/z 126 i m/z 377, sent l'ió m/z 377 el que permet establir la posició de l'oxidació, en aquest cas un sulfòxid. (Taula 5.2, Figura 5.2).

Adicionalment, el perfil isotòpic observat per al metabòlit és coherent amb la presència d'àtoms de Cl i S en l'estructura, de manera similar a la clindamycin (**Figura 5.2**).

Taula 5.2. Dades MS per a clindamycin sulfoxide.

Ío	m/z	Composició elemental	Error de massa (ppm)	Error de massa (mDa)	Observat per al compost original
$[M+H]^+$	441.18208	$C_{18}H_{33}ClN_2O_6S^+$	0.1	0.0	-
Fragment 1	126.12765	$C_{18}H_{33}ClN_2O_6S^+$	-0.6	-0.1	Si
Fragment 2	377.18452	$C_{18}H_{33}ClN_2O_6S^+$	2.0	0.7	Si

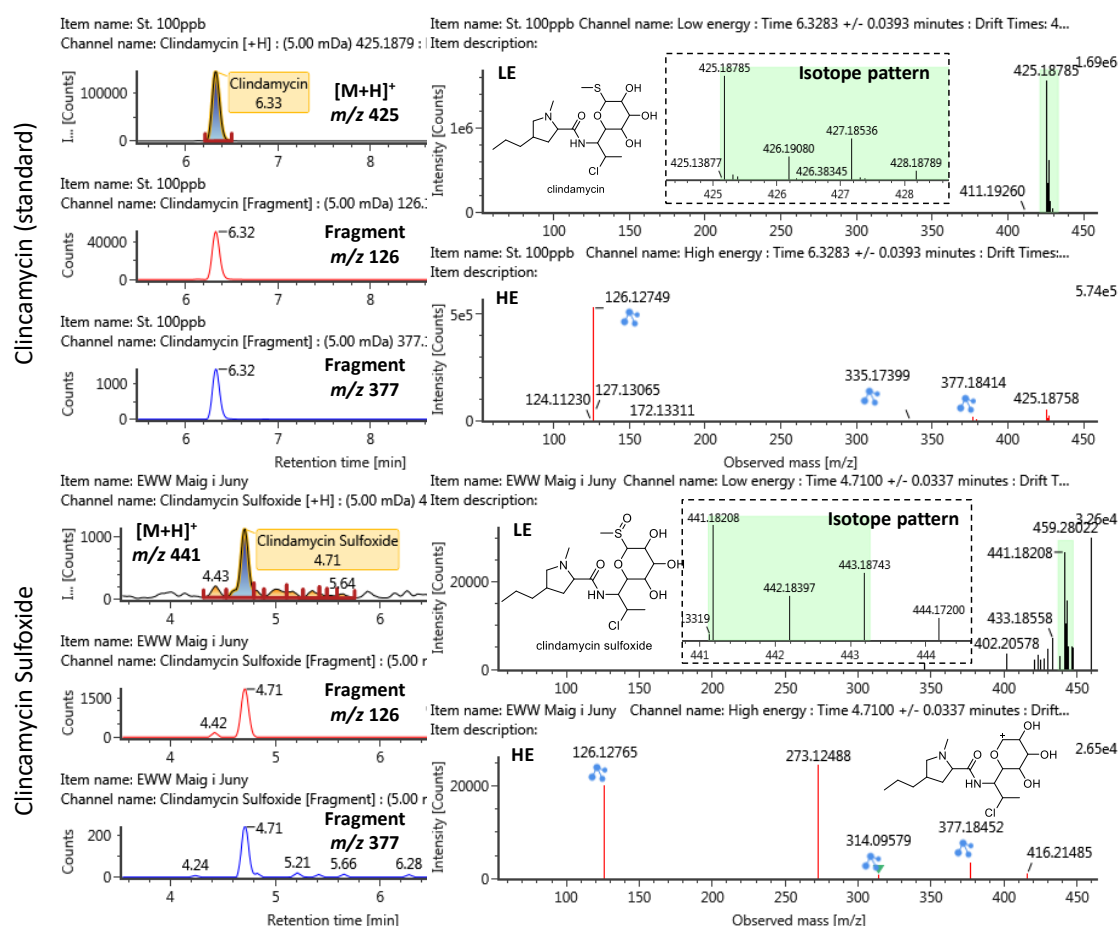


Figura 5.2. Comparació de la fragmentació del patró de clindamycin i del clindamycin sulfoxide detectat en una mostra real (dreta). Detall del perfil isotòpic observat en el compost inalterat i en el metabòlit. També es mostren els cromatogrames d'ió extret per a la molècula protonada i per als ions fragment diagnòstic (esquerra).

N-acetyl ciprofloxacin (Nivell 2) i oxociprofloxacin (Nivell 3)

El ciprofloxacin es metabolitza principalment per la CYP1A2 (*FDA Approved Drug Products: CIPRO (ciprofloxacin) oral tablets and suspension, accessed September 28, 2021*). Els metabòlits primaris oxociprofloxacin i sulociprofloxacin representen cadascun el 3-8% de la dosi total. També s'han reportat metabòlits minoritaris, com el desethylene ciprofloxacin i formylciprofloxacin (*FDA Approved Drug Products: CIPRO XR (ciprofloxacin) extended-release tablets, accessed September 28, 2021*) [7]. Aquests 4 metabòlits representen el 15% de la dosi oral total. Els estudis amb ciprofloxacin radiomarcats indiquen que aproximadament el 45% es recupera en orina com a compost inalterat, i el 62% en la femta (*LeBel, 1988*).

El metabòlit *N-acetyl* ciprofloxacin es va identificar sobre la base d'un fragment comú amb el compost original a m/z 231, el qual va permetre establir la posició de la biotransformació. (**Taula 5.3, Figura 5.3**).

Taula 5.3. Dades MS per a *N-acetyl* ciprofloxacin.

Ió	m/z	Composició elemental	Error de massa (ppm)	Error de massa (mDa)	Observat per al compost original
[M+H]⁺	374.15168	C₁₉H₂₁FN₃O₄⁺	1.7	0.6	-
Fragment 1	231.05823	C ₁₂ H ₈ FN ₂ O ₂ ⁺	7.8	1.8	Si

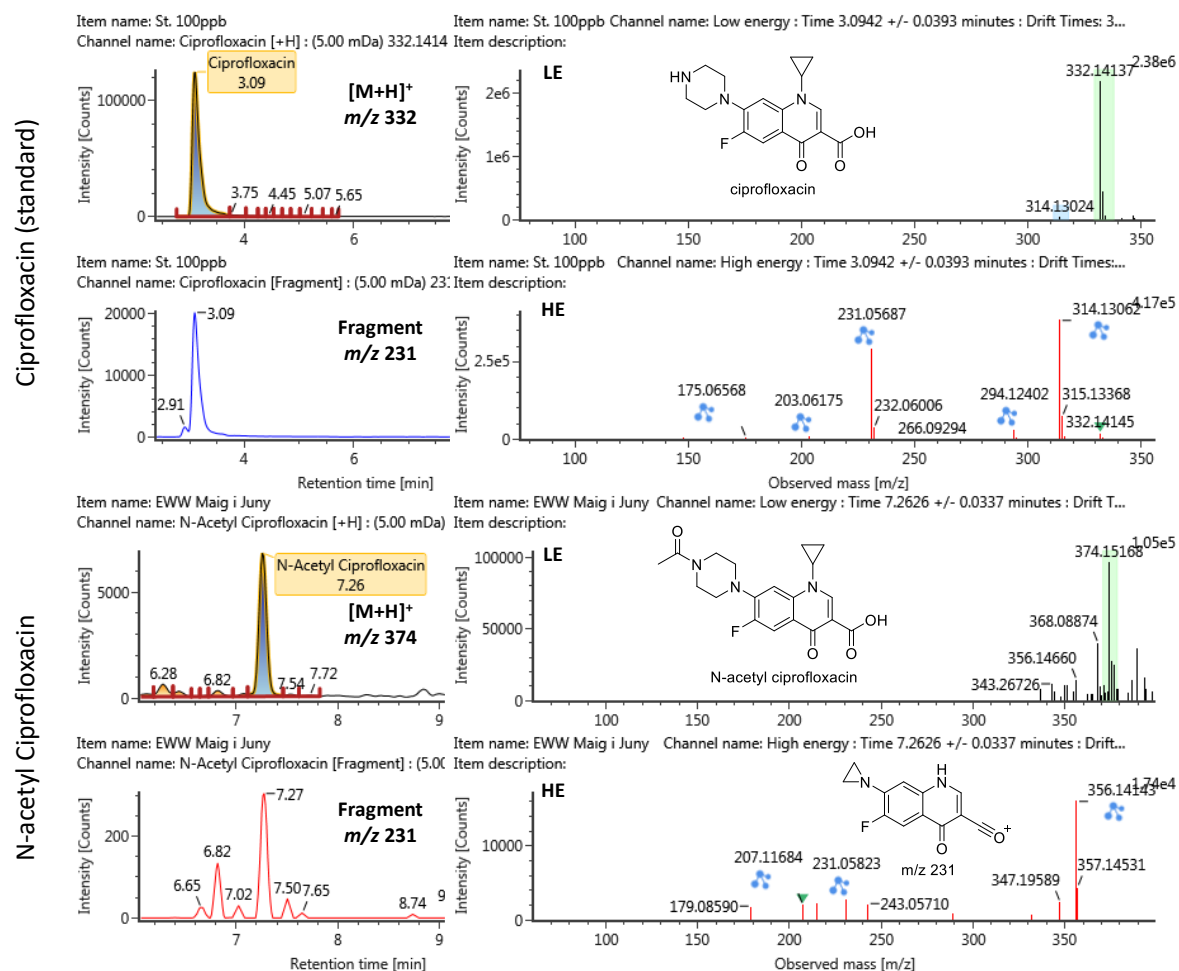


Figura 5.3. Comparació de la fragmentació del patró de ciprofloxacina i del N-acetyl ciprofloxacina sulfoxide detectat en una mostra real (dreta). També es mostren els cromatogrames d'ió extret per a la molècula protonada i per als ions fragment diagnòstic (esquerra).

En el cas de l'oxociprofloxacina, no es van observar fragments comuns amb el ciprofloxacina. No obstant això, els tres ions fragment observats es van poder justificar satisfactòriament amb l'estructura proposada per a aquest metabòlit. (Taula 5.4, Figura 5.4).

Taula 5.4. Dades MS per a oxociprofloxacina.

