



**Programa de Doctorado en Hidrología y Gestión de los Recursos Hídricos.**

**ATENUACIÓN DE CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE EN  
FILTROS VERDES. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN**

**Tesis Doctoral presentada por**

**BLANCA HUIDOBRO LÓPEZ**

**Año 2023**





**Programa de Doctorado en Hidrología y Gestión de los Recursos Hídricos.**

**ATENUACIÓN DE CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE EN  
FILTROS VERDES. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN**

**Tesis Doctoral presentada por**

**BLANCA HUIDOBRO LÓPEZ**

**Directoras:**

**DRA. IRENE DE BUSTAMANTE GUTIÉRREZ**

**DRA. LEONOR NOZAL MARTÍNEZ**

**Alcalá de Henares, 21 de julio de 2023**

Nos encontramos ahora en una encrucijada, en la que divergen dos caminos [...]. El que hemos estado siguiendo desde hace tiempo es de una facilidad engañosa, una autopista llana por la que avanzamos a una gran velocidad, pero al final de la cual está el desastre. La otra bifurcación (el camino “menos transitado”) ofrece nuestra última, nuestra única oportunidad de alcanzar una meta que asegure la conservación de nuestra Tierra.

R. CARSON

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer la posibilidad de realizar esta tesis y de vivir la experiencia de estos casi 5 años a mis directoras. A Irene, por todas las facilidades y libertades que me ha dado y, a Leonor, por favorecer que pudiera apuntarme a todo lo posible para imbuirme de la química analítica... Y a las dos por discutir conmigo tantas horas como para sacarnos un doctorado en lingüística.

Esta tesis ha llegado a buen puerto gracias a la irremplazable ayuda de Virtu y Mabel, que cada una, desde su lado me han hecho aprender, discutir, justificar, buscar, aguantar... en fina investigar. Y cómo no también por ello a Raffa, cuyos conocimientos han llegado a abrumarme a veces (pero siempre tiene razón) y Ana, que ha desarrollado, aunque ella no lo crea porque dice que ya la tengo, mi afán divulgador, entre otras muchísimas cosas.

También quería agradecer a Raúl y a Jorge, las personas con quienes más mañanas pasé sujetando, enrollando y cargando mangueras, fueron momentos inolvidables para mi. Y especialmente creo que debería dar las gracias a todas las personas que diariamente me soportaron como Gloria, Ana G, Cyn, Lesly o Sara, y con menos frecuencia semanal, pero sí findesemanal a Francesco, Theresa, Meli, Ari... (lo pasamos bien). Y a todas esas personas que han hecho más llevaderas mis horas de laboratorio: Cova, Diego, Mónica, Pako...

Por último, pero en este caso más importante, quiero dar las gracias por haber conocido y convivido en IMDEA con Lucía, compañera de tesis, de café, de despacho, de palabras, de sentimientos... Nunca lo olvidaré.

Quiero dedicar este trabajo a mis familia y amigos, que me han comprendido durante todo este tiempo, dándome espacio, tiempo y amor y especialmente a iaguet, por estar siempre a mi lado a pesar de todo.

Y a ti, que me lees, espero que te guste,

Blanca

## RESUMEN

La presente Tesis Doctoral se centra en evaluar la eficacia de filtros verdes (FVs) como tratamiento de aguas residuales en la atenuación de Contaminantes de Preocupación Emergente (CPEs). Los FVs consisten en una plantación forestal de alta densidad que se riega con aguas residuales pretratadas. Es un sistema de tratamiento o solución basada en la naturaleza (SBN) en la que se aprovechan los procesos naturales (principalmente (bio)degradación, adsorción y absorción) para reducir la contaminación presente en el agua. Esta técnica aporta grandes beneficios medioambientales, como la recuperación de nutrientes, la generación de biomasa y la recarga de acuíferos, pero se debe prestar especial atención a la posible introducción de contaminantes en el medio ambiente, los cuales podrían alcanzar las aguas subterráneas e incluso viajar grandes distancias inalterados. Este trabajo se encuadra en el marco del proyecto FILVER+ (CTM2016-79211-C2-1-R) cuyo objetivo era aumentar la eficiencia de un FV piloto en la mejora de la calidad de las aguas lixiviadas, maximizando la eliminación de materia orgánica, nutrientes, CPEs y microorganismos patógenos mediante la adición de enmiendas al suelo. Una mayor eficiencia en la atenuación de contaminantes no solo permitirá que el agua tratada tenga la calidad suficiente como para incrementar los recursos hídricos subterráneos de la zona, sino que también permitirá reducir la superficie del FV, aproximándose de esta manera algo más al concepto de tecnología intensiva, siempre sin dejar de regirse por los principios de las SBN. En concreto, este trabajo estudia el comportamiento de CPEs y, además, la aparición de **productos de transformación y/o metabolitos (en adelante PTs)** a través del suelo natural y enmendado.

Con el fin de cumplir los requisitos para la presentación de la Tesis Doctoral en el formato compendio de artículos, esta memoria se ha estructurado en varios capítulos. Se ha optado por mantener el formato de cada artículo científico traducido al castellano. También se ha incluido en el texto el material suplementario, así como algunos datos adicionales para facilitar la lectura de esta memoria (las tablas y figuras conservan la notación inglesa de puntos para los decimales).

El **capítulo I**, consta de una introducción general sobre el recurso hídrico y su necesidad de reutilización, así como de la contaminación que sufre, principalmente por CPEs, junto a las vías de entrada de los mismos. También se abordan los principales tratamientos de las aguas residuales y las técnicas de análisis para la determinación de CPEs en los diferentes tipos de matrices ambientales. Se incluye además un apartado sobre la legislación aplicada a la contaminación de las aguas, su análisis y reutilización. Por último, se recogen los objetivos de la Tesis Doctoral.

En el **capítulo II**, se describen los diseños experimentales realizados durante la investigación: 1) un ensayo a “escala de campo” empleando un FV piloto para el tratamiento de aguas residuales urbanas y, 2) un ensayo a “escala de laboratorio” empleando columnas de infiltración para simular la operación en un FV.

En el **capítulo III**, se desarrolla y valida una metodología analítica para la determinación de 40 CPEs, seleccionados por una serie de criterios científico-técnicos, en muestras de aguas y suelo procedentes del FV piloto, mediante Cromatografía de Líquidos acoplada a

Espectrometría de Masas en tándem (LC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo (QqQ). El método se basa en un pretratamiento de las muestras mediante extracción en fase sólida (SPE) y, en el caso de suelo, una extracción sólido-líquido con disolvente. La aplicabilidad del método se demuestra analizando las primeras muestras de aguas y suelos obtenidas del FV piloto.

El **capítulo IV**, se describe el ensayo realizado a “escala de laboratorio” en tres columnas de infiltración de suelo sin y con enmiendas (suelo natural procedente del FV piloto y el mismo suelo enmendado con astillas de madera o con biochar) regadas con agua residual sintética, que incluye 11 CPEs seleccionados de entre los 40 CPEs anteriores (capítulo III). En este estudio se evalúa: i) la atenuación de dichos CPEs (análisis dirigido) y ii) la formación de PTs desconocidos (análisis no dirigido). El análisis dirigido consistió en la aplicación del método de análisis desarrollado en el capítulo III para obtener las concentraciones de los 11 CPEs y con ello realizar un balance total de masas que permitió evaluar su atenuación en las tres columnas. La estrategia no dirigida consistió en un análisis de las muestras empleando la Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas en tándem de Alta Resolución (LC-HRMS) junto a la utilización de herramientas estadísticas para el tratamiento de los datos obtenidos. Esta estrategia permitió encontrar las diferencias entre grupos de muestras establecidos, sin tener conocimiento previo de los PTs en que debe centrarse el estudio. Con objeto de incrementar aún más la aplicabilidad del análisis no dirigido, fue imprescindible llevar a cabo un minucioso diseño de las etapas del estudio para detectar el mayor número de compuestos. Además, hay que considerar la complejidad de este tipo de análisis debido a que los compuestos presentan propiedades fisicoquímicas muy diversas. Ello unido a la gran variabilidad de las condiciones medioambientales junto a las bajas concentraciones en las que se espera encontrar los PTs en muestras reales, fue el motivo de realizar el estudio de la búsqueda de PTs generados desconocidos a escala de laboratorio en lugar de a escala de campo.

El **capítulo V** comprende los resultados de la monitorización de los CPEs seleccionados, en muestras reales del FV piloto recogidas durante todo el periodo de duración del proyecto (casi cuatro años). Estos resultados han permitido la evaluación de la capacidad del FV en la atenuación de dichos compuestos en diferentes condiciones de operación, diferenciadas principalmente en el uso de enmienda de astillas en dos configuraciones distintas y la modificación del tipo y la frecuencia de riego del FV. En concreto se probó riego superficial por inundación de los surcos y por goteo, y frecuencia semanal y diaria.

Aunque limitadas, las observaciones descritas hasta ahora en la bibliografía sugieren que, aunque las SBN, y más concretamente los FVs, representan tecnologías prometedoras para la eliminación de CPEs, surgen algunas preocupaciones sobre la lixiviación de compuestos más persistentes y móviles. Por ello, en este capítulo se presentan los resultados obtenidos tras actuar sobre dos parámetros considerados cruciales para conseguir un rendimiento robusto del tratamiento en los FVs: el patrón y método de riego, y la "reactividad" del suelo. Así, se investigaron específicamente los efectos del manejo del agua de riego y la incorporación de enmiendas en la capacidad de atenuación de los CPEs seleccionados. Además, también se evalúan los impactos potenciales sobre los recursos hídricos subterráneos recordando que los compartimentos sobre y bajo tierra representan un

conjunto indivisible. Este estudio hace frente a la escasez de datos proporcionando una investigación que abarca casi cuatro años durante los cuales se han monitorizado múltiples matrices y compartimentos medioambientales.

Finalmente, en el **capítulo VI** se realiza una discusión general en la que se expone el hilo conductor que enlaza las investigaciones realizadas y los principales resultados obtenidos. Y, por último, el **capítulo VII** recoge las conclusiones obtenidas durante los trabajos desarrollados que dan respuesta a los objetivos propuestos. Tras la realización de los trabajos presentados en esta tesis, se incluyen una serie de recomendaciones que podrían estudiarse en el futuro para completar el conocimiento sobre la atenuación de CPEs empleando FVs y que se exponen al final del capítulo VII.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Como parte de esta tesis presentada por compendio de artículos se incluyen las siguientes publicaciones:

### Artículo 1:

**Analytical method to monitor contaminants of emerging concern in water and soil samples from a non-conventional wastewater treatment system.** Blanca Huidobro-López, Isabel López-Heras, Covadonga Alonso-Alonso, Virtudes Martínez-Hernández, Leonor Nozal, Irene de Bustamante, 2022. En: Journal of Chromatography A, no. 1671, pp. 463006. Factor de Impacto (2021): 4,601. Analytical Chemistry: 20/87 (Q1). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463006>

### Artículo 2:

**Untargeted metabolomic analysis to explore the impact of soil amendments in a non-conventional wastewater treatment.** Blanca Huidobro-López, Carlos León, Isabel López-Heras, Virtudes Martínez-Hernández, Leonor Nozal, Antonio L. Crego, Irene de Bustamante, 2023. En: Science of the Total Environment, 870C,161890. Factor de Impacto (2021): 10,754. Environmental Sciences: 26/279 (Q1). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161890>

### Artículo 3:

**Evaluation of contaminants of emerging concern attenuation through a vegetation filter managed using different operating conditions.** Blanca Huidobro-López, Virtudes Martínez-Hernández, Lucía Barbero, Raffaella Meffe, Leonor Nozal, Irene de Bustamante, 2023. En: Journal of Hazardous Materials. Factor de Impacto (2021): 14,224. Environmental Sciences: Environmental Sciences (Q1) (en revisión).

Como trabajo complementario durante la elaboración de la Tesis Doctoral se ha publicado un **capítulo de libro:**

**Impacto del uso de astillas de madera como enmienda al suelo en un filtro verde piloto: contaminantes de preocupación emergente.** Blanca Huidobro-López, Virtudes Martínez-Hernández, Lucía Barbero, Raffaella Meffe, Isabel López-Heras, Raúl Pradana, Jorge Hernández-Martín, Ana de Santiago-Martín, Irene de Bustamante, Leonor Nozal, 2021. En: Estudios en la Zona No Saturada, Vol XV, pp. 153-160. Editores: F.J. Samper Calvete, A. Paz González, J. Dafonte Dafonte, E. Vidal Vázquez. Servizo de Publicacións Universidade Da Coruña. ISBN 978-84-9749-821-0

Además, se han realizado las siguientes presentaciones en congresos nacionales e internacionales:

2019:

- Póster presentado en el 46<sup>th</sup> International Association of Hydrogeologists Congress en Málaga: *Vegetation filters to attenuate contaminants of emerging concern and to recharge the underlying aquifer.*



- Presentación oral en el 2<sup>nd</sup> *International Conference on Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Environment* en Barcelona: *Amended vegetation filters to remove pharmaceuticals from wastewater.*

2020:

- Póster presentado oralmente en el 16<sup>th</sup> *Annual Workshop On Emerging High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) and LC-MS/MS Applications In Environmental Analysis And Food Safety* en Barcelona (online): *Optimization of analytical conditions to identify transformation products (TPs) by LC-QTOF: application to monitor the wastewater treatment of a vegetation filter.*

2021:

- Presentación oral en las XV Jornadas de Investigación en la Zona No Saturada en A Coruña: *Impacto del uso de astillas de madera como enmienda al suelo en un filtro verde piloto: contaminantes de preocupación emergente.*

2022:

- Presentación oral en la X Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas (SEEM) en Córdoba: *Análisis de contaminantes de preocupación emergente y sus productos de transformación en el medioambiente. Premiada como Mejor Comunicación Oral en este Congreso.*

# ÍNDICE

## ÍNDICE GENERAL:

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO II. DISEÑO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA MONITORIZAR LOS CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE EN AGUAS Y SUELOS DEL FILTRO VERDE

CAPÍTULO IV. ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS PARA EXPLORAR EL IMPACTO DE ENMIENDAS AL SUELO

CAPÍTULO V. ATENUACIÓN DE CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE EN EL FILTRO VERDE PILOTO BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE OPERACIÓN

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

## ÍNDICE COMPLETO:

RESUMEN .....	v
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....	viii
ÍNDICE .....	x
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS .....	xvii
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. El recurso hídrico y su contaminación .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Contaminantes de preocupación emergente y productos de transformación.....</b>	<b>6</b>
2.1. Presencia en las aguas residuales urbanas .....	6
2.2. Origen y destino en el medioambiente .....	10
<b>3. Tratamientos de las aguas residuales .....</b>	<b>12</b>
<b>4. Análisis de contaminantes de preocupación emergente y productos de transformación en el medioambiente .....</b>	<b>16</b>
<b>5. Marco legislativo.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Objetivos y justificación de la tesis .....</b>	<b>21</b>
<b>7. Referencias.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO II. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>35</b>
<b>1. Escala piloto: filtro verde.....</b>	<b>36</b>

2. Escala laboratorio: columnas de infiltración .....	43
3. Referencias .....	46
<b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA MONITORIZAR LOS CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE EN AGUAS Y SUELOS DEL FILTRO VERDE.....</b>	<b>49</b>
1. Introducción.....	51
2. Materiales y métodos .....	52
2.1. Estrategia de muestreo y caracterización de las matrices.....	52
2.2. Selección de contaminantes de preocupación emergente.....	53
2.3. Reactivos, estándares y materiales .....	56
2.4. Método de tratamiento de las muestras .....	56
2.5. Análisis de las muestras por LC-MS/MS.....	58
2.6. Parámetros de validación del método .....	60
3. Resultados y discusión.....	61
3.1. Optimización del método LC-MS/MS .....	61
3.2. Optimización del tratamiento de muestra .....	63
3.3. Validación del método.....	66
3.4. Aplicación a muestras medioambientales .....	71
4. Conclusiones .....	74
5. Referencias.....	75
<b>CAPÍTULO IV. ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS PARA EXPLORAR EL IMPACTO DE ENMIENDAS AL SUELO .....</b>	<b>81</b>
1. Introducción.....	83
2. Materiales y métodos .....	85
2.1. Reactivos y estándares .....	85
2.2. Caracterización de las enmiendas empleadas .....	86
2.3. Experimento de infiltración en columnas: diseño experimental, muestreo y análisis dirigido.....	88
2.4. Estrategia metabolómica no dirigida .....	93
3. Resultados y discusión.....	96
3.1. Evaluación de la atenuación de los CPEs en las columnas de suelo natural y suelo enmendado .....	96
3.2. Desarrollo y aplicación de la estrategia no dirigida para la búsqueda de PTs en las columnas de suelo natural y suelos enmendados.....	99
4. Conclusiones .....	107
5. Referencias.....	108
<b>CAPÍTULO V. ATENUACIÓN DE CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE EN EL FILTRO VERDE PILOTO BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE OPERACIÓN .....</b>	<b>113</b>

<b>1. Introducción</b> .....	115
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	118
2.1. Descripción de la operación en el filtro verde y la toma de muestras .....	118
2.2. Tratamiento de datos y estadística .....	120
<b>3. Resultados y discusión</b> .....	121
3.1. Agua de riego .....	121
3.2. Atenuación de los contaminantes de preocupación emergente en el filtro verde	122
3.3. Aguas subterráneas.....	129
<b>4. Conclusiones</b> .....	132
<b>5. Referencias</b> .....	133
<b>CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	141
<b>CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	149
<b>CAPÍTULO VIII. ANEXOS</b> .....	153

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura I.1.</b> Estrés hídrico estimado a nivel mundial (Fuente: FAO, 2018).....	2
<b>Figura I.2.</b> Producción estimada de aguas residuales en el mundo (figura adaptada de Jones et al., 2021).....	4
<b>Figura I.3.</b> Mapa mundial del número de fármacos detectados en aguas superficiales, subterráneas, de grifo y/o potables (Fuente: Aus der Beek et al., 2016) .....	8
<b>Figura I.4.</b> Ubicación de los ríos y cuencas estudiados (n=137) en Wilkinson et al. (2021). Los puntos indican grupos de lugares de muestreo en las respectivas cuencas fluviales y los países están sombreados en función del número total de lugares de muestreo. ....	8
<b>Figura I.5.</b> Grado de cumplimiento del requisito de recolección de las aguas residuales según el Artículo 3 sobre recolección (A), el artículo 4 sobre tratamiento secundario (B) y artículo 5 sobre tratamiento terciario (C) de la directiva de tratamiento de aguas residuales (91/271/CEE) por regiones europeas (fuente: reporte CE, 2022).....	15
<b>Figura I.6.</b> Evolución del número de publicaciones durante las últimas décadas sobre la presencia de CPEs en el agua y el suelo (Fuente: Web of Science, WOS, fecha de consulta: 13/03/2023, palabras clave en la búsqueda en abstract: (emerging contaminant) OR (emerging pollutant) OR (emergent contaminants) OR (contaminants of emerging concern)). ....	17
<b>Figura I.7.</b> Evolución del número de publicaciones durante las últimas décadas sobre la presencia de CPEs y PTs/metabolitos en agua y en suelo (Fuente: Web of Science, WOS, fecha de consulta: 13/03/2023, palabras clave en abstract: ((emerging contaminant) OR (emerging pollutant) OR (emergent contaminants) OR (contaminants of emerging concern)) AND ((transformation product) OR (metabolite)) AND (water))). ....	18
<b>Figura II.1.</b> Imagen del FV situado en las instalaciones experimentales de IMDEA Agua .....	37
<b>Figura II.2.</b> Puntos de muestreo de suelo para la determinación de sus propiedades físicas (densidad y textura).....	38
<b>Figura II.3.</b> Imágenes del riego del FV por inundación (A) y por goteo (B). ....	40
<b>Figura II.4.</b> Esquema del FV, orientación, instrumentación instalada, dirección de circulación de las aguas subterráneas y puntos de muestreo de aguas.....	40
<b>Figura II.5.</b> Imágenes obtenidas durante la toma de muestras en el FV de a) aguas subterráneas, b) agua residual de riego y, c) suelo.....	42
<b>Figura II.6.</b> Imágenes de los equipos de laboratorio empleados para realizar los análisis de: A) Cromatografía Iónica (Metrhom) para iones mayoritarios; B) Espectrofotómetro (Shimadzu) para nitrógeno y fósforo total, y C) LC-MS/MS (Agilent) para CPEs. ....	43
<b>Figura II.7.</b> Imagen de las columnas empleadas en el ensayo de infiltración a escala laboratorio.....	44
<b>Figura II.8.</b> Diseño experimental de las columnas a escala de laboratorio, incluyendo las dimensiones y los puntos de colocación de los sensores de presión y oxígeno .....	45
<b>Figura III.1.</b> Esquema del FV y ubicación de los puntos de muestreo de agua residual de riego (AR), agua de infiltración a 15 y 45 cm (AI <sub>15</sub> y AI <sub>45</sub> ) y subterráneas aguas arriba (AS <sub>arriba</sub> ) y aguas abajo (AS <sub>abajo</sub> ) del FV.....	52
<b>Figura III.2.</b> Resumen esquemático del tratamiento de muestras de agua muy cargadas (AMC) y poco cargadas (APC) y muestras de suelo para la determinación de CPEs.....	58
<b>Figura III.3.</b> Cromatogramas MRM para los CPEs estudiados (disoluciones de los estándares de los CPEs a diferentes concentraciones en el rango 0.3-10 µg/L preparados en MeOH:agua (10:90 v/v)) para los: a) 33 CPEs en condiciones de ESI+ con la columna Kinetex Bifenilo; b) 7 CPEs en condiciones de ESI- con la columna Poroshell C18 .....	63

