

“Investigación de antibióticos en aguas residuales de la provincia de Castellón: detección, eficiencia de eliminación en la EDAR, impacto ambiental y resistencia antimicrobiana”

**Proyecto de investigación aplicada a los recursos
hídricos en la Comunidad Valenciana
Ejercicio 2021**

**Financiado por la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural,
Emergencia Climática y Transición Ecológica.**

INFORME FINAL, NOVIEMBRE 2021

EQUIPO DE TRABAJO

Felix Hernandez Hernández

Catedrático de Química Analítica, Director Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA), Investigador responsable del proyecto

Elena Pitarch Arquimbau

Profesora Titular de Química Analítica, Co-investigadora responsable del proyecto

Francisco López Benet

Catedrático de Química Analítica

Lubertus Bijlsma

Investigador post-doctoral, IUPA

Ana María Botero-Coy

investigadora post-doctoral, IUPA

David Fabregat Safont

Investigador post-doctoral, IUPA

Marina Celia Campos Mañas

Investigadora post-doctoral Juan de la Cierva formación, IUPA

Alberto Celma Tirado

Investigador pre-doctoral, IUPA

Contratadas con cargo al convenio

Claudia Simarro Gimeno

Elisa Gracia Marín

INDICE

- 1. Objetivos y justificación**
- 2. Uso de antibióticos en la provincia de Castelló. Selección de los compuestos objeto de estudio**
- 3. Toma de muestras**
- 4. Análisis cuantitativo. Metodología y resultados obtenidos**
- 5. Screening de metabolitos**
- 6. Estimación del consumo de fármacos mediante epidemiología basada en el análisis de aguas residuales**
- 7. Eficacia de la eliminación de fármacos en la EDAR de Castelló**
- 8. Fase preliminar del estudio de resistencias a antibióticos**
- 9. Bibliografía**

Anexo 1.- Metodología analítica para antibióticos y otros fármacos

1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre la presencia de productos farmacéuticos en el medio acuático ha ido ganando interés debido a su amplio y creciente uso, así como a su frecuente detección en el ciclo del agua (*Bellver-Domingo et al., 2019*). Aunque los fármacos pueden llegar al medio acuático a través de diferentes vías, la baja eficacia de eliminación de la mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) convencionales es una de las razones principales de su presencia en las aguas superficiales receptoras a través de los efluentes tratados (*Botero-Coy et al., 2018*). Varios trabajos han destacado la necesidad de mejorar el tratamiento aplicado en las EDAR, empleando procesos de tratamiento terciario adicionales (*Sousa et al., 2018*).

La mayoría de las investigaciones sobre la presencia de fármacos en el medio acuático se centran en los compuestos inalterados, que, sin embargo, suelen representar una pequeña parte de la cantidad total de los compuestos excretados en la orina y heces (*Hernández et al., 2019a*). En los últimos años, el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) de la Universitat Jaume I ha publicado varios trabajos relacionados con la presencia de metabolitos de fármacos en aguas superficiales y residuales (*Boix et al., 2016; Gracia-Lor et al., 2014; Ibáñez et al., 2017; Fonseca et al., 2020*). Su determinación es de gran relevancia, pues suelen encontrarse un gran número de compuestos, incluso en concentraciones superiores a las del fármaco de partida. Por ello, deberían incluirse gradualmente en los métodos analíticos, pues además pueden ser tan persistentes y/o activos como el compuesto original y pueden tener efectos negativos en diferentes organismos acuáticos. Recientemente, el IUPA ha publicado una revisión muy completa sobre la presencia de metabolitos de fármacos en el medioambiente acuático en la zona del Mediterráneo español (*Ibáñez et al., 2021*).

La presencia de **antibióticos** en el medio ambiente es de especial preocupación ya que puede conducir al desarrollo de resistencias bacterianas, hecho que ya se ha observado incluso en áreas aisladas, como la Antártida (*Hernández et al., 2019b*), y que puede representar un grave problema en la lucha contra algunas enfermedades (*Posada et al., 2019*). La resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo. La Organización mundial de la salud (OMS) lleva años promoviendo un plan global de actuación para afrontar la creciente aparición de bacterias resistentes a los antibióticos actuales. Este plan de vigilancia y control no sólo se debería aplicar para regular la utilización clínica de antibióticos en humanos y animales, sino cualquier otro aspecto medioambiental donde pueden aparecer bacterias resistentes y que podrían ser cruciales para entender el impacto de las resistencias bacterianas en la salud. Investigaciones recientes muestran que las

EDAR urbanas constituyen puntos críticos para las emisiones de antibióticos, lo que contribuye al enriquecimiento de genes de resistencia en ecosistemas de aguas superficiales (Buelow *et al.*, 2020).

La Comisión Europea ha incluido cuatro antibióticos (amoxicilina, ciprofloxacina, sulfametoxazol y trimetoprima) en la Lista de Observación (Watch List) (European Commission 2020/1161) de sustancias a las que se debe dar seguimiento como parte de las políticas públicas en el tema del agua. El objetivo es recopilar datos de los Estados miembros sobre sus niveles de concentración en las aguas y decidir, en una etapa posterior, si pueden considerarse sustancias prioritarias en el control periódico de la calidad del agua. En el caso de las aguas residuales, sería necesario realizar campañas periódicas de seguimiento de los niveles de concentración en el efluente urbano para obtener información sobre el funcionamiento real de la EDAR y evaluar el impacto potencial del agua tratada en el medio acuático.

La problemática abordada en el presente trabajo es compleja y responde a la preocupación creciente de la sociedad actual por el elevado consumo de antibióticos y su presencia habitual en las aguas. Su identificación y cuantificación precisa se ha convertido en un desafío para la química analítica moderna. En este sentido, el IUPA tiene capacidad demostrada, a través de sus investigaciones, publicaciones y proyectos, para abordar esta problemática, tanto en su vertiente puramente analítica, basada en el uso de acoplamientos cromatografía/espectrometría de masas, como en los aspectos medioambientales. En los últimos años, los co-investigadores responsables del presente estudio han dirigido proyectos de investigación en los que se ha abordado esta problemática “Estrategias analíticas para el control de contaminantes emergentes y evaluación de la eficiencia de eliminación en procesos avanzados de oxidación en aguas residuales” (Dr. Félix Hernández, 2019-2021, MINECO, RTI2018-097417-B-I00) y “Estrategias analíticas avanzadas para el control y evaluación de contaminantes emergentes en aguas de riego” (Dra. Elena Pitarch, 2019-2020, UJI-B2018-55). Además, el IUPA ha participado en un proyecto internacional COLCIENCIAS “Remoción de antibióticos y bacterias resistentes en aguas residuales hospitalarias empleando tecnologías avanzadas de oxidación” (2019-2021) en colaboración con la Universidad de Antioquía (Medellín, Colombia).

El objetivo principal de este proyecto ha sido **investigar la presencia de antibióticos seleccionados en las aguas residuales** de la EDAR de Castellón de la Plana, para lo cual se han seleccionado alrededor de 20 compuestos ampliamente usados Castellón. Para este fin, ha sido necesario desarrollar metodología analítica de vanguardia capaz de determinar con fiabilidad niveles de concentración extremadamente bajos en las aguas. Por ello, uno de los objetivos del

trabajo ha sido el **desarrollo y validación de métodos avanzados para la determinación cuantitativa de antibióticos en aguas residuales**, que puedan ser aplicados en este proyecto y en futuros estudios relacionados con este tema. Los métodos desarrollados están basados en acoplamientos cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) con equipos de triple cuadrupolo. Adicionalmente, con el fin de ampliar la información sobre la presencia de estos compuestos, se han aplicado **métodos de cribado basados en el uso de LC-HRMS para identificar posibles metabolitos de antibióticos** que también pudieran estar presentes en las aguas.

Con los análisis realizados en las aguas de entrada y salida de la EDAR, se ha podido estudiar la **eficiencia de eliminación de la planta para los antibióticos estudiados**, así como realizar una **estimación del consumo** a través de los datos de concentración y cargas diarias obtenidas en el influente urbano (agua de entrada, sin tratar), y finalmente realizar una evaluación del **impacto ambiental de las aguas de salida**, ya tratadas.

El estudio realizado es muy complejo y requiere la aplicación de métodos analíticos sofisticados, con el fin de ampliar los trabajos a más antibióticos y metabolitos, además de realizar diversos estudios de resistencias y evaluaciones del riesgo medioambiental y toxicológico. Se trata, en suma, de un proyecto global que debe realizarse a lo largo de varios años para poder alcanzar conclusiones suficientemente soportadas y concluyentes. Es, por ello, una línea de investigación que involucra a varios investigadores de distintas disciplinas y centros de investigación. En este primer año, se han sentado las bases iniciales de trabajo y se ha obtenido una buena imagen de la situación de las aguas residuales de Castellón con información relativa a los antibióticos más usados. Los datos encontrados en las aguas residuales deberán correlacionarse en el futuro con estudios de **resistencias antimicrobianas**, que deberán realizarse en colaboración con otros centros. El objetivo final, a largo plazo, es implementar sistemas de vigilancia capaces de determinar la prevalencia de la resistencia de la población, puesto que existe una correlación entre las bacterias circulantes en la población y las que llegan a las EDAR. De este modo, se pretende **sentar las bases para futuros estudios de resistencia antimicrobiana en aguas residuales y en el medio ambiente**.

Los resultados más relevantes obtenidos en el marco de este trabajo se enviarán para su publicación en revistas especializadas y se presentarán en congreso y reuniones científicas, en el marco de la **difusión pública** que debe tener toda investigación.

Para la realización del estudio se ha contado con la colaboración inestimable de FACSA, empresa operadora de la EDAR de Castellón, que ha suministrado las muestras de agua residual y ha facilitado los datos necesarios para los cálculos de cargas diarias de fármacos en las aguas.

2. USO DE ANTIBIÓTICOS EN LA PROVINCIA DE CASTELLÓ. SELECCIÓN DE LOS COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO

En la fase inicial del presente proyecto, se contactó con el Departament de Salut de Castelló y con el Hospital Nisa Rey Don Jaime de Castelló, con el objeto de recopilar información sobre el consumo de antibióticos y resistencias observadas, y poder posteriormente correlacionarla con la obtenida en el análisis de las aguas residuales. Finalmente, se obtuvieron los datos de consumo de antibióticos a través del Servicio de Farmacia de Área de Salud del Departament de Salut de Castelló. La información obtenida correspondió a **(Tabla 2.1)**:

- Período: año 2000
- Número de dosis diarias prescritas (DHD) por mil habitantes y día de los principios activos pertenecientes al subgrupo J01 ANTIBIÓTICOS SISTÉMICOS, prescritos en receta oficial de la Seguridad Social y dispensados en oficinas de farmacia
- Ámbito: recetas prescritas a pacientes asignados a las Zonas Básicas de Salud pertenecientes a la ciudad de Castellón

Tabla 2.1. Consumo de principios activos del subgrupo J01 antibióticos sistémicos durante 2020 (información facilitada por el Departament de Salut de Castelló)

Grupo ATC Nivel 3	Principio Activo	DHD
J01C - ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS, PENICILINAS	200029A - AMOXICILINA + CLAVULANICO ACIDO	2,8395
J01C - ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS, PENICILINAS	108A - AMOXICILINA	1,6304
J01D - OTROS ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS	828A - CEFUROXIMA	1,3125
J01F - MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS (ANTIINFECC. SISTEMICOS)	7019A - AZITROMICINA	0,7915
J01A - TETRACICLINAS (ANTIINFECCIOSOS USO SISTEMICO)	1395A - DOXICICLINA	0,6336
J01M - ANTIBACTERIANOS DERIVADOS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	2049A - CIPROFLOXACINO	0,5939
J01M - ANTIBACTERIANOS DERIVADOS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	2791A - LEVOFLOXACINO	0,5423
J01F - MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS (ANTIINFECC. SISTEMICOS)	967A - CLARITROMICINA	0,4642
J01X - OTROS ANTIBACTERIANOS (ANTIINFECCIOSOS SISTEMICOS)	1599A - FOSFOMICINA	0,3086
J01D - OTROS ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS	7358A - CEFDITORENO	0,2810