Íon	m/z	Composició elemental	Error de massa (ppm)	Error de massa (mDa)	Observat per al compost original
[M+H] ⁺	346.12042	C ₁₇ H ₁₇ FN ₃ O ₄ ⁺	1.9	0.7	-
Fragment 1	328.10916	C ₁₇ H ₁₇ FN ₃ O ₄ ⁺	-0.1	0.0	No
Fragment 2	287.07105	C ₁₇ H ₁₇ FN ₃ O ₄ ⁺	3.4	1.0	No

Fragment 3 217.04074 $C_{17}H_{17}FN_3O_4^+$ -0.2 0.0 No

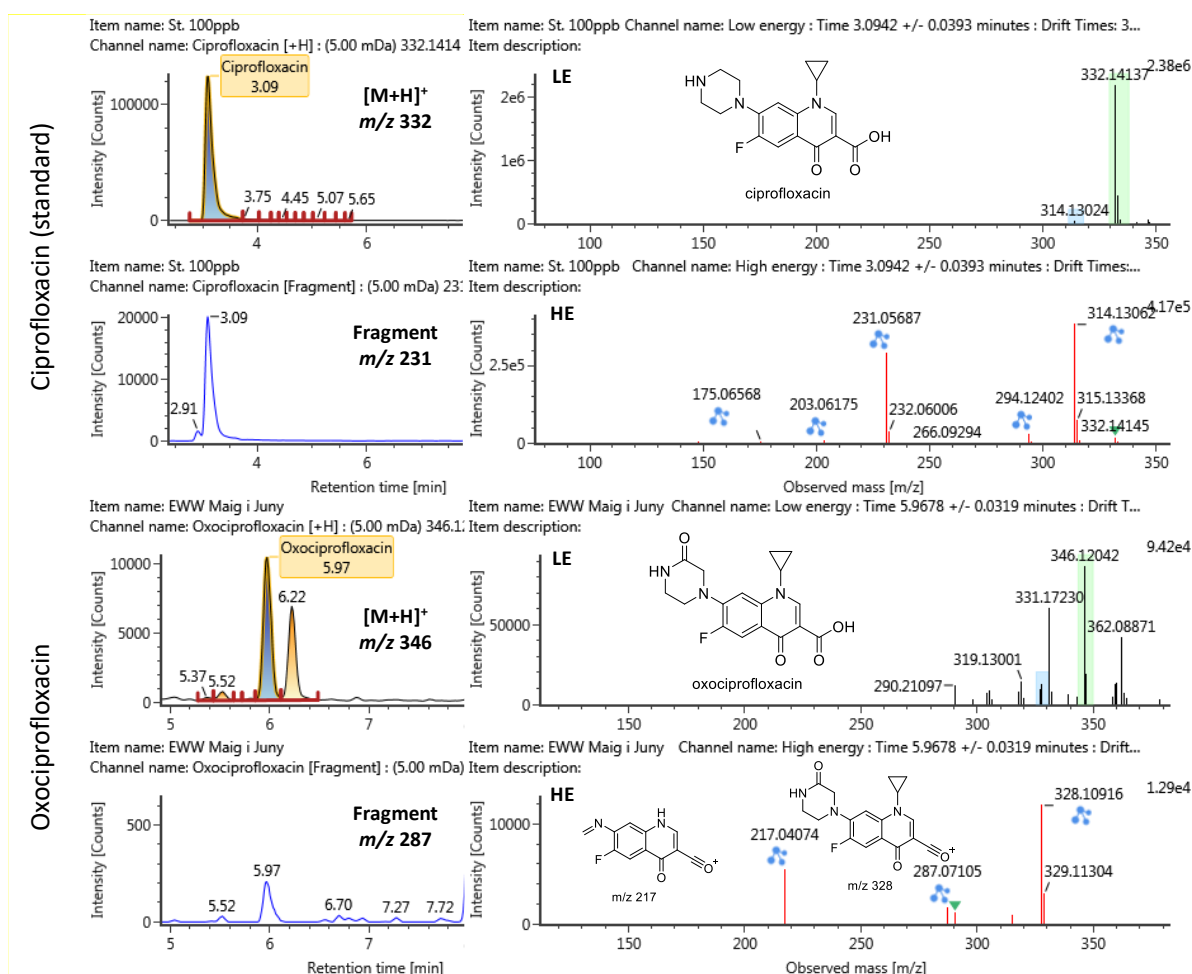


Figura 5.4. Comparació de la fragmentació del patró de ciprofloxacina i de l'oxociprofloxacina sulfoxide detectat en una mostra real (dreta). També es mostren els cromatogrames d'ió extret per a la molècula protonada i per als ions fragment diagnòstic (esquerra).

Els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que els quatre metabòlits descrits anteriorment s'han trobat en les dues mostres compostes d'efluent que s'han analitzat (EWW May-Jun, EWW Jul-Ago), mentre que en les mostres de recàrrega urbana només s'han trobat els metabòlits de ciprofloxacina (oxociprofloxacina en IWW Maig-Jun i IWW Jul-Ago; N-acetyl ciprofloxacina en IWW Maig-Jun). El fet de no haver detectat els metabòlits de trimethopim i clindamycin en la recàrrega pots ser degut a la major complexitat d'aquestes mostres, comparada amb l'efluent ja depurat, la qual cosa es tradueix en un major efecte matriu per supressió que impediria la detecció dels esmentats metabòlits.

L'estudi preliminar realitzat sobre metabòlits reportats d'antibiòtics demostra que aquests compostos també es troben presents en les aigües, per la qual cosa resulta necessari ampliar l'estudi a altres metabòlits i als productes de transformació (TPs), molts dels quals no han sigut reportats encara, per la qual cosa resulten desconeguts per al químic analític. Es recomana realitzar una investigació detallada sobre la presència de metabòlits i TPs d'antibiòtics en les aigües residuals en el futur pròxim, tant de compostos reportats en la bibliografia, com d'uns altres no reportats, usant per a això el potencial de la tècnica d'HRMS i aproximacions poderoses com són la cerca de compostos amb fragments comuns, o la predicció de metabòlits, entre altres. Aquesta investigació sobre metabòlits i TPs, juntament amb les dades obtingudes sobre els antibiòtics inalterats, permetria tindre una visió molt més completa de la situació de les nostres aigües residuals quant a presència d'antibiòtics i potencial impacte sobre la salut pública i el medi ambient.

6. ESTIMACIÓ DEL CONSUM DE FÀRMACS MITJANÇANT EPIDEMIOLOGIA BASADA EN L'ANÀLISI D'AIGÜES RESIDUALS

Fent ús de l'aproximació "Epidemiologia basada en aigües residuals", s'ha estimat el consum diari total dels antibiòtics i dels altres fàrmacs a la ciutat de Castelló, tenint quan la seua població (174.264 hab) i aplicant un factor d'excreció (FE) específic per a cada compost. Aquest FE generalment depén de la taxa d'excreció d'una substància, la relació de massa molecular del fàrmac original al seu metabòlit, i en alguns casos, l'estabilitat del fàrmac.

En el present estudi, els diferents FE s'han estimat com la inversa dels percentatges d'excreció en orina del fàrmac original, que es troben reportats en la literatura consultada (<https://go.drugbank.com>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Les **Taules 6.1 i 6.2** mostren els valors de percentatges d'excreció en orina i els factors FE obtinguts per als antibiòtics i els altres fàrmacs, respectivament.

Taula 6.1. Percentatge d'excreció i FE d'antibiòtics en orina

	% Excreció en orina	FE
Amoxicillin	78	1,3
Ampicillin	95	1,1
Cloxacillin	62	1,6
Azithromycin	6	17
Clarithromycin	30	3,3
Clindamycin	10	10
Erythromycin	5	20
Roxithromycin	10	10
Ciprofloxacin	45	2,2
Levofloxacin	87	1,2
Moxifloxacin	20	5,0
Norfloxacin	30	3,3
Doxycycline	60	1,7
Sulfamethoxazole	30	3,3
Trimethoprim	48	2,1
Metronidazole	20	5,0
Cefditoren	95	1,1
Cefuroxime	95	1,1

Taula 6.2. Percentatge d'excreció i FE d'altres fàrmacs en orina

	% Excreció en orina	FE
Acetaminophen	5	20
Alprazolam	95	1,1
Atorvastatin	1	100
Carbamazepine	1	100
Diclofenac	70	1,4
Enalapril	36,6	2,7
Flumequine	86	1,2
Furaltadone	*	*
Gabapentin	99	1,0
Iopromide	97	1,0
Irbesartan	0,4	250
Levamisole	*	*
Lincomycin	30,3	3,3
Lorazepam	26,4	3,8
Losartan	1,4	71
Metoprolol	5	20
Nalidixic acid	*	*
Oxolinic acid	*	*
Pantoprazole	71	1,4
Phenazone	*	*
Primidone	80,6	1,2
Salbutamol	70	1,4
Sulfadiazine	*	*
Tetracycline	80	1,2
Tramadol	30	3,3
Valsartan	10,4	9,6
Venlafaxine	5	20

* dada no disponible

El consum de la població de Castelló (g/24 h/1.000 hab) s'ha estimat a partir de les càrregues diàries dels fàrmacs en les aigües de recàrrega, segons la següent equació:

$$\text{Consumo} = q \times \frac{1000}{P} \times FE$$

q: càrrega diària del fàrmac (g/24 h) en la mostra de recàrrega

P: població (hab)

FE: factor d'excreció

Les **Taules 6.3 i 6.4** mostren els valors estimats del consum poblacional a la ciutat de Castelló quant a antibiòtics i a altres fàrmacs, respectivament. Cal assenyalar que per a aplicar l'aproximació WBE, basada en l'anàlisi de les aigües residuals, es requereix que el biomarcador analitzat siga prou estable en aigua i que procedisca exclusivament del compost que es desitja avaluar. El requisit de l'estabilitat pot explicar l'absència de dades sobre amoxicil·lina, un antibiòtic àmpliament usat, que no obstant això no s'ha detectat en les aigües residuals. Aquest fet s'atribueix a la poca estabilitat d'aquest compost en el medi aquós, que pateix una ràpida degradació per hidròlisi. Aquesta limitació, que afecta principalment l'amoxicil·lina, podria

també trobar-se, encara que en menor mesura, en altres compostos, per la qual cosa l'aproximació WBE resulta fiable en molts casos, però pot no ser la més apropiada en alguns casos concrets.

Com pot observar-se en la **Taula 6.3**, azythromycin ha sigut, amb diferència, l'antibiòtic més consumit durant els mesos d'estudi. Quant als altres fàrmacs, com era esperable, acetaminophen (paracetamol) ha sigut el compost més consumit, arribant fins i tot a assolir el valor de 411 g/24 h/1.000 hab el mes de juliol. El següent fàrmac amb un consum elevat (19–53 g/24 h/1.000 hab) ha sigut l'agent hipertensiu ibersartan.

Taula 6.3 Estimació del consum poblacional d'antibiòtics a partir de les dades obtingudes en l'anàlisi de les aigües residuals (g/24 h/1.000 hab)

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	I-001	I-002	I-004	I-005	I-007	I-008	I-010	I-011	I-013	I-014	I-016	I-017	I-019	I-020	I-022	I-023	I-025	I-026
Amoxicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azithromycin	9,4	13	9	11	17	7	17	17	17	16	11	7	14	14	15	12	12	11
Clarithromycin	0,46	0,62	0,44	0,63	0,63	0,45	0,72	0,73	0,70	0,64	0,43	0,36	0,53	0,50	0,46	0,43	0,41	0,52
Clindamycin	0,011	0,043	0,029	-	0,029	-	0,029	0,023	0,040	0,018	-	-	0,011	-	0,014	-	0,030	0,024
Erythromycin	0,48	0,71	0,59	0,79	0,86	0,59	0,78	0,72	0,61	0,59	0,51	0,45	0,54	0,55	0,61	0,53	0,59	0,59
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	0,53	0,55	0,33	0,48	0,91	0,26	0,74	0,69	0,87	0,90	0,36	0,32	0,56	0,55	0,59	0,45	0,55	0,69
Levofloxacin	0,17	0,18	0,12	0,16	0,17	0,10	0,24	0,22	0,30	0,23	0,15	0,12	0,20	0,21	0,20	0,14	0,21	0,23
Moxifloxacin	0,26	0,11	0,044	0,026	0,030	0,008	0,026	0,024	0,030	0,037	0,011	0,008	0,018	0,019	0,008	0,014	-	0,0067
Norfloxacin	0,49	0,45	0,24	0,34	0,49	0,18	0,42	0,41	0,51	0,59	0,25	0,21	0,30	0,35	0,43	0,30	0,34	0,42
Doxycycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	0,15	0,28	0,17	0,26	0,28	0,15	0,44	0,41	0,48	0,42	0,22	0,18	0,34	0,40	0,39	0,26	0,38	0,38
Trimethoprim	0,039	0,061	0,047	0,072	0,088	0,045	0,10	0,083	0,069	0,075	0,038	0,034	0,076	0,070	0,084	0,058	0,072	0,073
Metronidazole	-	0,0055	0,020	0,0081	0,031	0,039	0,0018	0,0085	0,015	0,010	0,0087	0,0053	0,0056	-	0,0073	0,0056	-	0,0061
Cefditoren	-	0,0085	0,0096	-	0,010	0,0099	0,0086	0,0083	0,0078	0,0086	0,0077	0,0071	-	0,010	0,0099	0,0075	0,0089	-
Cefuroxime	0,0060	0,0066	0,012	0,0030	0,0059	0,0036	0,0063	0,0046	-	0,0052	0,0058	0,0032	0,0104	0,0072	0,0128	-	-	-