<b>Figura III.4.</b> Número de CPEs, entre los 40 estudiados, con diferentes rangos de porcentajes de recuperación en muestras fortificadas a 100 ng/L durante el estudio del efecto de a) pH de las muestras y b) cartuchos de SPE.....	64
<b>Figura III.5.</b> Diagrama de cajas y bigotes (boxplot) para la suma de concentraciones de todos los CPEs en cada punto de muestreo durante el periodo de estudio (enero 2018-marzo 2019). Número de muestras por matriz: AR=10, AI <sub>15</sub> =10, AI <sub>45</sub> =5, AS <sub>arriba</sub> =4, AS <sub>abajo</sub> =10 .....	72
<b>Figura III.6.</b> Frecuencia de detección (f, %, y-eje izquierdo) de todos los CPEs en el agua de riego (AR) y el agua de infiltración a 15 y 45 cm de profundidad (AI <sub>15</sub> y AI <sub>45</sub> ), así como las concentraciones máximas detectadas (escala logarítmica, ng/L, y-eje derecho) en las muestras de AR, AI <sub>15</sub> y AI <sub>45</sub> y aguas subterráneas aguas arriba y aguas abajo del FV (AS <sub>arriba</sub> y AS <sub>abajo</sub> ).....	72
<b>Figura IV.1.</b> Resumen esquematizado de los objetivos de este trabajo.....	84
<b>Figura IV.2.</b> Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a (1) 200, (2) 500, (3) 1000 and (4) 2000 aumentos, correspondientes al biochar.....	87
<b>Figura IV.3.</b> Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a (1) 200, (2) 500, (3) 1000 and (4) 2000 aumentos, correspondientes a las astillas .....	87
<b>Figura IV.4.</b> Montaje experimental .....	89
<b>Figura IV.5.</b> Evolución de la saturación inicial y final durante los ensayos de atenuación (semanas 1-23) y desorción (semanas 24-31) .....	90
<b>Figura IV.6.</b> Resumen de las etapas de los ensayos (similar para las tres columnas) indicando las muestras analizadas para la cuantificación de los 11 CPEs y PTs seleccionados en agua y suelo. En cada semana muestreada se recogieron 5 fracciones de agua infiltrada en cada columna (excepto en las semanas 10 y 12 que sólo se recogieron las fracciones inicial (1ª) y final (5ª). Nótese que el experimento inicial de riego sin CPEs se numeró como “0” aunque tuviera una duración de 4 semanas.....	92
<b>Figura IV.7.</b> Combinación de muestras de las columnas S, SA y SB (y abreviaturas), empleadas en el estudio de identificación de PTs, procedentes de a) riego con CPEs (experimento de atenuación) y b) riego previo sin CPEs (“blancos de muestra”) .....	94
<b>Figura IV.8.</b> Esquema de trabajo para la búsqueda e identificación de PTs en las muestras de agua .....	95
<b>Figura IV.9.</b> Balance de masa total (%) en cada columna obtenido mediante la cuantificación por el método dirigido LC-MS/MS. La pérdida de masa representa la masa no extraíble y/o (bio)degradada. *=Diferencia significativa de atenuación con respecto a la columna S ( $\alpha = 0,05$ ). Nota: la amoxicilina y la cotinina muestran una masa sorbida = 0 porque no pudieron ser analizadas en las muestras de suelo con el método analítico empleado.....	97
<b>Figura IV.10.</b> Reducción de la concentración del ión cloruro en las muestras recogidas a la salida de las columnas S, SA y SB durante los días siguientes al riego con el trazador.....	98
<b>Figura IV.11.</b> Diagramas de Venn que muestran el número total de componentes identificados con fórmula molecular en las diferentes columnas cromatográficas (Atlantis d18, Kinetex y Zic-HILIC) y dos modos de ionización, positivo (ESI+) y negativo (ESI-).....	99
<b>Figura IV.12.</b> Comparativa de los TIC obtenidos de las muestras de agua empleadas en la estrategia de análisis no dirigido para un evento (semana 14) en la columna de suelo natural (A), suelo enmendado con astillas (B) o con biochar (C) de las muestras comparadas en la estrategia no dirigida obtenidos por LC-HRMS .....	100
<b>Figura IV.13.</b> PCA de los componentes detectados en las comparaciones de muestras de riego (AR <sub>CPE</sub> ) frente a infiltración (AI <sub>CPE</sub> ) de la columna de a) suelo (S), b) suelo enmendado	

con astillas (SA) y c) suelo enmendado con biochar (SB). Las elipses se obtuvieron mediante el test $t^2$ de Hotelling.....	102
<b>Figura IV.14.</b> Diagramas de Volcán (Volcano plots) para los diferentes componentes identificadas en las comparaciones entre las muestras de agua de infiltración ( $AI_{CPE}$ ) y de agua de riego ( $AR_{CPE}$ ) en a) columna S, b) columna SA, y c) columna SB, con respecto al factor de cambio (FC) y tasa de descubrimiento falso (FDR). Los puntos negros (derecha) son compuestos significativos con mayor concentración en el agua de infiltración que en las muestras de agua de riego ( $FC > 1,2$ ), mientras que los puntos grises (izquierda) son compuestos significativos con mayor concentración en el agua de riego ( $FC < 1/1,2$ ). .....	104
<b>Figura V.1.</b> Resumen esquematizado de los objetivos propuestos en este capítulo .....	118
<b>Figura V.2.</b> Resumen de la secuencia de cambios en el manejo del FV a lo largo de todo el periodo de estudio .....	119
<b>Figura V.3.</b> Boxplot con los rangos de concentración en el agua de riego (AR) para los siete CPEs con los niveles más altos ( $> 100$ ng/L) y frecuencia de detección ( $> 60\%$ ) en los tres periodos de operación (P1-P2-P3). .....	122
<b>Figura V.4.</b> Porcentajes de atenuación en masa para los siete CPEs, más concentrados y frecuentemente detectados en el agua de riego, a una profundidad de: a) 15 cm ( $AI_{15}$ ) y b) 45 cm ( $AI_{45}$ ). Tamaño de las muestras en a) $n=10$ (P1), $n=6$ (P2), $n=10$ (P3) y en b) $n=5$ (P1), $n=6$ (P2), $n=7$ (P3). Diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha < 0.05$ ): *=en P3 vs P1; †=en ambas comparaciones P2 y P3 vs P1.....	127
<b>Figura V.5.</b> Evolución temporal de la concentración de los productos farmacéuticos con concentración media $> 1$ ng/L en todos los puntos de muestreo de AS (incluye seis de los CPEs más recurrentes y concentrados en las muestras de agua de riego). Nótese que se aplica una escala y diferente para CAF y NIC (A) que para los otros seis CPEs (B).....	130

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla I.1.</b> Resumen de los principales contaminantes del agua (figura adaptada de Appelo, C. y Postma, D. (2005)).....	4
<b>Tabla III.1.</b> Contaminantes (CPEs y PTs) seleccionados.....	55
<b>Tabla III.2.</b> Parámetros LC-MS/MS para los CPEs estudiados: tiempo de retención (TR), transiciones MRM seleccionadas para monitorización de ión cuantificador y cualificadores ( $Q$ , $q_1$ , $q_2$ ), energías de colisión (EC) y relación (abundancia) entre el ión cualificador y el cuantificador ( $q/Q$ , %).....	59
<b>Tabla III.3.</b> Resultados de la validación del método desarrollado en muestras de agua muy cargadas (AMC) y poco cargadas (APC) fortificadas a diferentes niveles de concentración ( $n=3$ ). $LOD_i$ (ng/L): límite de detección instrumental; $LOQ_i$ (ng/L): límite de cuantificación instrumental; $R$ (%): recuperación; $RSD$ (%): porcentaje de desviación estándar relativo; $MQL$ (ng/L): límite de cuantificación metodológico.....	67
<b>Tabla III.4.</b> Resultados de la validación del método desarrollado en muestras de suelo fortificadas a los dos niveles de concentración ( $n=3$ ). $R$ (%): recuperación; $RSD$ (%): porcentaje de desviación estándar relativo; $MQL$ (ng/L): límite de cuantificación metodológico .....	69
<b>Tabla IV.1.</b> Análisis elemental, área superficial y punto de carga cero (PZC) correspondientes a los materiales empleados (astillas y biochar).....	86
<b>Tabla IV.2.</b> Descripción de los grupos funcionales en las astillas .....	88
<b>Tabla IV.3.</b> Descripción de los grupos funcionales en el biochar.....	88
<b>Tabla IV.4.</b> Productos de transformación (PTs) identificados en las columnas S, SA y SB junto con sus correspondientes tasas de falso descubrimiento (FDR) y factor de cambio relevante (FC) entre el agua de infiltración ( $AI_{CPE}$ ) y de riego ( $AR_{CPE}$ ). Niveles de identificación según Schymanski et al. (2014): Nivel 1 = estructura confirmada por el estándar de referencia; Nivel 2 = estructura más probable por coincidencia de espectros MS/MS de la librerías; Nivel 3 = candidatos tentativos por coincidencia de espectros en las librerías pero con información insuficiente para una sola estructura exacta; Nivel 4 = fórmula molecular inequívoca; Nivel 5 = masa exacta de interés. ....	106
<b>Tabla IV.5.</b> Valores de la tasa de descubrimiento falso (FDR) y del factor de cambio (FC) entre el agua de infiltración ( $AI_{CPE}$ ) y el agua de riego ( $AR_{CPE}$ ) en cada columna para los nueve CPEs detectados en ESI+ con la estrategia no dirigida. ....	107
<b>Tabla V.1.</b> Resumen de los periodos de operación y las estrategias de muestreo de CPEs en las distintas matrices.....	118
<b>Tabla V.2.</b> Contenido de los CPEs (ng/g $\pm$ desviación estándar ( $n=3$ )) en las muestras de suelo recogidas en cada campaña anual a lo largo de todo el periodo de operación. ....	125
<b>Tabla V.3.</b> Balance de masa referido a 1 m <sup>2</sup> del FV. Para la masa de CPEs en el suelo, se asumió un contenido medio uniforme para cada uno de ellos en la primera capa de 15 cm. ....	126
<b>Tabla V.4.</b> Resumen de las normas de calidad ambiental (NCA) consideradas, en aguas de infiltración a 45 cm de profundidad ( $AI_{45}$ ) y en aguas subterráneas (AS), recogidas en la propuesta de Sustancias Prioritarias (SP) recientemente publicada y en la última lista de observación (LO) en la que se incluyen los CPEs seleccionados en este estudio.....	132



## ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AI</b>	Agua de infiltración
<b>AI<sub>15</sub>, AI<sub>45</sub></b>	Agua de infiltración a 15 y 45 cm
<b>AR</b>	Agua residual de riego
<b>AS</b>	Agua subterránea
<b>AS<sub>arriba</sub></b>	Aguas subterráneas tomadas aguas arriba del FV
<b>AS<sub>abajo</sub></b>	Aguas subterráneas tomadas aguas abajo del FV
<b>CE</b>	Comisión Europea
<b>C<sub>máx</sub></b>	Concentración máxima
<b>COT</b>	Carbono orgánico total
<b>CPE</b>	Contaminante de preocupación emergente
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>EC</b>	Energía de colisión
<b>EDAR</b>	Estación Depuradora de Aguas Residuales
<b>EDTA</b>	Etilendiaminotetraacetato disódico
<b>EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
<b>ESI</b>	Fuente de ionización por electronebulización
<b>FAO</b>	Organización Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FC</b>	Factor de cambio ( <i>Fold-change</i> )
<b>FDR</b>	Tasa de descubrimiento falso ( <i>False Discovery Rate</i> )
<b>FIA</b>	Análisis de inyección en flujo ( <i>Flow Injection Analysis</i> )
<b>FP</b>	Factor de preconcentración
<b>FV</b>	Filtro verde
<b>HFBA</b>	Ácido heptafluorobutírico
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de alta eficacia ( <i>High Performace Liquid Chromatography</i> )
<b>HRMS</b>	Espectrometría de Masas de Alta resolución ( <i>High-Resolution Mass Spectrometry</i> )
<b>IGME</b>	Instituto Geológico y Minero de España
<b>IS</b>	Estándar interno ( <i>internal standard</i> )
<b>LC</b>	Cromatografía Líquida ( <i>Liquid Chromatography</i> )
<b>LOD<sub>i</sub></b>	Límite de detección instrumental
<b>LOQ<sub>i</sub></b>	Límite de cuantificación instrumental
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MQL</b>	Límite de cuantificación metodológico
<b>MRM</b>	Monitorización de múltiples reacciones ( <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
<b>MS</b>	Espectrometría de Masas ( <i>Mass Spectrometry</i> )
<b>MS/MS</b>	Espectrometría de Masas en tándem
<b>NCA</b>	Normas de calidad ambiental
<b>OECD</b>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub></b>	Periodos de operación en el filtro verde piloto
<b>PCA</b>	Análisis de Componentes Principales ( <i>Principal Component Analysis</i> )

<b>PTs</b>	Productos de transformación/metabolitos
<b>Q</b>	Ion cuantificador
<b>q</b>	Ión cualificador
<b>QC</b>	Muestra control
<b>QqQ</b>	Analizador de triple cuadrupolo
<b>QTOF</b>	Analizador de cuadrupolo - tiempo de vuelo ( <i>Time-Of-Flight Quadrupole</i> )
<b>R %</b>	Recuperación del analito expresado como porcentaje
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa
<b>S</b>	Suelo natural
<b>SA</b>	Suelo enmendado con astillas
<b>SB</b>	Suelo enmendado con biochar
<b>S/N</b>	Relación señal/ruido
<b>SBN</b>	Solución basada en la naturaleza
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida ( <i>Solid Phase Extraction</i> )
<b>TR</b>	Tiempo de retención
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>ZNS</b>	Zona no saturada o vadosa del suelo

Listado de los acrónimos empleados para los CPEs estudiados:

<b>4AA</b>	4-Aminoantipirina
<b>4AAA</b>	4-Acetamidoantipirina
<b>4DAA</b>	4-Dimetilaminoantipirina
<b>4FAA</b>	4-Formilaminoantipirina
<b>ACE</b>	Acetaminofén (paracetamol)
<b>AMO</b>	Amoxicilina
<b>ATE</b>	Atenolol
<b>ATE AC</b>	Ácido atenoloico
<b>ATOR</b>	Atorvastatin
<b>BENZ</b>	Benzoilecgonina
<b>CAF</b>	Cafeína
<b>CAR</b>	Carbamazepina
<b>CAREPOX</b>	Carbamazepina epóxido
<b>CIT</b>	Citalopram
<b>CLA</b>	Claritromicina
<b>COD</b>	Codeína
<b>COT</b>	Cotinina
<b>DIC</b>	Diclofenaco
<b>E1</b>	Estrona
<b>E2</b>	17 $\beta$ -Estradiol
<b>ENA</b>	Enalapril
<b>ERI</b>	Eritromicina
<b>ESTRIOL</b>	Estriol
<b>ETINIL</b>	17 $\alpha$ -Etinilestradiol
<b>FLE</b>	Flecainida
<b>FURO</b>	Furosemida

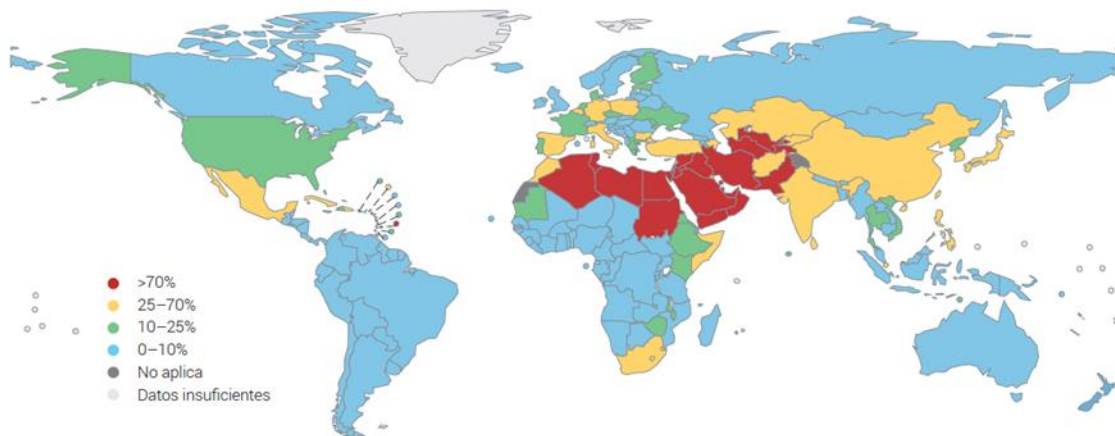
<b>IBU</b>	Ibuprofeno
<b>KET</b>	Ketoprofeno
<b>LORZ</b>	Lorazepam
<b>META</b>	Metamizol (sal de sodio o dipirona)
<b>METFOR</b>	Metformina
<b>N4ACE</b>	N4-acetilsulfametoxazol
<b>NAP</b>	Naproxeno
<b>NIC</b>	Nicotina
<b>OFLO</b>	Ofloxacino
<b>OME</b>	Omeprazol
<b>PAR</b>	Paraxantina
<b>SUL</b>	Sulfametoxazol
<b>TES</b>	Testosterona
<b>VEN</b>	Venlafaxina

**CAPÍTULO I.**  
**INTRODUCCIÓN**

## 1. El recurso hídrico y su contaminación

El agua, bien imprescindible para la vida, es un recurso escaso. De toda el agua de la Tierra, sólo un 1% del total es dulce y se encuentra directamente disponible y en estado líquido (ríos, lagos, acuíferos). Del total del agua dulce extraída cada año, aproximadamente el 70% se emplea en la agricultura, el 22% en la industria, y sólo el 8% es empleada como agua potable municipal (WWAP, 2009; FAO, 2020). Estas proporciones no han variado sustancialmente en los últimos 20 años (FAO, 2020). El último Informe Global sobre los Recursos Hídricos (World Meteorological Organization, 2022) indica que, en general, existe una tendencia global negativa del agua terrestre almacenada, y lo atribuye principalmente a la extracción excesiva de aguas subterráneas para el riego. El crecimiento de la demanda del recurso hídrico, así como el cambio climático, harán que la disponibilidad de agua, en cantidad y calidad suficientes, sea un reto cada vez mayor en el futuro.

Más de 2000 millones de personas viven en países que experimentan altos niveles de estrés hídrico (FAO, 2018). Aunque según los últimos datos del indicador 6.4.2 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) el nivel se encuentra en un valor seguro (18,6%), oculta importantes variaciones regionales. La **Figura I.1** muestra los diferentes niveles de estrés hídrico, calculados como la proporción total de agua dulce extraída anualmente respecto a la cantidad total de recursos renovables de agua dulce. El estrés hídrico sigue aumentando en las zonas que ya estaban gravemente afectadas en el último estudio (Asia meridional y central y África septentrional), superando en muchos casos el 70% (FAO, 2020).



**Figura I.1.** Estrés hídrico estimado a nivel mundial (Fuente: FAO, 2018)

Además de la amenaza que genera la captación de grandes cantidades de agua para uso agrícola, industrial y para el desarrollo urbano, la disponibilidad de agua con la calidad adecuada es una cuestión indispensable para la vida, y puede considerarse en sí misma una forma de escasez ya que impide la utilización del agua para muchos usos (Aylward et al., 2005).

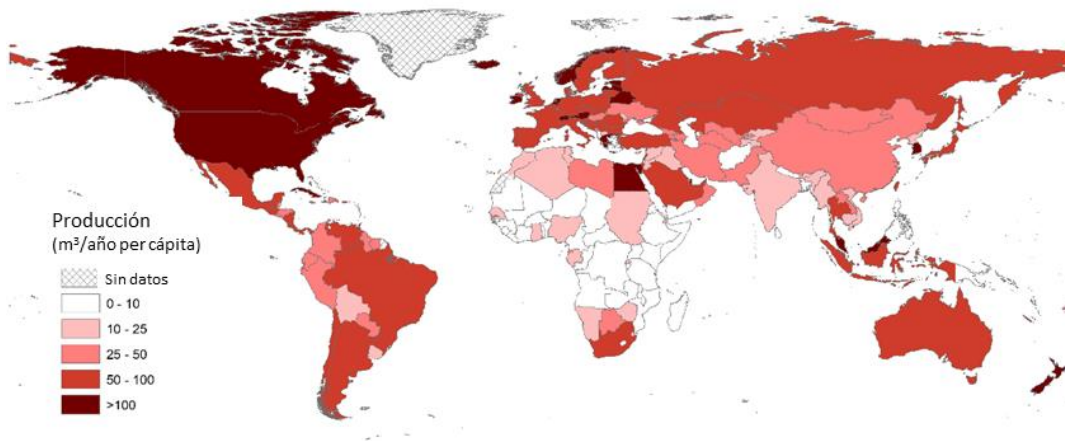
La contaminación procedente de la agricultura es uno de los problemas más graves a nivel mundial. La aplicación excesiva de agroquímicos (fertilizantes, pesticidas, etc.), que se infiltran hacia las aguas subterráneas o se arrastran por escorrentía hacia las aguas superficiales, junto a la expansión de los cultivos intensivos de regadío, dan lugar a la

degradación del ecosistema, especialmente del suelo, reduciendo su capacidad de proporcionar los servicios medioambientales que son importantes para mantener la calidad del agua. Además, el cambio climático no sólo afecta a la cantidad de agua disponible, contribuye a la degradación de la misma, ya que el aumento de la temperatura ambiental modifica los parámetros fisicoquímicos y biológicos de los que dependen los ecosistemas (Delpla *et al.*, 2009). Igualmente, las inundaciones, cada vez más frecuentes e intensas como consecuencia del cambio climático, pueden conducir a la dispersión de contaminantes por escorrentía, y el aumento del nivel del mar, a una mayor salinidad de las aguas subterráneas, entre otros efectos. Así, la degradación de la calidad del agua se traduce en riesgos ambientales, sociales y económicos que no sólo afectan a la salud humana, también limitan la producción de alimentos, reducen la funcionalidad de los ecosistemas a largo plazo y obstaculizan el crecimiento económico (UNESCO, 2015; World Meteorological Organization, 2022).

Así, se define como “contaminante” a aquella sustancia que se encuentra en el agua sin pertenecer a ella o que lo hace a niveles que pueden causar efectos negativos para la salud de los seres vivos o el medio ambiente. Esto incluye todo tipo de productos químicos, biológicos, nutrientes, etc., tanto de origen natural como sintético. También los microorganismos, especies endémicas, cambios en la temperatura, acidez o salinidad son considerados contaminación del agua, aunque no son objeto de esta tesis.

Debido a la gran variabilidad de contaminantes que pueden estar presentes en el agua tras su utilización, es muy difícil establecer una definición de agua residual en base a su composición ya que los contaminantes específicos y su concentración dependen de un gran número de factores, por lo que las aguas suelen clasificarse según su uso y su sistema de recolección: aguas residuales urbanas, que son aguas generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas, aguas residuales industriales procedentes de actividades industriales, aguas residuales procedentes de hospitales, etc. A las aguas residuales se le unen también aguas pluviales y las aguas de escorrentía urbana (en casos de alcantarillado unitario). Las aguas residuales industriales tienen una composición que claramente depende de la industria de la que procedan. Las aguas residuales urbanas, por su parte, son el reflejo del diferente uso de los compuestos (contaminantes) por la población en una aglomeración urbana. Hay que tener en cuenta que, a veces, las infiltraciones y otras aportaciones incontroladas (aguas que entran de forma directa o indirecta en la red de alcantarillado y no se puede conocer su composición) alteran la composición de las aguas residuales urbanas.

La producción de aguas residuales en el mundo se encuentra claramente relacionada con el nivel de desarrollo de los países, ya que refleja su mayor consumo del recurso hídrico. Como puede verse en la **Figura I.2**, muchos países tienen una producción de aguas residuales que supera los 100 m<sup>3</sup>/año per cápita, lo que hace, por ejemplo, que EEUU con una población de casi 332 millones, consuma 33.200 millones de toneladas de agua al año. Esto hace del tratamiento de las aguas residuales una cuestión imprescindible, tanto por la contaminación potencial de los ambientes acuáticos y del medioambiente en general, como por la necesidad de su reutilización dada la escasez del recurso.