J01E - SULFONAMIDAS Y TRIMETOPRIM (ANTIINFECC.SISTEMICOS)	200127A - COTRIMOXAZOL (SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIM)	0,2518
J01D - OTROS ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS	2400A - CEFIXIMA	0,1224
J01M - ANTIBACTERIANOS DERIVADOS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	209A - NORFLOXACINO	0,1095
J01C - ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS, PENICILINAS	89A - CLOXACILINA	0,1047
J01C - ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS, PENICILINAS	105A - FENOXIMETILPENICILINA	0,0786
J01F - MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS (ANTIINFECC. SISTEMICOS)	616A - CLINDAMICINA	0,0695
J01M - ANTIBACTERIANOS DERIVADOS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	1119A - MOXIFLOXACINO	0,0319
J01X - OTROS ANTIBACTERIANOS (ANTIINFECCIOSOS SISTEMICOS)	86A - NITROFURANTOINA	0,0288
J01A - TETRACICLINAS (ANTIINFECCIOSOS USO SISTEMICO)	1971A - MINOCICLINA	0,0245
J01F - MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS (ANTIINFECC. SISTEMICOS)	1419A - ERITROMICINA	0,0147
J01F - MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS (ANTIINFECC. SISTEMICOS)	1804A - JOSAMICINA	0,0051
J01F - MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS (ANTIINFECC. SISTEMICOS)	1434A - ESPIRAMICINA	0,0047
J01D - OTROS ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS	825A - CEFADROXILO	0,0036
J01X - OTROS ANTIBACTERIANOS (ANTIINFECCIOSOS SISTEMICOS)	1619A - FUSIDICO ACIDO	0,0031
J01D - OTROS ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS	192A - CEFALEXINA	0,0027
J01C - ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS, PENICILINAS	1006A - AMPICILINA	0,0026
J01D - OTROS ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS	3276A - CEFACLOR	0,0022
J01F - MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS (ANTIINFECC. SISTEMICOS)	2188A - MIDECAMICINA	0,0020
J01G - ANTIBACTERIANOS AMINOGLUCOSIDOS (ANTIINFEC.SISTEM)	372A - AMIKACINA	0,0015
J01M - ANTIBACTERIANOS DERIVADOS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	2223A - OFLOXACINO	0,0012
J01G - ANTIBACTERIANOS AMINOGLUCOSIDOS (ANTIINFEC.SISTEM)	1642A - GENTAMICINA	0,0011
J01G - ANTIBACTERIANOS AMINOGLUCOSIDOS (ANTIINFEC.SISTEM)	3141A - TOBRAMICINA	0,0008
J01C - ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS, PENICILINAS	106A - BENCILPENICILINA	0,0008
J01F - MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS (ANTIINFECC. SISTEMICOS)	2225A - ROXITROMICINA	0,0005
J01D - OTROS ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS	501A - CEFTRIAXONA	0,0005

J01D - OTROS ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS	3840A - CEFOTAXIMA	0,0002
J01M - ANTIBACTERIANOS DERIVADOS DE LA QUINOLONA (SISTEM)	3761A - PIPEMIDICO ACIDO	0,0002
J01X - OTROS ANTIBACTERIANOS (ANTIINFECCIOSOS SISTEMICOS)	3197A - VANCOMICINA	0,0001
J01D - OTROS ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS	189A - CEFTAZIDIMA	0,0001
J01C - ANTIBACTERIANOS BETALACTAMICOS, PENICILINAS	200056A - BENCILPENICILINA (SODICA - PROCAINA - BENZATINA)	0,0000

Paralelamente, se contactó con una oficina de farmacia ubicada en el centro de la ciudad de Castelló para recopilar información referente a la venta de antibióticos en la ciudad de Castelló (ver **Tabla 2.2**).

Tabla 2.2. Venta anual (2020) de antibióticos dispensados por oficina de farmacia de Castelló

Compuesto	Unidades anuales	Porcentaje	Tipo de antibiótico
Amoxicillin	700	37%	Penicilinas
Azithromycin	350	19%	Macrólidos
Phosphomycin	230	12%	Otros antibacterianos
Clarithromycin	100	5%	Macrólidos
Ciprofloxacin	100	5%	Quinolonas (fluoroquinolonas)
Metronidazole	100	5%	Otros antibacterianos (derivados imidazólicos)
Cefuroxime	94	5%	Cefalosposrinas de segunda generación
Norfloxacin	94	5%	Quinolonas (fluoroquinolonas)
Levofloxacin	80	4%	Quinolonas (fluoroquinolonas)
Moxifloxacin	25	1%	Quinolonas (fluoroquinolonas)

Sobre la base de los dos listados anteriores, y teniendo en cuenta las posibilidades analíticas, la bibliografía previa y la experiencia del grupo de investigación sobre determinación de fármacos en aguas residuales, se seleccionó un listado de 19 antibióticos de diferentes familias (ver **Tabla 2.3**). Cabe destacar, que cuatro de ellos (amoxicillin, ciprofloxacin, sulfamethoxazole y trimethoprim) aparecen en la lista de observación (*Watch List*) de la UE (Decisión de ejecución 2020/1161 de la comisión de 4 de agosto de 2020), la cual incluye un total de 15 contaminantes cuyos niveles de concentración deben ser controlados en aguas superficiales por los distintos Estados Miembros.

Tabla 2.3. Listado de antibióticos seleccionados para llevar a cabo el estudio

Clasificación		Antibióticos
Beta-lactams	<i>Penicillin</i>	Amoxicillin* Ampicillin Cloxacillin
	<i>Cephalosporin</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

* Antibióticos incluidos en la lista de observación (*Watch List 2020/1161*)

Por otra parte, para completar el presente estudio y aportar información de interés sobre la presencia de medicamentos de diversas familias en las aguas residuales, se seleccionaron alrededor de 40 fármacos sobre la base de nuestra experiencia en análisis de aguas residuales de diferentes poblaciones y países. La **Tabla 2.4** muestra los fármacos adicionales seleccionados y su grupo terapéutico correspondiente. Como puede observarse, en esta lista se han incluido también siete antibióticos, que no aparecen en la **Tabla 2.3**, por lo que los análisis aportarán información complementaria no sólo sobre otros fármacos sino también sobre siete antibióticos más, no incluidos en el método para antibióticos desarrollado en el presente proyecto

Tabla 2.4. Listado de otros fármacos estudiados en el proyecto

Clasificación	Compuestos
<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. TOMA DE MUESTRAS

El presente estudio se ha focalizado en la EDAR de Castellón. Se han llevado a cabo dos muestreos de agua residual de una semana, dos veces al mes, desde Abril hasta Julio de 2021, y de una sola semana en Agosto de 2021. En total, se tomaron 36 muestras compuestas de 24 h, que correspondieron a 18 muestras de agua de entrada (influyente) y otras 18 de agua de salida (efluente). El muestreo fue realizado por personal de la planta y congeladas inmediatamente en la misma planta, a temperatura inferior a -18 °C. Posteriormente, las muestras fueron recogidas mensualmente por personal del IUPA y recepcionadas en el laboratorio en buen estado. En el caso de no poder realizar los análisis inmediatamente, se guardaron en las instalaciones del IUPA en congelador a temperatura inferior a -18 °C hasta el momento de los análisis.

En la **Tabla 3.1** se indican las diferentes muestras analizadas, las fechas de muestreo y sus códigos de identificación, así como el caudal de entrada y de salida del día del muestreo.

Tabla 3.1. Muestreos de agua residual de entrada y de salida de la EDAR de Castelló (Abril-Agosto 2021)

	Muestras de entrada a la EDAR				Muestras de salida de la EDAR			
	Fecha	Día	Código muestra	Caudal de entrada (m ³ /d)	Fecha	Día	Código muestra	Caudal de salida (m ³ /d)
Abril	06/04/2021	Martes	I-001	33396	07/04/2021	Miércoles	E-002	39336
	07/04/2021	Miércoles	I-002	39336	08/04/2021	Jueves	E-003	37738
	20/04/2021	Martes	I-004	38577	21/04/2021	Miércoles	E-005	46301
	21/04/2021	Miércoles	I-005	46301	22/04/2021	Jueves	E-006	40640
Mayo	04/05/2021	Martes	I-007	38248	05/05/2021	Miércoles	E-008	38254
	05/05/2021	Miércoles	I-008	38254	06/05/2021	Jueves	E-009	42645
	18/05/2021	Martes	I-010	38918	19/05/2021	Miércoles	E-011	39286
	19/05/2021	Miércoles	I-011	39285	20/05/2021	Jueves	E-012	39598
Junio	08/06/2021	Martes	I-013	36453	09/06/2021	Miércoles	E-014	38188
	09/06/2021	Miércoles	I-014	38188	10/06/2021	Jueves	E-015	39793
	29/06/2021	Martes	I-016	36645	30/06/2021	Miércoles	E-017	36645
	30/06/2021	Miércoles	I-017	36645	01/07/2021	Jueves	E-018	37721
Julio	13/07/2021	Martes	I-019	38779	14/07/2021	Miércoles	E-020	37300
	14/07/2021	Miércoles	I-020	37300	15/07/2021	Jueves	E-021	37796
	27/07/2021	Martes	I-022	40158	28/07/2021	Miércoles	E-023	38772

	28/07/2021	Miércoles	I-023	38772	29/07/2021	Jueves	E-024	38665
Agosto	24/08/2021	Martes	I-025	37826	25/08/2021	Miércoles	E-026	41965
	25/08/2021	Miércoles	I-026	41965	26/08/2021	Jueves	E-027	38037

4. ANÁLISIS CUANTITATIVO. METODOLOGÍA Y RESULTADOS OBTENIDOS

4.1. Metodología analítica

Aunque el principal objetivo del presente estudio es la determinación de antibióticos en muestras de agua residuales, se han considerado también otros fármacos con el fin de aportar información de interés sobre la presencia de medicamentos diversos en las aguas residuales. Con ello, se pretende completar la información obtenida para antibióticos con otros fármacos, para dar una visión más realista de la situación actual de las aguas y del comportamiento de estos compuestos en las EDAR. Por consiguiente, el análisis cuantitativo de las muestras se ha llevado a cabo mediante la aplicación de dos métodos analíticos, uno únicamente para antibióticos y otro para fármacos pertenecientes a otros grupos terapéuticos. Las dos metodologías están basadas en la técnica de cromatografía líquida de ultra-resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo (QqQ), en modo de trabajo *Selected Reaction Monitoring* (SRM).

En el **Anexo 1** de este Informe, se describen los dos métodos analíticos aplicados, así como la validación de las metodologías analíticas.

4.2. Análisis de las muestras

En cada secuencia de análisis se han inyectado tanto las muestras como los controles de calidad (QC) entre dos curvas de calibrado, utilizando las respuestas medias de los calibrados para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos. Dicha cuantificación se ha realizado mediante calibración externa, o mediante el método de calibrado de patrón interno en aquellos casos en los que se dispone de patrón interno marcado isotópicamente (ILIS). Para cada compuesto, se ha adquirido una transición de cuantificación (Q) y dos transiciones de confirmación (q_1 , q_2). Se ha dado como positivo un compuesto solamente cuando se han cumplido los criterios de confirmación de la identidad (SANTE/11813/2017). Es decir, cuando, además de coincidir el tiempo de retención con el patrón/patrón interno, con una tolerancia máxima de ± 0.1 min, al menos una de las relaciones de intensidad (q_1/Q , q_2/Q) se desvía menos del $\pm 30\%$ con respecto al patrón de referencia (como valor medio del calibrado).

Controles de Calidad de los análisis

En este trabajo, se ha prestado especial atención al control de calidad de los análisis con el fin de asegurar la fiabilidad de los resultados. Los bajos niveles de concentración de los compuestos analizados y la complejidad de la matriz de las muestras, hacen que este tipo de determinaciones sea problemático, por lo que el control de calidad adquiere especial importancia. Se ha llevado a cabo mediante el análisis de muestras control (Quality Control, QC), incluidas en cada secuencia analítica.

Los QC se prepararon a partir de dos muestras de agua analizadas, escogidas al azar (muestras de entrada I-001 y I-014; muestras de salida E-002 y E-015) a tres niveles de concentración (100, 500 y 5000 ng L⁻¹ para antibióticos; 100, 1000 y 5000 ng L⁻¹ para los otros fármacos). En el campo del análisis de residuos se consideran aceptables las recuperaciones individuales de QCs en el rango entre 60 y 140% (SANTE, 2019). Cuando las recuperaciones para los QC se encontraron fuera de este rango, las concentraciones obtenidas se corrigieron en función de la recuperación media de las muestras QC inyectadas en la secuencia, siempre y cuando se observase una cierta robustez en los resultados obtenidos para dichas recuperaciones fuera de rango.

Las **Tablas 4.1 y 4.2** muestran los valores medios de recuperación de los QC obtenidos en el análisis de antibióticos y de otros fármacos, respectivamente, en las aguas residuales de entrada y de salida de la EDAR.

En el caso de los antibióticos, en general se obtuvieron recuperaciones medias satisfactorias con valores en el rango 60-140%, a excepción de cloxacillin y clindamycin al nivel más bajo de fortificación con recuperaciones inferiores al 50%. Por otro lado, en algunos QC, mayoritariamente al nivel más bajo de concentración (100 ng L⁻¹), no se pudieron calcular las recuperaciones (azitromycin, clarithromycin, erithromycin, ciprofloxacin y norfloxacin), como consecuencia de la elevada concentración de estos compuestos en las muestras “blanco” utilizadas para su preparación. Esto hizo que apenas se notase la adición de una pequeña cantidad de patrón, y que no pudiera, por tanto, calcularse su recuperación.

Para el resto de fármacos, las recuperaciones medias de los QCs también fueron satisfactorias (entre 60-140%) para la mayoría de los compuestos. También en algunos casos (acetaminophen, gabapentin, iopromide, valsartan y venlafaxine), no se obtuvieron valores satisfactorios de recuperación, especialmente en los QCs más bajos, debido al elevado nivel de concentración encontrado en las muestras “blanco”.

Tal como se ha indicado anteriormente, cuando las recuperaciones de los QC se encontraron fuera del rango 60-140%, las concentraciones obtenidas se corrigieron en función de la recuperación media de las muestras QC inyectadas en la secuencia de análisis.