Taula 6.4. Estimació del consum poblacional d'altres fàrmacs a partir de les dades obtingudes en l'anàlisi de les aigües residuals (g/24 h/1.000 hab)

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	I-001	I-002	I-004	I-005	I-007	I-008	I-010	I-011	I-013	I-014	I-016	I-017	I-019	I-020	I-022	I-023	I-025	I-026
Acetaminophen	149	281	123	246	367	247	231	214	284	155	110	86	149	296	411	238	254	287
Alprazolam	0,0017	0,0020	0,0009	0,0015	0,0017	0,0013	0,0010	0,0010	0,0022	0,0013	0,0014	0,0006	0,0009	0,0017	0,0010	0,0010	0,0012	0,0013
Atorvastatin	7,1	8,3	4,0	5,8	5,5	4,6	5,6	6,3	7,7	4,8	4,4	2,8	3,9	6,5	7,2	5,3	7,1	7,5
Carbamazepine	0,64	0,98	0,29	0,69	0,66	0,60	0,82	2,7	1,0	0,61	0,30	0,18	0,49	1,2	1,4	0,86	0,82	1,2
Diclofenac	0,35	0,33	0,14	0,26	0,25	0,20	0,21	0,27	0,36	0,24	0,18	0,11	0,13	0,28	0,34	0,24	0,28	0,32
Enalapril	0,14	0,19	0,07	0,18	0,16	0,12	0,15	0,15	0,28	0,17	0,11	0,07	0,09	0,21	0,25	0,14	0,26	0,29
Flumequine	0,0029	0,0026	0,0021	0,0016	0,0016	0,0016	-	0,0015	0,0015	0,0016	0,0014	0,0014	-	0,0014	-	0,0014	-	0,0013
Furaltadone	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gabapentin	2,1	3,0	1,0	2,2	2,6	2,0	2,3	2,2	3,5	2,2	1,7	1,1	1,5	2,9	3,1	2,3	3,1	3,0
Iopromide	0,96	2,9	2,2	2,1	2,6	4,4	6,6	4,4	13	2,7	0,65	0,84	2,1	5,2	4,4	2,5	2,1	0,10
Irbesartan	44	52	19	38	35	28	34	34	53	35	23	15	23	45	51	36	45	53
Levamisole	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Lincomycin	-	0,0088	0,0109	-	0,0097	-	-	0,0080	0,0130	0,0095	0,0084	0,0087	-	0,0087	-	-	0,0086	0,0090
Lorazepam	0,055	0,063	0,023	0,044	0,072	0,034	0,043	0,042	0,062	0,042	0,036	0,013	0,025	0,057	0,062	0,044	0,058	0,057
Losartan	5,4	6,3	2,7	4,6	4,4	3,4	4,0	4,4	7,2	3,9	3,3	1,9	3,2	6,2	6,4	5,0	6,5	7,1
Metoprolol	5,1	8,9	3,1	5,5	6,4	5,2	6,6	6,0	10,1	5,8	4,7	3,3	4,3	8,7	9,0	6,3	7,9	9,5
Nalidixic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	0,0026	0,0029	0,0027	0,0025	0,0032	0,0027	0,0023	0,0023	0,0025	0,0027	0,0025	0,0025	0,0023	0,0024	0,0024	0,0023	0,0023	0,0025
Phenazone	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Primidone	0,015	0,021	0,011	0,020	0,018	0,011	0,016	0,013	0,018	0,014	0,013	0,010	0,014	0,022	0,022	0,017	0,021	0,022
Salbutamol	0,0037	0,0043	0,0031	0,0036	0,0037	0,0034	0,0033	0,0037	0,0040	0,0034	0,0034	0,0028	0,0031	0,0036	0,0037	0,0034	0,0039	0,0039
Sulfadiazine	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Dada d'excreció (%) no trobada en bibliografia

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	I-001	I-002	I-004	I-005	I-007	I-008	I-010	I-011	I-013	I-014	I-016	I-017	I-019	I-020	I-022	I-023	I-025	I-026
Tramadol	1,1	1,9	0,68	1,2	1,4	1,1	1,5	1,3	2,2	1,3	1,0	0,72	0,94	1,9	2,0	1,4	1,7	2,1
Valsartan	21	27	8,8	22	18	14	18	19	33	20	12	8,4	11	26	31	18	26	29
Venlafaxine	2,5	4,5	1,5	2,3	3,5	2,5	3,4	3,3	4,7	2,8	2,3	1,4	2,1	4,5	4,5	3,1	3,8	4,3

*Dada d'excreció (%) no trobada en bibliografia

En la **Figura 6.1** es mostren els valors mitjans mensuals de consum poblacional (g/24 h/1.000 hab) obtinguts per als antibiòtics, i no s'hi ha trobat una tendència clara d'una possible variació estacional, encara que sí que s'observa un major consum estimat el mes de maig per als compostos més consumits.

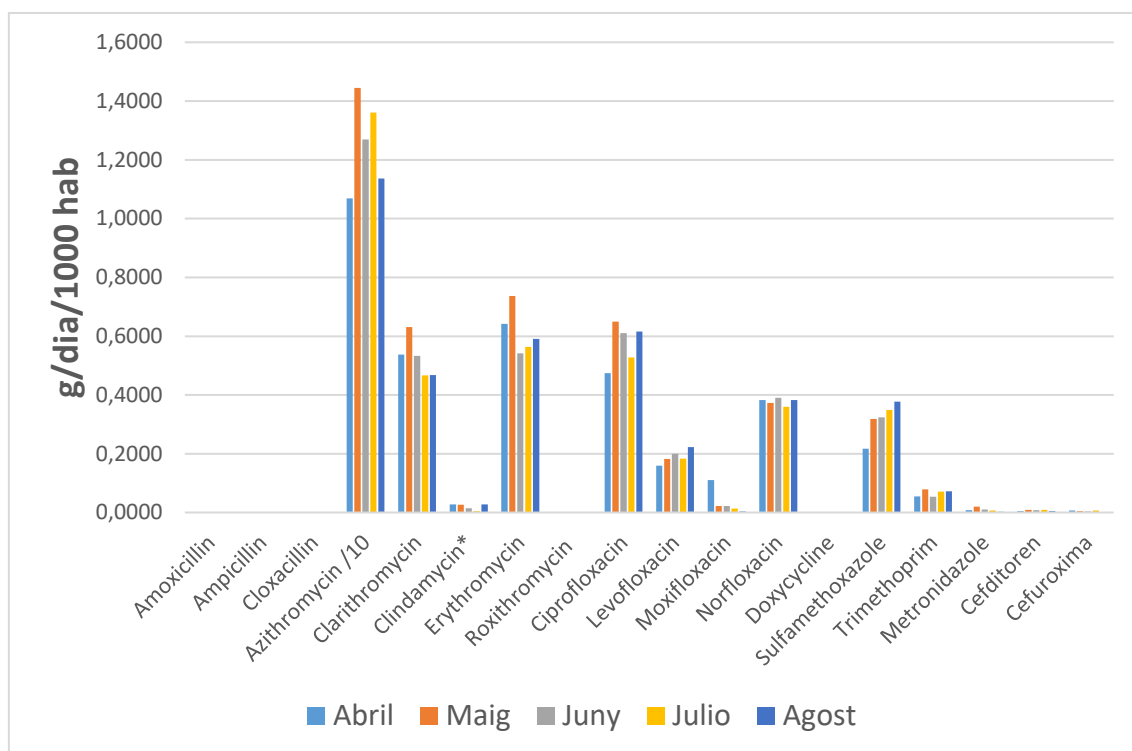


Figura 6.1. Variació mensual consum poblacional (g/24 h/1.000 hab) d'antibiòtics

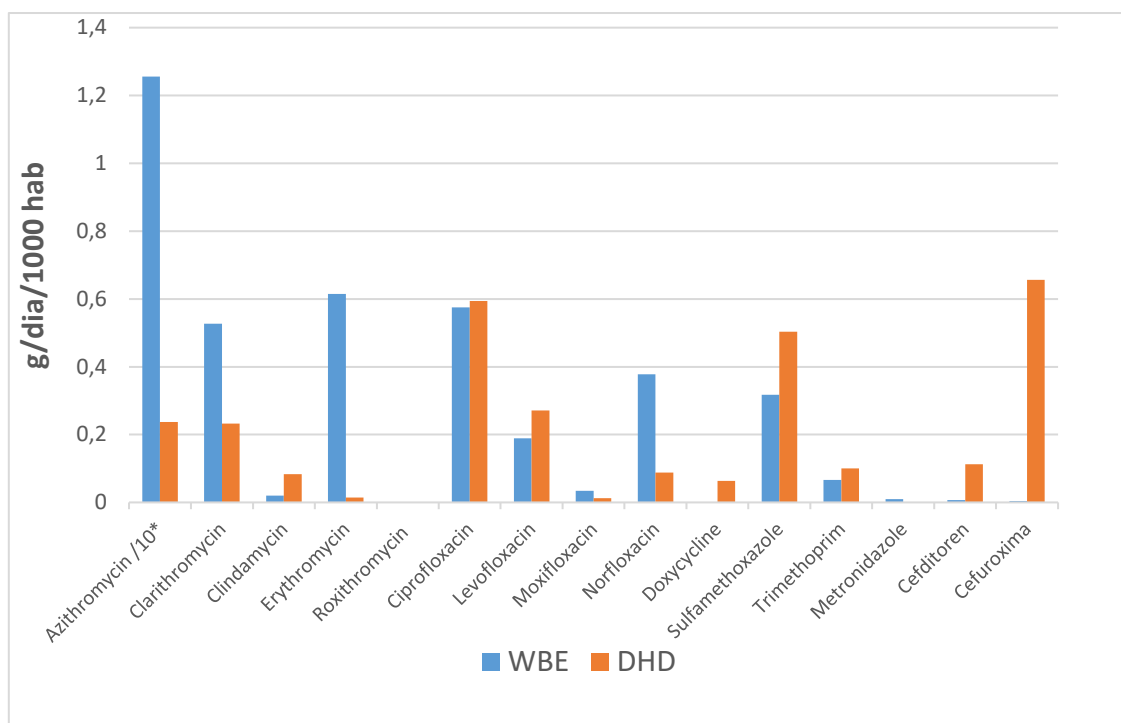
En el cas dels antibiòtics, es disposa de dades de dosis (DHD) per mil habitants prescrites en recepta oficial de la Seguretat Social i dispensades en oficines de farmàcia de Castelló. Encara que s'informa de les dades corresponents a antibiòtics consumits en centres hospitalaris o prescrits pel sistema de sanitat privat, s'ha realitzat, en una primera aproximació, una comparació de les dades de consum obtinguts utilitzant l'“Epidemiologia basada en aigües residuals” amb les dades d'antibiòtics prescrits. Per a això, s'han utilitzat les dades de dosi diària definida (DDD) per cada 1000 habitants, expressada en grams, per a cadascun dels antibiòtics, que es troben publicades en el web del Centre Col·laborador de l'OMS en Metodologia Estadística dels Medicaments (https://www.whocc.no/atc_ddd_index/). En la **Taula 6.5** es recullen els valors de DHD (dosis prescrites) i DDD per a cada antibiòtic (administració via oral), juntament amb el consum en g/24 h/1000 hab calculat a partir d'aquestes dades.

Taula 6.5. Valors de dosis per mil habitants (DHD), dosi diària definida (DDD, en g), i consum d'antibiòtics (g/dia) per 1.000 habitants estimat a partir d'aquests paràmetres.