**Figura I.2.** Producción estimada de aguas residuales en el mundo (figura adaptada de Jones et al., 2021)

Los contaminantes más frecuentes de las aguas, así como, su origen (tipo de agua residual) y la principal preocupación que genera su presencia en el medioambiente se describen brevemente en la **Tabla I.1.**

**Tabla I.1.** Resumen de los principales contaminantes del agua (figura adaptada de Appelo, C. y Postma, D. (2005))

Contaminante	Origen más frecuente	Principal preocupación
Sólidos sedimentables	Doméstico Escorrentía	Su acumulación puede originar depósitos de lodos en los sistemas de alcantarillado, en las estaciones depuradoras o incluso en ambientes acuáticos
Sólidos totales disueltos (sales)	Industrial Doméstico Infiltraciones salinas	Altos niveles de salinidad impiden aplicaciones de reutilización como el riego agrícola
Materia orgánica	Doméstico Industrial	Altos niveles conducen a un desarrollo desproporcionado de microbiota que puede consumir todo el oxígeno del agua, provocando condiciones anaeróbicas que generan malos olores, la muerte de peces y otros seres vivos, y un desajuste ecológico
Nutrientes (N y P)	Industrial Escorrentía (agricultura, ganadería, especialmente) Doméstico	Crecimiento desmesurado de algas (eutrofización), seguido de un aumento de la materia orgánica por la muerte de estas algas y el consecuente desajuste ecosistémico y deterioro general de la calidad del agua subterránea que la hace no apta para el consumo humano
Microcontaminantes (metales pesados y otros contaminantes orgánicos)	Escorrentía (agricultura, ganadería, especialmente) Industrial Doméstico	Los metales pueden bioacumularse y transmitirse a lo largo de la cadena trófica y los microcontaminantes orgánicos no biodegradables pueden ser tóxicos, carcinógenos o mutagénicos para algunos o todos los seres vivos
Microorganismos patógenos	Doméstico Escorrentía (ganadería)	Riesgo de transmisión de enfermedades transportadas a través del agua como por ejemplo el cólera o la disentería

El incremento de la productividad del agua es una necesidad urgente en especial en aquellas regiones en donde existe gran escasez de agua. Las aguas residuales tratadas y el agua desalinizada son los dos principales recursos que permiten reducir sustancialmente la presión sobre el agua natural, mitigando su escasez y disminuyendo el estrés hídrico. La desalinización tiene un elevado coste, pero se está aplicando en muchos lugares del mundo (especialmente en zonas desérticas), tanto para procesos industriales como para la agricultura y el consumo humano (por ejemplo, en Canarias, se usa para completar el suministro de agua potable obtenido de las aguas subterráneas (Santamarta et al., 2022). Puesto que el agua residual producida por la mayoría de las actividades humanas (doméstica/urbana) contiene únicamente un 1% de sustancias sólidas y coloidales disueltas y

suspendidas, es posible recuperar ese 99% de agua para otros usos. Esta visión del agua residual como una fuente fiable de reutilización para varios usos, está haciendo que la gestión de las aguas residuales no se considere únicamente un medio de tratamiento y eliminación de contaminantes sino también un proceso de reutilización, reciclaje y recuperación de recursos (WAAP, 2017). La reutilización de aguas es apropiada para muchas aplicaciones (principalmente reutilización agrícola, industrial, urbana, recreativa y recarga de acuíferos), siendo el diseño de los métodos de obtención de aguas regeneradas dependientes principalmente de las consideraciones económicas y de su uso final. Así, el agua regenerada o recuperada es aquella agua residual que ha sido sometida a diversos tratamientos con el objetivo de alcanzar una calidad final que garantice que no existen riesgos para la salud pública y/o el medioambiente por su uso. Aunque la mayoría de los proyectos de reutilización del agua son para uso no potable, existen hasta el momento algunas experiencias de implementación de reutilización potable indirecta como en Namibia y Estados Unidos de América (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México, 2021) y Singapur (NEWater, 2022).

Puesto que el riego agrícola es la actividad que más agua dulce consume en el mundo, el empleo de agua regenerada para este fin es un punto crucial para la protección del recurso hídrico. En general, el agua regenerada para este uso se obtiene de las aguas residuales domésticas ya que, por su composición, resulta una fuente más segura que las aguas residuales industriales o incluso que las aguas de escorrentía urbana o pluviales (CENTA, 2008). Aunque es difícil encontrar cifras a nivel mundial sobre la reutilización de agua para la agricultura, aproximadamente un 10% de la superficie total de tierras de regadío del mundo (más de 30 millones de hectáreas en 50 países) recibe aguas residuales sin tratar o parcialmente tratadas (FAO, 2020). En particular el ODS 6 sobre Agua Potable y Saneamiento, fija el objetivo de aumentar de forma sustancial la regeneración y la reutilización segura del agua en el mundo para 2030, con el fin de preservar las fuentes de agua de primer uso. La Unión Europea (UE) no sólo señala el ahorro como prioridad, sino también el empleo de aguas residuales urbanas regeneradas como alternativa fiable de suministro de agua con fines agrícolas (2020/741). Como parte de un enfoque integrado de la gestión de agua, también se fomenta su uso para el riego de parques y jardines, actividades de recreo como campos de golf o cualquier otra aplicación que no requiera de una alta calidad, lo cual no sólo permite reducir la escasez de agua, también amplía su ciclo de vida, ayudando a preservar los recursos hídricos y a cumplir con el objetivo de economía circular. Según reportó la UE en 2015 (Water Reuse Report, 2015), en la actualidad, se reutilizan anualmente unos 1.000 hm<sup>3</sup> de aguas residuales urbanas depuradas, lo que representa aproximadamente el 2,4% de los efluentes de aguas residuales urbanas depuradas y menos del 0,5% de las extracciones anuales de agua dulce de la UE. Pero el potencial de la UE es mucho mayor, ya que se estima en unos 6.000 hm<sup>3</sup>, seis veces el volumen actual. Tanto los Estados miembros del sur (España, Italia, Grecia, Malta y Chipre), como los del norte (Bélgica o Alemania), cuentan ya con numerosas iniciativas de reutilización del agua para riego, usos industriales y recarga de acuíferos. Chipre y Malta reutilizan actualmente más del 90% y el 60% de sus aguas residuales, respectivamente, mientras que Grecia, Italia y España reutilizan entre el 5% y el 12% de sus efluentes. A pesar de ello, según datos publicados por el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (2021) se reportó una reutilización de agua en España en los



periodos 2018-19 y 2019-20 de unos 400 hm<sup>3</sup>, cifra muy similar a lo observado casi 20 años atrás (TYPESA, 2004). Por lo tanto, resulta necesario que las políticas de agua a escala mundial fomenten la reutilización, la disminución del consumo de agua, en todos los sectores, y el aumento del tratamiento de la mismas antes de su devolución al medioambiente.

A pesar de aportar grandes beneficios a la agricultura, la eliminación incompleta de contaminantes en las plantas de tratamiento de aguas y residuos (Cabeza *et al.*, 2012; Patiño *et al.*, 2014; Noguera-Oviedo *et al.*, 2016; Ahmed *et al.*, 2021), del que proceden los efluentes y lodos aplicados al suelo, hace que éstos puedan transferirse al medio ambiente (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009; Clarke y Smith, 2011) y generar un impacto en la contaminación difusa (Glassmayer *et al.*, 2005). Las aguas superficiales dulces (ríos, lagos, etc.) se contaminan principalmente por vertidos de aguas insuficientemente tratadas o por escorrentía de zonas contaminadas, mientras que la principal fuente de contaminación de las aguas subterráneas, aparte de la intrusión de agua salada en acuíferos costeros, procede de la lixiviación de contaminantes a través del terreno, desde las aguas superficiales, cuando los ríos son perdedores, y de retornos de riego, así como de la desorción de aquellos que se encontraban retenidos en suelo y que viajan con el agua que se infiltra o son arrastrados hacia aguas superficiales (Chefetz *et al.*, 2008; Calderón-Preciado *et al.*, 2012; Estévez *et al.*, 2012; Hdidou *et al.*, 2022).

## 2. Contaminantes de preocupación emergente y productos de transformación

### 2.1. Presencia en las aguas residuales urbanas

La aparición de la preocupación y del concepto de contaminante emergente puede ser atribuida a la escritora, ecologista, científica y bióloga marina Rachel Carson, que en 1962 demostró en su libro “La primavera silenciosa” entre otras muchas cosas, que el uso generalizado del insecticida DDT había conducido a la muerte y desaparición de muchas especies vegetales en Estados Unidos, aunque en ese momento no pudo demostrar su presencia en muestras ambientales dada la inexistencia de técnicas analíticas adecuadas. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) comenzó a incluir en 2008 el término de CPE (*Contaminant of Emerging Concern*, CEC) que ha remplazado al término más simple de contaminante emergente empleado hasta entonces (USEPA Emerging Contaminants Workgroup, 2008), y, en 2014, definió a los CPEs como “sustancias químicas que no se habían detectado previamente o se están detectando en niveles que pueden ser significativamente diferentes a los esperados y el riesgo para la salud humana y el ambiente asociado con su presencia, frecuencia de ocurrencia o fuente puede no ser conocida”.

En general, se define como CPE toda sustancia química sintética o de origen natural cuya presencia puede suponer un riesgo potencialmente dañino para el medioambiente y/o los seres vivos, que carece de una legislación vigente que incluya medidas para su control, y que se encuentra en los compartimientos ambientales del orden de unos pocos ng/L (Kümmerer, 2008; Li, 2014; Petrie *et al.*, 2015; Aus der Beek *et al.*, 2016; Noguera-Oviedo *et al.*, 2016; OECD, 2017; López-Pacheco *et al.*, 2019). Además, una característica que poseen es que, aunque su

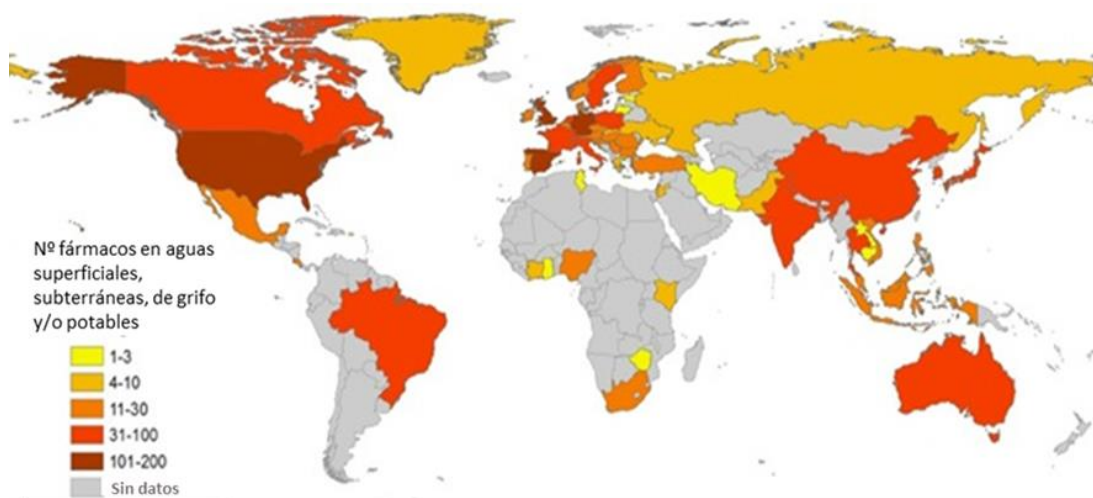
introducción en el medioambiente sea muy paulatina (debido a elevadas tasas de transformación), su presencia, y por tanto efecto, puede ser persistente debido a su introducción continuada. Por todo ello, no se trata de nuevas sustancias sino de compuestos que hasta la actualidad no se habían podido determinar y que gracias al avance en los últimos años de las técnicas de análisis pueden ser detectados y cuantificados. Bajo la denominación de CPE se incluyen productos farmacéuticos, de cuidado personal, hormonales, plastificantes, surfactantes, plaguicidas, antiparasitarios, biocidas, aditivos industriales antioxidantes, retardantes de llama, protectores anticorrosivos, aditivos alimentarios, drogas de abuso, detergentes, sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas (PFAS), micro y nanoplasticos o productos derivados del propio proceso de desinfección de las aguas.

La vulnerabilidad de un medio acuático a un contaminante depende de varios factores entre los que se incluyen las propiedades y concentración de los compuestos y las propiedades del ecosistema al que llegan. La repercusión que pueden originar va desde pequeños trastornos hasta grandes daños ecológicos (Orta, 2002). Es de resaltar que en muchos casos las consecuencias de la presencia de CPEs en el medioambiente no están aún claras, pero en otros casos, existen evidencias de su riesgo. El riesgo se determina atendiendo a la peligrosidad y a la concentración de las sustancias en el agua. En relación con la peligrosidad, bastantes CPEs se comportan como disruptores endocrinos, aunque pueden tener otros efectos tóxicos. La mayoría de los estudios de ecotoxicología realizados hasta la fecha comprenden distintos organismos como peces, invertebrados de agua dulce, algas, moluscos e incluso células embrionarias (De la Cruz, 2013). Además, los CPEs pueden originar productos de transformación y/o metabolitos, los cuales también pueden llegar al medioambiente y suponer un riesgo. En algunos casos, estos compuestos son desconocidos y podrían ser incluso más peligrosos que los compuestos de partida, por lo que la falta de conocimiento sobre sus posibles efectos en el ecosistema es prácticamente total. La escasa información reportada sobre su presencia y sus consecuencias en el medio ambiente es, en parte, debida a la falta de metodología analítica para su determinación. En la presente Tesis Doctoral se denominará de forma genérica como **PTs** tanto a los productos derivados de la transformación directa (generalmente abiótica) de los compuestos de partida, como a los metabolitos generados durante la descomposición biótica (metabolismo).

A continuación, se describen de forma resumida, los principales tipos de CPEs (objeto de esta Tesis Doctoral), los cuales se encuentran con bastante frecuencia en aguas residuales urbanas, y sus posibles efectos conocidos sobre los seres vivos y el medioambiente en general.

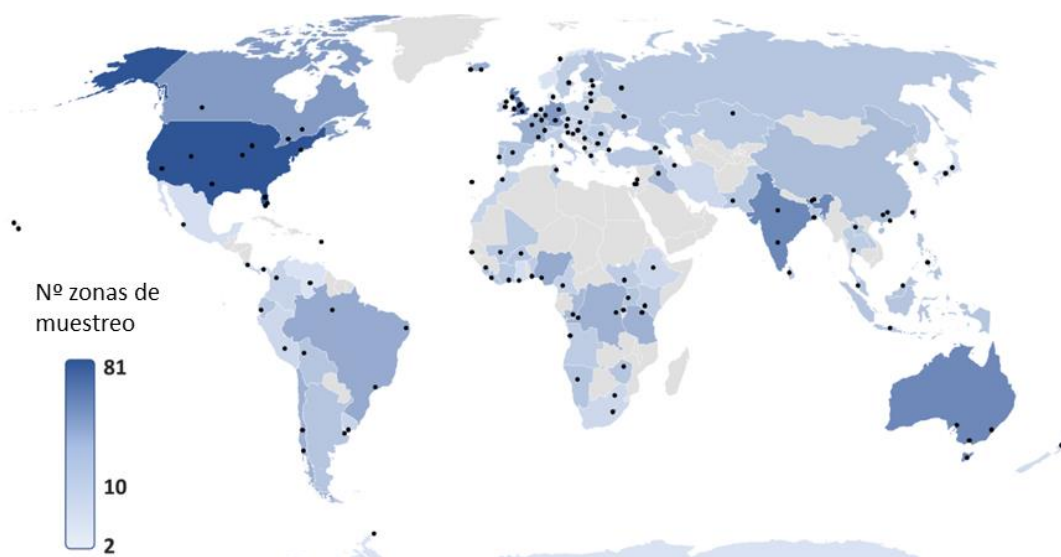
**Productos farmacéuticos:** En este grupo se incluyen todos los fármacos de origen natural y sintético consumidos por el ser humano y los animales. Los fármacos son el grupo de CPEs que más se estudian actualmente ya que, además de administrarse más de 2000 fármacos diferentes en el mundo, debido a las características de su diseño, suelen ser estables, actuar a dosis bajas, producir una respuesta biológica y atravesar las barreras biológicas. A escala mundial, los fármacos de prescripción humana más empleados son los analgésicos, los hipertensivos y los antimicrobianos (Gil *et al.*, 2012). Los analgésicos, además, son los fármacos de mayor automedicación (ASHP, 1999), especialmente el acetaminofén (paracetamol) y otros analgésicos como los antiinflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno), y, por ende, se encuentran entre los más detectados en el medioambiente (López-Pacheco *et al.*, 2019). También se observan recurrentemente los

hipertensivos ya que la hipertensión arterial es la enfermedad cardiovascular más común en el mundo (Ternes *et al.*, 2003). Por último, es importante resaltar la clase terapéutica de los antibióticos, que se producen y consumen cada vez en mayor medida en el mundo, tanto para el tratamiento contra microorganismos patógenos en animales y humanos como para la preservación de alimentos. Las tetraciclinas, los aminoglicósidos, los macrólidos y los betalactámicos, son las familias de antibióticos estudiados en mayor número en las aguas residuales (Gil *et al.*, 2012). La **Figura I.3** muestra el número de fármacos en el medio acuático (aguas superficiales, aguas subterráneas y/o agua de suministro/potables) encontradas en concentraciones superiores a su límite de detección (Aus der Beek *et al.*, 2016). Como puede observarse, en varios países europeos y en Estados Unidos se han encontrado más de 100 sustancias farmacéuticas diferentes.



**Figura I.3.** Mapa mundial del número de fármacos detectados en aguas superficiales, subterráneas, de grifo y/o potables (Fuente: Aus der Beek *et al.*, 2016)

Sin embargo, es importante resaltar que el número de fármacos detectados se ve claramente influenciado por el número de estudios realizados y la variedad de compuestos analizados en los diferentes países como se observa en la **Figura I.4**.



**Figura I.4.** Ubicación de los ríos y cuencas estudiados ( $n=137$ ) en Wilkinson *et al.* (2021). Los puntos indican grupos de lugares de muestreo en las respectivas cuencas fluviales y los países están sombreados en función del número total de lugares de muestreo.

Un gran número de fármacos (como por ejemplo determinados antidepresivos, analgésicos y antiparasitarios) entrañan riesgos medioambientales y ecotoxicológicos, pudiendo afectar directa o indirectamente a la supervivencia de las especies incluso a bajas concentraciones (Desbiolles *et al.*, 2018). Todo ello tiene, no sólo consecuencias directas sobre las especies afectadas, sino también sobre los ciclos de nutrientes en los que participen dichas especies, e incluso, otros efectos desconocidos. Aunque todavía no se ha encontrado un efecto directo en la salud humana de los fármacos presentes en el medioambiente, y es poco probable que exista dadas las concentraciones tan bajas a las que se encuentran, no puede ignorarse los posibles efectos de la exposición a largo plazo en poblaciones vulnerables (OMS, 2017). Sin embargo, lo que sí se ha observado y representa una amenaza, es la resistencia de los microorganismos a los antibióticos, provocado por su continua liberación al medioambiente.

**Hormonas naturales y sintéticas:** Este grupo incluye, tanto hormonas de origen humano y animal, segregadas por los testículos, los ovarios, la placenta y la corteza adrenal, como las hormonas sintéticas de amplio uso tales como los anticonceptivos (Vulliet y Cren-Olivé, 2011). Estas últimas también podrían considerarse dentro del grupo de compuestos farmacéuticos. Los más investigados por su ocurrencia en las aguas residuales, superficiales y subterráneas (Kim *et al.*, 2007; Krein *et al.*, 2012) son, entre los estrógenos, la estrona, el 17- $\beta$ -estradiol, el estriol o el 17- $\alpha$ -etinilestradiol y, entre los andrógenos, la testosterona, androstenoide, oxadrolona y nandrolona. En general, dada su naturaleza, la mayoría de las hormonas naturales y sintéticas pueden llegar a actuar como disruptores endocrinos, es decir, pueden interactuar o interferir con la acción hormonal normal de los seres vivos generando consecuencias negativas, de mayor o menor importancia para ellos, los ecosistemas y las cadenas tróficas, como la masculinización o feminización de especies, la reducción del peso y la altura de los individuos, el cambio en el comportamiento natural o en la producción de algunos compuestos esenciales o no para su supervivencia.

**Drogas ilícitas:** Entre las drogas más estudiadas están la anfetamina, la cocaína y sus metabolitos. Su paso al medioambiente es similar al de todos los CPEs aunque en este caso, su elevada presencia en las aguas residuales también puede proceder de la descarga accidental o deliberada de laboratorios clandestinos de drogas (González-Mariño *et al.*, 2012). Además, algunas agencias gubernamentales como la OMS, la EPA o la UE han aceptado la presencia de drogas de abuso en bajas concentraciones (trazas) en aguas superficiales que son captadas posteriormente para consumo humano. De hecho, se ha confirmado la presencia de drogas ilícitas en las aguas de grifo en Estados Unidos y en varios países europeos (Muñiz-Bustamante *et al.*, 2022). Los efectos que producen las drogas sobre el medioambiente pueden ser tóxicos a largo plazo, aunque aún no ha sido demostrado. Hasta ahora, la determinación de su concentración en el medioambiente, y concretamente en las aguas residuales, se emplea comúnmente como herramienta indirecta para estimar los niveles de consumo de estas sustancias en aglomeraciones urbanas.

**Compuestos “Estilo de vida”:** Se trata de una serie de compuestos que se denominan así porque su uso no es directamente médico (como los fármacos) ni recreativo (como las drogas). Entre los más estudiados se incluyen la cafeína, la nicotina y sus metabolitos, pero también otros como los edulcorantes artificiales (acesulfamo, sacarina, etc.). Aunque la

caféina se usa en ocasiones con fines terapéuticos, la mayor parte es introducida al medioambiente a través de alimentos y bebidas. La principal fuente de la nicotina proviene del tabaco. Además, sus metabolitos principales, paraxantina y cotinina, respectivamente, se detectan en aguas residuales de entrada a Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) en concentraciones casi tan elevadas como sus compuestos de partida. Afortunadamente su eliminación en los tratamientos de aguas residuales suele ser elevada (Evgenidou *et al.*, 2015). En general no se ha encontrado un efecto negativo de estas sustancias sobre el medioambiente, pero en algunos casos las concentraciones detectadas en el medioambiente son muy elevadas (del orden de mg/L), por lo que no se debe abandonar su vigilancia.

## 2.2. Origen y destino en el medioambiente

El origen de los CPEs en el medio acuático es diverso, aunque suele considerarse como principal causa la actividad humana, por ello las aguas residuales urbanas son una fuente de emisión significativa. Los CPEs de origen antropogénico (y uso humano y/o animal) constituyen la mayor parte de los CPEs encontrados en aguas naturales en efluentes de EDAR y Estaciones Potabilizadoras de Agua (ETAP) (López-Pacheco *et al.*, 2019).

La mayor fuente u origen de la emisión de CPEs al medio ambiente (principalmente a las aguas y los suelos) es su consumo y excreción en orina y heces, aunque la vía concreta difiere de si se trata de un CPE de uso humano o veterinario. En resumen, cuando el ser humano ingiere los CPEs, éstos sufren una serie de transformaciones metabólicas (bioquímicas) para su asimilación y posterior excreción del organismo tanto del producto ingerido como de los metabolitos generados (Kagle *et al.*, 2009). La ruta que siguen los CPEs comienza, por tanto, cuando éstos pasan a las redes de saneamiento, y llegan a las EDAR, donde por lo general no se eliminan por completo. En función del tipo de CPE y del método de tratamiento de las aguas llevado a cabo, estos contaminantes pueden ser más o menos persistentes en los efluentes y/o en los lodos de depuradora, haciendo que lleguen a las aguas y/o suelos donde se descargan dichos efluentes y/o lodos en mayor o menor medida. La ruta que siguen los CPEs de uso veterinario comienza también por su metabolismo y excreción, pero alcanzan el suelo y las aguas superficiales directamente, por descarga directa o por escorrentía superficial. En ambos casos, pueden, posteriormente, viajar con las aguas superficiales o infiltrarse a través del suelo hasta los acuíferos (Chefetz *et al.*, 2008; Estévez *et al.*, 2012; Lapworth *et al.*, 2012). También alcanzan las aguas subterráneas los CPEs presentes en los purines y estiércoles producidos por la industria ganadera o abonos procedentes de lodos de depuradora, así como las infiltraciones de fosas sépticas en mal estado (Eckstein y William, 2011). Las fugas en redes de alcantarillado (Wolf *et al.*, 2012) o la eliminación de residuos sólidos en vertederos incontrolada son otras posibles rutas de entrada de los CPEs al medioambiente (Ruhoy y Daughton, 2008). Además, todavía tienen lugar una gran cantidad de vertidos no autorizados que suponen una fuente de entrada adicional incontrolable de CPEs al medio. Así, una gran variedad de CPEs han sido encontrados en aguas superficiales que reciben directa o indirectamente efluentes de depuradora (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009; Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011; Cabeza *et al.*, 2012; Lin y Gan, 2011; Blair *et al.*, 2015; Petrie *et al.*, 2015; Wang y Wang, 2016; Senta *et al.*, 2017; WWAP, 2017; Snow *et al.*, 2020; Bayati *et al.*, 2021), en efluentes destinados a actividades de reutilización como el riego agrícola

(Calderón-Preciado *et al.*, 2011; De Santiago-Martín *et al.*, 2020; Meffe *et al.*, 2021) o la recarga de acuíferos (Teijón *et al.*, 2010; Cabeza *et al.*, 2012; Estévez *et al.*, 2012; Bertelkamp *et al.*, 2014; Valhondo *et al.*, 2020), así como también en suelos y sedimentos (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011; Calderón-Preciado *et al.*, 2011; González-Naranjo y Voltes, 2013; Li, 2014; Martínez-Piernas *et al.*, 2018).