Tabla 4.1. Recuperaciones medias (%) de los QCs de antibióticos en las aguas residuales

	Aguas de entrada			Aguas de salida		
	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* se muestran las recuperaciones fuera del rango 60-140% aceptado

*Compuestos cuantificados mediante método patrón interno, al estar disponible el ILIS correspondiente

- Valor no disponible por falta de sensibilidad

a: Presencia del compuesto en el “blanco” utilizado para preparar el QC a concentraciones altas, lo que impide obtener un valor de recuperación satisfactorio

b: Valor de recuperación anómalo, próximo al 200%

Tabla 4.2. Recuperaciones medias (%) de los QCs de otros fármacos analizados en las aguas

	Aguas de entrada			Aguas de salida		
	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

*Compuestos cuantificados mediante método patrón interno, al estar disponible el ILIS correspondiente

a: Presencia del compuesto en el “blanco” utilizado para preparar el QC a concentraciones altas, lo que impide obtener un valor de recuperación satisfactorio

b: Valor de recuperación anómalo, próximo al 200%

Análisis de aguas residuales de entrada (influyente urbano)

Las 18 muestras de influente se analizaron mediante las dos metodologías descritas en el presente informe, una para la determinación de antibióticos y otra para la determinación de otros fármacos. Las **Tablas 4.3** y **4.4** muestran los resultados obtenidos para la determinación de antibióticos y otros fármacos, respectivamente, en cada una de las muestras de entrada (influyente) recogidas en la EDAR de Castelló.

Se han encontrado la mayoría de los compuestos estudiados (14 de 18 antibióticos y 24 de 27 del resto de fármacos). Entre los antibióticos detectados, cabe señalar azithromycin y ciprofloxacin, que presentaron concentraciones en muestras superiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$, siendo el valor más alto para azithromycin en la muestra de Junio I-013 ($4.9 \mu\text{g L}^{-1}$). En el caso de los otros fármacos, el analgésico acetaminophen, el anticonvulsivo gabapentin, el medio de contraste iopromide y el antihipertensivo valsartan mostraron concentraciones por encima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, llegando incluso a superar en algún caso el valor de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (acetaminophen en la muestra de Julio I-022, $107 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 4.3. Concentraciones (ng L⁻¹) de antibióticos en muestras de entrada (influyente)

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación (5 ng L⁻¹)

Tabla 4.4. Concentraciones (ng L^{-1}) de otros fármacos en muestras de entrada (influyente)

[illegible]

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación (5 ng L⁻¹)

Análisis de aguas residuales de salida (efluente)

Las 18 muestras de efluente, ya tratadas en la EDAR, también se analizaron mediante las dos metodologías descritas en el presente informe. Las **Tablas 4.5 y 4.6** muestran los resultados obtenidos para la determinación de antibióticos y otros fármacos, respectivamente, en las muestras de salida recogidas en la EDAR de Castelló.

Se ha encontrado el mismo número de compuestos estudiados que en las aguas de entrada (14 de 18 antibióticos y 24 de 25 del resto de fármacos), aunque los niveles de concentración son en general más bajos que en el influente. Cabe destacar que, de los dos antibióticos que presentaban las concentraciones más altas ($> 1 \mu\text{g L}^{-1}$) en el influente, únicamente ciprofloxacina ha rebajado sus concentraciones por debajo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. En el caso de azithromycin, los valores de concentración en efluente son similares a los de influente, y en todas las muestras se encuentran por encima de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Entre los otros fármacos, de entre los cuatro compuestos que presentaron las concentraciones más altas en las muestras de influente, cabe señalar el caso del acetaminophen y de gabapentin, ya que sus concentraciones se han rebajado drásticamente en las muestras de efluente.

Cabe destacar que en los efluentes analizados se han detectado cuatro fármacos (ciprofloxacina, sulfamethoxazole, trimethoprim y venlafaxine) que están incluidos en la Lista de Observación (*Watch List*) de la UE (Decisión de ejecución 2020/1161) cuyos niveles deben ser controlados en aguas superficiales. Por el contrario, amoxicillin, antibiótico también incluido en la Lista de Observación, no se ha detectado en ninguna de las aguas de salida analizadas.

Tabla 4.5. Concentraciones (ng L⁻¹) de antibióticos en muestras de salida (efluente)

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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

*Antibióticos incluidos en la lista de observación (Watch List 2020/1161)

Tabla 4.6. Concentraciones (ng L^{-1}) de otros fármacos en muestras de salida (efluente)

[illegible]

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación (2 ng L⁻¹)

*Fármaco incluido en la lista de observación (Watch List 2020/1161)

Las **Tablas 4.7** y **4.8** muestran las concentraciones medias mensuales encontradas para antibióticos y para otros fármacos, respectivamente, tanto en las aguas de entrada como en las de salida.

Como se ha indicado anteriormente, las concentraciones en el efluente son, en general, menores que en las muestras de influente, lo que denota una cierta eficiencia de la EDAR en cuanto a la eliminación de fármacos, aunque queda lejos de ser completa pues aún se encuentran muchos fármacos y a niveles relativamente importantes en las aguas tratadas. Sin embargo, se observan tres antibióticos (clindamycin, metronidazole y cefuroxime) y otros seis fármacos más (alprazolam, carbamazepine, levamisole, lorazepam, phenazone y primidone) con concentraciones medias mensuales del mismo orden, e incluso mayores, en las muestras de efluente.

Comparando las concentraciones mensuales de los productos farmacéuticos estudiados tanto en las aguas de entrada como en las de salida, no se observa una tendencia clara en cuanto a niveles de concentración, o uso diferencial de fármacos en el tiempo, a lo largo de los cinco meses de estudio.

Tabla 4.7. Concentraciones medias (ng L^{-1}) mensuales de antibióticos

	Abril		Mayo		Junio		Julio		Agosto	
	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida
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

Tabla 4.8. Concentraciones medias (ng L⁻¹) mensuales de otros fármacos

	Abril		Mayo		Junio		Julio		Agosto	
	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida
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: detectado, no cuantificado, concentración inferior al valor límite para la cuantificación (5 ng L⁻¹)

A modo de ejemplo, se presentan las **Figuras 4.1** y **4.2** correspondientes a positivos de antibióticos encontrados en dos muestras del mes de abril y a positivos de otros fármacos en dos muestras del mes de julio, respectivamente.

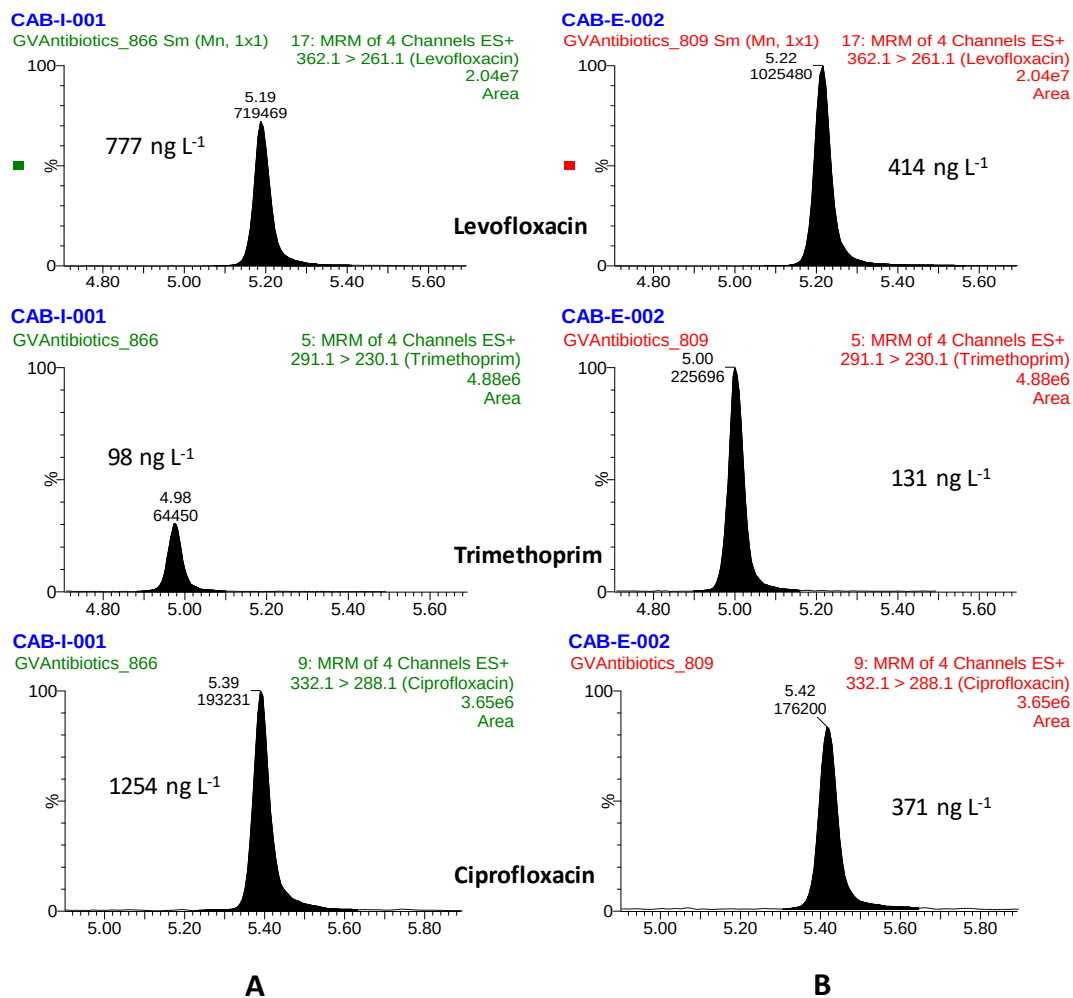


Figura 4.2. Ejemplos de cromatogramas de muestras positivas a antibióticos: influente I-001 (A) y efluente E-002 (B). Los cromatogramas corresponden a extractos de muestra de influente diluida x5 y de efluente diluida x2.

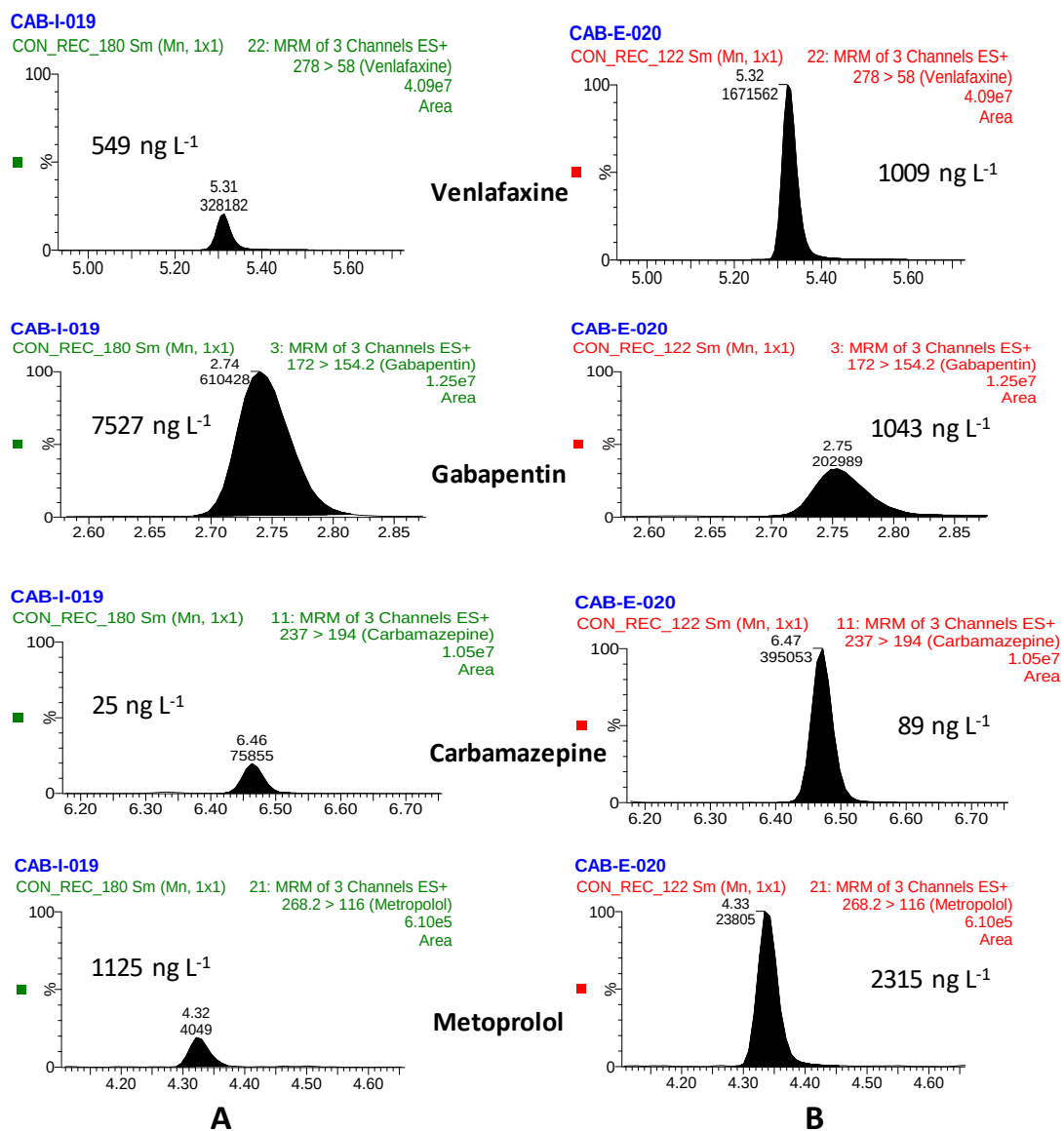


Figura 4.2. Ejemplos de cromatogramas de muestras positivas a otros fármacos: influente I-019 (A) y efluente E-020 (B). Los cromatogramas corresponden a extractos de muestra de influente diluida x5 y de efluente diluida x2.