	DHD	DDD (g)	g diaris per 1000 hab
Amoxicillin + clavulanic	2,8395	1,5	4,25925
Amoxicillin	1,6304	1,5	2,44560
Ampicillin	0,0026	2	0,00520
Cloxacillin	0,1047	2	0,20940
Azithromycin	0,7915	0,3	0,23745
Clarithromycin	0,4642	0,5	0,23210
Clindamycin	0,0695	1,2	0,08340
Erythromycin	0,0147	1	0,01470
Roxithromycin	0,0005	0,3	0,00015
Ciprofloxacin	0,5939	1	0,59390
Levofloxacin	0,5423	0,5	0,27115
Moxifloxacin	0,0319	0,4	0,01276
Norfloxacin	0,1095	0,8	0,08760
Doxycycline	0,6336	0,1	0,06336
Sulfamethoxazole	0,2518	2	0,50360
Trimethoprim	0,2518	0,4	0,10072
Metronidazole	*	2	*
Cefditoren	0,2810	0,4	0,11240
Cefuroxime	1,3125	0,5	0,65625

* dada no disponible

En la **Figura 6.2** es comparen les dades de consum obtinguts mitjançant “Epidemiologia basada en aigües residuals” (WBE) amb els valors de consum calculats a partir de les dosis prescrites (DHD).



*consum calculat a partir WBE dividit per 10

Figura 6.2. Comparació consum poblacional antibiòtics (g/dia/1000 hab) calculat a partir epidemiologia aigües residuals (WBE) i a partir dosis prescrites (DHD)

Amb la finalitat de realitzar la comparació estadística dels valors de consum derivats de les dades experimentals obtingudes (g/24h/1000 hab) i el calculat sobre la base de les dades de prescripció en el sistema públic, es va aplicar una prova t per a la comparació d'un valor amb una mitjana experimental. Els resultats obtinguts van mostrar que per a tots els antibiòtics els dos valors eren diferents a un nivell de confiança del 95%, excepte per al ciprofloxacin i moxifloxacin. Cal destacar la gran discrepància en les estimacions de consum realitzades per WBE i per DHD per a l'azitromicina. Aquest és juntament amb l'amoxicil·lina, esmentada anteriorment, el cas més cridaner de discrepàncies entre fonts convencionals d'informació i la més nova aproximació de WBE. Si bé el cas de l'amoxicil·lina es pot explicar per la falta d'estabilitat d'aquest antibiòtic en les aigües, patint una ràpida degradació que impedeix la seua anàlisi, el cas de l'azitromicina resulta més complex. Aquest antibiòtic s'excreta en orina, com a compost inalterat, en un 6% (administració oral) o 12% (via intravenosa), la qual cosa fa que el factor d'excreció aplicat per al càlcul del consum a partir de les dades de concentració en les aigües residuals siga molt alt ($\times 17$, o $\times 8.3$, segons la via d'administració). D'altra banda, s'ha reportat que la major part d'aquest antibiòtic s'excreta inalterat en la femta (Singlas, 1995). Per això, pot ocórrer que part del compost present en la femta passe a l'aigua residual, en una proporció desconeguda, per la qual cosa l'estimació del consum resulta molt complicada, amb

clara tendència a un càlcul per excés quan es realitza a partir de les seues concentracions en les aigües residuals.

Pot concloure's que, encara que WBE és una aproximació poderosa, que ha demostrat una gran fiabilitat i utilitat en l'àmbit de les drogues d'abús, alcohol o tabac, entre altres, encara presenta unes certes limitacions i aspectes complexos que han de ser investigats detalladament. L'estabilitat dels biomarcadors utilitzats, juntament amb les dades d'excreció d'aquests, són aspectes claus que, mentre no siguen prou clars, limiten la seua aplicació fins que es dispose de més informació. És la nostra intenció, aprofundir en aquests aspectes en futurs projectes relacionats amb aquest tema.

7. EFICÀCIA DE L'ELIMINACIÓ DE FÀRMACS EN L'EDAR DE CASTELLÓ

A partir de les dades de concentració de fàrmacs en les aigües d'entrada i eixida de l'EDAR és possible estimar l'eficiència d'eliminació de la planta per als compostos objecte de l'estudi. L'eficiència s'ha estimat comparant les càrregues totals diàries dels compostos en les aigües d'entrada i d'eixida (*Bijlsma et al. , 2021*), per a això és necessari usar la informació disponible sobre els cabals ($\text{m}^3/24 \text{ h}$) dels corrents corresponents (vegeu la **Taula 3.1**).

Les càrregues diàries de fàrmacs s'han calculat a partir de les concentracions trobades en les aigües, de la següent manera:

$$q = C \times F \times 1000$$

q: càrrega diària del fàrmac ($\text{g}/24 \text{ h}$) en la mostra de recàrrega o de l'efluent

C: concentració del fàrmac (g L^{-1}) en la mostra de recàrrega o de l'efluent

F: cabal ($\text{m}^3/24 \text{ h}$) d'entrada o d'eixida de l'EDAR

El percentatge d'eliminació s'ha calculat a partir de la següent expressió:

$$E \% () = \frac{q_I - q_{E,q}}{q_I} \times 100$$

E: percentatge d'eliminació (%)

qI: càrrega diària del fàrmac ($\text{g}/24 \text{ h}$) en la mostra de recàrrega del dia x

qE: càrrega diària del fàrmac ($\text{g}/24 \text{ h}$) en la mostra d'efluent del dia x+1

Les **Taules 7.1-7.4** mostren les càrregues diàries dels antibiòtics i altres fàrmacs, tant en les aigües d'entrada com d'eixida.

Taula 7.1. Càrregues diàries (g/24h) d'antibiòtics en les aigües d'entrada a l'EDAR

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	E-002	E-003	E-005	E-006	E-008	E-009	E-011	E-012	E-014	E-015	E-017	E-018	E-020	E-021	E-023	E-024	E-026	E-027
Amoxicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azithromycin	98	140	97	112	175	76	174	179	178	166	110	76	150	146	152	128	125	113
Clarithromycin	24	32	23	33	33	24	37	38	37	33	23	19	28	26	24	23	21	27
Clindamycin	0,21	0,75	0,49	-	0,49	-	0,49	0,37	0,69	0,30	-	-	0,20	-	0,25	-	0,54	0,40
Erythromycin	4,2	6,2	5,2	6,8	7,5	5,2	6,8	6,2	5,3	5,1	4,5	3,9	4,7	4,8	5,3	4,7	5,1	5,2
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	42	43	26	38	71	20	58	54	68	71	28	25	44	43	46	35	43	54
Levofloxacin	26	27	19	25	26	14	37	33	46	35	23	18	31	32	30	21	32	35
Moxifloxacin	9,0	3,9	1,5	0,92	1,0	0,28	0,91	0,85	1,0	1,3	0,40	0,27	0,63	0,67	0,29	0,49	-	0,23
Norfloxacin	26	24	13	18	25	9,3	22	21	27	31	13	11	16	18	22	16	18	22
Doxycycline	-	2,5	1,6	1,4	3,7	1,5	3,8	2,3	3,4	2,3	2,8	1,7	1,9	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	8,0	15	9,0	14	14	7,8	23	21	25	22	11	9,5	18	21	20	14	20	20
Trimethoprim	3,3	5,1	3,9	6,0	7,3	3,8	8,3	6,9	5,8	6,3	3,2	2,8	6,4	5,8	7,0	4,9	6,0	6,1
Metronidazole	-	0,19	0,70	0,28	1,1	1,4	0,06	0,30	0,53	0,36	0,30	0,18	0,16	-	0,25	0,19	-	0,21
Cefditoren	-	1,4	1,6	-	1,7	1,6	1,4	1,4	1,3	1,4	1,3	1,2	-	1,7	1,6	1,2	1,5	-
Cefuroxime	0,99	1,1	1,9	0,50	0,97	0,59	1,0	0,77	-	0,87	0,95	0,54	1,7	1,2	2,1	-	-	-

Taula 7.2. Càrregues diàries (g/24h) d'antibiòtics en les aigües d'eixida de l'EDAR

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	E-002	E-003	E-005	E-006	E-008	E-009	E-011	E-012	E-014	E-015	E-017	E-018	E-020	E-021	E-023	E-024	E-026	E-027
Amoxicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azithromycin	112	117	126	73	101	115	164	159	134	138	94	109	90	103	97	113	66	68
Clarithromycin	7,9	8,1	10,3	9,1	7,5	8,0	8,7	8,0	7,8	8,4	6,2	6,3	6,3	6,4	6,8	6,5	7,1	6,4
Clindamycin	1,7	1,4	1,7	1,0	2,1	2,5	2,0	2,2	3,5	2,4	1,2	1,4	1,9	2,0	1,4	1,8	1,0	1,2
Erythromycin	5,5	4,9	5,7	4,0	5,5	5,3	5,8	5,9	4,2	4,5	3,7	3,8	3,6	3,6	4,0	3,9	3,9	3,8
Roxithromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	15	10	12	5,7	16	16	22	20	21	25	20	19	19	19	15	19	12	17
Levofloxacin	16	12	14	5,8	17	17	23	24	26	27	26	24	26	24	18	22	16	20
Moxifloxacin	4,3	1,4	0,92	0,28	0,37	0,33	0,36	0,36	0,24	0,53	0,36	-	0,34	0,32	0,16	0,21	0,08	-
Norfloxacin	10	5,3	6,4	3,0	6,8	7,7	8,1	7,8	8,3	9,6	8,3	7,6	6,7	6,9	6,0	7,5	4,1	6,1
Doxycycline	1,0	-	-	-	0,38	-	0,39	-	0,38	1,3	0,44	0,44	0,37	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole	1,3	0,92	1,3	0,61	3,8	2,2	2,6	3,2	2,6	2,6	2,3	3,0	6,4	4,4	6,7	3,8	3,5	2,6
Trimethoprim	5,1	4,5	6,1	3,1	6,9	8,2	6,9	6,7	6,5	7,3	5,1	5,4	3,8	3,5	2,2	2,6	0,84	1,3
Metronidazole	6,6	6,2	8,1	3,6	8,4	8,5	6,1	6,9	7,5	8,3	5,2	6,4	4,1	4,4	4,5	4,5	2,6	3,3
Cefditoren	1,4	1,3	1,5	1,2	1,3	-	1,4	1,5	1,5	1,4	1,2	1,8	1,3	1,4	1,4	1,3	1,5	-
Cefuroxime	3,6	3,0	8,5	2,5	3,2	4,2	3,4	3,6	3,8	3,2	4,1	5,5	4,4	3,1	4,1	3,5	1,4	2,4

Taula 7.3. Càrregues diàries (g/24h) d'altres fàrmacs en les aigües d'entrada de l'EDAR