De forma general, los CPEs que se encuentran en las aguas pueden quedarse retenidos en los sólidos (suelos, sedimentos, materia orgánica, etc.), ser degradados abióticamente (por procesos de hidrólisis, fotólisis, oxidación, cloración u otros tipos de reacciones químicas) o bióticamente (por metabolismo humano, animal, vegetal, microbiano, principalmente) o, en el peor de los casos, viajar grandes distancias, transformados o inalterados, contaminando aguas superficiales y subterráneas y afectando por tanto a todos los ecosistemas presentes. A lo largo del ciclo del agua, también ocurren una serie de fenómenos que pueden contribuir a su atenuación (Clothier y Green, 2005; Maeng *et al.*, 2011), y con ello, a la disminución del impacto sobre el medioambiente, entre los que se incluyen algunos como la fotodegradación, la hidrólisis, la bioacumulación (retención en tejidos de seres vivos), etc. Es importante resaltar que PTs originados por cualquiera de los procesos mencionados, llegan de igual modo a las aguas residuales ocasionando, en numerosas ocasiones, los mismos riesgos y presentando los mismos problemas o más de persistencia que los CPEs de partida (Celiz *et al.*, 2009; Michael *et al.*, 2014; Tak *et al.*, 2020). Además, los PTs también pueden presentar diferentes propiedades fisicoquímicas y/o biológicas debido a su diferente estructura y, potencialmente más toxicidad, que los compuestos de partida (La Farré *et al.*, 2008).

Los CPEs que se infiltran a través de la zona no saturada del suelo (ZNS), que comprende desde la superficie del suelo hasta el inicio de la zona saturada y que está constituida por una fase sólida (principalmente partículas y minerales y materia orgánica), una líquida (agua y las sustancias que lleva disueltas) y una gaseosa (aire, vapor de agua y otros gases), sufren una serie de fenómenos antes de alcanzar las aguas subterráneas. Los procesos naturales que más afectan al destino de los CPEs presentes en el agua son los procesos de retención (absorción, adsorción y desorción), principalmente en partículas minerales y materia orgánica (Martínez-Hernández *et al.*, 2014) y los procesos de biodegradación microbiana (Onesios *et al.*, 2009; Martínez-Hernández *et al.*, 2016), que se describen brevemente a continuación. Ambos fenómenos dependen fundamentalmente de las características de los contaminantes, de las propiedades del suelo (Drillia *et al.*, 2005; Karickhoff *et al.*, 1979) y del manejo del agua (Estévez *et al.*, 2010) afectando así a la mayor o menor presencia de cada CPE en los distintos compartimientos ambientales.

**Adsorción-Absorción.** Aunque no existe en castellano el término “**sorción**” se empleará en esta memoria para englobar los procesos de adsorción sobre superficies y los procesos de absorción en los que el contaminante se introduce dentro del absorbente ya sea por una reacción química o un proceso físico (disolución). Los principales factores que controlan los fenómenos de sorción-desorción son las propiedades y características de las fases sólida (sorbente) y líquida y de los CPEs. La cinética de sorción, aparte de los citados factores, depende además del espesor de la lámina de agua que se genera en torno a las superficies sólidas, así como de las propiedades de difusión de los contaminantes a su través. La sorción tiene lugar por mecanismos de diversa índole y pueden estar debidos a la interacción con materia orgánica (y biomasa), con las superficies de partículas minerales o con las raíces de la vegetación (en caso de haberla). La adsorción ocurre por mecanismos físicos de atracción

(como las fuerzas de Van de Waals) o por reacciones químicas (conlleva una transferencia de electrones entre adsorbente y adsorbato). La adsorción física es por lo general reversible y la quimisorción, irreversible, aunque en este caso, de existir desorción iría acompañada de un cambio químico del adsorbato (es decir, se genera un PT). Además, la sorción provoca el retardo de contaminantes durante la infiltración, lo que permite más tiempo para que ocurran otros procesos de atenuación como la (bio)degradación (Valhondo *et al.*, 2020). Otros ejemplos de interacción y retención de los CPEs en el medio agua-suelo son la formación de complejos de superficie, los procesos de transferencia de carga, las interacciones ion-dipolo o los puentes de hidrógeno, entre otras.

**Biodegradación.** Los factores principales que controlan la biodegradación son la biodisponibilidad y la toxicidad de los CPEs, su estructura química y capacidad de difusión molecular, las condiciones del medio y la actividad enzimática. La biodisponibilidad depende tanto de la solubilidad del CPE como de su capacidad de retenerse. La toxicidad influye ya que, aunque un CPE sea biodegradable, si su metabolismo implica la aparición de sustancias nocivas puede generar un decaimiento microbiano que dificulta la biodegradación del carbono orgánico, incluidos los CPEs. La influencia de la estructura química de los CPEs se debe a que existen grupos funcionales más fácilmente biodegradables que otros o con mayor o menor capacidad de difusión molecular en la película de agua. Las condiciones del medio, especialmente el pH, la temperatura o la cantidad de oxígeno, y las condiciones de operación, no sólo influyen sobre las propiedades de los CPEs (estado de ionización, hidrofobicidad, etc.), sino que también afectan a la actividad enzimática de los microorganismos responsables de su biodegradación (Teerlink *et al.*, 2012; Tiwari *et al.*, 2017; Clyde *et al.*, 2021). Los principales microorganismos responsables de la biodegradación de compuestos orgánicos pertenecen a los reinos *bacteria* y *fungi* (Hemond y Fechner-Levy, 2000). Se encuentran dispersos en el agua o bien adheridos a la superficie de las partículas del suelo formando una película de mayor o menor espesor (*biofilm*) y son capaces de degradar los CPEs por asimilación directa como fuente de carbono y energía (metabolismo) o por degradación simultánea con otra fuente de carbono que actúe como sustrato (co-metabolismo). Normalmente una comunidad microbiana que ha estado en contacto con un CPE tiene más posibilidades de adaptarse para la liberación de enzimas capaces de biodegradarlo por lo que se logran eliminaciones más eficientes del mismo (Kümmerer, 2008). Las rutas metabólicas (o co-metabólicas) de los diferentes microorganismos son muy variadas y son la causa de la obtención de unos PTs u otros, ya que la degradación de algunos de estos contaminantes no es completa (hasta mineralización, es decir, degradación total a sustancias inorgánicas) y se generan una serie de productos de distinta naturaleza. La biodegradación puede ocurrir bajo condiciones aerobias y/o anaerobias y ha sido reportada como el principal mecanismo de eliminación de CPEs en diferentes tipos de tratamientos de aguas residuales que implican a los medios agua y suelo (Du *et al.*, 2014; Tiwari *et al.*, 2017; Clyde *et al.*, 2021) y también en otros más convencionales (Kim *et al.*, 2014).

### 3. Tratamientos de las aguas residuales

El método de tratamiento de las aguas residuales condiciona la mayor o menor eliminación de su carga contaminante y, con ello, como se comentaba en el apartado anterior, su mayor o menor descarga en el medioambiente.

Las etapas esenciales del tratamiento de aguas residuales en las EDAR tienen como objetivo fundamental la reducción de los sólidos (pretratamiento o tratamiento primario), la materia orgánica (tratamiento secundario o biológico) y la carga de nutrientes y microorganismos patógenos (tratamientos terciarios o avanzados), contenidos en el agua residual, antes de devolverla al ciclo hidrológico. Estos procesos eliminan materia orgánica y nutrientes en concentraciones del orden de g/L (Patiño *et al.*, 2014), valores muy elevados si se comparan con las concentraciones habituales en las que se encuentran los CPEs (niveles del orden de unos pocos ng/L). Sin embargo, muchos de ellos, especialmente los avanzados, se han demostrado capaces de eliminarlos en parte, al ser aplicados a efluentes secundarios (Bolong *et al.*, 2009; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009; Wang y Wang, 2016; Rizzo *et al.*, 2019). Entre ellos, la ozonización es una de las técnicas más estudiadas para la desinfección y también para la eliminación de CPEs (Patiño *et al.*, 2014), aunque las últimas tendencias en tratamientos avanzados en EDAR, especialmente aquellas que disponen del capital suficiente para renovación de sus tecnologías, avanzan en el empleo de tratamientos combinados ya que permiten una eliminación más eficaz de los CPEs de las aguas residuales (Ahmed *et al.*, 2017, 2021). Ejemplos de ello son los biorreactores de membrana (conocidos por sus siglas en inglés, MBR, *Membrane Bioreactors*), que combinan procesos de degradación biológica en lodos activos con una separación sólido-líquido a través de procesos de ultrafiltración (Petrovic *et al.*, 2003; Tambosi *et al.*, 2010; Miralles-Cuevas *et al.*, 2014) o la combinación de una etapa de adsorción con carbón activo seguida de una membrana de ultrafiltración (Gil *et al.*, 2012) o una de radiación UV con ozonización (Ternes *et al.*, 2003).

Por lo general, los procesos de tratamiento de aguas residuales descritos anteriormente son intensivos y consumen mucha energía. Sin embargo, existen otros tipos de tratamientos que tienen un consumo nulo o muy bajo de energía, aunque por lo general requieren grandes superficies de implantación (tratamientos extensivos). Además, permiten un mantenimiento y explotación muy simples, tienen un funcionamiento eficaz y estable frente a las grandes oscilaciones de caudal y carga en el influente a tratar y la gestión de los lodos generados en estos procesos de depuración es muy sencilla o inexistente, lo que las convierte en tecnologías óptimas para aplicar en pequeñas aglomeraciones urbanas (Moreno, 2003). Existen múltiples tratamientos de este tipo: i) los que recurren al empleo del suelo como elemento depurador en sistemas de aplicación superficial o subsuperficial (es el caso de los FVs), ii) los que se basan en la filtración a través de un carbón natural (como los filtros de turba), iii) los que tratan de imitar los procesos naturales de depuración que se dan en ríos y lagos (sistemas de lagunaje), y iv) los que simulan las condiciones propias de los humedales naturales (humedales artificiales) (CENTA, 2008).

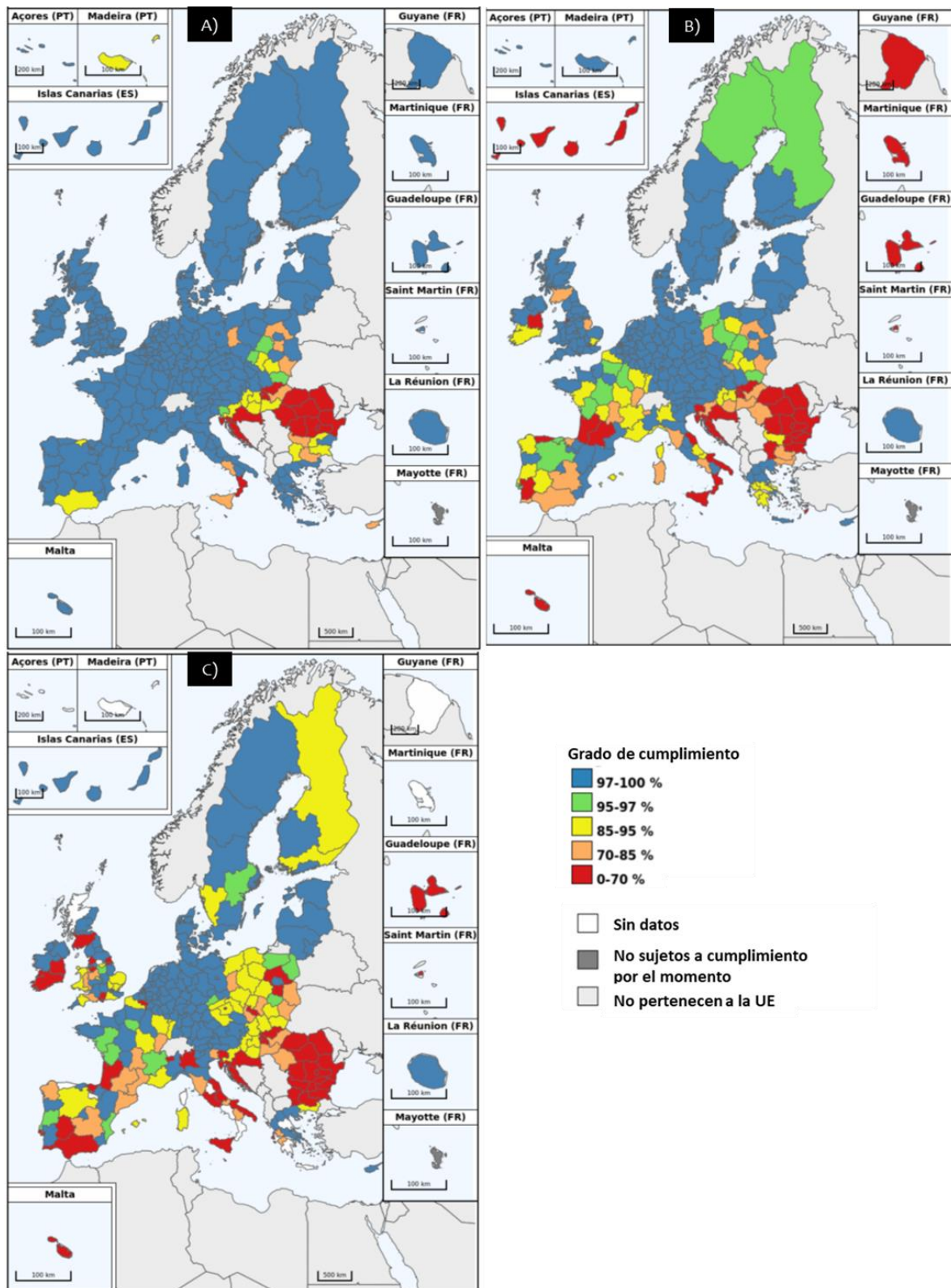
Los procesos que intervienen en estos tratamientos extensivos incluyen a muchos de los que se aplican en los tratamientos convencionales (sedimentación, filtración, adsorción, precipitación química, intercambio iónico, degradación biológica, etc.), junto con procesos propios de los tratamientos naturales (fotosíntesis, fotooxidación, asimilación por parte de las plantas, etc.) (IGME, 1995). Por ejemplo, las lagunas aerobias o de maduración recurren a la oxigenación por medio de la fotosíntesis, en humedales a la difusión de oxígeno se produce por las raíces de las plantas, o en FVs, a la alternancia de ciclos de mojado-secado. Por ello, todos estos tratamientos se conocen actualmente como SBN. Se denominan como “soluciones” con el fin de señalar su contribución a solucionar o superar los principales desafíos contemporáneos de la gestión del agua a todos los niveles (WWAP, 2018). Muchas SBN, además de permitir la mejora de la calidad del agua (TEEB, 2011), ofrecen funcionalidades y servicios adicionales como la mejora del hábitat, el secuestro de carbono,



la estabilización del suelo, la recarga de aguas subterráneas y la mitigación de inundaciones (Pavelic *et al.*, 2015; Haddaway *et al.*, 2016; Oral *et al.*, 2020; Hdidou *et al.*, 2022). Las SBN también pueden emplearse como complemento posterior a las tecnologías de tratamiento de aguas en EDAR, proporcionando una solución adecuada para reducir más la carga de contaminantes (Venditti *et al.*, 2022).

En los FVs, objeto de esta Tesis Doctoral, se emplea agua residual pretratada para regar una plantación arbórea. El agua es depurada al infiltrarse a través de la zona no saturada debido al efecto conjunto del suelo, las plantas y los microorganismos. Este sistema, además, produce biomasa, recarga el acuífero subyacente, mejora el paisaje, genera nichos ecológicos y contribuye a la mitigación del cambio climático, gracias a la vegetación que consume dióxido de carbono. Es posible optimizar la operación en FVs, por ejemplo, mediante la adición de enmiendas al suelo, pudiéndose reducir, de esta forma, el área necesaria para el tratamiento de la misma cantidad de agua residual, acercándose así algo más al concepto de tecnología intensiva. Se ha evaluado la eliminación de CPEs en muchas SBN (Oral *et al.*, 2020; García *et al.*, 2020) como FVs (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011; McEachran *et al.*, 2017; Martínez-Hernández *et al.*, 2018) y otras aplicaciones de agua y/o lodos al suelo (Estévez *et al.*, 2012; Lin y Gan, 2011; Calderón-Preciado *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2012; Martínez-Piernas *et al.*, 2018; De Santiago *et al.*, 2020; Meffe *et al.*, 2021; ), así como en lagunas (Vázquez-Roig *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013), humedales artificiales (Vázquez-Roig *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Clyde *et al.*, 2021; Venditti *et al.*, 2022; Hdidou *et al.*, 2022) o en recarga de acuíferos (Teijón *et al.*, 2010; Maeng *et al.*, 2011; Bertelkamp *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2019; Valhondo *et al.*, 2020).

Aunque los datos sobre la generación, la recolección y el tratamiento de las aguas residuales son prácticamente inexistentes, es evidente que, en todo el mundo, la mayor parte de las aguas residuales no se recoge ni se tratan (WWAP, 2017). El nivel de tratamiento de las aguas residuales a nivel mundial es generalmente reflejo de su nivel económico. De media, los países de ingresos altos tratan en torno al 70% de las aguas que generan, mientras que sólo el 33% se trata en países de ingresos medios, y el 8% en países de bajos ingresos (Sato *et al.*, 2013). A nivel de la UE, la recogida y el tratamiento de las aguas es un requisito indispensable para aglomeraciones de más de 2.000 habitantes equivalentes conforme a la Directiva de Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas (91/271/CEE). En concreto, en su artículo 3 indica que todas ellas deben tener una red de recolección de aguas residuales y, en su artículo 4, que debe realizarse al menos un tratamiento secundario de estas aguas. Además, en su artículo 5, incluye la necesidad de realizar un tratamiento más riguroso (terciario) en caso de vertido a zonas sensibles o protegidas. El grado de cumplimiento a fecha 31 de diciembre de 2018 respecto a esto, publicado en el último reporte (CE, 2022) se muestra en la **Figura I.5 (A)** recolección, B) tratamiento secundario y C) tratamiento terciario). En estas figuras, Europa se encuentra representada en regiones denominadas NUTS (del francés *Nomenclature des Unités Territoriales Statistiques*) 2, que corresponden a regiones con una población entre 800.000-7.000.000 de habitantes equivalentes (en España esto coincide directamente con las Comunidades Autónomas). En resumen, para la Europa de los 28, el cumplimiento del artículo 3 ascendía al 95%, mientras que el 89% cumplía el artículo 4 y el 88%, el artículo 5. Sin embargo, estos porcentajes fueron muy distintos para cada país e incluso entre regiones, como se observa en la **Figura I.5 (A)**.



**Figura I.5.** Grado de cumplimiento del requisito de recolección de las aguas residuales según el Artículo 3 sobre recolección (A), el artículo 4 sobre tratamiento secundario (B) y artículo 5 sobre tratamiento terciario (C) de la directiva de tratamiento de aguas residuales (91/271/CEE) por regiones europeas (fuente: reporte CE, 2022)

La mayoría de los países recogieron entre el 97 y el 100% de las aguas residuales de acuerdo a los requerimientos de recolección del artículo 3 de la directiva de aguas (Figura I.5 (A)). Sin embargo, todas las regiones de Chipre, Croacia y Rumanía y también algunas

regiones de Bulgaria, Hungría, Italia y Polonia, mostraron un grado de cumplimiento por debajo del 85%, y otras 14 regiones, por debajo del 70%. En España, todas las regiones excepto Cantabria y Andalucía tuvieron un grado de cumplimiento superior al 97%. Aunque varios países presentaron de media un grado de cumplimiento respecto al tratamiento secundario (artículo 4) superior al 95%, se observaron grandes diferencias entre regiones dentro de cada país (**Figura I.5 (B)**). Todas las regiones de Croacia, Malta, Rumanía y Eslovenia y algunas regiones de Bulgaria, República Checa, España, Francia, Hungría, Irlanda, Italia, Polonia y Portugal tuvieron un grado de cumplimiento inferior a dicho valor, y, como puede verse, otras 33 regiones inferior al 70%. En España, sin embargo, la distancia al objetivo fue inferior al 30% en prácticamente todas las regiones a fecha del último reporte oficial de datos (31/12/2018) en el momento de escritura de la presente Tesis Doctoral. Sin embargo, pocos países cumplen, en todas sus regiones, los requerimientos del tratamiento terciario o “más riguroso” (artículo 5) en más del 97% y, además, existen diferencias muy grandes entre y dentro de cada país (**Figura I.5 (C)**). Todas las regiones de Bulgaria, Croacia, Malta, Rumanía y Eslovenia, así como sólo algunas regiones de Bélgica, República Checa, España, Francia, Hungría, Irlanda, Italia, Polonia, Portugal y Reino Unido tuvieron un grado de cumplimiento inferior a dicho valor, y, otras 48 regiones inferior al 70%. Es de destacar que, de la Europa de los 15, algunas regiones todavía presentaron bajos grados de cumplimiento teniendo en cuenta que sus plazos de vencimiento expiraron hace ya años.

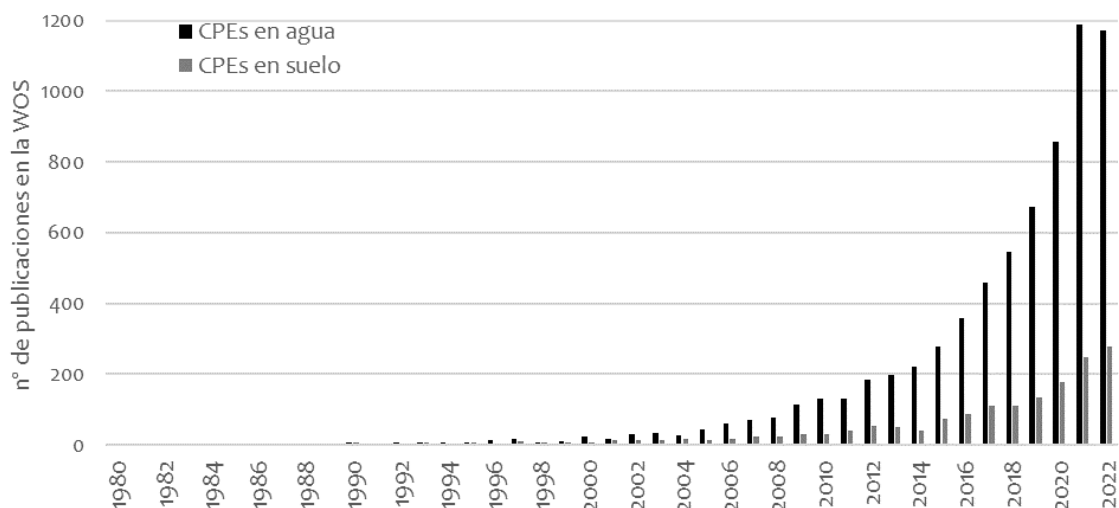
En general, la UE reconoce avances en el cumplimiento de las directivas de aguas, aunque limitados, lo que demuestra que es necesaria una vigilancia continua para mantener y mejorar las instalaciones, lo que se unirá además a los nuevos desafíos que también van a requerir esfuerzos específicos. De hecho, la Comisión Europea publicó recientemente una propuesta (COM(2022) 541 final) para la revisión de la directiva de tratamiento de aguas residuales urbanas (91/271/CEE) cuya ambición incluye la monitorización y eliminación de CPEs, la eficiencia energética de las EDAR o el fomento de la reutilización para fomentar la preservación del recurso hídrico, entre otros. También propone reducir el alcance de la recolección y el tratamiento secundario de las aguas residuales procedentes de todas las aglomeraciones desde 2000 hasta 1000 habitantes equivalentes. En este contexto, y por todas las características anteriormente descritas, se deduce que el empleo de las SBN resulta una buena opción que puede llegar a cumplir con los requerimientos establecidos de tratamiento para las aguas residuales si estas soluciones se operan y mantienen de una forma adecuada. Sin embargo, diseñar un proceso de depuración eficaz para muchos contaminantes a la vez es una tarea compleja y cara y, con todo, ningún tratamiento actualmente consigue eliminar al 100% todos los CPEs existentes (Ahmed *et al.*, 2021; Propuesta (COM) 540 final).