5. SCREENING DE METABOLITOS

Los métodos analíticos publicados en la literatura científica para la determinación de antibióticos en aguas permiten la cuantificación de un número limitado de compuestos, a niveles de concentración muy bajos, con alta fiabilidad en cuanto a las concentraciones reportadas y la identidad del compuesto detectado. Se trata de métodos “target” desarrollados para unos pocos antibióticos seleccionados, pero no permiten obtener información sobre sus metabolitos u otros fármacos que puedan también estar presentes en las aguas. Para tener una visión más completa sobre la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana es necesario complementar estos métodos cuantitativos con un **screening amplio (cribado) que permita identificar otros antibióticos o metabolitos que pudieran estar también presentes en las aguas.**

Actualmente, la técnica de elección para los métodos cuantitativos es LC-MS/MS (ver apartado anterior), mientras que para el screening se utilizan **métodos basados en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS)**. En este apartado, se indica la metodología aplicada por nuestro grupo de trabajo para el screening de metabolitos de los antibióticos objeto de estudio mediante LC-HRMS. Los análisis se llevaron sobre una mezcla homogenizada de las muestras de influente tomadas en mayo y junio (IWW May-Jun), por un lado, y en julio y agosto (IWW Jul-Ago), por otro lado. El mismo procedimiento se utilizó para las muestras de efluente (EWW May-Jun, EWW Jul-Ago).

Metodología analítica

Preparación de las muestras

Se tomaron 50 mL de muestra y se diluyeron x 2 con agua ultrapura, pasándolos posteriormente por un cartucho Oasis HLB (200 mg, Waters), previamente acondicionado con un volumen de metano, y un volumen de agua ultrapura, grado HPLC. A continuación, se secó el cartucho pasando aire y se eluyó con 10 mL de metanol. El eluato se evaporó a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno a 40°C y se reconstituyó en un volumen final de 0.5 mL metanol:agua (20:80, v/v) (factor de pre-concentración en el proceso SPE x100). Finalmente, se inyectaron 10 µL en el sistema UHPLC-IMS-HRMS.

Instrumentación

Los análisis de screening se llevaron a cabo con un equipo de cromatografía líquida Waters Acquity I-Class UPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado a un sistema de espectrometría de masa de alta resolución Vion IMS QTOF (Waters Corp., Wilmslow, Manchester, UK), usando ionización por electrospray (ESI), y operando tanto en modo positivo como negativo.

La separación cromatográfica se realizó con una columna Cortecs C18 2.1 x 100 mm, 2.7 μ m fused-core (Waters Corp., Wexford, Ireland), mantenida a 40 °C. Se aplicó un gradiente de elución a un flujo de 0.3 mL/min, con agua (A) y metanol (B), ambos al 0.01 % ácido fórmico: 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, con un tiempo total de 18 min. El volumen de inyección fue 10 μ L.

Los parámetros de ionización de la fuente ESI fueron los siguientes: 1.0 kV de voltaje de capilar en modo positivo y 1.5 kV en negativo, 30 V de voltaje de cono en ambos modos, temperatura de la fuente 120 °C, temperatura de desolvatación 650 °C, flujo de gas de desolvatación 1.200 L/h, y flujo de gas de cono 250 L/h. La celda de movilidad iónica (IMS) de tipo *Travelling Wave* (TWIMS) se configuró con una velocidad de onda de 250 m/s, y una altura de onda variable aplicando una rampa de 20 a 50 V. Se utilizó nitrógeno (≥ 99.999 %) como gas de deriva en la celda de IMS. La resolución del TOF fue de ~ 36.000 FWHM en modo positivo (medida para la masa m/z 556), y de 38.000 FWHM en negativo (m/z 554). La calibración del instrumento se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante, usando en este caso la solución de calibración "Major Mix IMS/TOF calibration" (Waters Corp.). Para asegurar una correcta exactitud de masa, se midió de forma continua durante todo el tiempo de análisis una solución de leucina encefalina preparada a 50 μ g/L en agua:acetonitrilo 50:50 acidificada con 0.01% de ácido fórmico. Se utilizó nitrógeno (≥ 99.999 %) como gas de colisión para realizar la fragmentación de los compuestos (CID, *collision induced dissociation*). Se adquirieron dos funciones de tipo full-range de forma secuencial: una función a baja energía de colisión (LE, *low energy*) usando 6 eV de energía de colisión, y una función a alta energía de colisión (HE, *high energy*) usando una rampa de energía de colisión de 28-56 eV. Ambas funciones se adquirieron en el rango de masa m/z 50-1000, con un tiempo de escaneo de 0.3 s. Los datos se adquirieron y procesaron con el sistema informático UNIFI v1.9 (Waters Corp.).

Base de datos usada para la búsqueda de metabolitos

Se preparó una base de datos en nuestro laboratorio con el fin de realizar la búsqueda de metabolitos de los antibióticos estudiados en este trabajo. Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica de metabolitos reportados en diferentes bases de datos online de acceso libre (<https://go.drugbank.com/>, <https://www.pharmgkb.org/>) para los antibióticos incluidos en el estudio. Además, la base de datos se completó con las estructuras de potenciales metabolitos no reportados para los antibióticos estructuralmente similares a otros con biotransformaciones reportadas, obteniendo un total de 50 metabolitos, que se incluyeron en la base de datos.

Procesamiento de datos

Un compuesto detectado en las aguas se consideró completamente identificado (Nivel 1 de confianza (*Celma et al., 2020*) cuando se observó en la muestra la molécula protonada y al menos un ion fragmento, ambos con errores de masa menores de 5 ppm. Además, el tiempo de retención cromatográfico debería diferenciarse en menos de 0.1 min del observado para el patrón de referencia y el parámetro de movilidad iónica (CCS) debería tener un error menor de 2% con respecto al de dicho patrón de referencia. Por lo tanto, este nivel de confianza, que permite una identificación inequívoca del metabolito, es solo posible cuando se dispone del patrón de referencia, lo cual no es habitual. Para la mayoría de metabolitos, no estaba disponible el patrón de referencia, pero sin embargo se dispuso de información sobre la masa exacta de sus iones fragmento gracias a trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación (*Boix et al., 2016*), por lo que dicha información se pudo incluir en la base de datos.

Como se ha indicado, para la mayoría de metabolitos y TPs reportados en la bibliografía, no hay patrones de referencia analíticos disponibles comercialmente. En este caso, los compuestos se identificaron tentativamente en base a la fragmentación en masa exacta observada y su justificación en base a la estructura de la molécula. Para aumentar la confianza en la identificación, los iones fragmento observados para el supuesto metabolito se compararon con los del antibiótico original, ya que muchos metabolitos y productos de transformación presentan normalmente rutas de fragmentación similares a la molécula original. Adicionalmente, la fragmentación observada también se comparó con la descrita en la bibliografía para estos compuestos. En este caso, para considerar un compuesto como tentativamente identificado (Nivel 2, *Celma et al., 2020*), la fragmentación se justificó en base a la estructura del compuesto, siendo algunos de los iones fragmento comunes con la molécula original o habiéndose reportado previamente en bibliografía. En todos los casos, el error de masa de la molécula

protonada y de los iones fragmento utilizados para la identificación tentativa debe ser menor de 5 ppm. En el caso de que no haya información reportada sobre la fragmentación del compuesto, y los iones fragmento no coincidan con los del compuesto original, si estos se pueden justificar en base a la estructura propuesta para el metabolito, el compuesto se considera identificado a Nivel 3.

Metabolitos identificados en las muestras de agua residual

3-desmethyl trimethoprim (Nivel 2)

El trimethoprim se metaboliza por vía oxidativa en diferentes compuestos, siendo más abundantes los originados por desmetilación en la posición 3' y 4', representando aproximadamente el 65% y 25% del total de metabolitos, respectivamente (*Goldman et al., 2015*). En el caso de administración oral, entre el 50 y el 60% del trimethoprim se excreta en orina en unas 24 horas, siendo el compuesto inalterado alrededor del 80% del total excretado (*FDA Approved Drug Products: Trimethoprim oral tablets, accessed September 28, 2021*).

La identificación de este metabolito se realizó en base a la presencia de dos fragmentos comunes con el trimethoprim, observados a m/z 261 y 123, los cuales sirven para establecer la posición de la desmetilación en anillo aromático (**Tabla 5.1, Figura 5.11**). Sin embargo, no se puede conocer qué grupo methoxy se ha desmetilado, ya que la fragmentación sería equivalente en todos los casos. Se propone el 3-desmethyl en base a la información metabólica reportada, que indica que este es el metabolito mayoritario (*Goldman et al., 2015*).

Tabla 5. 1. Datos MS para 3-desmethyl trimethoprim.

Ion	m/z	Composición elemental	Error de masa (ppm)	Error de masa (mDa)	Observado para el compuesto original
[M+H] ⁺	277.12826	C ₁₃ H ₁₇ N ₄ O ₃ ⁺	-4.5	-1.3	-
Fragmento 1	261.09872	C ₁₂ H ₁₃ N ₄ O ₃ ⁺	1.4	0.4	Si
Fragmento 2	123.06649	C ₅ H ₇ N ₄ ⁺	6.6	0.8	Si

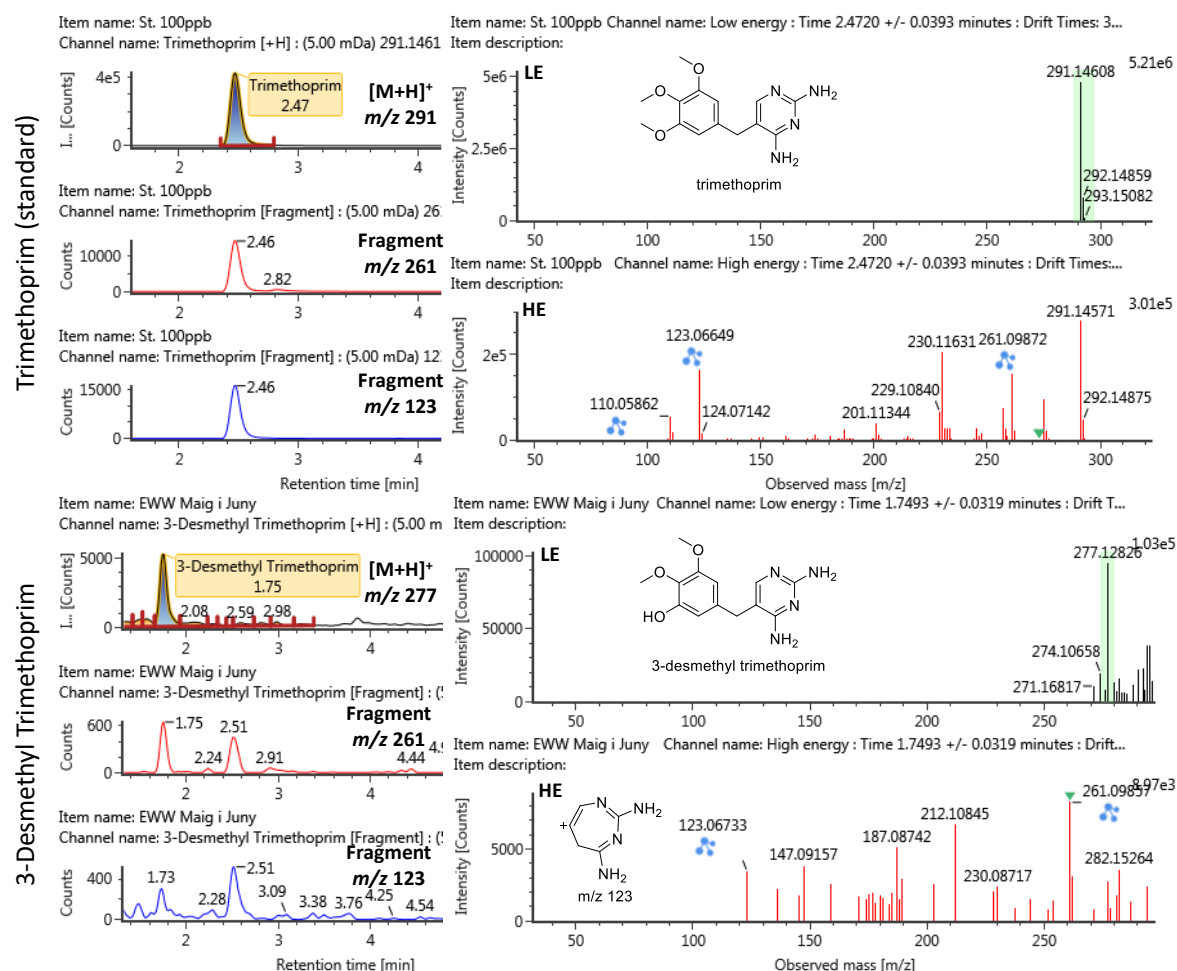


Figura 5. 1. Comparación de la fragmentación de un patrón de trimethoprim y del 3-demethyl trimethoprim detectado en una muestra real (dcha). También se muestran los cromatogramas de ion extraído para la molécula protonada y para los iones fragmento diagnóstico (izda)

Clindamycin sulfoxide (Nivel 2)

El antibiótico clindamycin se metaboliza principalmente por vía hepática a través de la CYP3A4 y, en menor medida, la CYP3A5. (*FDA Approved Drug Products: Cleocin (clindamycin hydrochloride) oral capsules*, accessed September 28, 2021). Se han reportado dos metabolitos inactivos: un metabolito de oxidación (clindamycin sulfoxide), y un *N*-desmetil metabolito (*N*-desmethyl clindamycin) [5]. Aproximadamente el 10% de la clindamycin se excreta en la orina y un 3.6% en la heces, siendo el resto excretado como metabolitos inactivos (*FDA Approved Drug Products: Cleocin (clindamycin hydrochloride) oral capsules*, accessed September 28, 2021).