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	I-001	I-002	I-004	I-005	I-007	I-008	I-010	I-011	I-013	I-014	I-016	I-017	I-019	I-020	I-022	I-023	I-025	I-026
Acetaminophen	1300	2883	1234	2976	3658	2467	2342	2193	2702	1545	1048	819	1503	2885	4308	2410	2510	3147
Alprazolam	0,32	0,39	0,18	0,29	0,33	0,24	0,19	0,19	0,41	0,25	0,26	0,10	0,18	0,33	0,19	0,19	0,24	0,24
Atorvastatin	14	17	8,1	12	11	9,2	11	13	16	9,7	8,9	5,7	7,9	13	14	11	14	15
Carbamazepine	1,3	2,0	0,57	1,4	1,3	1,2	1,7	5,4	2,1	1,2	0,60	0,37	0,98	2,5	2,9	1,7	1,7	2,4
Diclofenac	49	46	19	37	36	29	30	38	51	33	25	15	19	39	48	34	39	46
Enalapril	10	14	5,3	13	12	8,8	11	11	21	12	8,0	5,0	6,4	16	19	10	19	21
Flumequine	0,50	0,44	0,36	0,27	0,28	0,27	-	0,26	0,26	0,27	0,24	0,24	-	0,23	-	0,24	-	0,22
Furaltadone	0,66	0,58	0,42	0,32	0,30	0,37	-	0,28	-	-	-	-	-	-	0,27	0,25	-	-
Gabapentin	417	605	205	441	517	399	449	429	701	429	330	212	290	577	615	460	611	601
Iopromide	187	571	423	411	498	868	1285	868	2559	532	127	164	405	1010	861	495	413	20
Irbesartan	35	42	15	30	28	22	27	27	43	28	18	12	19	36	41	29	36	43
Levamisole	0,39	0,93	0,60	1,0	0,60	1,0	-	-	0,28	0,28	0,06	0,06	0,06	0,19	0,28	0,06	0,19	0,28
Lincomycin	-	0,54	0,67	-	0,59	-	-	0,49	0,79	0,58	0,51	0,53	-	0,53	-	-	0,53	0,55
Lorazepam	2,9	3,3	1,2	2,4	3,8	1,8	2,3	2,2	3,3	2,2	1,9	0,68	1,3	3,0	3,3	2,4	3,1	3,0
Losartan	15	18	7,7	13	12	9,6	11	13	20	11	9,3	5,4	9,1	18	18	14	18	20
Metoprolol	52	89	31	55	64	52	67	60	102	58	48	33	43	88	91	63	79	96
Nalidixic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	0,37	0,42	0,38	0,36	0,46	0,38	0,33	0,33	0,35	0,39	0,36	0,35	0,32	0,34	0,34	0,34	0,33	0,35
Phenazone	13	13	12	12	12	12	12	12	13	12	12	12	13	13	13	13	14	14
Primidone	2,5	3,4	1,9	3,2	2,9	1,7	2,5	2,1	3,0	2,3	2,1	1,7	2,2	3,6	3,6	2,8	3,3	3,6
Salbutamol	0,52	0,60	0,44	0,50	0,52	0,48	0,46	0,53	0,56	0,48	0,48	0,40	0,44	0,51	0,52	0,48	0,55	0,55
Sulfadiazine	0,29	0,37	0,61	0,81	0,45	0,44	1,0	1,1	0,63	0,27	0,34	0,25	0,54	0,61	0,58	0,41	0,62	0,74
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	I-001	I-002	I-004	I-005	I-007	I-008	I-010	I-011	I-013	I-014	I-016	I-017	I-019	I-020	I-022	I-023	I-025	I-026
Tramadol	68	117	41	72	84	69	88	79	134	76	63	43	57	115	119	83	104	126
Valsartan	438	559	184	457	378	286	369	406	689	428	254	175	241	551	644	378	550	617
Venlafaxine	26	45	15	23	36	25	34	33	47	28	23	14	21	46	45	31	39	43

Taula 7.4. Càrregues diàries (g/24h) d'altres fàrmacs en les aigües d'eixida de l'EDAR

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	E-002	E-003	E-005	E-006	E-008	E-009	E-011	E-012	E-014	E-015	E-017	E-018	E-020	E-021	E-023	E-024	E-026	E-027
Acetaminophen	1,1	0,71	2,7	5,7	1,1	1,1	0,90	1,0	0,89	0,70	0,59	0,93	1,1	1,2	5,8	0,79	2,5	12
Alprazolam	0,42	0,55	0,42	0,13	0,36	0,61	0,33	0,38	0,32	0,39	0,32	0,45	0,50	0,34	0,30	0,36	0,29	0,31
Atorvastatin	2,8	1,9	1,3	2,9	0,88	0,88	1,7	1,5	0,56	0,95	0,82	0,62	0,82	0,75	0,62	0,56	0,62	0,62
Carbamazepine	2,3	3,0	2,2	1,0	1,9	2,0	4,0	6,5	2,2	2,3	1,6	2,3	3,5	2,1	2,2	2,4	1,9	2,1
Diclofenac	15	19	16	15	28	17	23	20	14	23	16	26	34	19	20	26	19	19
Enalapril	-	-	-	-	-	-	0,51	-	-	-	-	0,36	-	0,35	-	-	-	-
Flumequine	0,25	0,18	0,13	0,08	0,08	0,07	0,09	0,08	0,08	0,13	0,08	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,07
Furaltadone	0,32	0,28	0,20	-	0,16	-	0,14	0,15	-	-	-	-	0,11	0,13	0,13	0,13	0,13	-
Gabapentin	19	22	28	14	22	21	43	34	13	17	19	31	41	23	24	18	59	25
Iopromide	365	662	332	169	438	445	834	691	459	591	230	384	502	335	247	226	27	23
Irbesartan	28	38	29	14	31	27	25	28	20	36	21	34	37	21	19	30	22	21
Levamisole	1,4	2,2	1,9	0,88	1,2	1,3	0,97	1,2	0,84	1,3	0,76	0,97	1,1	0,67	0,59	0,76	1,4	1,5
Lincomycin	0,22	0,23	0,49	0,38	-	-	-	-	0,39	0,43	-	0,32	0,39	0,32	0,29	0,29	0,44	0,44
Lorazepam	3,1	4,5	3,3	1,3	2,9	3,0	2,8	2,9	2,3	3,1	2,4	3,5	3,8	2,2	2,1	2,6	2,0	2,3
Losartan	8,0	10	7,7	4,9	8,8	7,1	8,6	9,1	5,8	9,1	5,8	8,4	11	6,3	5,3	5,8	7,6	6,2
Metoprolol	58	77	61	30	60	64	61	68	53	72	51	73	91	58	51	56	48	51
Nalidixic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pantoprazole	0,26	0,33	0,30	0,23	0,42	0,33	0,29	0,31	0,39	0,40	0,30	0,38	0,47	0,29	0,29	0,38	0,23	0,25
Phenazone	15	19	16	14	16	21	21	22	28	39	24	34	33	26	14	25	21	25
Primidone	2,8	4,8	3,0	1,8	2,8	2,9	2,7	3,0	2,3	2,9	2,6	3,3	4,2	3,0	2,8	3,0	2,8	2,9
Salbutamol	0,64	0,70	0,55	0,25	0,49	0,54	0,52	0,57	0,50	0,58	0,50	0,61	0,66	0,48	0,46	0,52	0,43	0,47
Sulfadiazine	-	-	0,06	-	0,06	0,07	0,45	0,09	-	-	0,05	-	0,12	0,08	-	-	0,13	-
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Abril				Maig				Juny				Juliol				Agost	
	E-002	E-003	E-005	E-006	E-008	E-009	E-011	E-012	E-014	E-015	E-017	E-018	E-020	E-021	E-023	E-024	E-026	E-027
Tramadol	76	101	80	40	79	84	81	90	70	94	67	96	119	76	68	73	63	67
Valsartan	28	38	29	14	31	27	25	28	20	36	21	34	37	21	19	30	22	21
Venlafaxine	25	29	23	12	21	23	27	29	24	30	22	32	40	25	22	25	19	20

Les **Taules 7.5 i 7.6** mostren l'eficiència d'eliminació (%) estimada per a antibiòtics i els altres fàrmacs detectats, respectivament, calculada a partir de les dades de les càrregues diàries. Per a l'estimació de l'eficiència s'ha comparat les aigües de l'efluent del dia després amb les aigües de la recàrrega del dia anterior, assumint d'aquesta manera un temps de residència dels fàrmacs de 24 hores en la planta.

En el cas d'antibiòtics, s'observa que 9 dels 14 compostos que es van trobar en les aigües es van eliminar en major o menor mesura en l'EDAR, i en destaquen dos d'aquests (doxycycline i sulfamethoxazole), que semblen eliminar-se quasi de manera completa en l'EDAR, amb valors mitjans d'eficiència superiors al 80%, mentre que altres compostos, com ara clarithromycin, ciprofloxacina, moxifloxacina i norfloxacina, s'han eliminat per damunt del 60%. Tres dels antibiòtics estudiats (azithromycin, erythromycin i levofloxacin) es van eliminar en menor mesura, amb una eficiència mitjana inferior al 30%.

Dos antibiòtics (trimethoprim i cefditoren) van mostrar eficiència d'eliminació altament variable durant els cinc mesos d'estudi, encara que amb tendència a la no eliminació. Finalment, per a tres antibiòtics (clindamycin, metronidazole i cefuroxime) s'han obtingut eficiències negatives, en presentar nivells de concentració en l'aigua d'eixida superiors als de l'aigua d'entrada, fet que pot semblar sorprenent però que ha sigut reportat en la literatura científica (*Gros et al., 2010; Jelic et al., 2011; Botero-Coy et al., 2018; Bijlsma et al., 2021*). La baixa eficiència de la planta per a l'eliminació d'aquests compostos unida al possible alliberament de conjugats (generalment glucurònids i sulfats) durant el pas de l'aigua per la planta podrien ser possibles causes d'aquest augment de concentració.

Quant a altres famílies de fàrmacs, sis dels compostos detectats (acetaminophen, atorvastatin, enalapril, gabapentin, sulfadiazine i valsartan) es van eliminar quasi de manera completa amb valors d'eficiència mitjana entre 90-100%. Per a altres fàrmacs, com ara diclofenac, flumequine, furaltadone, lincomycin i losartan, l'eliminació ha sigut parcial amb valors entre 45-70%. També hi ha fàrmacs (iopromide, metoprolol, pantoprazol, tramadol i venlafaxine) per als quals l'eficiència d'eliminació va ser altament variable durant els cinc mesos d'estudi, encara que amb tendència a la no eliminació. Finalment, igual que ocorre amb els antibiòtics, s'han obtingut eficiències negatives per a huit dels fàrmacs trobats en les aigües residuals (alprazolam, carbamazepine, irbesartan, levamisole, lorazepam, phenazone, primidone i salbutamol).

Les **Figures 7.1 i 7.2** mostren gràficament les eficiències d'eliminació mensuals per als antibiòtics i els altres fàrmacs detectats en les aigües residuals de l'EDAR.

Taula 7.5. Eficiència d'eliminació (%) mensual i mitjana per als antibiòtics

	Abril	Maig	Juny	Juliol	Agost	Mitjana
Azithromycin	2	2	3	30	43	16
Clarithromycin	68	75	73	74	72	72
Clindamycin	-514	-538	-776	-825	-139	<0
Erythromycin	5	11	13	22	25	15
Ciprofloxacin	70	56	47	56	69	60
Levofloxacin	48	21	5	19	46	28
Moxifloxacin	56	41	62	51	100	62
Norfloxacin	68	67	51	62	75	65
Doxycycline	100	95	82	-	-	92
Sulfamethoxazole	90	80	81	70	84	81
Trimethoprim	-13	-22	-45	49	82	0*
Metronidazole	-1787	-3203	-2142	-2137	-1444	<0
Cefditoren	5	5	-17	11	1	0*
Cefuroxime	-296	-361	-511	-134	-200	<0

* S'ha considerat eficiència nul·la d'eliminació perquè les dades són altament variables, però amb tendència a la no eliminació

Taula 7.6. Eficiència d'eliminació (%) mensual i mitjana per als altres fàrmacs

	Abril	Maig	Juny	Juliol	Agost	Mitjana
--	--------------	-------------	-------------	---------------	--------------	----------------

Acetaminophen	100	100	100	100	100	100
Alprazolam	-39	-83	-101	-83	-26	<0
Atorvastatin	82	89	92	94	96	91
Carbamazepine	-94	-69	-199	-65	-1	<0
Diclofenac	51	34	47	45	54	46
Enalapril	100	99	98	99	100	99
Flumequine	61	72	64	70	70	67
Furaltadone	64	64	-	50	-	59
Gabapentin	94	93	93	94	93	93
Ioprimide	-8	29	-36	42	38	0*
Irbesartan	-2	-7	-41	-1	44	<0
Levamisole	-155	-63	-768	-769	-546	<0
Lincomycin	42	100	54	40	18	51
Lorazepam	-41	-23	-110	-35	29	<0
Losartan	38	27	42	65	64	47
Metoprolol	-13	-5	-26	30	43	0*
Pantoprazole	27	11	-1	-7	30	0*
Phenazone	-30	-65	-156	-93	-61	<0
Primidone	-17	-29	-29	-15	19	<0
Salbutamol	-4	-7	-17	-10	18	<0
Sulfadiazine	98	80	96	91	90	91
Tramadol	-13	-5	-26	30	43	0*
Valsartan	92	92	90	93	96	93
Venlafaxine	9	21	-19	7	51	0*