#### **4. Análisis de contaminantes de preocupación emergente y productos de transformación en el medioambiente**

Aunque cada vez son más estudiados los posibles efectos potenciales de los CPEs sobre la vida y el medio natural, todavía existe un elevado grado de desconocimiento de sus consecuencias a largo plazo. Dado que no se conocen todos los riesgos que tiene su

transferencia al medioambiente, en los últimos años ha aumentado la preocupación por la presencia de una gran variedad de CPEs en aguas residuales urbanas y, con ello, por la evaluación de la eficacia de los procesos de tratamiento de aguas residuales en su eliminación. Precisamente en este sentido avanzan actualmente las nuevas propuestas para la revisión de la directiva de tratamiento de aguas residuales urbanas y la directiva marco de agua (2000/60/CE) en la que se van a incluir nuevos CPEs como sustancias prioritarias con valores límite ambientales (2008/105/CE) y, en algunos casos, requerimientos de control en las aguas subterráneas (2006/118/CE). En este sentido tiene especial interés el análisis de CPEs dado que va a ser necesario tanto monitorizarlos como eliminarlos de las aguas residuales.

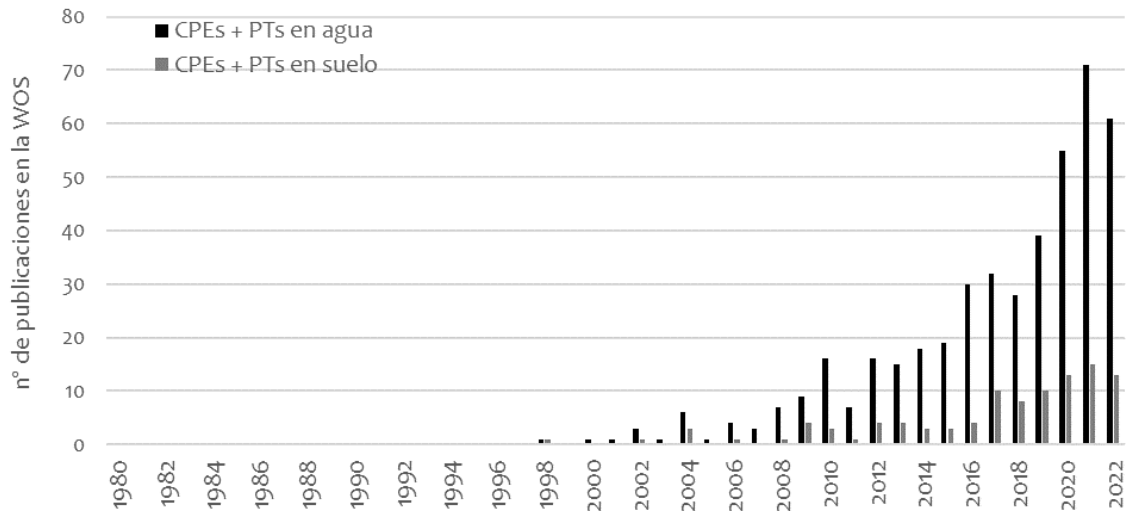
En los últimos años, se ha observado un creciente desarrollo de las técnicas de análisis, para la determinación de trazas de CPEs y PTs en el campo medioambiental (Evgenidou *et al.*, 2015). La sensibilidad de los métodos analíticos desarrollados ha permitido la determinación de muchos de esos compuestos a bajas concentraciones (orden de unos pocos ng/L) y su detección en diferentes tipos de muestras de aguas y suelo. Sin embargo, la identificación de compuestos desconocidos, como son los PTs, presentan dificultades debido, generalmente, a las diferentes propiedades fisicoquímicas de los compuestos y al amplio rango de concentraciones en la que se encuentran en las muestras medioambientales, por lo que su detección sigue siendo un reto (OECD, 2017) y, más aún, dado el número de sustancias existentes (Zuloaga *et al.*, 2012). Así, gracias a los últimos avances en cuanto a metodologías de análisis se refiere, se ha incrementado el número de publicaciones científicas que determinan la presencia de CPEs y PTs en aguas y suelos (ver **Figura I.6** y **Figura I.7**). Sin embargo, la complejidad de algunas matrices como el suelo (WHO, 2011; Zuloaga *et al.*, 2012) dificulta el análisis de CPEs y PTs, tal y como puede verse en ambas figuras, donde hay un menor número de publicaciones de la matriz suelo frente a la matriz agua.



**Figura I.6.** Evolución del número de publicaciones durante las últimas décadas sobre la presencia de CPEs en el agua y el suelo (Fuente: Web of Science, WOS, fecha de consulta: 13/03/2023, `palabras clave en la búsqueda en abstract: (emerging contaminant) OR (emerging pollutant) OR (emergent contaminants) OR (contaminants of emerging concern)`).

Por otro lado, aunque la mayoría de los estudios sobre contaminación ambiental acerca de los CPEs están centrados en la determinación de los compuestos de partida, la información acerca de sus PTs en los distintos compartimentos ambientales es mucho más escasa (Evgenidou *et al.*, 2015), como se observa en la **Figura I.7**, donde el estudio conjunto de CPEs y sus PTs en agua y suelo es de un orden de magnitud inferior al estudio de

únicamente CPEs (**Figura I.6**). Además, en la matriz suelo la determinación de PTs todavía resulta menos frecuente, sólo existen 110 publicaciones al respecto.



**Figura I.7.** Evolución del número de publicaciones durante las últimas décadas sobre la presencia de CPEs y PTs/metabolitos en agua y en suelo (Fuente: Web of Science, WOS, fecha de consulta: 13/03/2023, palabras clave en abstract: ((emerging contaminant) OR (emerging pollutant) OR (emergent contaminants) OR (contaminants of emerging concern)) AND ((transformation product) OR (metabolite)) AND (water))).

Para llevar a cabo los análisis de contaminantes en matrices medioambientales es necesario realizar un paso previo de pretratamiento y tratamiento de las muestras. Principalmente, en las muestras líquidas se lleva a cabo un pretratamiento, normalmente para eliminar los sólidos en suspensión y una extracción en fase sólida (SPE) para extraer, preconcentrar los analitos y eliminar las interferencias de matriz. La SPE consta de varias etapas consecutivas: la etapa de acondicionamiento, la etapa de carga de la muestra en los cartuchos de SPE con un relleno sólido adsorbente, la etapa de lavado de los cartuchos (seguida en ocasiones de otra de secado) y, finalmente, la etapa de elución de los analitos retenidos. Esta técnica es la más extendida (Robles-Molina *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2017) ya que se puede adaptar fácilmente a un gran número de matrices y analitos seleccionando el tipo de adsorbente adecuado (en función de su capacidad de adsorción hidrofílica-lipófila) y optimizando las diferentes variables que intervienen en el proceso en función de las características de los compuestos seleccionados (Robles-Molina *et al.*, 2014). Existen otras técnicas como la microextracción sólido-líquido y líquido-líquido o la extracción empleando barras agitadoras, pero se emplean con menor frecuencia para este tipo de contaminantes y de muestras (Vázquez-Roig *et al.*, 2011). Las muestras sólidas también requieren de un proceso previo de extracción, sin embargo, la mayor complejidad de estas matrices hace imprescindible un mayor número de etapas de limpieza, las cuales dependerán de la naturaleza de la matriz. Existen diferentes tratamientos para las muestras sólidas (suelo y sedimento), como los basados en la extracción con disolventes, la extracción asistida por microondas (Varga *et al.*, 2010), la extracción de líquidos a presión (Zuloaga *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2020), la extracción asistida por ultrasonidos (Aznar *et al.*, 2014) o la extracción sólido-líquido con disolventes mediante QuEChERS (Da Silva *et al.*, 2020).

Existen diferentes estrategias de análisis para llevar a cabo la detección de los CPEs y PTs en el medio ambiente, dependiendo de la instrumentación, las herramientas y los programas disponibles y en función de los objetivos buscados: i) el análisis dirigido (*target analysis*) que consiste en la búsqueda de una serie de compuestos objetivo conocidos donde la

identificación y cuantificación se lleva a cabo comparando los resultados con un estándar; ii) y el análisis de sospechosos (*suspect screening*) que implica la búsqueda de posibles candidatos de compuestos recopilados en una lista a partir de la bibliografía o bases de datos de masas exactas; y iii) el análisis no dirigido (*non-target analysis*) en el que se lleva a cabo una búsqueda de compuestos desconocidos de los cuales no se dispone información previa y la identificación se lleva a cabo con herramientas estadísticas de tratamiento de datos, softwares especializados y librerías de masas exactas.

Para abordar estos análisis, en la bibliografía se describen varias técnicas de análisis como la Cromatografía de Gases (CG) y de Líquidos (LC) acopladas a la Espectrometría de Masas (MS). Concretamente la LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo (QqQ), en modo de reacción múltiple (MRM) es la herramienta más adecuada para determinar bajos niveles de concentración de compuestos conocidos (Petrie *et al.*, 2016). En este modo, se selecciona un ión precursor y unos iones producto, dado que durante todo el tiempo del análisis se está midiendo una o varias transiciones específicas, lo que aporta una alta selectividad y sensibilidad en el análisis. Se emplea principalmente la ionización por electronebulización (*electrospray*, ESI) para moléculas con polaridad intermedia-alta. Además, otros tipos de ionización como la ionización química (*atmospheric pressure chemical*, APCI) o en la fotoionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure photoionization*, APPI), son empleados para la ionización de moléculas de polaridad intermedia-baja. Por otro lado, dentro de las técnicas de MS, las de alta resolución (HRMS) son empleadas para el análisis de sospechosos y no dirigidos, ya que su elevada exactitud y precisión en la determinación de la relación masa/carga de los iones detectados y el perfil isotópico característico permite centrar la búsqueda de compuestos desconocidos y obtener las fórmulas moleculares (Milman, 2015) que junto con espectros MS/MS disponibles en las bases de datos, permiten la identificación tentativa de los PTs (Albergamo *et al.*, 2019). Los sistemas LC-HRMS empleando analizadores como tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) y cuadrupolo-Orbitrap (Q-Orbitrap), han demostrado una excelente capacidad para detectar e identificar compuestos de bajo peso molecular en diversas matrices medioambientales (Schymanski *et al.*, 2015; Albergamo *et al.*, 2019). A pesar de ello, la confirmación final de compuestos desconocidos sigue siendo un reto, principalmente, por la falta de estándares e información estructural en las bases de datos (Kang *et al.*, 2020).

La combinación de estas estrategias analíticas a muestras procedentes del tratamiento de aguas residuales permite una mejor comprensión del destino de los contaminantes en estos sistemas y, por tanto, una evaluación más completa de la eficiencia del tratamiento. Como se comentaba de forma general sobre las figuras anteriores (**Figura I.6** y **Figura I.7**), aunque muchos trabajos abordan el comportamiento de los CPEs en tratamientos de aguas residuales intensivos y extensivos, pocos determinan los productos formados por su (bio)degradación (Kiss *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Además, en el caso concreto de tratamientos de aguas residuales basados en la naturaleza como los filtros verdes, a pesar de que existen algunos estudios sobre su capacidad para atenuar CPEs (McEachran *et al.*, 2017; Martínez-Hernández *et al.*, 2018) su información al respecto es aún limitada (y todavía lo es más para los PTs).

## 5. Marco legislativo

El régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas (mínimos requisitos de calidad para cinco usos: agrario, industrial, energético, recreativo y ambiental) se encontraba regulado a nivel estatal (RD 1620/2007) antes de la reciente publicación del Reglamento Europeo 2020/741, relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua para el uso agrario, y de la última actualización del reglamento (RD 47/2022) sobre la protección de las aguas contra la contaminación difusa producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias. Otras directivas europeas, como la de tratamiento de aguas residuales urbanas (91/271/CEE) ya contemplaban la reutilización, aunque no la fomentaban especialmente. Sin embargo, la revisión que se está llevando a cabo actualmente de esta directiva (propuesta COM(2022) 541 final) sí la impulsa más. En esta propuesta también se incluyen por primera vez niveles mínimos de atenuación para algunos CPEs.

La contaminación ambiental, y concretamente, la de las aguas ha despertado una gran preocupación que, ya en el año 2000, se tradujo en el establecimiento de un marco legal para el control de la misma a nivel europeo. La Directiva 2000/60/CE, conocida como la Directiva Marco de Agua, modificada por la Decisión 2001/2455/CE estableció como “contaminantes peligrosos o prioritarios” una lista de sustancias que se sabía presentaban un cierto riesgo medioambiental en base a su persistencia, su bioacumulación o su toxicidad. Más tarde, se establecieron unas Normas de Calidad Ambiental (NCA) de estas sustancias a través de la Directiva 2008/105/CE. Esta lista de contaminantes prioritarios es revisada periódicamente y está abierta a la inclusión de nuevas sustancias en base a conclusiones de estudios realizados por la comunidad científica. Posteriormente, se amplió la lista de 33 a 45 contaminantes mediante la Directiva 2013/39/UE en la que aparece por primera vez una Lista de Observación de compuestos (CPEs) que poseen un riesgo potencial y cuyas concentraciones en matrices acuosas convendría monitorizar. Los estados miembros son invitados a recopilar información sobre los compuestos incluidos en la Lista de Observación. Así, en su siguiente actualización (aproximadamente cada dos años), un compuesto puede mantenerse en ella si no se dispone de la información suficiente, o pasar a la lista de “contaminantes prioritarios” y tratarse, por tanto, conforme a las NCA. Así, los CPEs no se consideran sólo aquellos que se encuentran en la Lista de Observación, sino que pueden llegar a abarcar un abanico mucho más amplio. La Lista de Observación fue actualizada en 2015 (Decisión 2015/495/UE), 2018 (Decisión 2018/840/UE), 2020 (Decisión 2020/1161/UE) y la última actualización (Decisión 2022/1307/UE) contempla 12 compuestos o grupos de compuestos entre los que se incluyen varios fármacos y algunos de sus productos de transformación. Además, para los fármacos, y de acuerdo con la Directiva sobre sustancias prioritarias (2008/105/CE modificada por la 2013/39/UE), se publicó en 2019 una comunicación sobre el Enfoque estratégico de la Unión Europea en materia de productos farmacéuticos en el medio ambiente (Comunicación COM/2019/128final). Este enfoque plantea una farmacovigilancia en diversos sectores que permita determinar la magnitud del problema de la contaminación de las aguas y los suelos con residuos farmacéuticos. Entre ellos, ya se ha comunicado un plan de acción contra la resistencia antimicrobiana (COM/2011/748 final).

Los niveles de calidad ambiental recogidos en las NCA y en las diferentes listas de observación mencionadas anteriormente se refieren aguas superficiales, no incluyendo información sobre las aguas subterráneas. En este sentido, y como exigía la Directiva Europea sobre la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro

(2006/118/CE) en su anexo II (modificado por la Directiva 2014/80/UE), debe establecerse una lista de observación de los contaminantes de las aguas subterráneas en el marco de la estrategia común de aplicación de la Directiva (UE) 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Esta vigilancia debe realizarse con el fin de aumentar la disponibilidad de datos de seguimiento sobre las sustancias que pueden suponer un riesgo para las masas de agua subterránea, facilitando así la identificación de las mismas y el establecimiento de normas de calidad para las aguas subterráneas (por ejemplo, valores umbral). Actualmente, esta lista aún está en construcción, apareciendo recogida únicamente una lista provisional de vigilancia voluntaria en 2019 que incluye CPEs de diferentes clases seleccionados por su frecuencia de detección y concentración reportados, junto a los niveles de venta y/o consumo de esos productos en las zonas de muestreo.

Recientemente, además de las comentadas en los párrafos anteriores, también se ha publicado una propuesta (COM(2022) 540 final) para la modificación de varias directivas de aguas. En concreto la Directiva Marco de Agua 2000/60/CE mediante la inclusión como compuestos prioritarios de sustancias procedentes de las listas de observación ya mencionadas y para los cuáles los estudios publicados dan indicios suficientes de un peligro medioambiental, así como mediante la modificación de los valores ambientales de calidad establecidos por la Directiva 2008/105/CE. También pretende modificar la Directiva para la protección de aguas subterráneas (2006/118/CE) mediante la sugerencia de creación de una lista de observación específica para estas aguas, entre otras cosas.

Por último, también debe considerarse la normativa en materia de análisis de CPEs. Se aplica el Reglamento Europeo 2017/625/UE relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, que se publicó para evitar duplicidades y en aras de la claridad por todas las modificaciones ocurridas, especialmente de la por tanto derogada Directiva 96/23/CE. Además, los métodos de análisis de las sustancias o grupos de residuos a revisar conforme a dicho reglamento deben desarrollarse y validarse mediante la implementación de Directiva 2002/657/CE. Sin embargo, estas normativas no están específicamente descritas para análisis de CPEs, y menos aún para la enorme variedad existente de ellos, esencialmente porque no existe una regulación en cuanto al nivel permisible en ninguna matriz viva o ambiental. Únicamente para los pesticidas, cuya preocupación y por tanto estudio no es algo tan nuevo como para otros tipos de CPEs, se han establecido (CE, 2021) guías para el desarrollo de métodos de análisis (SANTE/2020/12830). La aplicación de las recomendaciones establecidas en estas guías es empleada comúnmente para evaluar la calidad de los métodos de análisis de CPEs en muestras ambientales (Martínez-Piernas *et al.*, 2018; Muñiz-Bustamante *et al.*, 2022) junto con lo exigido por la Directiva 2002/657/CE.

## 6. Objetivos y justificación de la tesis

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar la atenuación de CPEs y PTs que están presentes en el agua residual aplicada al suelo del FV y se aborda a través de los siguientes objetivos específicos, que son:



- 1) Desarrollar y validar una metodología de análisis sensible y selectiva para la determinación de una selección de CPEs en aguas y suelos mediante LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo (capítulo III).
- 2) Evaluar la eficiencia de los FVs en términos de atenuación de contaminantes en dos ensayos experimentales y aplicando diversas estrategias de análisis:
  - a. Estudiar el comportamiento de los CPEs seleccionados en un ensayo a escala de laboratorio simulando el FV con suelo natural (sin enmendar) y enmendado (con astillas de madera o con biochar) e identificar los PTs desconocidos generados mediante un análisis metabolómico no dirigido (capítulo IV)
  - b. Realizar un experimento a escala de campo de un FV piloto en diferentes condiciones de operación y estudiar el comportamiento de los CPEs seleccionados durante un periodo de unos cuatro años (capítulo V).

## 7. Referencias

- Ahmed, M.B., Zhou, J.L., Ngo, H.H., Guo, W., 2017. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *Journal of Hazardous Materials* 323, 274-298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045>
- Ahmed, S.F., Mofijur, M., Nuzhat, S., Tasnim Chowdhury, A., Rafa, N., Alhaz Uddin, Md., Inayat, A., Mahlia, T.M.I., Ong, C.H., Chia, W.Y., Loke Show, P., 2017. Recent developments in physical, biological, chemical, and hybrid treatment techniques for removing emerging contaminants from wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 416, 125912. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125912>
- Albergamo, V., Schollée, J., Schymanski, E.L., Helmus, R., Timmer, H., Hollender, J., De Voogt, P., 2019. Nontarget Screening Reveals Time Trends of Polar Micropollutants in a Riverbank Filtration System. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 7584–7594. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01750>
- Appelo, C.A.J., Postma, D., 2005. *Geochemistry, Groundwater and Pollution* (D. Postma, & C.A.J. Appelo, Eds.) (2nd ed.). CRC Press. <http://doi.org/10.1201/9781439833544>
- ASHP, 1999. American Society of Health-System Pharmacists: Therapeutic Position Statement on the Safe Use of Oral Nonprescription Analgesics. *Am J Health Syst Pharm.*, 56(11), 1126-1131
- Aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2016. Pharmaceuticals in the environment—global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.*, 35(4), 823–835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Aylward, B., Bandyopadhyay, J., Belausteguigotia, J., 2005. *Freshwater Ecosystem Services. Evaluación de los ecosistemas para el milenio, Ecosystems and Human Well-being: Policy Responses.* Washington DC, Island Press. Disponible online en [www.millenniumassessment.org/documents/document.312.aspx.pdf](http://www.millenniumassessment.org/documents/document.312.aspx.pdf)
- Bayati, M., Ho, T.L., Vu, D.H., Wnag, F., Rogers, E., Cuvellier, C., Huebotter, S., Inniss, E.C., Udawatta, R., Jose, S., Lin, C.H., 2021. Assessing the efficiency of constructed wetlands in removing PPCPs from treated wastewater and mitigating the ecotoxicological impacts. *International*

Journal of Hygiene and Environmental Health, 231, 113664.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113664>

- Bertelkamp, C., Reungoat, J., Cornelissen, E. R., Singhal, N., Reynisson, J., Cabo, A. J., van der Hoek, J. P., y Verliefde, A. R. D., 2014. Sorption and biodegradation of organic micropollutants during riverbank filtration: A laboratory column study. *Water Res.* 52, 231-241.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.068>
- Blair, B., Nikolaus, A., Hedman, C., Klaper, R., Grundl, T., 2015. Evaluation the degradation, sorption, and negative mass balances of pharmaceuticals and personal care products during wastewater treatment. *Chemosphere*, 134, 395-401.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.078>
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239, 229-246.  
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>
- Cabeza, Y., Candela, L., Ronen, D., Teijón, G., 2012. Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). *Journal of Hazardous Materials*, 239-240, 32-39
- Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Matamoros, V., Bayona, J.M., 2011. Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation Waters and their soil loading. *Water Research*, 45, 221-231
- CE, 2021. Recomendación de la Comisión Europea SANTE/2020/12830, de 24 de febrero de 2021, sobre métodos analíticos de plaguicidas para la evaluación de riesgos y el control y seguimiento posteriores a la aprobación. Sustituye a los documentos de orientación SANCO/3029/99 y SANCO/825/00.
- CE, 2022. Fribourg-Blanc, B., Dhuygelaere, N., Madec, C., et al., 11th technical assessment on UWWTD implementation, Publications Office of the European Union. Comisión Europea Dirección General del Medioambiente. <https://data.europa.eu/doi/10.2779/915400>
- Celiz, M.D., Tso, J., Aga, D.S., 2009. Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28, 2473-2484.
- CENTA, 2008. Secretariado Alianza por el Agua / Ecología y Desarrollo y Centro de las Nuevas Tecnologías del Agua. Manual de depuración de aguas residuales urbanas, Ed.: Ideasmares
- Chefetz, B., Mualem, T., Ben-Ari, J., 2008. Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater. *Chemosphere*, 73, 1335-43.
- Clarke, B.O., Smith S.R., 2011. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.*, 37(1), 226-247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.06.004>
- Clothier, B.E. y Green, S., 2005. Leaching Processes. In Daniel Hillel & Jerry L. Hatfield (Ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Volume 4. Virginia, USA: Elsevier/Academic Press.
- Clyde, P.M., Lee, C.S., Price, R.E., Venkatesan, A.K., Brownawell, B.J., 2021. Occurrence and removal of PPCPs from on site wastewater using nitrogen removing biofilters. *Water Research*, 206, 117743. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117743>