La identificación de este metabolito se realizó en base a la presencia de dos iones fragmento compartidos con la clindamycin, con m/z 126 y m/z 377, siendo el ion m/z 377 el que permite establecer la posición de la oxidación, en este caso un sulfóxido. (Tabla 5.2, Figura 5.2).

Adicionalmente, el perfil isotópico observado para el metabolito es coherente con la presencia de átomos de Cl y S en la estructura, de forma similar a la clindamycin (**Figura 5.2**).

Tabla 5.2. Datos MS para clindamycin sulfoxide.

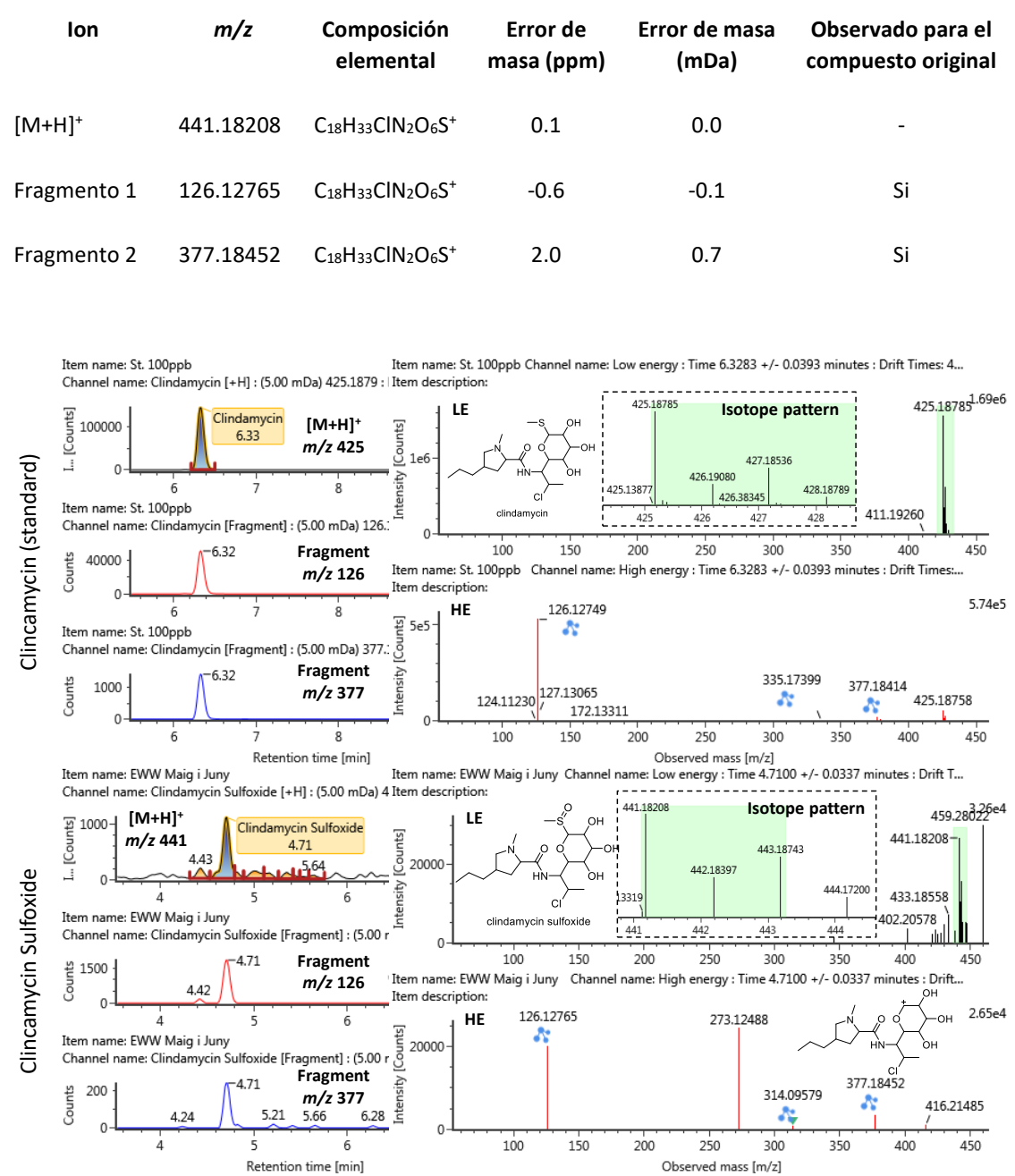


Figura 5.2. Comparación de la fragmentación del patrón de clindamycin y del clindamycin sulfoxide detectado en una muestra real (dcha). Detalle del perfil isotópico observado en el compuesto inalterado y en el metabolito. También se muestran los cromatogramas de ion extraído para la molécula protonada y para los iones fragmento diagnóstico (izda).

***N*-acetyl ciprofloxacin (Nivel 2) y oxociprofloxacin (Nivel 3)**

El ciprofloxacin se metaboliza principalmente por la CYP1A2 (*FDA Approved Drug Products: CIPRO (ciprofloxacin) oral tablets and suspension, accessed September 28, 2021*). Los metabolitos primarios oxociprofloxacin y sulociprofloxacin representan cada uno el 3-8% de la dosis total. También se han reportado metabolitos minoritarios, como el desethylene ciprofloxacin y formylciprofloxacin (*FDA Approved Drug Products: CIPRO XR (ciprofloxacin) extended-release tablets, accessed September 28, 2021*) [7]. Estos 4 metabolitos representan el 15% de la dosis oral total. Los estudios con ciprofloxacin radiomarcado indican que aproximadamente el 45% se recupera en orina como compuesto inalterado, y el 62% en las heces (*LeBel, 1988*).

El metabolito *N*-acetyl ciprofloxacin se identificó en base a un fragmento común con el compuesto original a m/z 231, el cual permitió establecer la posición de la biotransformación. (Tabla 5.3, Figura 5.3).

Tabla 5.3. Datos MS para *N*-acetyl ciprofloxacin.

Ion	m/z	Composición elemental	Error de masa (ppm)	Error de masa (mDa)	Observado para el compuesto original
[M+H] ⁺	374.15168	C ₁₉ H ₂₁ FN ₃ O ₄ ⁺	1.7	0.6	-
Fragmento 1	231.05823	C ₁₂ H ₈ FN ₂ O ₂ ⁺	7.8	1.8	Si

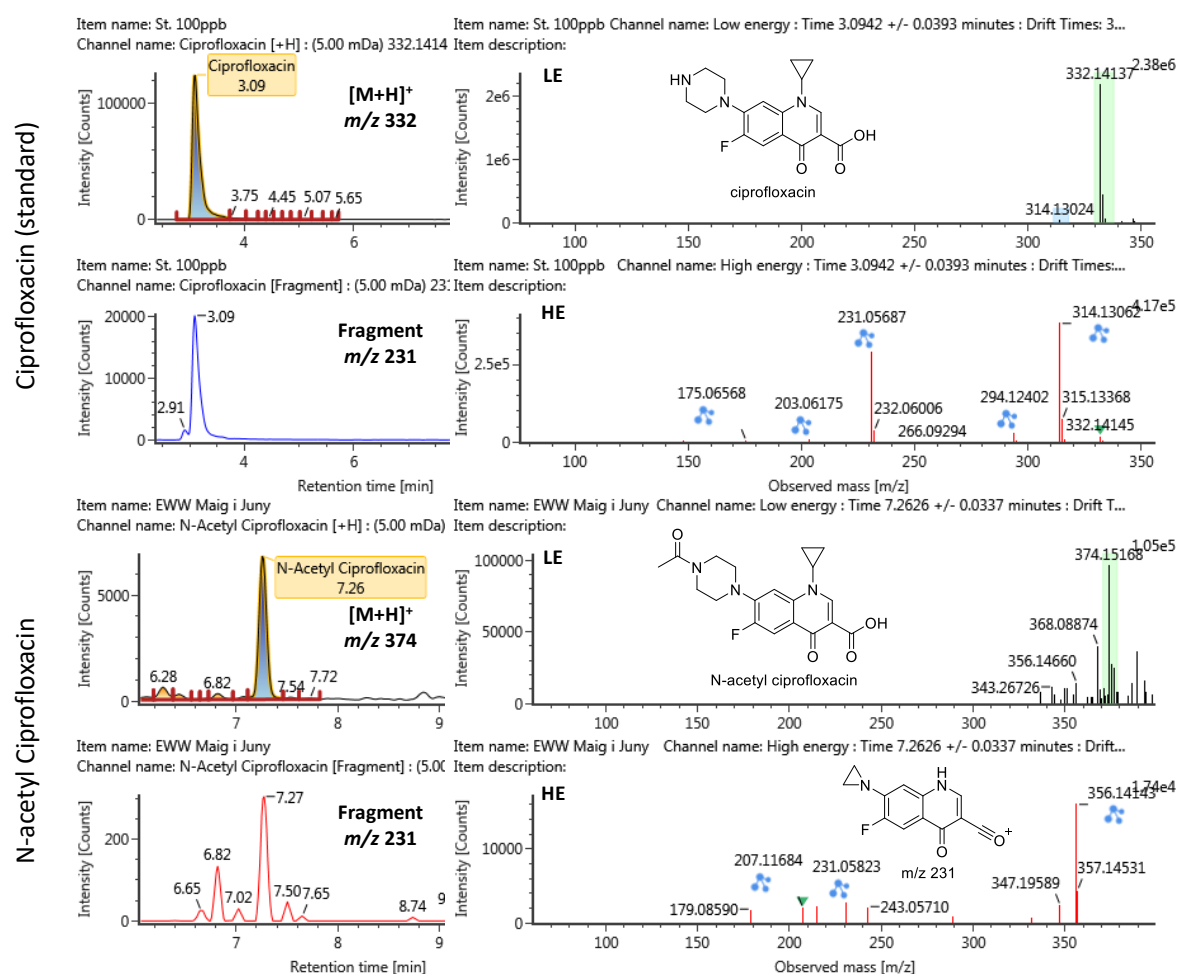


Figura 5.3. Comparación de la fragmentación del patrón de ciprofloxacin y del N-acetyl ciprofloxacin sulfoxide detectado en una muestra real (dcha). También se muestran los cromatogramas de ion extraído para la molécula protonada y para los iones fragmento diagnóstico (izda).

En el caso del oxociprofloxacin, no se observaron fragmentos comunes con el ciprofloxacin. Sin embargo, los tres iones fragmento observados se pudieron justificar satisfactoriamente con la estructura propuesta para este metabolito. (Tabla 5.4, Figura 5.4).

Tabla 5.4. Datos MS para oxociprofloxacin.

Ion	m/z	Composición elemental	Error de masa (ppm)	Error de masa (mDa)	Observado para el compuesto original
[M+H] ⁺	346.12042	C ₁₇ H ₁₇ FN ₃ O ₄ ⁺	1.9	0.7	-
Fragmento 1	328.10916	C ₁₇ H ₁₇ FN ₃ O ₄ ⁺	-0.1	0.0	No
Fragmento 2	287.07105	C ₁₇ H ₁₇ FN ₃ O ₄ ⁺	3.4	1.0	No

Fragmento 3	217.04074	C ₁₇ H ₁₇ FN ₃ O ₄ ⁺	-0.2	0.0	No
-------------	-----------	---	------	-----	----