* S'ha considerat eficiència nul·la d'eliminació perquè les dades són altament variables, però amb tendència a la no eliminació

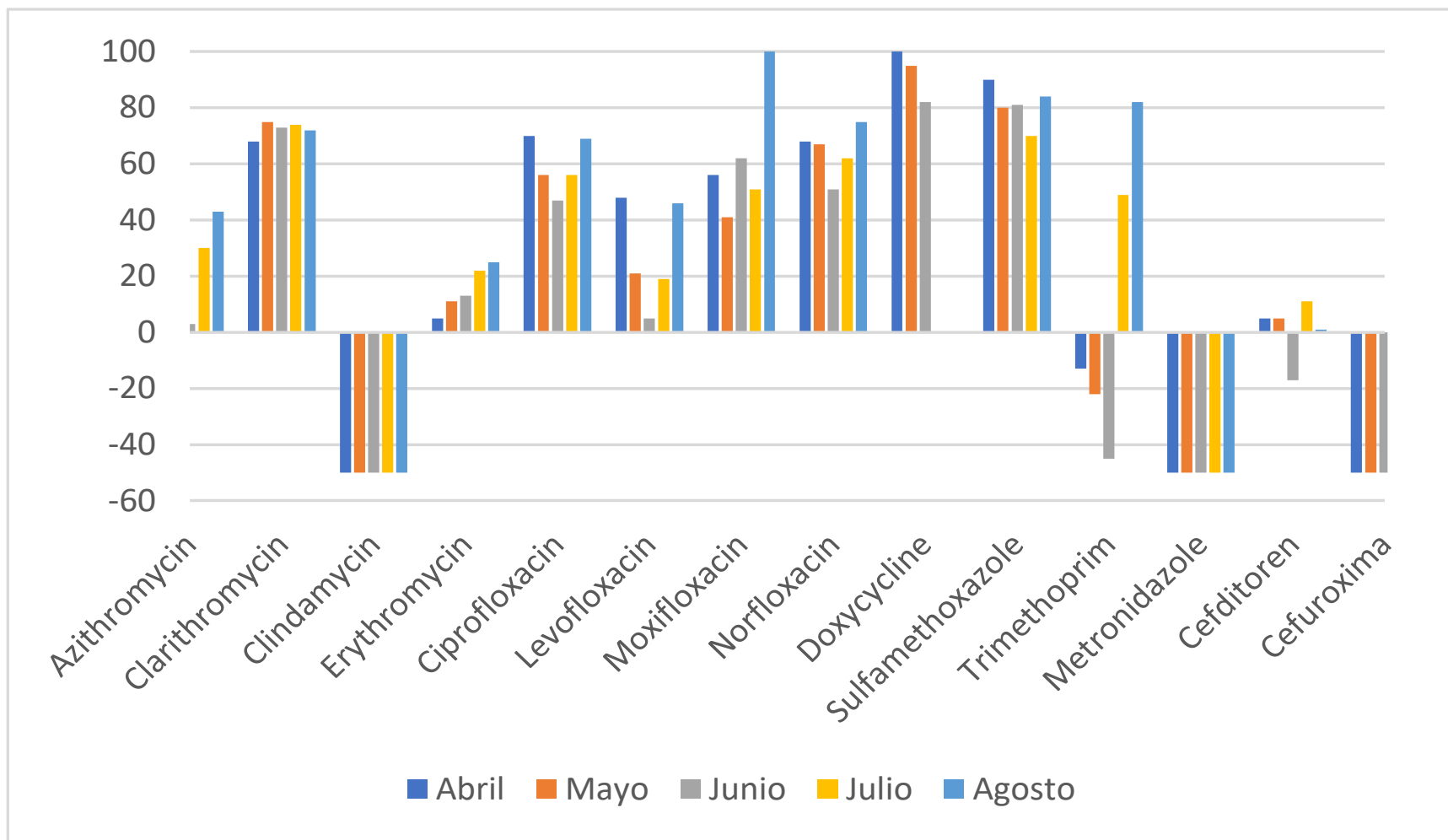


Figura 7.1. Eficiència d'eliminació mensual (%) dels antibiòtics detectats en les aigües residuals de l'EDAR

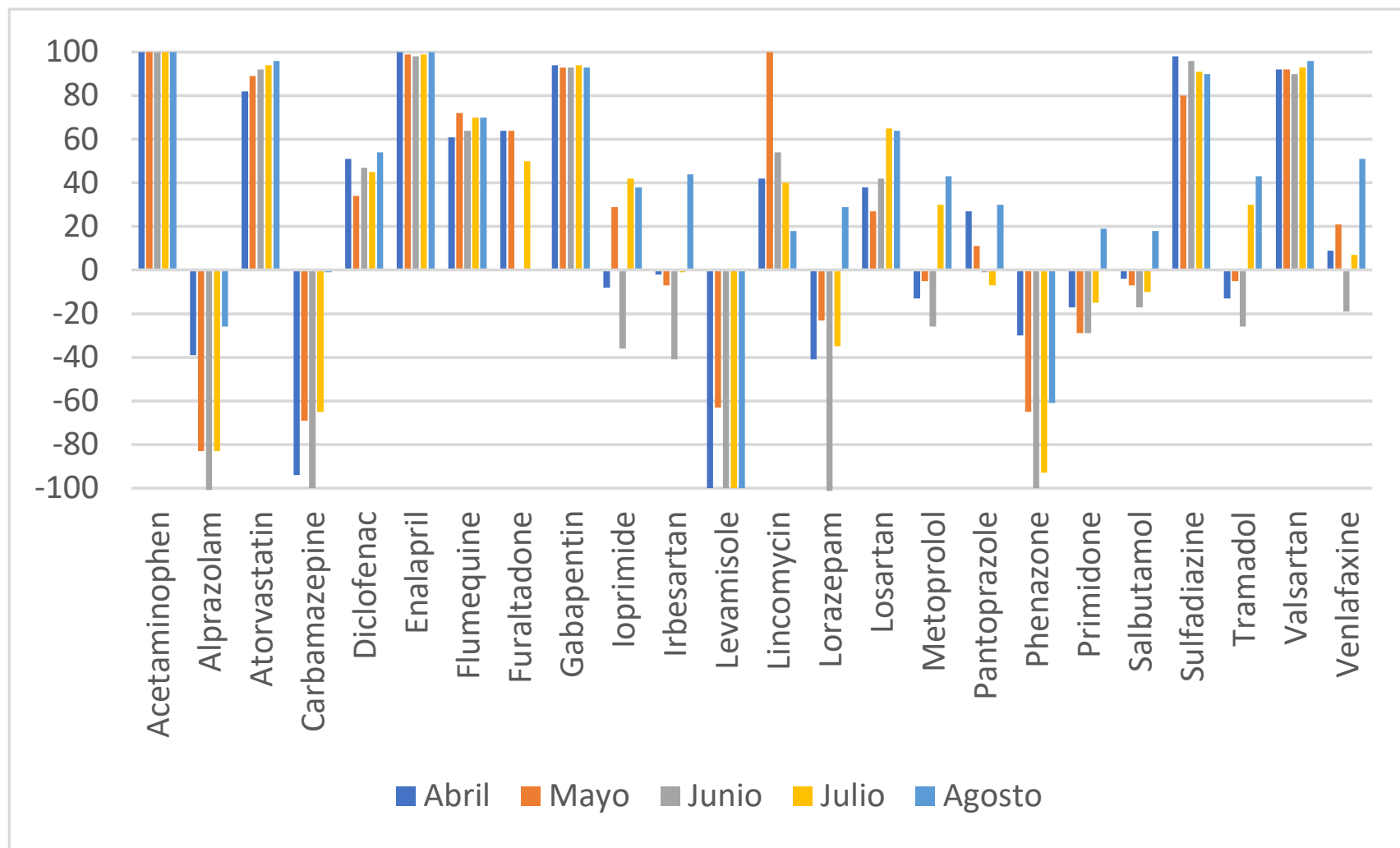


Figura 7.2. Eficiència d'eliminació mensual (%) dels altres fàrmacs detectats en les aigües residuals de l'EDAR

8. FASE PRELIMINAR DE L'ESTUDI DE RESISTÈNCIES A ANTIBIÒTICS

Les EDAR usen complexes comunitats microbianes per a l'eliminació de nutrients, però no hi ha suficient informació sobre com afecten aquests processos els antibiòtics i altres fàrmacs que puguin ser presents en les aigües residuals. Encara que estudis recents han abordat la problemàtica d'antibiòtics i de gens resistents a antibiòtics (ARGs), no són clar com varia l'eficiència d'eliminació per als diferents compostos estudiats. La tendència és abordar aquestes qüestions comparant l'abundància i distribució d'antibiòtics (ex. macròlids, fluoroquinolones, sulfamethoxazole o chloramphenicol) amb els corresponents ARGs.

Amb aquest Projecte s'inicia una nova línia d'investigació en el IUPA, que requereix d'estreta col·laboració amb especialistes en microbiologia, ja que aquesta no és l'especialitat del IUPA. Així, s'han establert els primers contactes amb la University of Bath, Department of Chemistry (Prof Dr. Barbara Kasprzyk-Hordern) and the Department of Biology and Biochemistry (Prof. Dr. Edward J Feil), i dins de la mateixa Universitat Jaume I, amb el Departament de Medicina (Dr. Rosa de Llanos Frutos), a fi d'estudiar i monitorar possibles resistències antimicrobianes (AMR). D'aquesta manera, s'ha identificat una sèrie de gens de resistència bacteriana (*ermB*, *qnrS*, *sul1* and *tst*) com a gens de gran interès. L'ARG *qnrS* confereix resistència a les fluoroquinolones a través de l'enllaç amb l'antibiòtic diana, DNA gyrase, prevenint l'accés a l'antibiòtic (target protection). L'ARG *ermB* confereix resistència a tots els antibiòtics de la família de macròlids a través de la metilació del ribosoma 23S (target protection). L'ARG *sul1* codifica un enzim DHPS mutant, de manera que les sulfonamides, inclòs sulfamethoxazole, ja no són capaces d'enllaçar-se (target change), la qual cosa confereix resistència a aquesta família d'antibiòtics. El gen *tst* confereix resistència al chloramphenicol mitjançant codificació de l'enzim acetyltransferase, la qual altera a aquest antibiòtic sent així incapaç d'enllaçar-se amb la seua diana, el ribosoma 16S.

Amb el present projecte s'han iniciat les primeres fases de l'estudi de resistències i s'ha elaborat una estratègia de col·laboració, que s'espera poder aplicar en pròximes edicions del Conveni entre la Conselleria d'Agricultura i l'UJI. Es tracta d'una línia de gran interès sobre una qüestió que genera molta preocupació, per la qual cosa és altament recomanable que els esforços realitzats en la present investigació servisquen per a avançar cap a una línia multidisciplinària de gran futur.