- Comunicación de la Comisión Europea al Parlamento y al Consejo nº 2011/748 final, de 15 de noviembre de 2011, sobre el plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas.
- Comunicación de la Comisión Europea al Parlamento, al Consejo y al Comité Económico y Social Europeo nº 2019/128 final, de 3 de noviembre de 2019, sobre el enfoque estratégico de la Unión Europea en materia de productos farmacéuticos en el medio ambiente
- De la Cruz, N., Giménez, J., Esplugas, S., Grandjean, D., De Alencastro, L.F., Pulgarín, C., 2012. Degradation of 37 emergent contaminants by UV and neutral Fenton and photo-Fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. *Water Research*, 46, 1947-1957. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.014>
- De Santiago-Martín, A., Meffe, R., Teijón, G., Martínez-Hernández, V., López-Heras, I., Alonso-Alonso, C., Arenas Romasanta, M., De Bustamante, I., 2020. Pharmaceuticals and trace metals in the surface water used for crop irrigation: Risk to health or natural attenuation? *Sci Tot Environ.*, 705, 135825. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135825>
- Decisión (UE) 2001/2455 del Parlamento y el Consejo Europeos, de 20 de noviembre de 2001, por la se establece una lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea* L331/1.
- Decisión (UE) 2002/657 de la Comisión Europea, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de la Unión Europea* L221/8.
- Decisión (UE) 2015/495 de la Comisión Europea, de 20 de marzo de 2015, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y que com. *Diario Oficial de la Unión Europea* L78/40.
- Decisión (UE) 2018/840 del Parlamento y el Consejo Europeo, de 20 de marzo de 2018, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y por la que se deroga la Decisión de Ejecución (UE) 2015/495 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea* L141/9.
- Decisión (UE) 2020/657 de la Comisión Europea, de 4 de agosto de 2020, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y por la que se deroga la Decisión de Ejecución (UE) 2018/840 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea* L257/32.
- Decisión (UE) 2022/1307 de la Comisión Europea, del 22 de julio de 2022, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y por la que se deroga la Decisión de Ejecución (UE) 2020/657 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea* L197, 117-121.
- Delpla, I., Jung, A.V., Baures, E., Clement, M., Thomas, O., 2009. Impacts of climate change on surface water quality in relation to drinking water production. *Environment International*, 35(8), 1225–1233. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.07.001>

- Desbiolles, F., Malleret, L., Tiliacos, C., Wong-Wah-Chung, P., Laffont-Schwob, I., 2018. Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? *Sci Tot Environ.*, 639, 1334-1348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.351>
- Directiva (UE) 2000/60 del Parlamento y Consejo Europeos, de 23 de octubre de 2000, que establece un marco de acción para la Comunidad Europea en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea L327/1.
- Directiva (UE) 2006/118 del Parlamento y Consejo Europeos, de 12 de diciembre de 2006, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro. Diario Oficial de la Unión Europea L372/19.
- Directiva (UE) 2008/105 del Parlamento y Consejo Europeos, de 16 de diciembre de 2008, sobre normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y posteriormente se derogan las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE del Consejo y se modifica la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L348/84.
- Directiva (UE) 2013/32 del Parlamento y Consejo Europeos, de 16 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en lo que respecta a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea L226/1.
- Directiva (UE) 2014/80 del Parlamento y Consejo Europeos, de 20 de junio de 2014, que modifica el anexo II de la Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro. Diario Oficial de la Unión Europea L182/52.
- Directiva (UE) 91/271 del Parlamento y Consejo Europeos, de 30 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas. Diario Oficial de la Unión Europea L135/40.
- Directiva (UE) 96/23 del Consejo Europeo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. Diario Oficial de la Unión Europea L125/10.
- Directiva (UE) 98/15 del Parlamento y Consejo Europeos, de 7 de marzo de 1998, por la que se modifica la Directiva 91/271/CEE del Consejo en relación con determinados requisitos establecidos en su anexo I. Diario Oficial de la Unión Europea L67/29.
- Drillia, P., Stamatelatos, K., Lyberatos, G., 2005. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere*, 60, 1034-44.
- Du, B., Price, A.E., Casan Scott, W., Kristofco, L.A., Ramirez, A.J., Chambliss, C.K., Yelderman, J.C., Brooks, B.W., 2014. Comparison of contaminants of emerging concern removal, discharge, and water quality hazards among centralized and on-site wastewater treatment system effluents receiving common wastewater influent. *Sci Tot Environ.*, 466-467, 976-984. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.126>
- Eckstein, G., William, G., 2011. Alternative Strategies for Managing Pharmaceutical and Personal Care Products in Water Resources. (pp. 8 y 9). Texas Tech University Center for Water Law & Policy.

- Estévez, E., Cabrera, M.C., Fernández-Vera, J.R., Hernández-Moreno, J.M., Mendoza-Grimón, V., Palacios-Díaz, M.P., 2010. Twenty-five years using reclaimed water to irrigate a golf course in Gran Canaria. *Span J Agric Res.*, 8(S2), S95–S101.
- Estévez, E., Cabrera, M.C., Molina-Díaz, A., Robles-Molina, J., Palacios-Díaz, M.P., 2012. Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/ec) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain). *Sci Tot Environ.*, 433, 538–546 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.031>
- Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A., 2015. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Sci. Total Environ.*, 505, 905-926. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.021>
- FAO, 2018. Progresos en el nivel de estrés hídrico: valores de referencia mundiales para el indicador 6.4.2 de los ODS. Roma. FAO y ONU-Agua. 58 pp. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Fuente de los datos para el mapa: base de datos AQUASTAT de la FAO e IWMI
- FAO, 2020. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Superar los desafíos relacionados con el agua en la agricultura. Roma. <https://doi.org/10.4060/cb1447es>
- Fiehn, O., 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genom.*, 2, 155-168. <http://dx.doi.org/10.1002/cfg.82>
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol.*, 48(1-2), 155-71. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- García, J., García-Galán, M.J., Day, J.W., Boopathy, R., White, J.R., Wallace, S., Hunter, R.G., 2020. A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresour. Technol.*, 307, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>
- Gil, M.J., Soto, A.M., Usma, J.I., Gutiérrez, O.D., 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+limpia*, 7(2), 52-73.
- Glassmeyer, S.T., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Cahill, J.D., Zaugg, S.D., Werner, S.L., Meyer, M.T., Kryak, D.D., 2005. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ Sci Technol.*, 39(14), 5157-5169. <http://dx.doi.org/10.1021/es048120k>
- González-Mariño, I., Quintana, J., Rodríguez, I., González-Díez, M., Cela, R., 2012. Screening and selective quantification of illicit drugs in wastewater by mixed mode solid phase extraction and quadrupole time-of-flight liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Chem.*, 84, 1708-17. <https://doi.org/10.1021/ac202989e>
- González-Naranjo, V., Boltes, K., 2013. Toxicity of ibuprofen and perfluorooctanoic acid for risk assessment of mixtures in aquatic and terrestrial environments. *Int J Environ Sci Technol.*, 11, 1743–1750. <http://dx.doi.org/10.1007/s13762-013-0379-9>
- Haddaway, N. R., Brown, C., Eggers, S., Josefsson, J., Kronvang, B., Randall, N., Uusi-Kämpä, J., 2016. The multifunctional roles of vegetated strips around and within agricultural fields. *A*

- systematic map protocol. *Environmental Evidence*, 1(5), 18. <https://doi.org/10.1186/s13750-016-0067-6>.
- Hdidou, M., Chaker Necibi, M., Labille, J., El Hajjaji, S., Dhiba, D., Chehbouni, A., Roche, N., 2022. Potential Use of Constructed Wetland Systems for Rural Sanitation and Wastewater Reuse in Agriculture in the Moroccan Context. *Energies*, 15(1), 156. <https://doi.org/10.3390/en15010156>
- Hemond, H.F., Fechner-Levy, E.J., 2000. *Chemical fate and transport in the environment*. Academic Press
- IGME (Instituto Geológico y Minero de España), 1995. Nuevas tecnologías para el saneamiento, depuración y reutilización de las aguas residuales en la provincia de Alicante. Capítulo 3: Métodos naturales de tratamiento de aguas residuales. Consultado online en: [https://www.igme.es/actividadesIGME/lineas/HidroyCA/publica/libros2\\_TH/libro33/pdf/lib33/cap\\_3.pdf](https://www.igme.es/actividadesIGME/lineas/HidroyCA/publica/libros2_TH/libro33/pdf/lib33/cap_3.pdf)
- Jones, E. R., van Vliet, M. T. H., Qadir, M., and Bierkens, M. F. P., 2021. Country-level and gridded estimates of wastewater reuse, production and treatment, *Earth Syst. Sci. Data*, 13, 237–254. <https://doi.org/10.5194/essd-13-237-2021>
- Kagle, J., Porter, A.W., Murdoch, R.W., Rivera-Cancel, G., Hay, A.G., 2009. Biodegradation of Pharmaceutical and Personal Care Products. In: *Advances in Applied Microbiology*. Eds. Laskin, A.I., 67, 65-108
- Kang, D., Doudrick, K., Park, N., Choi, Y., Kim, K., Jeon, J., 2020. Identification of transformation products to characterize the ability of a natural wetland to degrade synthetic organic pollutants. *Water Research*, 187, 116425. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116425>
- Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A., 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Res.*, 13, 241–8.
- Karnjanapiboonwong, A., Suski, J.G., Shah, A.A., Cai, Q., Morse, A.N., Anderson, T.A., 2011. Occurrence of PPCPs at a wastewater treatment plant and in soil and groundwater at a land application site. *Water, Air, & Soil Pollut.* 216, 257-273. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0532-8>
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M. y Guwy, A.J., 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* 43, 363-380
- Kim, M., Guerra, P., Shah, A., Parsa, M., Alaei, M., Smyth, S. A., 2014. Removal of pharmaceuticals and personal care products in a membrane bioreactor wastewater treatment plant. *Water Sci Technol* 69 (11), 2221–2229. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.145>
- Kim, S. D., Cho, J., Kim, I.S., Vanderford, B.J., Snyder, S.A., 2007. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res.*, 41, 1013-1021. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.034>
- Kiss, A., Bergé, A., Domenjoud, B., Gonzalez-Ospina, A., 2017. Chemometric and high-resolution mass spectrometry tools for the characterization and comparison of raw and treated wastewater samples of a pilot plant on the SIPIBEL site. *Environ Sci Pollut Res*, 25(10), 9230-9242. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0748-x>

- Krein, A., Pailler, J.Y., Guignard, C., Gutleb, A., Hoffmann, L., Meyer, B., Keßler, S., Berckmans, P., Witters, H., 2012. Determination of Estrogen Activity in River Waters and Wastewater in Luxembourg by Chemical Analysis and the Yeast Estrogen Screen Assay. *Environment and Pollution*, 2(1), 86-96. <https://doi.org/10.5539/ep.v1n2p86>
- Kümmerer, 2008. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer
- La Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991-1007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environ Pollut.*, 163, 287–303.
- Li, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.*, 187, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015>
- Li, X.L., Zheng, W., Kelly, W.R., 2013. Occurrence and removal of pharmaceutical and hormone contaminants in rural wastewater treatment lagoons. *Sci Tot Environ.*, 445, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.035>
- Lin, K. y Gan, J., 2011. Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere* 83, 240-246
- López-Pacheco, I.Y., Silva-Núñez, A., Salinas-Salazar, C., Arévalo-Gallegos, A., Lizarazo-Holguin, L.A., Barceló, D., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R., 2019. Anthropogenic contaminants of high concern: Existence in water resources and their adverse effects. *Sci Tot Environ.*, 690, 1068-1088. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.052>
- Maeng, S.K., Sharma, S.K., Lekkerkerker-Teunissen, K. y Amy, G.L., 2011. Occurrence and fate of bulk organic matter and pharmaceutically active compounds in managed aquifer recharge: A review. *Water Res.*, 45(10), 3015-3033
- Martínez-Hernández, V. Leal, M., Meffe, R., de Miguel, A., Alonso-Alonso, C., de Bustamante, I., Lillo, J., Martín, I. y Salas, J.J., 2018. Removal of emerging contaminants in a poplar vegetation filter. *J. Hazard. Mater.* 342, 482-491
- Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Herrera López, S., de Bustamante, I., 2016. The role of sorption and biodegradation in the removal of acetaminophen, carbamazepine, caffeine, naproxen and sulfamethoxazole during soil contact: A kinetics study. *Sci. Total Environ.*, 559, 232-241.
- Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Herrera, S., Arranz, E., De Bustamante, I., 2014. Sorption/desorption of non-hydrophobic and ionisable pharmaceutical and personal care products from reclaimed water onto/from a natural sediment. *Sci Tot Environ.*, 481, 280-295.
- Martínez-Piernas, A.B., Plaza-Bolaños, P., García-Gómez, E., Fernández-Ibáñez, P., Agüera, A., 2018. Determination of organic microcontaminants in agricultural soils irrigated with reclaimed wastewater: Target and suspect approaches. *Anal. Chim. Acta*, 1030, 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.049>
- McEachran, A.D., Shea, D. y Nichols, E.G., 2017. Pharmaceuticals in a temperate forest-water reuse system. *Sci. Total Environ.* 581–582, 705–714

- Meffe, R., de Santiago-Martín, A., Teijón, G., Martínez Hernández, V., López-Heras, I., Nozal, L., de Bustamante, I., 2021. Pharmaceutical and transformation products during unplanned water reuse: Insights into natural attenuation, plant uptake and human health impact under field conditions. *Environ. Int.* 157. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106835>
- Michael, I., Vasquez, M., Hapeshi, E., Haddad, T., Baginska, E., Kümmerer, K., Fatta-Kassinos, D. (2014). Metabolites and transformation products of pharmaceuticals in the aquatic environment as contaminants of emerging concern. Transformation products of emerging contaminants in the environment: analysis, processes, occurrence, effects and risks, Vol. 1 (Nollet E & Lambropoulou D, eds), pp. 425–469. John Wiley & Sons, United Kingdom
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2021. Informe de seguimiento de los planes hidrológicos e cuenca y de los recursos hídricos en España ([https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/planificacion-hidrologica/memoria\\_infoseg\\_2020\\_tcm30-531935.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/planificacion-hidrologica/memoria_infoseg_2020_tcm30-531935.pdf))
- Miralles, S., Audino, F., Oller, I., Sánchez, R., Sánchez, J., Malato, S., 2014. Pharmaceuticals removal from natural water by nanofiltration combined with advanced tertiary treatments (solar photo-Fenton, photo-Fenton-like Fe(III)-EDDS complex and ozonation). *Separation and purification technology*, 122, 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.12.006>
- Moreno, L., 2003. La depuración de aguas residuales urbanas de pequeñas poblaciones mediante infiltración directa en el terreno: fundamentos y casos prácticos. Edición y Publicación: Instituto Geológico y Minero de España. ISBN 978-84-7840-464-3. [https://aguas.igme.es/igme/publica/depuracion\\_aresidual/2.pdf](https://aguas.igme.es/igme/publica/depuracion_aresidual/2.pdf)
- Moschet, C., Piazzoli, A., Singer, H., Hollender, J., 2013. Alleviating the Reference Standard Dilemma Using a Systematic Exact Mass Suspect Screening Approach with Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 85(21), 10312–10320. <https://doi.org/10.1021/ac4021598>
- Muñiz-Bustamante, L., Caballero-Casero, N., Rubio, S., 2022. Drugs of abuse in tap water from eight European countries: Determination by use of supramolecular solvents and tentative evaluation of risks to human health. *Environment International*, 164, 107281. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107281>
- Noguera-Oviedo, K., Aga, D.S., 2016. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment, *J. Hazard. Mater.*, 316, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.058>
- OECD, 2017. Diffuse Pollution, Degraded Waters: Emerging Policy Solutions, OECD Studies on Water, OECD Publishing, Paris, France. <https://doi.org/10.1787/9789264269064>
- OMS, 2017. Drinking Water Parameter Cooperation Project. Support to the revision of Annex I Council Directive 98/83/EC on the Quality of Water Intended for Human Consumption (Drinking Water Directive). Available online in: [http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/pdf/20171215\\_EC\\_project\\_report\\_final\\_corrected.pdf](http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/pdf/20171215_EC_project_report_final_corrected.pdf)
- Onesios, K., Yu, J., Bouwer, E., 2009. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation*, 20(4), 441-466.



- Oral, H.V., Carvalho, P., Gajewska, M., Ursino, N., Masi, F., Hullebusch, E.D. van, Kazak, J.K., Exposito, A., Cipolletta, G., Andersen, T.R., Finger, D.C., Simperler, L., Regelsberger, M., Rous, V., Radinja, M., Buttiglieri, G., Krzeminski, P., Rizzo, A., Dehghanian, K., Nikolova, M. y Zimmermann, M., 2020. A review of nature-based solutions for urban water management in European circular cities: a critical assessment based on case studies and literature. *Blue-Green Syst.* 2, 112–136
- Orta, L., 2002. Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. *Fitosanidad*, 6(3), 55-62. <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209118292006.pdf>
- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C., Mohan, D., 2019. Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chem. Rev.*, 119, 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>
- Patiño, Y., Díaz, E., Ordóñez, S., 2014. Microcontaminantes Emergentes en Aguas: Tipos y Sistemas de Tratamiento. *Avances en Ciencia e Ingeniería*, 5(2), 1-20. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323631115001>
- Pavelic, P., Brindha, K., Amarnath, G., Eriyagama, N., Muthuwatta, L., Smakhtin, V., Gangopadhyay, P. K., Malik, R. P. S., Mishra, A., Sharma, B. R., Hanjra, M. A., Reddy, R. V., Mishra, V. K., Verma, C. L., Kant, L., 2015. Controlling Floods and Droughts through Underground Storage: From Concept to Pilot Implementation in the Ganges River Basin. Instituto Internacional de Gestión del Agua (IWMI). Research Report, 165. <https://doi.org/10.5337/2016.200>.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring, *Water Res*, 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Petrovic, M., González, S., Barceló, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 685-696. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01105-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01105-1)
- Proposal COM(2022) 540 final for a directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy (2022/0344 (COD)). Brussels
- Proposal COM(2022) 541 final: Proposal of the October 26th 2022 for a directive, of the European parliament and of the council, concerning urban wastewater treatment (recast), (2022/0343 (COD)). Brussels
- Real Decreto 1620/2007, del 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Ministerio de la Presidencia, BOE-A-2007-21092
- Reglamento (UE) 2020/741 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de mayo de 2020 relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua. *Diario Oficial de la Unión Europea* 5.6.2020. L 177/32-55.
- Rizzo, L., Malato, S., Antakyali, D., Beretsou, V.G., Đolić, M.B., Gernjak, W., Heath, E., Ivancev-Tumbas, I., Karaolia, P., Lado Ribeiro, A.R., Mascolo, G., McArdell, C.S., Schaar, H., Silva, A.M.T., Fatta-Kassinos, D., 2019. Consolidated vs new advanced treatment methods for the

- removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. *Sci. Total Environ.*, 655, 986–1008. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.265>
- Ruhoy, I.S., Daughton, C.G., 2008. Beyond the medicine cabinet: An analysis of where and who medications accumulate. *Environment International*, 34, 1157-1169
- Santamarta, J.C., Rubiales, I.C., Rodríguez-Martín, J. et al, 2022. Water status in the Canary Islands related to energy requirements. *Energy Efficiency* 15, 13. <https://doi.org/10.1007/s12053-021-10016-7>
- Sato, T., Qadir, M., Yamamoto, S., Endo, T., Zahoor, A., 2013. Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment and use. *Agricultural Water Management* 130, 1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2013.08.007>
- Schollée, J.E., Schimanski, E.L., Avak, S.E., Loos, M., Hollender, J., 2015. Prioritizing Unknown Transformation Products from Biologically-Treated Wastewater Using High-Resolution Mass Spectrometry, Multivariate Statistics, and Metabolic Logic. *Anal. Chem.*, 87(24), 12121–12129. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02905>
- Schymanski, E.L., Singer, H.P., Slobodnik, J., Ipolyi, I.M., Oswald, P., Krauss, M., et al., 2015. Non-target screening with high resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 6237–6255. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8681-7>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México. Comisión Nacional del Agua, 2021. Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Diseño de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: Procesos Avanzados con Fines de Reúso.
- Senta, I., Krizman-Matasic, I., Terzic, S., Ahel, M., 2017. Comprehensive determination of macrolide antibiotics, their synthesis intermediates and transformation products in wastewater effluents and ambient waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1509, 60-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.005>
- Singh, R.R., Lester, Y., Linden, K.G., Love, N.G., Atilla-Gokcumen, G.E., Aga, D.S., 2015. Application of metabolite profiling tools and time-of-flight mass spectrometry in the identification of transformation products of iopromide and iopamidol during advanced oxidation. *Environ Sci Technol.*, 49(5), 2983-90. <https://doi.org/10.1021/es505469h>
- Snow, D.D., Cassada, D.A., Biswas, S., Malakar, A., D'Alessio, M., Marshall, A.H.L., Sallach, J.B., 2020. Detection, occurrence, and fate of emerging contaminants in agricultural environments. *Water Environment Research*, 92(10), 1741-1750. <https://doi.org/10.1002/wer.1429>
- Tak, S., Tiwari, A., Prakash Vellanki, B., 2020. Identification of emerging contaminants and their transformation products in a moving bed biofilm reactor (MBBR)–based drinking water treatment plant around River Yamuna in India. *Environ. Monit. Assess.*, 192, 365. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08303-4>
- Tambosi, J.L., Felix de Sena, R., Favier, M., Gebhardt, W., Jorge José, H., Friedrich Schröder, H., Peralta Muniz Moreira, R.F., 2010. Removal of pharmaceutical compounds in membrane bioreactors (MBR) applying submerged membranes. *Desalination*, 261, 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.05.014>

- TEEB (The Economics of Ecosystems and Biodiversity), 2011. Manual for Cities: Ecosystem Services in Urban Management. [www.teebweb.org/publication/teeb-manual-for-citiesecosystem-services-in-urban-management/](http://www.teebweb.org/publication/teeb-manual-for-citiesecosystem-services-in-urban-management/)
- Teerlink, J., Martínez-Hernández, V., Higgins, C.P., Drewes, J.E., 2012. Removal of trace organic chemicals in onsite wastewater soil treatment units: A laboratory experiment. *Water Res.*, 46, 5174–5184. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.024>
- Teijón, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Sci. Total Environ.*, 408(17), 3584-3595. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.041>
- Ternes, T., Stüber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B., 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Research*, 37(8), 1976-1982. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00570-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00570-5)
- Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R.D., Buelna, G., 2017. Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresource Technology*, 224, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.042>
- TYPSA, 2004. Report on wastewater reuse in the European Union ([https://ec.europa.eu/environment/water/blueprint/pdf/Final%20Report\\_Water%20Reuse\\_April%202013.pdf](https://ec.europa.eu/environment/water/blueprint/pdf/Final%20Report_Water%20Reuse_April%202013.pdf))
- UNESCO, 2015. Iniciativa internacional sobre la calidad del agua: orientada a promover la investigación científica, la divulgación del conocimiento y el desarrollo de tecnologías y políticas eficaces para responder a los retos de calidad del agua para un desarrollo sostenible. París, UNESCO. [unesdoc.unesco.org/images/0024/002436/243651e.pdf](https://unesdoc.unesco.org/images/0024/002436/243651e.pdf).
- USEPA Emerging Contaminants Workgroup, 2008. White paper Aquatic Life Criteria for Contaminants of Emerging Concern, Part I: General Challenges and Recommendations. Consultado el 06/06/2022 en [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/white\\_paper\\_aquatic\\_life\\_criteria\\_for\\_contaminants\\_of\\_emerging\\_concern\\_part\\_i\\_general\\_challenges\\_and\\_recommendations\\_1.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/white_paper_aquatic_life_criteria_for_contaminants_of_emerging_concern_part_i_general_challenges_and_recommendations_1.pdf)
- Valhondo, C., Carrera, J., Martínez-Landa, L., Wang, J., Amalfitano, S., Levantesi, C., Diaz-Cruz, M.S., 2020. Reactive Barriers for Renaturalization of Reclaimed Water during Soil Aquifer Treatment. *Water*, 12, 1012. <https://doi.org/10.3390/w12041012>
- Vázquez-Roig, P., Andreu, V., Onghena, M., Blasco, C., Picó, Y., 2011. Assessment of the occurrence and distribution of pharmaceuticals in a Mediterranean wetland (L'Albufera, Valencia, Spain) by LCMS/ MS. *Anal Bioanal Chem.*, 40, 1287–1301.
- Venditti, S., Brunhoferova, H., Hansen, J., 2022. Behaviour of 27 selected emerging contaminants in vertical flow constructed wetlands as post-treatment for municipal wastewater. *Sci Tot Environ.*, 819, 153234. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153234>
- Vulliet, E. y Cren-Olivé, C., 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, 159, 2929-2934

- Wang, X., Yu, N., Yang, J., Jin, L., Guo, H., Shi, W., Zhang, X., Yang, L., Yu, H., Wei, S., 2020. Suspect and non-target screening of pesticides and pharmaceuticals transformation products in wastewater using QTOF-MS. *Environ. Int.*, 137, 105599. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105599>
- Wang, J. y Wang, S., 2016. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *J. Environ. Manage.*, 182, 620-640
- Water Reuse Report, 2015. Water Reuse in Europe - Relevant guidelines, needs for and barriers to innovation. By: Alcalde Sanz L, Gawlik B. EUR 26947. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union. JRC92582
- WHO (World Health Organization), 2011. Guidelines for drinking water quality-4th ed. WHO Library Cataloguing in Publication Data
- Wolf, L., Zwiener, C., Zemann, M., 2012. Tracking artificial sweeteners and pharmaceuticals introduced into urban groundwater by leaking sewer networks. *Sci Tot Environ*, 430, 8-19
- World Metereological Organization, 2022. State of Global Water Resources 2021. Chair Publications Board, Ginebra. ISBN 978-92-63-11308-5
- WWAP, 2009. World Water Development Report 3: Water in Changing World Facts and Figures. World Water Assessment Program (WWAP). Paris, UNESCO.
- WWAP, 2017. The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource. World Water Assessment Program. Paris, UNESCO. Available online: <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/247153e.pdf>
- WWAP, 2018. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos (World Water Assessment Program) 2018: Soluciones basadas en la naturaleza para la gestión del agua. París, UNESCO.
- Zhang, D., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environ. Pollut.*, 184, 620-639. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.009>



**CAPÍTULO II.**  
**DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para lograr la consecución de los objetivos de este trabajo se diseñaron dos experimentos, uno en campo y otro en laboratorio, que se describen a continuación.