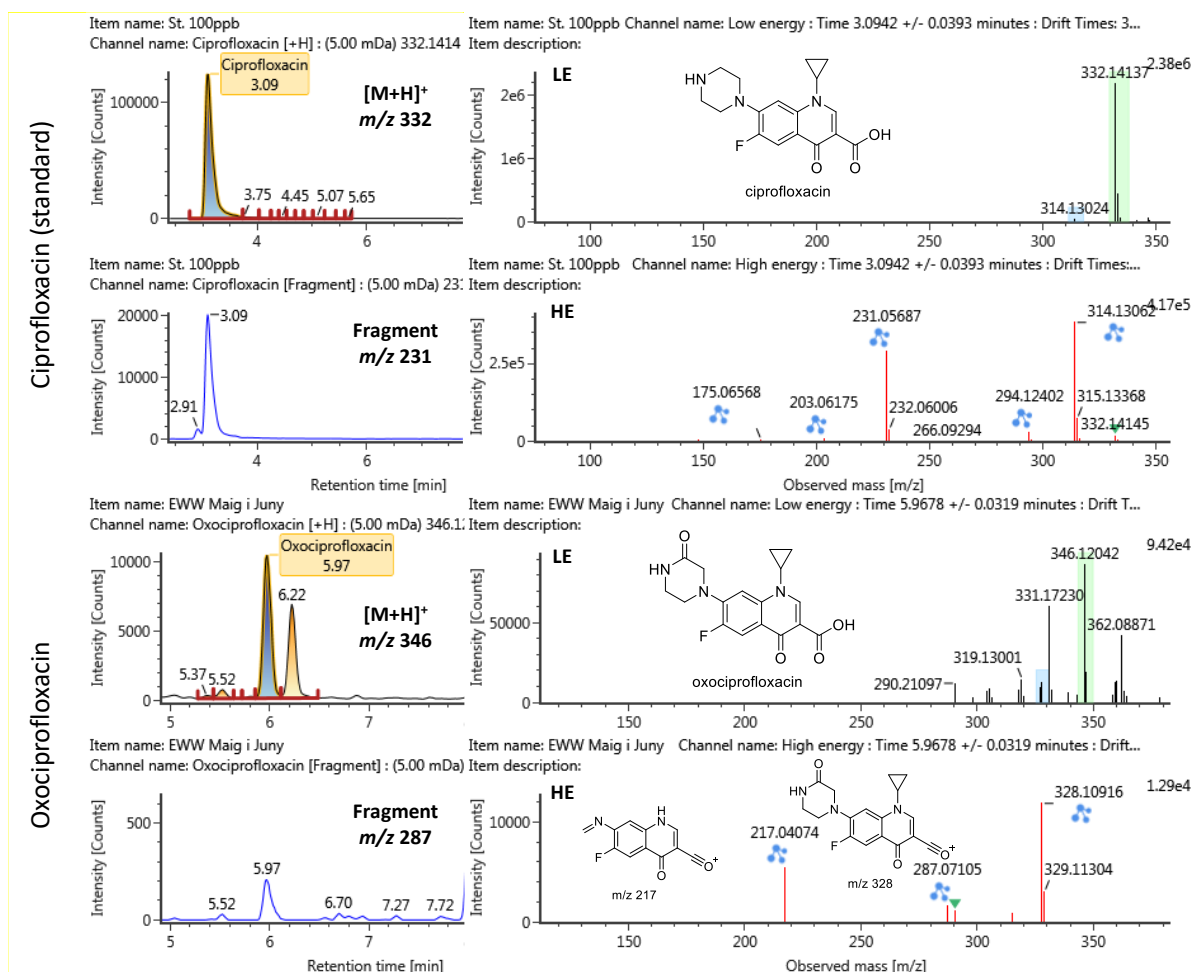


Figura 5.4. Comparación de la fragmentación del patrón de ciprofloxacina y del oxociprofloxacina sulfóxido detectado en una muestra real (dcha). También se muestran los cromatogramas de ion extraído para la molécula protonada y para los iones fragmento diagnóstico (izda).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los cuatro metabolitos descritos anteriormente se han encontrado en las dos muestras compuestas de efluente que se han analizado (EWW May-Jun, EWW Jul-Ago), mientras que en las muestras de influente urbano sólo se han encontrado los metabolitos de ciprofloxacina (oxociprofloxacina en IWW May-Jun y IWW Jul-Ago; N-acetyl ciprofloxacina en IWW May-Jun). El hecho de no haber detectado los metabolitos de trimethoprim y clindamycin en el influente puede ser debido a la mayor complejidad de estas muestras, comparada con el efluente ya depurado, lo que se traduce en un mayor efecto matriz por supresión que impediría la detección de los mencionados metabolitos.

El estudio preliminar realizado sobre metabolitos reportados de antibióticos demuestra que estos compuestos también se encuentran presentes en las aguas, por lo que resulta necesario ampliar el estudio a otros metabolitos y a los productos de transformación (TPs), muchos de los cuales no han sido reportados todavía, por lo que resultan desconocidos para el químico analítico. Se recomienda realizar una investigación detallada sobre la presencia de metabolitos y TPs de antibióticos en las aguas residuales en el futuro próximo, tanto de compuestos reportados en la bibliografía, como de otros no reportados, usando para ello el potencial de la técnica de HRMS y aproximaciones poderosas como son la búsqueda de compuestos con fragmentos comunes, o la predicción de metabolitos, entre otras. Esta investigación sobre metabolitos y TPs, junto con los datos obtenidos sobre los antibióticos inalterados, permitiría tener una visión mucho más completa de la situación de nuestras aguas residuales en lo relativo a presencia de antibióticos y potencial impacto sobre la salud pública y el medio ambiente.

6. ESTIMACIÓN DEL CONSUMO DE FÁRMACOS MEDIANTE EPIDEMIOLOGÍA BASADA EN EL ANÁLISIS DE AGUAS RESIDUALES

Haciendo uso de la aproximación “Epidemiología basada en aguas residuales”, se ha estimado el consumo diario total de los antibióticos y de los otros fármacos en la ciudad de Castelló, teniendo en cuanto su población (174.264 hab) y aplicando un factor de excreción (FE) específico para cada compuesto. Este FE generalmente depende de la tasa de excreción de una sustancia, la relación de masa molecular del fármaco original a su metabolito, y en algunos casos, la estabilidad del fármaco.

En el presente estudio, los diferentes FE se han estimado como la inversa de los porcentajes de excreción en orina del fármaco original, que se encuentran reportados en la literatura consultada (<https://go.drugbank.com>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Las **Tablas 6.1 y 6.2** muestran los valores de porcentajes de excreción en orina y los factores FE obtenidos para los antibióticos y los otros fármacos, respectivamente.

Tabla 6.1. Porcentaje de excreción y FE de antibióticos en orina

	% Excreción 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

Tabla 6.2. Porcentaje de excreción y FE de otros fármacos en orina

	% Excreción 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

* dato no disponible

El consumo de la población de Castelló (g/24 h/1.000 hab) se ha estimado a partir de las cargas diarias de los fármacos en las aguas de influente, según la siguiente ecuación:

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

q: carga diaria del fármaco (g/24 h) en la muestra de influente

P: población (hab)

FE: factor de excreción

Las **Tablas 6.3** y **6.4** muestran los valores estimados del consumo poblacional en la ciudad de Castelló en cuanto a antibióticos y a otros fármacos, respectivamente. Cabe señalar que para aplicar la aproximación WBE, basada en el análisis de las aguas residuales, se requiere que el biomarcador analizado sea suficientemente estable en agua y que proceda exclusivamente del compuesto que se desea evaluar. El requisito de la estabilidad puede explicar la ausencia de datos sobre amoxicilina, un antibiótico ampliamente usado, que sin embargo no se ha detectado en las aguas residuales. Este hecho se achaca a la poca estabilidad de este compuesto en medio

acuso, sufriendo una rápida degradación por hidrólisis. Esta limitación, que afecta principalmente a la amoxicilina, podría también encontrarse, aunque en menor medida, en otros compuestos, por lo que la aproximación WBE resulta fiable en muchos casos, pero puede no ser la más apropiada en algunos casos concretos.

Como puede observarse en la **Tabla 6.3**, azythromycin ha sido, con diferencia, el antibiótico más consumido durante los meses de estudio. En cuanto a los otros fármacos, como era esperable, acetaminophen (paracetamol) ha sido el compuesto más consumido, llegando incluso a alcanzar el valor de 411 g/24 h/1.000 hab en el mes de julio. El siguiente fármaco con un consumo elevado (19–53 g/24 h/1.000 hab) ha sido el agente hipertensivo ibersartan.

Tabla 6.3 Estimación del consumo poblacional de antibióticos a partir de los datos obtenidos en el análisis de las aguas residuales (g/24 h/1.000 hab)

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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	-	-	-

Tabla 6.4. Estimación del consumo poblacional de otros fármacos a partir de los datos obtenidos en el análisis de las aguas residuales (g/24 h/1.000 hab)

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Dato de excreción (%) no encontrado en bibliografía

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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

*Dato de excreción (%) no encontrado en bibliografía

En la **Figura 6.1** se muestran los valores medios mensuales de consumo poblacional (g/24 h/1.000 hab) obtenidos para los antibióticos, no encontrándose una tendencia clara de una posible variación estacional, aunque sí que se observa un mayor consumo estimado en el mes de mayo para los compuestos más consumidos.

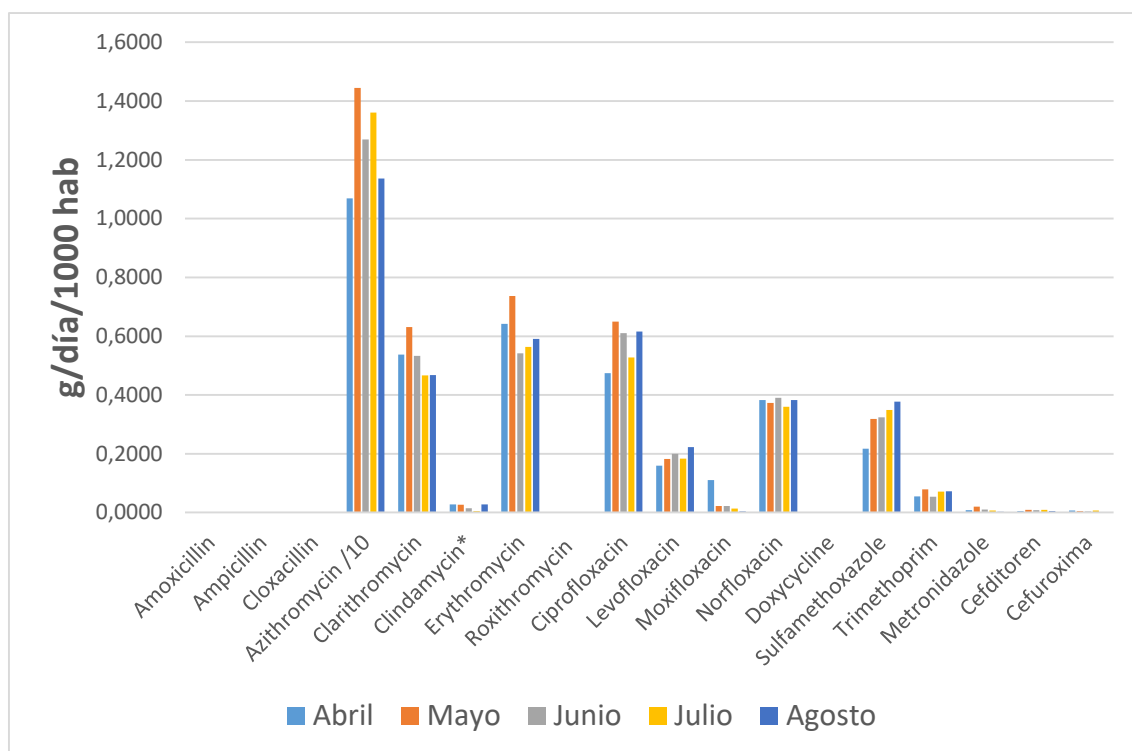


Figura 6.1. Variación mensual consumo poblacional (g/24 h/1.000 hab) de antibióticos

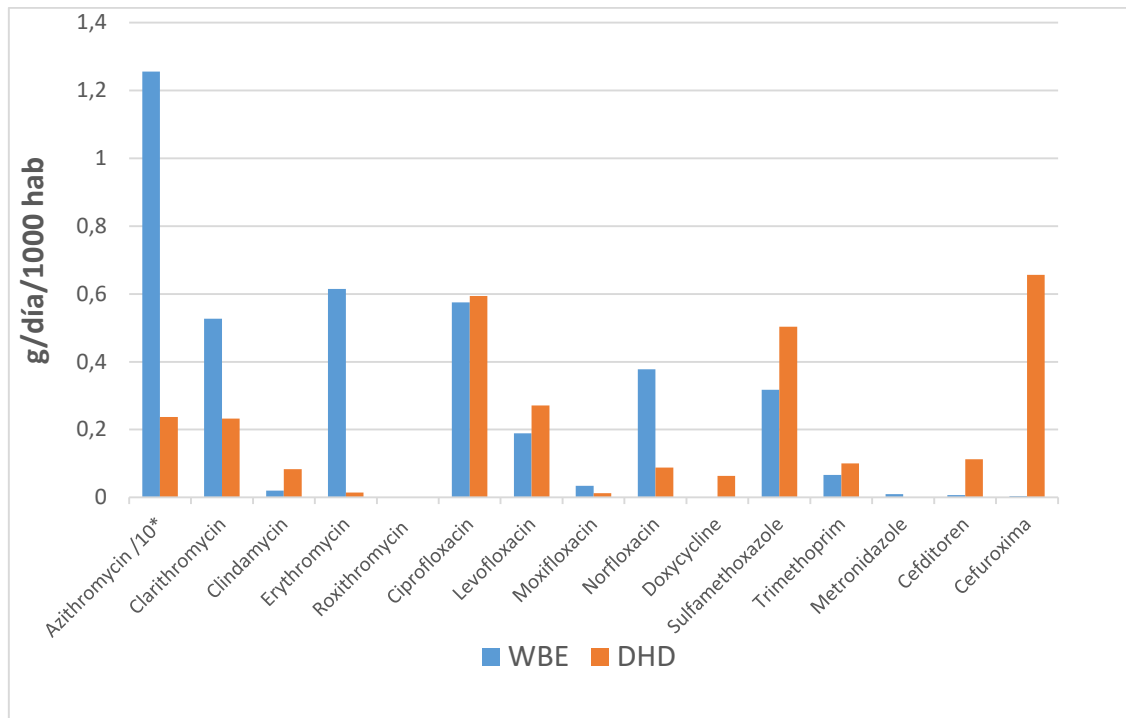
En el caso de los antibióticos, se dispone de datos de dosis (DHD) por mil habitantes prescritas en receta oficial de la Seguridad Social y dispensadas en oficinas de farmacia de Castelló. Aunque se adolece de los datos correspondientes a antibióticos consumidos en centros hospitalarios o prescritos por el sistema de sanidad privado, se ha realizado, en una primera aproximación, una comparación de los datos de consumo obtenidos utilizando la “Epidemiología basada en aguas residuales” con los datos de antibióticos prescritos. Para ello, se han utilizado los datos de dosis diaria definida (DDD) por cada 1000 habitantes, expresada en gramos, para cada uno de los antibióticos, que se encuentran publicadas en la web del Centro Colaborador de la OMS en Metodología Estadística de los Medicamentos (https://www.whocc.no/atc_ddd_index/). En la **Tabla 6.5** se recogen los valores de DHD (dosis prescritas) y DDD para cada antibiótico (administración vía oral), junto con el consumo en g/24 h/1000 hab calculado a partir de estos datos.