9. BIBLIOGRAFIA

- Bellver-Domingo, A., Maldonado-Devis, M., Hernández-Sancho, F., Carmona, E., Picó, Y., 2019. Identification of effective parameters for anti-inflammatory concentration in Valencia City's wastewater using fuzzy-set qualitative comparative analysis. *Sci Tot. Environ.* 663, 110-124
- Boix, C., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Parsons, J.R., Voogt, P. de, Hernández, F., 2016. Biotransformation of pharmaceuticals in surface water and during waste water treatment: Identification and occurrence of transformation products. *J. Hazard. Mater.* 302, 175–187
- Botero-Coy, A.M., Martínez-Pachón, D., Boix, C., Rincón, J., Castillo, N., Arias-Marín, L.P., Manrique-Losada, L., Torres-Palma, R.A., Moncayo-Lasso, A., Hernández, F., 2018. An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater. *Sci. Total Environ.* 642, 842-853
- Buelow, E., Rico, A., Gaschet, M., Lourenço, J., Kennedy, S.P., Wiest, L., Ploy, M.-C., Dagot, C., 2020. Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. *Water Res.* X 7, 100045
- Celma, A., Sancho, J. V., Schymanski, E.L., Fabregat-Safont, D., Ibáñez, M., Goshawk, J., Barknowitz, G., Hernández, F., Bijlsma, L., 2020. Improving Target and Suspect Screening High-Resolution Mass Spectrometry Workflows in Environmental Analysis by Ion Mobility Separation, *Environ. Sci. Technol.* 54, 15120–15131. doi:10.1021/acs.est.0c05713.
- European Commission 2020/1161, 2020. COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2020/1161 of 4 August 2020 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council, Off. J. Eur. Union
- FDA Approved Drug Products: Trimethoprim oral tablets, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/018679s044lbl.pdf (accessed September 28, 2021).
- FDA Approved Drug Products: Cleocin (clindamycin hydrochloride) oral capsules, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/050162s101lbl.pdf (accessed September 28, 2021).
- FDA Approved Drug Products: CIPRO (ciprofloxacin) oral tablets and suspension, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/019537s093,020780s049lbl.pdf (accessed September 28, 2021).
- FDA Approved Drug Products: CIPRO XR (ciprofloxacin) extended-release tablets, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/021473s043lbl.pdf (accessed September 28, 2021).
- Fonseca, E., Hernández, F., Ibáñez, M., Rico, A., Pitarch, E., Bijlsma, L., 2020. Occurrence and ecological risks of pharmaceuticals in a Mediterranean river in Eastern Spain. *Environ. Int.* 144, 106004
- Goldman, J.L., Leeder, J.S., Van Haandel, L., Pearce, R.E., 2015, In Vitro Hepatic Oxidative Biotransformation of Trimethoprim, *Drug Metab. Dispos.* 43, 1372–1380. doi:10.1124/dmd.115.065193.
- Gracia-Lor, E., Ibáñez, M., Zamora, T., Sancho, J. V., Hernández, F., 2014. Investigation of

pharmaceutical metabolites in environmental waters by LC-MS/MS. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 5496–5510

Hernández, F., Bakker, J., Bijlsma, L., de Boer, J., Botero-Coy, A.M., Bruinen de Bruin, Y., Fischer, S., Hollender, J., Kasprzyk-Hordern, B., Lamoree, M., López, F.J., ter Laak, T.L., van Leerdam, J.A., Sancho, J.V., Schymanski, E., de Voogt, P., Hogendoorn, E.A., 2019a. The role of analytical chemistry in exposure science: focus on the aquatic environment. *Chemosphere* 222, 564-583

Hernández, F., Calisto-Ulloa, N., Gómez-Fuentes, C., Gómez, M., Ferrer, J., González-Rocha, G., Bello-Toledo, H., Botero-Coy, A.M., Boix, C., Ibáñez, M., Montory, M., 2019b. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *J. Hazard. Mat.* 363,447-456

Ibáñez, M., Borova, V., Boix, C., Aalizadeh, R., Bade, R., Thomaidis, N.S., Hernández, F., 2017. UHPLC-QTOF MS screening of pharmaceuticals and their metabolites in treated wastewater samples from Athens. *J. Hazard. Mater.* 323, 26–35

Ibáñez, M., Bijlsma, L., Pitarch, E., López, F.J., Hernández, F., 2021. Occurrence of pharmaceutical metabolites and transformation products in the aquatic environment of the Mediterranean area. *Trends. Environ. Anal. Chem.* doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00118

LeBel, M., 1988, Ciprofloxacin: Chemistry, Mechanism of Action, Resistance, Antimicrobial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Trials, and Adverse Reactions, *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* 8, 3–30. doi:10.1002/j.1875-9114.1988.tb04058.x.

Posada, C. E., Ramírez, A., Porras, P., Oppong, B.A., Botero-Coy, A.M., Hernández, F., Anzola, J.M., Díaz, L., Dantas, G., Reyes, A., Zambrano, M.M., 2019. Bogotá River anthropogenic contamination alters microbial communities and promotes spread of antibiotic resistance genes. *Scientific Reports*, 9: 11764

Singlas, E., 1995. Clinical pharmacokinetics of azithromycin. *Pathol. Biol.* 43, 505-511

Sousa, J.C.G., Ribeiro, A.R., Barbosa, M.O., Pereira, F.R., 2018. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *J. Hazard. Mat.* 344, 146-162

ANNEX 1

Metodologia analítica per a antibiòtics

La determinació d'antibiòtics s'ha dut a terme mitjançant la injecció directa de les mostres d'aigua (prèviament diluïdes en funció de la complexitat de les mostres), sense tractament/pre-concentració previ, amb la qual cosa es minimitzen notablement els errors analítics associats a l'etapa de tractament de la mostra. Això és possible gràcies a l'excel·lent sensibilitat i selectivitat aconseguides amb la moderna instrumentació analítica utilitzada i a l'ús d'un bon nombre de patrons interns marcats (ILIS) per a la correcció de l'efecte matriu.

La metodologia aplicada en aquest estudi és la que es ve aplicant en els últims anys en el IUPA, i està contínuament sotmesa a avaluació a través de l'anàlisi de nombrosos controls de qualitat (QC) amb resultats satisfactoris.

Preparació de les mostres

Les mostres d'aigua es van centrifugar a 12000 rpm en el cas que presentaren terbolesa i es van preparar de la següent manera:

- Recàrrega: 200 µL de mostra, 760 µL d'aigua MilliQ i 40 µL de dissolució ILIS de 5 ng ml⁻¹ en aigua s'introdueixen en el vial d'injecció (dilució × 5 de la mostra)
- Efluent: 500 µL de mostra, 460 µL d'aigua MilliQ i 40 µL de dissolució ILIS de 5 ng ml⁻¹ en aigua s'introdueixen en el vial d'injecció (dilució × 2 de la mostra)

Determinació UHPLC-MS/MS

L'anàlisi de les mostres s'ha dut a terme en un sistema UPLC Waters Acquity (Waters, Milford, DT., USA) acoblat a un espectròmetre de masses amb analitzador de triple quadrupol (TQS, Waters Micromass, Manchester, UK) utilitzant la interfase electroesprai (ESI) en les següents condicions:

Columna: Atlantis T3 3 µm, 3.0 × 150 mm (Waters)

Fase mòbil:

- Dissolvent A: aigua 0.1% àcid fòrmic i 2 mm acetat amònic
- Dissolvent B: metanol 0.1% àcid fòrmic i 2 mm acetat amònic

Gradient fase mòbil:

temps (min)	% A	% B
0.00	90	10
6.00	1	99
8.00	1	99
8.10	90	10
10.00	90	10

Flux fase mòbil: 0.400 ml/min; Volum d'injecció: 100 µL

La **Taula A1** mostra les condicions MS/MS utilitzades per als 18 antibiòtics seleccionats. S'indica la manera de ionització (ESI), l'energia de con, les transicions seleccionades -quantificació (Q) i confirmació (q)-, i les respectives energies de col·lisió (EC). En la **Taula A2** s'inclouen les condicions de mesurament per als patrons interns marcats isotòpicament (ILIS) utilitzats.

Taula A1. Condiciones MS/MS corresponents a antibiòtics

Compost	ESI	Con (V)	Transició Q	EC (eV)	Transició q	EC (eV)
Amoxicillin	+	40	349.0 > 114.0	15	349.0 > 137.0	35
					349.0 > 165.0	20
					349.0 > 208.0	10
Ampicillin	+	20	350.0 > 106.0	20	350.0 > 160.0	10
					350.0 > 192.0	15
					350.0 > 114.0	25
Azithromycin	+	20	375.3 > 591.2	10	375.3 > 82.8	20
					375.3 > 116.0	30
					375.3 > 158.0	30
Cefditoren	+	20	507.0 > 241.0	20	507.0 > 197.1	25
					507.0 > 166.0	35
					507.0 > 210.0	15
Cefuroxime	+	20	364.0 > 179.0	10	364.0 > 211.0	15
					364.0 > 165.0	20
Ciprofloxacin	+	20	332.1 > 231.0	35	332.1 > 288.1	15
					332.1 > 245.1	25
					332.1 > 294.1	30
Clarithromycin	+	20	748.4 > 158.0	30	748.4 > 590.3	15
					748.4 > 82.9	40
					748.4 > 116.0	30
Clindamycin	+	20	425.2 > 126.0	30	425.2 > 377.1	20
					425.2 > 81.9	50
					425.2 > 69.8	50
Cloxacillin	+	20	436.0 > 277.0	15	436.0 > 160.0	15
					436.0 > 178.0	30
					436.0 > 114.0	30
Doxycycline	+	20	445.0 > 154.1	30	445.0 > 267.1	35
					445.0 > 201.0	40
					445.0 > 97.9	40
Erythromycin	+	20	734.3 > 158.1	30	734.3 > 576.2	20
					734.3 > 116.0	35
					734.3 > 82.8	50
Levofloxacin	+	20	362.1 > 261.1	25	362.1 > 318.0	20
					362.1 > 221.1	35
					362.1 > 205.1	40
Metronidazole	+	20	172.1 > 128.0	15	172.1 > 81.9	20
					172.1 > 80.9	40
Moxifloxacin	+	20	402.1 > 110.1	25	402.1 > 261.0	20
					402.1 > 96.0	45
					402.1 > 358.1	20
Norfloxacin	+	20	320.1 > 231.0	40	320.1 > 282.1	30
					320.1 > 276.1	15
					320.1 > 233.0	20
Roxithromycin	+	20	419.2 > 158.0	15	419.2 > 82.8	15
					419.2 > 679.2	10
					419.2 > 116.0	25
Sulfamethoxazole	+	20	254.0 > 156.0	15	254.0 > 91.9	25

Compost	ESI	Con (V)	Transició Q	EC (eV)	Transició q	EC (eV)
Trimethoprim	+	20	291.10 > 230.10	20	254.0 > 108.0	20
					254.0 > 64.8	35
					291.1 > 261.0	25
					291.1 > 123.1	25
					291.1 > 110.1	30

Taula A2. *Condiciones MS/MS corresponents als ILIS utilitzats per a antibiòtics*

Compost	ESI	Con (V)	Transició Q	EC (eV)
Amoxicillin- ¹³ C ₆	+	40	355.0 > 114.0	15
Ampicillin-d ₅	+	20	355.1 > 160.0	15
Azithromycin-d ₃	+	20	377.0 > 82.9	15
Ciprofloxacin-d ₈	+	20	340.2 > 235.0	40
Clarithromycin-d ₃	+	20	751.3 > 161.1	30
Clindamycin-d ₃	+	20	428.1 > 129.1	30
Cloxacillin- ¹³ C ₄	+	20	440.0 > 160.0	15
Doxycycline-d ₃	+	20	448.0 > 155.0	30
Erythromycin- ¹³ C-d ₃	+	20	738.3 > 162.1	25
Levofloxacin-d ₈	+	20	370.1 > 265.1	25
Moxifloxacin- ¹³ C-d ₃	+	20	406.2 > 110.1	25
Norfloxacin-d ₅	+	20	325.1 > 231.0	35
Roxithromycin-d ₇	+	20	422.2 > 158.0	15
Sulfamethoxazole-d ₄	+	20	258.0 > 160.1	15
Trimethoprim- ¹³ C ₃	+	20	294.1 > 231.1	20

Quantificació

La quantificació dels antiètics trobats en les aigües s'ha realitzat mitjançant el mètode del patró intern (per a aquells compostos dels quals es disposava d'ILIS) o del patró extern (quan no es va aplicar ILIS), amb corbes de calibrat preparades en aigua HPLC.