En el experimento en “campo”, en primer lugar, se llevó a cabo el diseño y la construcción del FV-piloto y se desarrolló la estrategia de riego y muestreo para el mismo. A continuación, se realizaron pruebas preliminares de riego con aguas residuales y muestreo de las mismas que sirvieron, además de para evaluar la operación del FV piloto (funcionamiento hidráulico y de los equipos de muestreo y monitorización), para identificar la presencia de CPEs en el agua (mediante un análisis cualitativo de “screening”) que permitiera seleccionar los CPEs con mayor frecuencia de aparición y concentración. Este fue uno de los criterios para desarrollar un método de determinación de 40 CPEs y que más tarde se aplicaría para evaluar su comportamiento en FVs y que se desarrolla en el capítulo III. El experimento en campo se dividió en tres periodos en los que se aplicaron diferentes condiciones de operación (tipo y frecuencia de riego)

Una vez comenzó el riego continuado en el FV piloto, se llevó a cabo paralelamente un experimento a “escala de laboratorio” simulando la operación en el campo que permitió, en un ambiente controlado y a una escala menor, analizar el efecto del empleo de dos enmiendas (astillas de madera y biochar obtenido a partir de las astillas) al suelo del FV en cuanto a la eliminación de CPEs, y la formación de PTs desconocidos. Los resultados obtenidos en este estudio se describen en el capítulo IV de esta Tesis Doctoral.

Cabe destacar que los resultados del experimento a escala de laboratorio en términos de CPEs no fueron empleados para seleccionar la enmienda a aplicar al FV, ya que el principal problema de la aplicación de aguas residuales al terreno es la lixiviación de nitratos, especialmente cuando éstos alcanzan las aguas subterráneas. Por este motivo se seleccionaron las astillas ya que se demostró, a escala de laboratorio y en las mismas condiciones en las que se realizó en esta memoria, que disminuían sustancialmente la lixiviación de nitratos en la columna debido principalmente a un aumento de la actividad microbiana (Martínez-Hernández *et al.*, 2020).

## 1. Escala piloto: filtro verde

El FV piloto (**Figura II.1**) se ubicó en las instalaciones de IMDEA Agua (Alcalá de Henares, Madrid, España - 40° 30' 49" N, 3° 20' 15" W) y recibía las aguas residuales generadas en el edificio, pretratadas en un tanque Imhoff. La parcela se localiza en una terraza fluvial del río Henares constituida por gravas de cantos poligénicos, incluidos en una matriz de proporciones variables de arenas, arcillas y limos (IGME, 1990). La parte superior de la terraza está constituida por un suelo con alto contenido de carbonato cálcico secundario (Monuriol y Alcalá, 1990).



**Figura II.1.** Imagen del FV situado en las instalaciones experimentales de IMDEA Agua

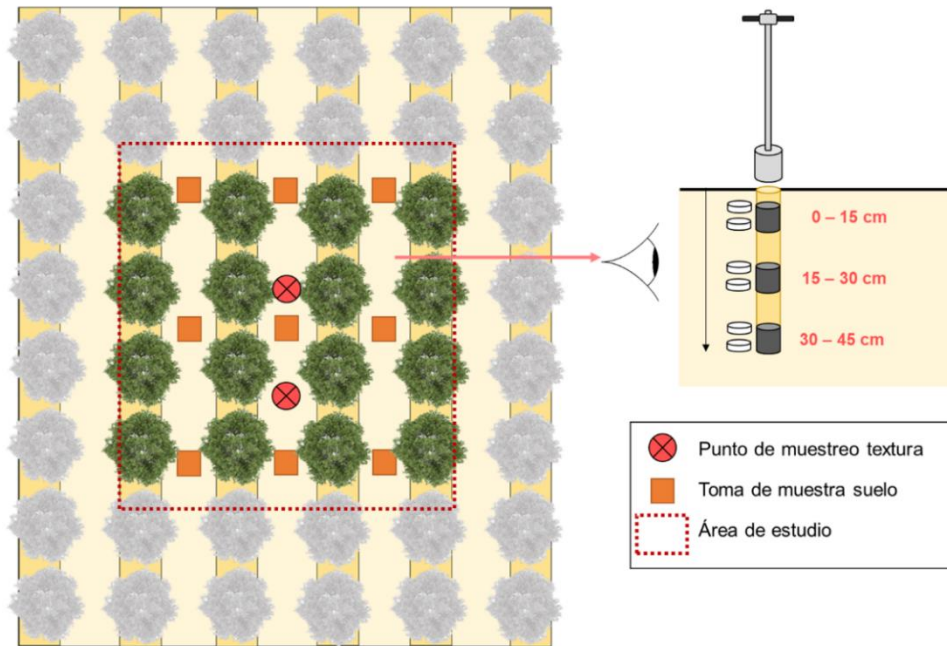
Para el diseño del FV se tuvieron en cuenta la selección de la vegetación a plantar, su necesidad hídrica diaria, la cantidad media estimada de agua residual a tratar diariamente y las características del medio físico en que se van a implantar.

El nivel piezométrico local se sitúa a una cota media de 603 metros sobre el nivel del mar en el momento de su construcción con una profundidad media de 4 metros, suficiente para permitir un tiempo de residencia adecuado del agua con el terreno. La dirección del flujo de aguas subterráneas en la zona del FV (local) es NO-SE.

El clima de la zona de estudio es mediterráneo continental. Se controlaron diariamente los parámetros climáticos más significativos como la temperatura, la precipitación y la evapotranspiración, obteniéndolos de la estación más cercana del Sistema de Información Agroclimática para el Regadío (SIAR) que se ubica en la Finca Experimental de San Fernando de Henares (Madrid), a unos 8 km de la zona de estudio. La precipitación y la temperatura media anuales durante el periodo de estudio (2018-2021) fue de 489 mm y 14,3°C, respectivamente (AEMET, 2021). Considerando todo el periodo completo de estudio (2018-2021), la temperatura osciló entre 0 y 18 °C de noviembre a marzo, y entre 5 y 33 °C de abril a octubre.

El análisis granulométrico del suelo en el que se instaló el FV mostró que estaba compuesto por 42,5% de arena, 26% de limo y 32,5% de arcilla, por lo que se clasifica como suelo franco arcilloso (Soil Survey Staff, 1999). Este análisis textural se realizó con muestras de suelo tomadas a 15, 30 y 45 cm de profundidad. La tasa de infiltración media del agua en el suelo, determinada mediante un infiltrómetro de doble anillo (Eijkelkamp Ringkit-C), fue de 1400 mm/día. El cálculo de la densidad aparente del suelo del FV se llevó a cabo por diferencia de pesada de varias muestras de suelo inalteradas, tomadas en cilindros de 1 cm<sup>3</sup> en los puntos indicados en la **Figura II.2**, antes y después de secarse durante 60 días en condiciones ambientales.





**Figura II.2.** Puntos de muestreo de suelo para la determinación de sus propiedades físicas (densidad y textura).

Como vegetación, son preferibles especies de árboles de rápido crecimiento, con gran requerimiento hídrico y cuyas raíces sean tolerantes a condiciones anaerobias, permitiendo la aplicación de grandes volúmenes de agua residual. Las más empleadas son los chopos, los sauces y los eucaliptos (Persson y Lindroth, 1994; Herschbach *et al.*, 2005; CENTA, 2008; Pradana *et al.*, 2021). Tradicionalmente los FVs se diseñaban con densidades de plantación bajas (300-500 árboles/ha) y turnos de poda largos (entre 12 y 17 años), con el fin de obtener maderas de calidad. Sin embargo, un FV diseñado con mayor densidad de plantación (7500-15000 árboles/ha) y turnos de poda cortos (2-3 años) posee una capacidad mayor de asimilación de nutrientes y permite una mayor aplicación de agua por unidad de terreno (Dimitriou y Aronsson, 2005), lo que reduce su área. Además, supone un atractivo para la obtención de biomasa (tras cada turno de poda) para aplicaciones que no requieran madera de muy alta calidad (Tzanakakos *et al.*, 2011).

El área del FV pueden calcularse en base a un balance hídrico teniendo en cuenta el caudal medio de agua a tratar, los requerimientos de la planta y su variación a lo largo del año (De Bustamante *et al.*, 2009). Puesto que inicialmente se pretendía recargar del acuífero subyacente por retornos del riego, se decidió aplicar dos veces el volumen de la evapotranspiración. Para ello se empleó la ecuación (1) donde ET es la evapotranspiración de referencia (L/m<sup>2</sup>mes) según la fórmula de Blaney y Criddle siguiendo el método publicado por la FAO (1977).

$$\text{Área del FV (m}^2\text{)} = \frac{\text{Caudal a tratar (L/mes)}}{2 \cdot \text{ET}} \quad (1)$$

El FV piloto instalado en la parcela de IMDEA Agua consistió en una plantación (48 m<sup>2</sup>) de alta densidad (10.000 pies/ha) de chopos (*Populus euroamericana*, clon I-214) dispuestos en 6 filas, cada uno con un marco de plantación de 1x1 (1 m<sup>2</sup>), que dejan entre medias 5 surcos (calles) a lo largo de las cuales se aplica el agua. Las calles se nivelaron con una cierta pendiente para favorecer el reparto homogéneo del agua durante el riego por gravedad. Los

árboles se podaron cada dos años aproximadamente y la madera se astilló y pesó para conocer la cantidad de biomasa obtenida tras cada poda. Estas astillas se emplearon como enmienda del FV, contribuyendo así a la economía circular.

El periodo total de ensayo en el FV fue de 4 años (enero 2018 - noviembre 2021). Durante este tiempo, se llevaron a cabo una serie de cambios para maximizar la eliminación de contaminantes. Así, en la experimentación realizada, se diferenciaron tres periodos en función de: i) el método y patrón de riego (en términos de frecuencia), y ii) las enmiendas del suelo. En el primer periodo (P1) (enero de 2018 - marzo de 2019), el suelo no tenía enmiendas y el agua se aplicaba mediante riego por inundación sobre cada surco (calle) una vez por semana. El segundo periodo (P2) (abril 2019 - junio 2020) coincidió con la incorporación de astillas de madera (producidas a partir del propio FV) mezcladas al 3% (en peso) con los 15 cm superiores del suelo. Durante el P2, el método y el patrón de riego se mantuvieron similares al primer periodo. Al comienzo del tercer periodo (P3) (julio de 2020 - noviembre de 2021), se colocó una capa de 10 cm de espesor de astillas de madera sobre la superficie del suelo. Al mismo tiempo, se instaló un sistema de riego por goteo a lo largo de todos los surcos. Las tuberías (2 cm de diámetro interior) tenían goteros de flujo turbulento (25 cm de espaciado) para evitar la deposición de sólidos en suspensión y distribuir homogéneamente el agua (8 L/h). La frecuencia de riego en P3 se cambió de una aplicación semanal a una diaria. Estos cambios implicaron una disminución de las cargas hidráulicas diarias y, en consecuencia, en una reducción de los volúmenes infiltrados, manteniendo invariable el volumen semanal de agua residual tratada.

Estas decisiones se basaron en una serie de hipótesis. En cuanto a la enmienda de astillas y su disposición en el suelo, se habían realizado ensayos a escala de laboratorio (Meffe *et al.*, 2016; Martínez-Hernández *et al.*, 2020) que demostraban una potencial mejora de la actividad microbiana responsable de la (bio)degradación de los nutrientes (N y P) y materia orgánica presentes en aguas residuales (Maeng *et al.*, 2011; Teerlink *et al.*, 2012). En cuanto al sistema de riego y la frecuencia, no se había realizado ningún estudio preliminar para evaluarlos, pero se esperaba que una mayor frecuencia de ciclos de humectación-secado mejorara los ciclos de nitrificación-desnitrificación, disminuyendo la lixiviación de nitratos, y que esto también tuviera un efecto positivo en la atenuación de otros contaminantes orgánicos. Todos los cambios en las condiciones de operación realizados en el FV piloto se describen en profundidad en el capítulo V. La **Figura II.3** muestra una imagen del FV regado por inundación (A), y por goteo (B), los dos sistemas de riego estudiados.



Figura II.3. Imágenes del riego del FV por inundación (A) y por goteo (B).

En la **Figura II.4** se muestra un esquema del FV que incluye su orientación, la disposición de los chopos y los puntos de muestreo de los diferentes tipos de aguas para el control de calidad. También se muestra la instrumentación instalada y su ubicación en el FV.

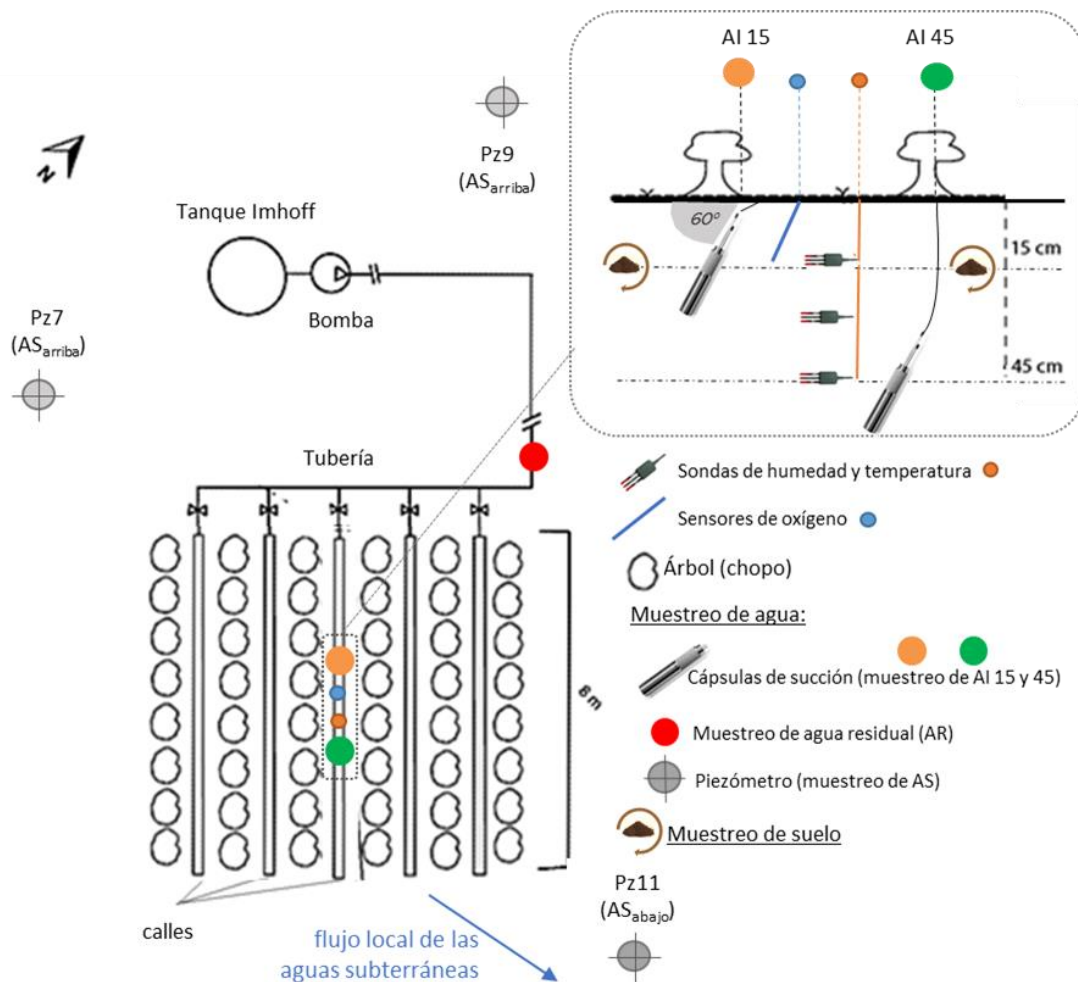


Figura II.4. Esquema del FV, orientación, instrumentación instalada, dirección de circulación de las aguas subterráneas y puntos de muestreo de aguas.

Se instalaron tres sondas de humedad y temperatura (ECH2O-5TE, Decagon Devices, Pullman, WA, EEUU) a 15, 30 y 45 cm de profundidad, así como un tensiómetro (UMS T8 Long-

term Monitoring Tensiometer) a 15 o 30 cm, en la calle central, como se muestra en el esquema del FV. Además, en julio de 2020 (al inicio del tercer periodo de operación), se instalaron dos sensores de oxígeno para monitorizar su evolución durante el riego a 15 y 45 cm de profundidad. Estos instrumentos realizaban mediciones cada 10 min y las lecturas se almacenaban conjuntamente en un datalogger Em50G (Decagon Devices, Pullman, WA, EEUU). Los caudales de riego se controlaron mediante un contador de aspas instalado a la salida del tanque Imhoff antes de las tuberías de riego de las calles.

Se empleó una sonda de nivel (Waterline Envirotech LTD, Inglaterra) para la monitorización del nivel piezométrico con el fin de controlar la dirección del flujo subterráneo local y las variaciones del nivel del agua subterránea a lo largo del año, así como para detectar problemas de exceso de agua lixiviada. El crecimiento y evolución de los chopos se controló tanto visualmente como tomando medidas periódicas del tronco y la altura de los árboles. Esto, además, sirvió para estimar la producción de biomasa (madera) que se obtendría tras las podas.

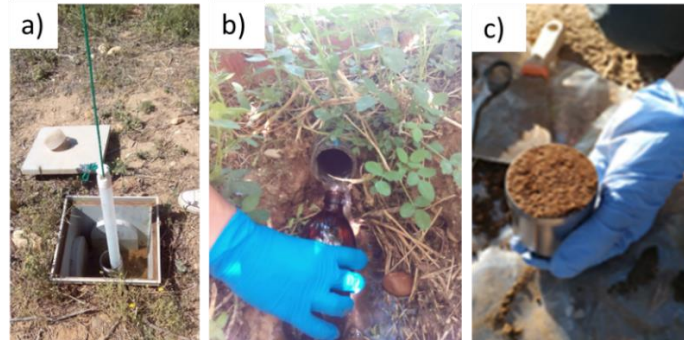
Para evitar los problemas de obstrucción que puede generar el riego con aguas residuales, se realizaba un control general de la instalación hidráulica revisando las tuberías de presurización del sistema de riego, las válvulas antirretorno, la arqueta previa al FV y el caudalímetro. Durante el tercer periodo de operación se realizó un esfuerzo adicional de control dado el mayor peligro de obstrucción de los goteros y de las tuberías instaladas en las calles para el riego por goteo. Además, durante este periodo, se pasó de regar por gravedad a regar con presión mediante la bomba de impulsión de salida del Imhoff.

Durante todas las campañas de muestreo se recogieron las muestras de agua y suelo (ver **Figura II.4**) que se describen a continuación:

- Agua residual de riego (AR) a la salida del tanque Imhoff.
- Agua de infiltración (AI) recogida mediante cápsulas de succión (lisímetros de acero inoxidable de 260 mL conectados a tubos de pentafluoroetileno (PFTE), SW-071-260, Soil Measurement Systems, Tucson, AZ, EEUU) instaladas en la calle central del FV, para evitar el efecto de borde, a 15 cm (AI15) y 45 cm (AI45) de profundidad ( $40^{\circ}30'48.6''N$ ,  $3^{\circ}20'15.3''W$ ). El vacío para las cápsulas se aplicaba poco después del riego, manualmente durante los dos primeros años de experimentación y después se instaló una bomba de succión automática (VS-Pro, UMS GmbH München, Alemania) operando entre 3,5 y 4 bares de presión.
- Agua subterránea (AS) recogida en los piezómetros (Pz) situados alrededor de la parcela del FV, entubados en acero inoxidable, y previamente vaciados, mediante una bomba de impulsión sumergible de 2" (Grundfos Holding, Dinamarca) y un bailer tomamuestras de PFTE para recoger la muestra. Las muestras de AS se tomaron:
  - Aguas arriba del FV: Pz9 ( $40^{\circ}30'50.1''N$ ,  $3^{\circ}20'16.9''W$ ) a 10 metros de profundidad y Pz7 ( $40^{\circ}30'48.6''N$ ,  $3^{\circ}20'15.6''W$ ) a 15 metros de profundidad
  - Aguas abajo del FV: Pz11 ( $40^{\circ}30'48.4''N$ ,  $3^{\circ}20'15.2''W$ ) a 10 m de profundidad
- Suelo del FV de los primeros 15 cm de profundidad: Durante cada campaña de muestreo se recogieron 9 muestras, con un equipo perforador (barrena manual) y tomamuestras (rizoma, Eijelkamp, Agrisearch Equipment, Países Bajos), cubriendo la zona central del FV (ver **Figura II.2**), para evitar los efectos de borde, y se obtuvo una

muestra compuesta de 9 alícuotas del mismo tamaño de cada una de las muestras tomadas.

En la **Figura II.5** se muestra una imagen de la toma de muestras de AS en los piezómetros (a), AR empleada para el riego (b) y suelo (c).