Tabla 6.5. Valores de dosis por mil habitantes (DHD), dosis diaria definida (DDD, en g), y consumo de antibióticos (g/día) por 1.000 habitantes estimado a partir de dichos parámetros.

	DHD	DDD (g)	g diarios por 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

* dato no disponible

En la **Figura 6.2** se comparan los datos de consumo obtenidos mediante “Epidemiología basada en aguas residuales” (WBE) con los valores de consumo calculados a partir de las dosis prescritas (DHD).



*consumo calculado a partir WBE dividido por 10

Figura 6.2. Comparación consumo poblacional antibióticos (g/día/1000 hab) calculado a partir epidemiología aguas residuales (WBE) y a partir dosis prescritas (DHD)

Con el fin de realizar la comparación estadística de los valores de consumo derivados de los datos experimentales obtenidos (g/24h/1000 hab) y el calculado en base a los datos de prescripción en el sistema público, se aplicó una prueba t para la comparación de un valor con una media experimental. Los resultados obtenidos mostraron que para todos los antibióticos los dos valores eran diferentes a un nivel de confianza del 95%, excepto para el ciprofloxacin y moxifloxacin. Cabe destacar la gran discrepancia en las estimaciones de consumo realizadas por WBE y por DHD para la azitromicina. Este es junto con la amoxicilina, mencionada anteriormente, el caso más llamativo de discrepancias entre fuentes convencionales de información y la más novedosa aproximación de WBE. Si bien el caso de la amoxicilina se puede explicar por la falta de estabilidad de este antibiótico en las aguas, sufriendo una rápida degradación que impide su análisis, el caso de la azitromicina resulta más complejo. Este antibiótico se excreta en orina, como compuesto inalterado, en un 6% (administración oral) o 12% (vía intravenosa), lo que hace que el factor de excreción aplicado para el cálculo del consumo a partir de los datos de concentración en las aguas residuales sea muy alto (x17, o x 8.3, según la vía de administración). Por otro lado, se ha reportado que la mayor parte de este antibiótico se excreta inalterado en las heces (Singlas, 1995). Por ello, puede ocurrir que parte del compuesto presente en las heces pase al agua residual, en una proporción desconocida, con

lo que la estimación del consumo resulta muy complicada, con clara tendencia a un cálculo por exceso cuando se realiza a partir de sus concentraciones en las aguas residuales.

Puede concluirse que, aunque WBE es una aproximación poderosa, que ha demostrado una gran fiabilidad y utilidad en el ámbito de las drogas de abuso, alcohol o tabaco, entre otros, aún presenta ciertas limitaciones y aspectos complejos que deben ser investigados en detalle. La estabilidad de los biomarcadores utilizados, junto con los datos de excreción de los mismo, son aspectos claves que, mientras no estén suficientemente claros, limitan su aplicación hasta que se disponga de mayor información. Es nuestra intención, profundizar en estos aspectos en futuros proyectos relacionados con este tema.

7. EFICACIA DE LA ELIMINACIÓN DE FÁRMACOS EN LA EDAR DE CASTELLÓ

A partir de los datos de concentración de fármacos en las aguas de entrada y salida de la EDAR es posible estimar la eficiencia de eliminación de la planta para los compuestos objeto del estudio. La eficiencia se ha estimado comparando las cargas totales diarias de los compuestos en las aguas de entrada y de salida (*Bijlsma et al.*, 2021), para lo cual es necesario usar la información disponible sobre los caudales ($\text{m}^3/24 \text{ h}$) de las corrientes correspondientes (ver **Tabla 3.1**).

Las cargas diarias de fármacos se han calculado a partir de las concentraciones encontradas en las aguas, del siguiente modo:

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

q: carga diaria del fármaco ($\text{g}/24 \text{ h}$) en la muestra de influente o del efluente

C: concentración del fármaco (g L^{-1}) en la muestra de influente o del efluente

F: caudal ($\text{m}^3/24 \text{ h}$) de entrada o de salida de la EDAR

El porcentaje de eliminación se ha calculado a partir de la siguiente expresión:

$$E (\%) = \frac{q_i - q_E}{q_i} \times 100$$

E: porcentaje de eliminación (%)

q_i : carga diaria del fármaco ($\text{g}/24 \text{ h}$) en la muestra de influente del día x

q_E : carga diaria del fármaco ($\text{g}/24 \text{ h}$) en la muestra de efluente del día x+1

Las **Tablas 7.1-7.4** muestran las cargas diarias de los antibióticos y otros fármacos, tanto en las aguas de entrada como de salida.

Tabla 7.1. Cargas diarias (g/24h) de antibióticos en las aguas de entrada a la EDAR

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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	-	-	-

Tabla 7.2. Cargas diarias (g/24h) de antibióticos en las aguas de salida de la EDAR

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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

Tabla 7.3. Cargas diarias (g/24h) de otros fármacos en las aguas de entrada de la EDAR

[illegible]

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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

Tabla 7.4. Cargas diarias (g/24h) de otros fármacos en las aguas de salida de la EDAR

[illegible]

	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	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

Las **Tablas 7.5 y 7.6** muestran la eficiencia de eliminación (%) estimada para antibióticos y los otros fármacos detectados, respectivamente, calculada a partir de los datos de las cargas diarias. Para la estimación de la eficiencia se ha comparado las aguas del efluente del día después con las aguas del influente del día anterior, asumiendo de este modo un tiempo de residencia de los fármacos de 24h en la planta.

En el caso de antibióticos, se observa que 9 de los 14 compuestos que se encontraron en las aguas se eliminaron en mayor o menor medida en la EDAR, destacando dos de ellos (doxycycline y sulfamethoxazole), que parecen eliminarse casi de forma completa en la EDAR, con valores promedio de eficiencia superiores al 80%, mientras que otros compuestos, tales como clarithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin y norfloxacin, se han eliminado por encima del 60%. Tres de los antibióticos estudiados (azithromycin, erythromycin y levofloxacin) se eliminaron en menor medida, con una eficiencia promedio inferior al 30%.

Dos antibióticos (trimethoprim y cefditoren) mostraron eficiencia de eliminación altamente variable durante los cinco meses de estudio, aunque con tendencia a la no eliminación. Por último, para tres antibióticos (clindamycin, metronidazole y cefuroxime) se han obtenido eficiencias negativas, al presentar niveles de concentración en el agua de salida superiores a los del agua de entrada, hecho que puede parecer sorprendente pero que ha sido reportado en la literatura científica (*Gros et al., 2010; Jelic et al., 2011; Botero-Coy et al., 2018; Bijlsma et al., 2021*). La baja eficiencia de la planta para la eliminación de estos compuestos unida a la posible liberación de conjugados (generalmente glucurónidos y sulfatos) durante el paso del agua por la planta podrían ser posibles causas de este aumento de concentración.

En cuanto a otras familias de fármacos, seis de los compuestos detectados (acetaminophen, atorvastatin, enalapril, gabapentin, sulfadiazine y valsartan) se eliminaron casi de forma completa con valores de eficiencia promedio entre 90-100%. Para otros fármacos, tales como diclofenac, flumequine, furaltadone, lincomycin y losartan, la eliminación ha sido parcial con valores entre 45-70%. También existen fármacos (iopromide, metoprolol, pantoprazol, tramadol y venlafaxine) para los que la eficiencia de eliminación fue altamente variable durante los cinco meses de estudio, aunque con tendencia a la no eliminación. Por último, al igual que ocurre con los antibióticos, se han obtenido eficiencias negativas para ocho de los fármacos encontrados en las aguas residuales (alprazolam, carbamazepine, irbesartan, levamisole, lorazepam, phenazone, primidone y salbutamol).

Las **Figuras 7.1 y 7.2** muestran gráficamente las eficiencias de eliminación mensuales para los antibióticos y los otros fármacos detectados en las aguas residuales de la EDAR.

Tabla 7.5. Eficiencia de eliminación (%) mensual y promedio para los antibióticos

	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Promedio
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

* Se ha considerado eficiencia nula de eliminación puesto que los datos son altamente variables, pero con tendencia a la no eliminación

Tabla 7.6. Eficiencia de eliminación (%) mensual y promedio para los otros fármacos

	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Promedio
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*

* Se ha considerado eficiencia nula de eliminación puesto que los datos son altamente variables, pero con tendencia a la no eliminación

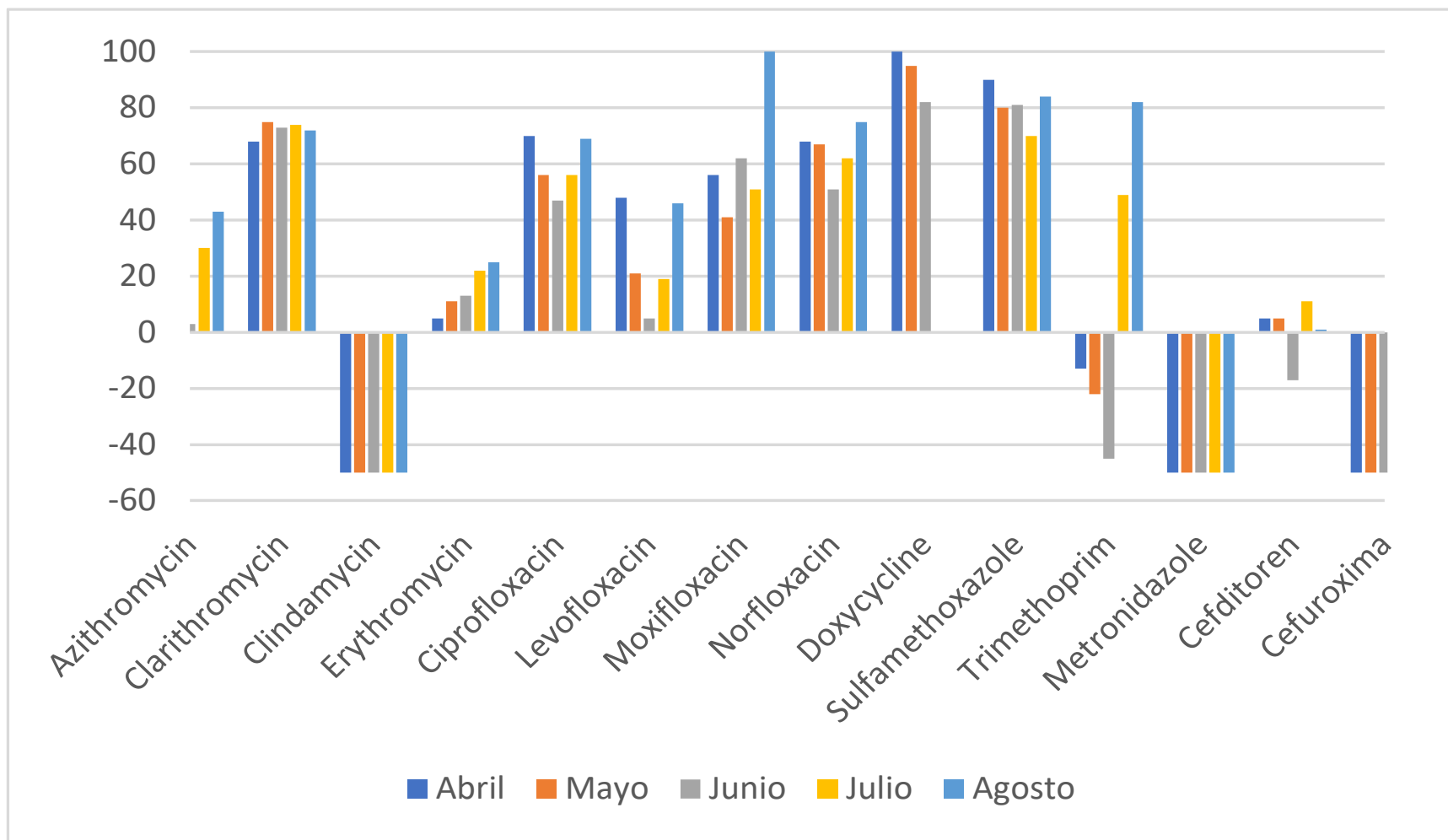


Figura 7.1. Eficiencia de eliminación mensual (%) de los antibióticos detectados en las aguas residuales de la EDAR