Les dissolucions patró per al calibratge s'han preparat mitjançant dilució de diferents mesclres patró de tots els antibiòtics estudiats. El rang de concentració nominal de les corbes de calibratge ha sigut ens 1 i 5000 ng L⁻¹. El valor límit de quantificació s'ha considerat el corresponent al punt del calibrat de menor concentració (*lowest calibration level*, LCL, tenint en compte la dilució de les aigües de recàrrega (LCLx5) i d'efluent (LCLx2).

Validació

El procediment analític per a la determinació d'antibiòtics s'ha validat en cinc aigües diferents de recàrrega i altres cinc d'efluent, i s'ha estudiat l'exactitud i precisió del mètode mitjançant assajos de recuperació a tres nivells de concentració (100, 500 i 5000 ng L⁻¹) (veure **Taula A3**).

Taula 1. Recuperacions (%) i RSD (entre parèntesis, %) (n=5) del mètode UPHLC-MS/MS per a la determinació d'antibiòtics en aigua residual d'entrada (recàrrega) i eixida (efluent)

Compost	Nivell de fortificació (ng L ⁻¹)	Recàrrega	Efluent
Amoxicillin	100	~*	103 (8)
	500	110 (8)	108 (6)
	5000	99 (4)	101 (3)
Ampicillin	100	105 (6)	86 (5)
	500	83 (5)	89 (5)
	5000	93 (2)	86 (5)
Azithromycin	100	a	a
	500	a	a
	5000	79 (3)	77 (17)
Cefditoren	100	110 (22)	113 (18)
	500	112 (2)	106 (17)
	5000	109 (16)	101 (8)
Cefuroxime	100	~*	149 (24)
	500	78 (24)	116 (4)
	5000	106 (13)	108 (9)
Ciprofloxacin	100	99 (42)	99 (10)
	500	95 (17)	86 (15)
	5000	91 (11)	74 (2)
Clarithromycin	100	106 (25)	74 (6)
	500	81 (7)	77 (30)
	5000	93 (3)	96 (11)
Clindamycin	100	95 (3)	88 (10)
	500	107 (12)	88 (7)
	5000	105 (6)	66 (6)
Cloxacillin	100	103 (5)	110 (6)
	500	96 (2)	101 (3)
	5000	103 (3)	104 (8)
Doxycycline	100	93 (32)	82 (8)
	500	98 (13)	99 (7)
	5000	b	b

Compost	Nivell de fortificació (ng L ⁻¹)	Recàrrega	Efluent
Erythromycin	100	103 (5)	88 (14)
	500	91 (11)	80 (8)
	5000	96 (2)	95 (4)
Levofloxacin	100	82 (24)	82 (24)
	500	96 (4)	104 (3)
	5000	101 (3)	101 (2)
Metronidazole	100	91 (19)	143 (14)
	500	112 (16)	104 (38)
	5000	95 (15)	104 (36)
Moxifloxacin	100	93 (18)	91 (6)
	500	94 (2)	95 (6)
	5000	98 (4)	100 (2)
Norfloxacin	100	83(35)	79 (8)
	500	94 (6)	97 (6)
	5000	98 (2)	100 (2)
Roxithromycin	100	143 (3)	103 (2)
	500	104 (9)	89 (3)
	5000	108 (3)	99 (3)
Sulfamethoxazole	100	119 (11)	103 (4)
	500	109 (16)	108 (7)
	5000	105 (16)	97 (7)
Trimethoprim	100	93 (7)	99 (4)
	500	96 (4)	95 (5)
	5000	b	b

a: Presència del compost a concentracions altes en el “blanc” utilitzat per a preparar el QC, la qual cosa impedeix obtenir un valor de recuperació satisfactori

b: Concentració fora de rang lineal

*, no detectat, per falta de sensibilitat

Els resultats obtinguts van ser en general satisfactoris, tant per a aigua de recàrrega com a efluent, amb recuperacions en l'interval 70-120%. Metronidazole i cefuroxime, compostos per als quals no es disposava del seu ILIS corresponent, van presentar algun valor de recuperació lleugerament superior al 140%. D'altra banda, azythromycin no es va poder validar als dos nivells de fortificació més baixos a causa de la presència d'aquest compost en concentració elevada en el blanc de mostra utilitzat per a la validació.

Metodologia analítica per a altres fàrmacs

La determinació de la resta de fàrmacs també s'ha dut a terme mitjançant la injecció directa de les mostres d'aigua, sense tractament/pre-concentració previ. La metodologia aplicada en aquest estudi és la que es ve aplicant en els últims anys en el IUPA per a la determinació de fàrmacs en aigües residuals, i està contínuament sotmesa a avaluació a través de l'anàlisi de nombrosos controls de qualitat (QC) amb resultats satisfactoris. Per consegüent, no s'ha dut a terme la validació d'aquesta metodologia.

Preparació de les mostres

Totes les mostres d'aigua es van centrifugar a 12000 rpm durant 15 minuts i es van preparar de la següent manera:

- Recàrrega: 200 µL de mostra, 750 µL d'aigua MilliQ i 50 µL de dissolució ILIS de 10 ng ml⁻¹ en metanol s'introdueixen en el vial d'injecció (dilució × 5 de la mostra)
- Efluent: 500 µL de mostra, 450 µL d'aigua MilliQ i 50 µL de dissolució ILIS de 10 ng ml⁻¹ en metanol s'introdueixen en el vial d'injecció (dilució × 2 de la mostra)

Determinació UHPLC-MS/MS

L'anàlisi de les mostres s'ha dut a terme en un sistema UPLC Waters Acquity (Waters, Milford, DT., USA) acoblat a un espectròmetre de masses amb analitzador de triple quadrupol (TQS, Waters Micromass, Manchester, UK) utilitzant la interfase electroesprai (ESI).

Columna: Cortecs C18 2.7 µm, 100 × 2.1 mm (Waters)

Fase mòbil:

- Dissolvent A: aigua 0.01% àcid fòrmic i 1 mM acetat amònic
- Dissolvent B: metanol 0.01% àcid fòrmic i 1 mM acetat amònic

Gradient fase mòbil:

temps (min)	% A	% B
0.00	95	5
9.00	5	95
9.10	1	99
10.00	1	99
10.10	95	5
12.00	95	5

Flux fase mòbil: 0.400 ml/min; Volum d'injecció:50 µL

La **Taula A4** mostra les condicions MS/MS utilitzades per als fàrmacs seleccionats. S'indica la manera de ionització (ESI), l'energia de con, les transicions seleccionades -quantificació (Q) i confirmació (q)-, i les respectives energies de col·lisió (EC). En la **Taula A5** s'inclouen les condicions de mesurament per als ILIS que s'han utilitzat.

Taula A4. *Condiciones MS/MS corresponents a altres fàrmacs*

Compost	ESI	Con (V)	Transició Q	EC (eV)	Transició q	EC (eV)
Acetaminophen	+	10	152.0 > 110.0	15	152.0 > 93.0 152.0 > 65.0	20 25
Alprazolam	+	10	309.0 > 281.0	25	309.0 > 274.0 309.0 > 205.0	25 25
Atorvastatin	+	10	559.0 > 440.0	20	559.0 > 466.0 559.0 > 292.0	15 25
Carbamazepine	+	10	237.0 > 194.0	20	237.0 > 179.0 237.0 > 192.0	25 10
Diclofenac	+	10	296.2 > 214.2	30	296.2 > 250.0 296.2 > 278.0	10 5
Enalapril	+	10	377.0 > 234.0	15	377.0 > 303.0 377.0 > 177.0	15 25
Flumequine	+	10	262.1 > 202.0	30	262.1 > 126.0 262.1 > 146.0 262.1 > 174.1	40 40 40
Furaltadone	+	10	325.0 > 100.0	20	325.0 > 281.0 325.0 > 252.0	10 15
Gabapentin	+	10	172.0 > 154.2	15	172.0 > 137.0 172.0 > 95.0	15 20
Iopromide	+	10	791.8 > 572.8	30	791.8 > 558.8 791.8 > 444.6	30 30
Irbesartan	+	10	429.0 > 207.0	25	429.0 > 195.0	20

Compost	ESI	Con (V)	Transició Q	EC (eV)	Transició q	EC (eV)
					429.0 > 180.0	25
Levamisole	+	10	205.0 > 178.0	20	205.0 > 91.0 205.0 > 123.0	25 25
Lincomycin	+	10	407.0 > 126.0	20	407.0 > 359.0 407.0 > 389.0	15 15
Lorazepam	+	10	321.0 > 275.0	20	321.0 > 303.0 321.0 > 229.0	15 25
Losartan	+	10	423.1 > 405.1	10	423.1 > 377.1 423.1 > 207.1	15 15
Metoprolol	+	10	268.2 > 116.0	15	268.2 > 74.0 268.2 > 191.0	20 15
Nalidixic acid	+	10	233.0 > 215.0	10	233.0 > 187.0 233.0 > 159.0	25 25
Oxolinic acid	+	10	262.0 > 244.0	15	262.0 > 216.0 262.0 > 283.0	25 25
Pantoprazole	+	10	384.0 > 200.0	10	384.0 > 138.0 384.0 > 153.0	25 15
Phenazone	+	10	189.3 > 104.1	20	189.3 > 58.1 189.3 > 131.1	20 20
Pirimidone	+	10	219.2 > 162.0	10	219.2 > 119.2 219.2 > 91.0	15 20
Salbutamol	+	10	240.0 > 148.0	15	240.0 > 222.1 240.0 > 166.1	10 10
Sulfadiazine	+	10	251.0 > 156.0	15	251.0 > 92.0 251.0 > 108.0	25 20
Tetracycline	+	10	445.0 > 410.0	15	445.0 > 154.0 445.0 > 427.0	25 10
Tramadol	+	10	264.0 > 246.0	10	264.0 > 58.0 264.0 > 121.0	10 25
Valsartan	+	10	436.0 > 207.0	25	436.0 > 235.0 436.0 > 291.0	15 15
Venfalaxine	+	10	278.0 > 58.0	15	278.0 > 260.0 278.0 > 121.0	15 25

Taula A5. Condiciones MS/MS corresponents als ILIS utilitzats per a altres fàrmacs

Compost	ESI	Con (V)	Transició Q	EC (eV)
Acetaminophen-d ₄	+	10	156.0 > 114.0	10
Atorvastatin-d ₅	+	10	564.0 > 445.0	20
Carbamazepine-epoxi-d ₁₀	+	30	263.2 > 190.0	30
Diclofenac-d ₄	+	10	300.1 > 219.2	20
Irbesartan-d ₆	+	10	435.1 > 213.3	25
Levamisole-d ₅	+	20	210.2 > 183.1	25
Tetracycline-d ₆	+	10	451.1 > 416.0	15
Valsartan-d ₈	+	10	444.0 > 207.0	25
Venfalaxine-d ₆	+	30	284.1 > 64.0	30

Quantificació

La quantificació d'aquests fàrmacs s'ha realitzat mitjançant el mètode del patró intern (per a aquells compostos dels quals es disposava de patró marcat isotòpicament (ILIS)) o del patró extern (quan no es va aplicar ILIS), amb corbes de calibratge preparades en aigua HPLC:metanol (90:10, v/v).

Les dissolucions patró de calibratge s'han preparat mitjançant dilució de diferents mesclures patró de tots els antibiòtics estudiats. El rang de concentració nominal de les corbes de calibratge ha sigut entre 1 i 5000 ng L⁻¹. Com a valor límit de quantificació s'ha considerat el corresponent al punt del calibratge de menor concentració (*lowest calibration level*, LCL, tenint en compte la dilució de les aigües de recàrrega (LCLx5) i d'efluent (LCLx2).