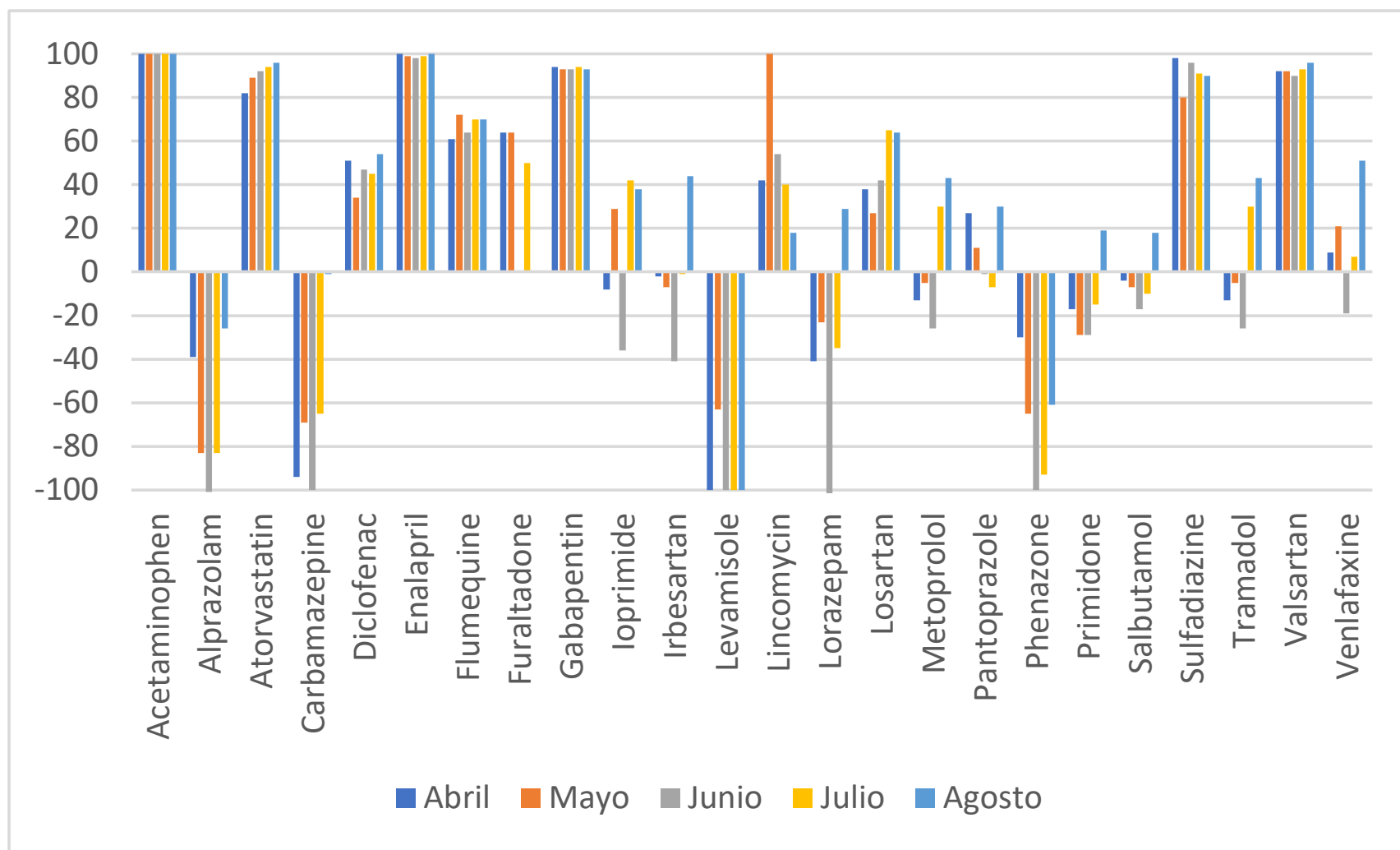


Figura 7.2. Eficiencia de eliminación mensual (%) de los otros fármacos detectados en las aguas residuales de la EDAR

8. FASE PRELIMINAR DEL ESTUDIO DE RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS

Las EDAR usan complejas comunidades microbianas para la eliminación de nutrientes, pero no hay suficiente información sobre cómo afectan a estos procesos los antibióticos y otros fármacos que puedan estar presentes en las aguas residuales. Aunque estudios recientes han abordado la problemática de antibióticos y de genes resistentes a antibióticos (ARGs), no están claro cómo varía la eficiencia de eliminación para los diferentes compuestos estudiados. La tendencia es abordar estas cuestiones comparando la abundancia y distribución de antibióticos (ej. macrólidos, fluoroquinolonas, sulfamethoxazole o chloramphenicol) con los correspondientes ARGs.

Con este Proyecto, se inicia una nueva línea de investigación en el IUPA, que requiere de estrecha colaboración con especialistas en microbiología, ya que ésta no es la especialidad del IUPA. Así, se han establecido los primeros contactos con la University of Bath, Department of Chemistry (Prof Dr. Barbara Kasprzyk-Hordern) and the Department of Biology and Biochemistry (Prof. Dr. Edward J Feil), y dentro de la propia Universitat Jaume I, con el Departamento de Medicina (Dr. Rosa de Llanos Frutos), con el objeto de estudiar y monitorizar posibles resistencias antimicrobianas (AMR). De este modo, se ha identificado una serie de genes de resistencia bacteriana (*ermB*, *qnrS*, *sul1* and *catA*) como genes de gran interés. El ARG *qnrS* confiere resistencia a las fluoroquinolonas a través del enlace con el antibiótico diana, DNA gyrase, previniendo el acceso al antibiótico (target protection). El ARG *ermB* confiere resistencia a todos los antibióticos de la familia de macrólidos a través de la metilación del ribosoma 23S (target protection). El ARG *sul1* codifica una enzima DHPS mutante, de modo que las sulfonamidas, incluido sulfamethoxazole, ya no son capaces de enlazarse (target change), con lo que confiere resistencia a esta familia de antibióticos. El gen *catA* confiere resistencia al chloramphenicol mediante codificación de la enzima acetyltransferase, la cual altera a dicho antibiótico siendo así incapaz de enlazarse con su diana, el ribosoma 16S.

Con el presente proyecto se han iniciado las primeras fases del estudio de resistencias y se ha elaborado una estrategia de colaboración, que se espera poder aplicar en próximas ediciones del Convenio entre la Consellería de Agricultura y la UJI. Se trata de una línea de gran interés sobre un tema que genera mucha preocupación, por lo que es altamente recomendable que los esfuerzos realizados en la presente investigación sirvan para avanzar hacia una línea multidisciplinar de gran futuro.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 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

ANEXO 1

Metodología analítica para antibióticos

La determinación de antibióticos se ha llevado a cabo mediante la inyección directa de las muestras de agua (previamente diluidas en función de la complejidad de las muestras), sin tratamiento/pre-concentración previo, con lo cual se minimizan notablemente los errores analíticos asociados a la etapa de tratamiento de la muestra. Ello es posible gracias a la excelente sensibilidad y selectividad alcanzadas con la moderna instrumentación analítica utilizada y al uso de un buen número de patrones internos marcados (ILIS) para la corrección del efecto matriz.

La metodología aplicada en este estudio es la que se viene aplicando en los últimos años en el IUPA, y está continuamente sometida a evaluación a través del análisis de numerosos controles de calidad (QC) con resultados satisfactorios.

Preparación de las muestras

Las muestras de agua se centrifugaron a 12000 rpm en el caso de que presentaran turbidez y se prepararon del siguiente modo:

- Influyente: 200 μL de muestra, 760 μL de agua MilliQ y 40 μL de disolución ILIS de 5 ng mL^{-1} en agua se introducen en el vial de inyección (dilución $\times 5$ de la muestra)
- Efluente: 500 μL de muestra, 460 μL de agua MilliQ y 40 μL de disolución ILIS de 5 ng mL^{-1} en agua se introducen en el vial de inyección (dilución $\times 2$ de la muestra)

Determinación UHPLC-MS/MS

El análisis de las muestras se ha llevado a cabo en un sistema UPLC Waters Acquity (Waters, Milford, MA., USA) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (TQS, Waters Micromass, Manchester, UK) utilizando la interfase electrospray (ESI) en las siguientes condiciones:

Columna: Atlantis T3 3 μm , 3.0 $\times$ 150 mm (Waters)

Fase móvil:

- Disolvente A: agua 0.1% ácido fórmico y 2 mM acetato amónico
- Disolvente B: metanol 0.1% ácido fórmico y 2 mM acetato amónico

Gradiente fase móvil:

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

Flujo fase móvil: 0.400 mL/min; Volumen de inyección: 100 µL

La **Tabla A1** muestra las condiciones MS/MS utilizadas para los 18 antibióticos seleccionados. Se indica el modo de ionización (ESI), la energía de cono, las transiciones seleccionadas -cuantificación (Q) y confirmación (q)-, y las respectivas energías de colisión (EC). En la **Tabla A2** se incluyen las condiciones de medida para los patrones internos marcados isotópicamente (ILIS) utilizados.

Tabla A1. Condiciones MS/MS correspondientes a antibióticos

Compuesto	ESI	Cono (V)	Transición Q	EC (eV)	Transición 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

Compuesto	ESI	Cono (V)	Transición Q	EC (eV)	Transición 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

Tabla A2. Condiciones MS/MS correspondientes a los ILIS utilizados para antibióticos

Compuesto	ESI	Cono (V)	Transición 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

Cuantificación

La cuantificación de los antiéticos encontrados en las aguas se ha realizado mediante el método del patrón interno (para aquellos compuestos de los que se disponía de ILIS) o del patrón externo (cuando no se aplicó ILIS), con curvas de calibrado preparadas en agua HPLC.

Las disoluciones patrón para el calibrado se han preparado mediante dilución de diferentes mezclas patrón de todos los antibióticos estudiados. El rango de concentración nominal de las curvas de calibrado ha sido ente 1 y 5000 ng L⁻¹. El valor límite de cuantificación se ha considerado el correspondiente al punto del calibrado de menor concentración (*lowest calibration level*, LCL, teniendo en cuenta la dilución de las aguas de influente (LCLx5) y de efluente (LCLx2).

Validación

El procedimiento analítico para la determinación de antibióticos se ha validado en cinco aguas diferentes de influente y otras cinco de efluente, estudiándose la exactitud y precisión del método mediante ensayos de recuperación a tres niveles de concentración (100, 500 y 5000 ng L⁻¹) (ver **Tabla A3**).

Tabla 1. Recuperaciones (%) y RSD (entre paréntesis, %) (n=5) del método UPHLC-MS/MS para la determinación de antibióticos en agua residual de entrada (influyente) y salida (efluente)

Compuesto	Nivel de fortificación (ng L ⁻¹)	Influyente	Efluente
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

Compuesto	Nivel de fortificación (ng L ⁻¹)	Influente	Efluente
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: Presencia del compuesto a concentraciones altas en el “blanco” utilizado para preparar el QC, lo que impide obtener un valor de recuperación satisfactorio

b: Concentración fuera de rango lineal

*, no detectado, por falta de sensibilidad

Los resultados obtenidos fueron en general satisfactorios, tanto para agua influente como efluente, con recuperaciones en el intervalo 70-120%. Metronidazole y cefuroxime, compuestos para los que no se disponía de su ILIS correspondiente, presentaron algún valor de recuperación ligeramente superior al 140%. Por otro lado, azythromycin no se pudo validar a los dos niveles de fortificación más bajos debido a la presencia de este compuesto en concentración elevada en el blanco de muestra utilizado para la validación.

Metodología analítica para otros fármacos

La determinación del resto de fármacos también se ha llevado a cabo mediante la inyección directa de las muestras de agua, sin tratamiento/pre-concentración previo. La metodología aplicada en este estudio es la que se viene aplicando en los últimos años en el IUPA para la determinación de fármacos en aguas residuales, y está continuamente sometida a evaluación a través del análisis de numerosos controles de calidad (QC) con resultados satisfactorios. Por consiguiente, no se ha llevado a cabo la validación de esta metodología.

Preparación de las muestras

Todas las muestras de agua se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos y se prepararon del siguiente modo:

- Influyente: 200 μL de muestra, 750 μL de agua MilliQ y 50 μL de disolución ILIS de 10 ng mL^{-1} en metanol se introducen en el vial de inyección (dilución $\times 5$ de la muestra)
- Efluente: 500 μL de muestra, 450 μL de agua MilliQ y 50 μL de disolución ILIS de 10 ng mL^{-1} en metanol se introducen en el vial de inyección (dilución $\times 2$ de la muestra)

Determinación UHPLC-MS/MS

El análisis de las muestras se ha llevado a cabo en un sistema UPLC Waters Acquity (Waters, Milford, MA., USA) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (TQS, Waters Micromass, Manchester, UK) utilizando la interfase electrospray (ESI).

Columna: Cortecs C18 2.7 μm , 100 $\times$ 2.1 mm (Waters)

Fase móvil:

- Disolvente A: agua 0.01% ácido fórmico y 1 mM acetato amónico
- Disolvente B: metanol 0.01% ácido fórmico y 1 mM acetato amónico

Gradiente fase móvil:

tiempo (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

Flujo fase móvil: 0.400 mL/min; Volumen de inyección:50 µL

La **Tabla A4** muestra las condiciones MS/MS utilizadas para los fármacos seleccionados. Se indica el modo de ionización (ESI), la energía de cono, las transiciones seleccionadas - cuantificación (Q) y confirmación (q)-, y las respectivas energías de colisión (EC). En la **Tabla A5** se incluyen las condiciones de medida para los ILIS que se han utilizado.

Tabla A4. Condiciones MS/MS correspondientes a otros fármacos

Compuesto	ESI	Cono (V)	Transición Q	EC (eV)	Transición 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

Compuesto	ESI	Cono (V)	Transición Q	EC (eV)	Transición 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

Tabla A5. Condiciones MS/MS correspondientes a los ILIS utilizados para otros fármacos

Compuesto	ESI	Cono (V)	Transición 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

Cuantificación

La cuantificación de estos fármacos se ha realizado mediante el método del patrón interno (para aquellos compuestos de los que se disponía de patrón marcado isotópicamente (ILIS)) o del patrón externo (cuando no se aplicó ILIS), con curvas de calibrado preparadas en agua HPLC:metanol (90:10, v/v).

Las disoluciones patrón de calibrado se han preparado mediante dilución de diferentes mezclas patrón de todos los antibióticos estudiados. El rango de concentración nominal de las curvas de calibrado ha sido ente 1 y 5000 ng L⁻¹. Como valor límite de cuantificación se ha considerado el correspondiente al punto del calibrado de menor concentración (*lowest calibration level*, LCL, teniendo en cuenta la dilución de las aguas de influente (LCLx5) y de efluente (LCLx2).