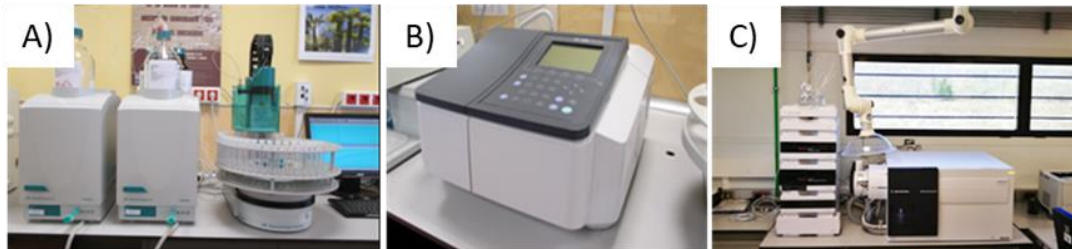


**Figura II.5.** Imágenes obtenidas durante la toma de muestras en el FV de a) aguas subterráneas, b) agua residual de riego y, c) suelo.

Todas las muestras de agua se recogieron en botellas de 1L de vidrio ámbar para análisis de CPEs (para evitar la retención y cualquier tipo de fotodegradación de los CPEs antes de su análisis), y de polietileno de alta densidad (HDPE), para el resto de los análisis realizados en campo y en laboratorio y, las muestras de suelo, en botes de polipropileno (PP). Todas las muestras de agua se analizaron directamente en campo (*in-situ*) y posteriormente en el laboratorio. Los parámetros que se midieron *in-situ* fueron el pH, la conductividad eléctrica, el potencial redox y el oxígeno disuelto, empleando un multímetro (MM41 Crison, Barcelona, España) y un oxímetro (OXI 45P CRISON, Barcelona) utilizando los métodos estandarizados para cada caso (UNE-EN-ISO 10523:2012, UNE-EN 27888:1994, IEC 60746-5:1992, UNE-EN ISO 5814:2013, respectivamente). Además, para las aguas subterráneas se realizó una medida *in-situ* semanal de nitratos mediante un analizador ultravioleta multiparamétrico transportable (PASTEL-UV).

En el laboratorio, se llevaron a cabo los análisis de las muestras empleando las técnicas y equipos que se describen a continuación (ver algunos en la **Figura II.6**). Los iones mayoritarios presentes en el agua ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) se analizaron con un equipo de cromatografía iónica (Metrohm 861 Advanced Compact IC) unido a un valorador titrando (Metrohm Tritando 809) para la determinación de la alcalinidad ( $\text{HCO}_3^-$ ). El nitrógeno total, el fósforo total y la demanda química de oxígeno (DQO) se analizaron mediante un espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu, UV1800) de acuerdo a los métodos estandarizados (UNE-EN-ISO-11905-1:1998; UNE-EN-ISO-6878:2005; UNE-77004:2002I, respectivamente). Para el carbono orgánico total (COT) se empleó un analizador en el que se realiza la combustión de la materia orgánica a dióxido de carbono y un detector mediante espectrofotometría infrarroja no dispersiva, y, para la demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>), el método respirométrico Oxitop (según la norma EN 1889-2). Por último, se realizó la determinación de los sólidos en suspensión mediante filtración con filtros de fibra Millipore tipe AP40 de 90 mm de diámetro y secado a 105 °C. La frecuencia de muestreo para estos análisis fue mayor ya que son más simples y rápidos que para la determinación de los CPEs. En el primer periodo de operación en el FV piloto (P1), todas las muestras de agua se recogieron una vez al mes. En el segundo periodo de operación (P2), se

tomaron muestras una vez a la semana para los parámetros *in-situ* y los iones mayoritarios y, una vez al mes, para el resto de los parámetros. En el tercer periodo de operación (P3), todas las muestras se recogieron y analizaron diariamente para los parámetros *in-situ*. Cada semana, una muestra combinada de AR y AI recogidas diariamente, se analizó para los iones mayoritarios y, cada mes, para el resto de parámetros. Las muestras de AS en el tercer periodo se analizaron mensualmente para el resto de parámetros, al igual que en los otros periodos.



**Figura II.6.** Imágenes de los equipos de laboratorio empleados para realizar los análisis de: A) Cromatografía Iónica (Metrhom) para iones mayoritarios; B) Espectrofotómetro (Shimadzu) para nitrógeno y fósforo total, y C) LC-MS/MS (Agilent) para CPEs.

Las muestras de suelos se recogieron una vez al año para determinar el pH, la conductividad eléctrica, el contenido de materia orgánica, nutrientes y  $\text{CaCO}_3$  (alcalinidad) y la capacidad de intercambio catiónico. El pH y la conductividad eléctrica se midieron en un ratio 1:5 de disolución suelo:agua (según las normas UNE-ISO 10390:2005, UNE 77308:2001). El contenido de materia orgánica en el suelo se realizó mediante el método de pérdida de ignición (PNE-prEN 17685-1). También se determinaron: el contenido de nitrato (mediante Cromatografía Iónica con una extracción previa descrita en Griffin *et al.*, 2011), el nitrógeno total Kjeldahl (Bloc Digest 6 para mineralización y unidad de destilación automática Pro-Nitro A, Selecta, de acuerdo con la UNE 77318:2001), el fósforo total (mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) previa extracción asistida por microondas y digestión ácida de acuerdo a la UNE 77324:2003) y el de fósforo asimilable (determinación espectrofotométrica según la norma ISO 11263:1994 trasladada a la UNE 77324:2003). La capacidad de intercambio catiónico se realizó mediante una extracción con una disolución 1M de acetato de sodio (pH 8), etanol y 1M de acetato de amonio (pH 7) seguida de un análisis cuantitativo de los cationes sodio con ICP-MS (UNE-EN ISO 11260:2018).

Finalmente, para realizar la cuantificación de CPEs en las muestras de agua de diversa procedencia y de suelo, se llevó a cabo un tratamiento de las mismas, previo al análisis por LC-MS/MS (HPLC, serie 1200 de Agilent, Palo Alto, CA; EEUU) con analizador de triple cuadrupolo (Agilent 6495). Todos los detalles del método de análisis de CPEs se describen en profundidad en el capítulo III de esta memoria.

## 2. Escala laboratorio: columnas de infiltración

Como se indicó al inicio de este capítulo, para comprender el comportamiento de los CPEs y la formación de PTs en el agua durante su infiltración a través del suelo natural y el suelo enmendado, se llevaron a cabo ensayos en columnas a escala de laboratorio (**Figura II.7**)

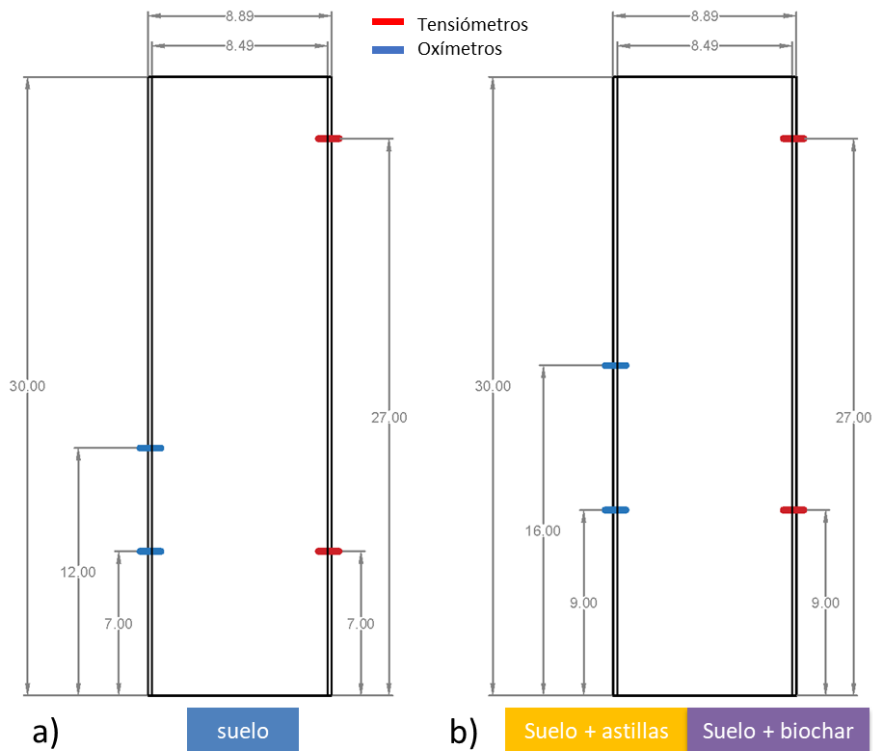
empleando suelo procedente del FV. Además, se evaluó el efecto de las dos enmiendas en la atenuación de contaminantes, que pueden causar problemas de contaminación de las masas de agua. El estudio del comportamiento de los CPEs se ve simplificado en el laboratorio, donde es posible tener un mayor control sobre las condiciones experimentales que en la realidad, como la temperatura o la composición del agua residual de cada evento de riego (Banzhaf y Hebig, 2016). Toda lo referente al ensayo a escala de laboratorio se discute en el capítulo IV de esta memoria.



**Figura II.7.** Imagen de las columnas empleadas en el ensayo de infiltración a escala laboratorio.

Las enmiendas seleccionadas para este ensayo fueron astillas de madera y biochar. Las enmiendas empleadas para el suelo suelen ser materiales orgánicos sin procesar o de bajo procesado, como las astillas de madera, que favorecen la actividad microbiana y los procesos de sorción (Meffe *et al.*, 2016; Martínez-Hernández *et al.*, 2020; Espinosa *et al.*, 2020). Alternativamente también pueden ser materiales procesados de origen orgánico muy ricos en carbono, como el biochar, un material sólido derivado de la pirólisis de biomasa, normalmente de origen vegetal, en un ambiente controlado de oxígeno, temperatura y presión (Kah *et al.*, 2017). El biochar empleado en este estudio se obtuvo sometiendo las astillas, procedentes de la poda de los chopos del FV, al proceso de pirólisis a 400W descrito por Martín *et al.* (2017). El biochar y las astillas fueron analizados para conocer los parámetros que más influyen sobre sus propiedades, como el área superficial específica mediante la teoría de Brunauer-Emmett-Teller (BET) o el punto de carga cero (PZC), entre otras. Más información sobre esta caracterización se presenta en el capítulo IV.

Las columnas se diseñaron con una altura similar a la profundidad a la que se tomaban muestras en el FV (15 cm) y con un diámetro suficiente para permitir que los efectos de dispersión del flujo fueran despreciables. La **Figura II.8** muestra un esquema con las dimensiones de las columnas y la colocación de los sensores de presión (tensiómetros) y oxígeno (oxímetros) en las mismas.



**Figura II.8.** Diseño experimental de las columnas a escala de laboratorio, incluyendo las dimensiones y los puntos de colocación de los sensores de presión y oxígeno

El riego de las columnas se llevó a cabo simulando las condiciones de riego del FV piloto al inicio de la experimentación (enero de 2018) y empleando para ello un agua residual sintética enriquecida con una selección de 11 CPEs y PTs, simulando el agua de riego del FV piloto. Las muestras de aguas de entrada y salida de las columnas recogidas durante todo el experimento fueron cuantificadas mediante con la metodología de análisis descrita en el capítulo III.

Dado que el objetivo fue evaluar el comportamiento de los CPEs, se llevaron a cabo varios estudios en las columnas de infiltración, que se enumeran a continuación por orden cronológico:

- 1º) **Análisis del contenido inicial de CPEs en suelos:** Se analizaron varias muestras del suelo del FV que se iba a emplear para los ensayos en las columnas antes de realizar el llenado y compactación de las mismas. Además de que es difícil encontrar muestras ambientales que no se encuentren impactadas por CPEs, el suelo empleado se recogió casi un año después de comenzar la operación en el FV por lo que, aunque eso permitió su estabilización biológica y química, también requirió realizar este análisis previo para conocer las cantidades de CPEs presentes en el suelo al inicio del ensayo.
- 2º) **Riego previo sin CPEs:** Se realizó para comprobar que la infiltración se producía de manera similar a lo observado en campo. Las muestras de este ensayo también se emplearon como blancos de muestra para la búsqueda de PTs (ver capítulo IV).
- 3º) **Experimento de riego con CPEs:** En este estudio se evaluó la atenuación de los CPEs y PTs seleccionados debida, fundamentalmente, a la disminución de concentración de ocurrida por los procesos de (bio)degradación y sorción.



- 4º) **Experimento de desorción:** Este ensayo permitió conocer las cantidades de CPEs desorbidas de las columnas y, por tanto, evaluar la sorción reversible de los CPEs en el suelo natural y el suelo enmendado.
- 5º) **Análisis del contenido final de CPEs en el relleno de las columnas:** Se evaluó la cantidad de CPEs retenidos irreversiblemente en las columnas de suelo con y sin enmiendas.

Por último, para alcanzar el objetivo de identificar la presencia de los posibles PTs que se forman en el agua residual al atravesar el suelo natural y el suelo enmendado, se desarrolló una estrategia de análisis no dirigida. El hecho de no detectar algunos de los CPEs en las muestras de suelo y de agua infiltrada durante los experimentos de atenuación (riego con CPEs) no significa que su biodegradación fuese total, es decir, hasta mineralización (Michael *et al.*, 2014), ya que podrían encontrarse subproductos de su degradación y/o transformación (PTs). El diseño de cada etapa del estudio para poder detectar la mayor cantidad de compuestos fue crucial, debido a la diferente naturaleza de los PTs que se pueden generar. Los resultados obtenidos de esta investigación se describen en el capítulo IV de esta memoria.

### 3. Referencias

- AEMET, Información elaborada por la Agencia Estatal de Meteorología. 2021. [http://www.aemet.es/es/datos\\_abiertos/AEMET\\_OpenData](http://www.aemet.es/es/datos_abiertos/AEMET_OpenData)
- Banzhaf, S. and Hebig, K.H., 2016. Use of column experiments to investigate the fate of organic micropollutants – a review. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.*, 20(9), 3719–3737. <https://doi.org/10.5194/hess-2016-196>
- De Bustamante, I., Lillo, F.J., Sanz, J.M., De Miguel, A., Garcia, E., Carreno, F., Gomez, D., Martin, T., Martinez, F., Corvea, J.L., 2009. A comparison of different methodologies for designing land application systems: case study at the Re- duena WWTP, *Desalin. Water Treat.*, 4, 98–102. <https://doi.org/10.5004/dwt.2009.362>.
- De Miguel, A., Meffe, R., Leal, M., González-Naranjo, V., Martínez-Hernández, V., Lillo, J., Martín, I., Salas, J.J., De Bustamante, I., 2014. Treating municipal wastewater through a vegetation filter with a short-rotation poplar species. *Ecol. Eng.* 73, 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.059>
- Dimitriou, I., Aronsson, P., 2005. Willows for energy and phytoremediation in Sweden. *Unasylva*, 56(221), 47-50
- Espinosa, N.J., Moore, D.J.P., Rasmussen, C., Fehmi, J.S., Gallery, R.E., 2020. Woodchip and biochar amendments differentially influence microbial responses, but do not enhance plant recovery in disturbed semiarid soils. *Restoration Ecology*, 28(S4), S381-S392. <https://doi.org/10.1111/rec.13165>
- FAO, 1997. Irrigation and drainage paper. Crop water requirements. <https://www.fao.org/3/x0490s/x0490s.pdf>

- Griffin, G., Jokela, W., Ross, D., Pettinelli, D., Morris, T. & A. Wolf, 2011. Recommended soil testing procedures for the northeastern United States. *Northeastern Regional Bulletin*. College of Agriculture and Natural Resources, 493, 27–38.
- Herschbach, C., Mult, S., Kreuzwieser, J., Kopriva, S., 2005. Influence of anoxia on whole plant sulphur nutrition on flooding-tolerant poplar (*Populus tremula* x *P. alba*). *Plant, Cell and Environment*, 28(2), 167-175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01256.x>
- IGME, 1990. Granitos de España. Recursos minerales ISBN: 84-7840-140-0
- Kah, M., Sigmund, G., Xiao, F., Hofmann, T., 2017. Sorption of ionizable and ionic organic compounds to biochar, activated carbon and other carbonaceous materials. *Water Research* 124, 673-692. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.070>
- Maeng, S.K., Sharma, S.K., Lekkerkerker-Teunissen, K. y Amy, G.L., 2011. Occurrence and fate of bulk organic matter and pharmaceutically active compounds in managed aquifer recharge: A review. *Water Res.* 45(10), 3015-3033
- Martín, M.T., Sanz, A.B., Nozal, L., Castro, F., Alonso, R., Aguirre, J.L., González, S.D., Matía, M.P., Novella, J.L., Peinado, M., Vaquero, J.J., 2017. Microwave-assisted pyrolysis of Mediterranean forest biomass waste: bioproduct characterization. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 127, 278–285. <https://doi.org/10.1016/J.JAAP.2017.07.024>
- Martínez-Hernández, V., 2015. Comportamiento de fármacos en la Zona No Saturada [Tesis Doctoral, Universidad Alcalá de Henares]. Repositorio eBuaH-UAH
- Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Hernández-Martín, J., Alonso González, A., de Santiago-Martín, A. y de Bustamante, I., 2020. Sustainable soil amendments to improve nature-based solutions for wastewater treatment and resource recovery. *J. Environ. Manage.*, 261, 110255. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110255>
- Meffe, R., De Miguel, A., Martínez-Hernández, V., Lillo, J., De Bustamante, I., 2016. Soil amendment using poplar woodchips to enhance the treatment of wastewater-originated nutrients. *J. Environ. Manage.* 180, 517-525. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.083>
- Michael, I., Vasquez, M., Hapeshi, E., Haddad, T., Baginska, E., Kümmerer, K., Fatta-Kassinos, D., 2014. Metabolites and transformation products of pharmaceuticals in the aquatic environment as contaminants of emerging concern. *Transformation products of emerging contaminants in the environment: analysis, processes, occurrence, effects and risks*, Vol. 1 (Nollet E & Lambropoulou D, eds), pp. 425–469. John Wiley & Sons, United Kingdom
- Monuriol, F., Alcalá, M., 1990. Mapa de Asociación de Suelos de la Comunidad de Madrid 1:200000.
- Persson, G., Lindroth, A., 1994. Simulating evaporation from short-rotation forest: variations within and between seasons. *Journal of Hydrology*, 156(1-4), 21-45
- Pradana, R., Hernández-Martín, J.A., Martínez-Hernández, V., Meffe, R, de Santiago-Martín, A, Pérez Barbón, A., I. de Bustamante, 2021. Attenuation mechanisms and key parameters to enhance treatment performance in vegetation filters: A review. *Journal of Environmental Management*, 300, 113752. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113752>
- Soil Survey Staff, 1999. *Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys in Natural Resources Conservation Service*. U.S. Department of Agriculture Handbook 436, 2ª Ed

- Teerlink, J., Martínez-Hernández, V., Higgins, C.P., Drewes, J.E., 2012. Removal of trace organic chemicals in onsite wastewater soil treatment units: A laboratory experiment. *Water Res.* 46, 5174–5184. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.024>
- Tzanakakos. V.A., Paranychianakis, N.V., Angelakis, A.N., 2009. Nutrient removal and biomass production in land treatment systems receiving domestic effluent. *Ecological Engineering*, 35(10), 1485-1492. <http://doi.org/10.1016/J.ecoieng.2009.06.009>

**CAPÍTULO III.**  
**METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA**  
**MONITORIZAR LOS CONTAMINANTES DE**  
**PREOCUPACIÓN EMERGENTE EN AGUAS Y**  
**SUELOS DEL FILTRO VERDE**

## ARTÍCULO N°1

**Título original:** *Analytical method to monitor contaminants of emerging concern in water and soil samples from a non-conventional wastewater treatment system.* En: *Journal of Chromatography A*, no. 1671, pp. 463006. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463006>)

**Autores:** Blanca Huidobro-López<sup>a,c</sup>, Isabel López-Heras<sup>a</sup>, Covadonga Alonso-Alonso<sup>a</sup>, Virtudes Martínez-Hernández<sup>a</sup>, Leonor Nozal<sup>a,b</sup>, Irene de Bustamante<sup>a,c</sup>

**Revista:** *Journal of Chromatography A*

**Editor:** Yan Sun, Tianjin University, China

**Editorial:** Elsevier

**Año de publicación:** 2022

**ISSN:** 0021-9673 (Impreso), 1873-3778 (Online)

**Categoría:** Analytical chemistry

**Posición de la revista en la categoría:** 20/87

**Factor de impacto (2021):** 4,601

**Factor de impacto (5 años):** 4,313

**Cuartil:** Q1

El presente capítulo III está basado en el artículo n°1 publicado.

## 1. Introducción

Los CPEs, entre los que se incluyen fármacos, productos de cuidado personal, drogas ilícitas u hormonas, entre otros, son contaminantes no regulados detectados muy frecuentemente en el medio ambiente (Li *et al.*, 2014; Petrie *et al.*, 2015). Su introducción en los compartimentos ambientales tiene su origen principal en las actividades antropogénicas como los efluentes de las EDAR convencionales, en las que los CPEs se eliminan de forma incompleta (Noguera-Oviedo y Aga, 2016). Hoy en día, a pesar de que existen métodos avanzados de tratamiento de aguas residuales urbanas capaces de eliminar en gran medida los CPEs (Rizzo *et al.*, 2019), su aplicación y, con ello, su verdadera eficacia se limita a grandes ciudades. Para pequeñas poblaciones, en las que las limitaciones económicas y técnicas impiden la implantación de los métodos de tratamiento avanzados mencionados, las SBN son opciones viables, sencillas y sostenibles para llevar a cabo el tratamiento de sus aguas residuales. Estas tecnologías consisten en simular y promover los procesos que ocurren de forma natural en el medioambiente para reducir la contaminación presente en el agua residual (CE, 2018), y comprenden soluciones como los humedales artificiales o los FVs. Los FVs son plantaciones arbóreas que se riegan con aguas residuales pretratadas y se dimensionan en función del caudal (De Bustamante *et al.*, 2009). El agua se infiltra a través de la zona no saturada del suelo y es depurada mediante los procesos de atenuación natural que tienen lugar en el conjunto suelo-planta-microorganismos. Esta técnica ofrece numerosas ventajas: producción de biomasa, recarga de acuíferos, mejora del paisaje, creación de nichos ecológicos, contribución a la mitigación del cambio climático y bajos costes de instalación y mantenimiento (De Miguel *et al.*, 2014). En la bibliografía, recientemente se ha descrito cómo las SBN son capaces de atenuar CPEs (Martínez-Hernández *et al.*, 2018; Oral *et al.*, 2020; García *et al.*, 2020). Sin embargo, para controlar la eficacia de su tratamiento (atenuación), el desarrollo de métodos multicomponente y multimatriz es un objetivo prioritario.

Los bajos niveles de concentración de la mayoría de CPEs presentes en las muestras ambientales (OECD, 2017), junto con el creciente número de sustancias estudiadas, hacen imprescindible el desarrollo de metodologías sensibles y selectivas capaces de determinarlos en las matrices de agua y suelo. Las muestras ambientales pueden contener otros componentes que den lugar a un efecto matriz. Por lo tanto, durante el desarrollo de estas metodologías, gran parte del esfuerzo debe centrarse en la eliminación de las posibles interferencias, causadas por estos componentes, mediante la optimización del tratamiento de muestra, pero siempre intentando reducir el número de pasos a realizar (Zuloaga *et al.*, 2012). En la bibliografía se describe una amplia variedad de procedimientos de extracción de CPEs de matrices ambientales líquidas y sólidas. La bibliografía incluye diferentes tratamientos para las muestras de suelo, como los basados en la extracción asistida por microondas (Varga *et al.*, 2010), la extracción de líquidos a presión Zuloaga *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2020), la extracción asistida por ultrasonidos (Aznar *et al.*, 2014) o la extracción sólido-líquido con disolventes mediante QuEChERS (Da Silva *et al.*, 2020). Por su parte, las muestras acuosas requieren de etapas de filtración previas al tratamiento de extracción con el fin de eliminar la mayor parte de los sólidos en suspensión que pueden estar presentes en cantidades elevadas y, a continuación, los CPEs se recuperan mediante SPE. Esta última

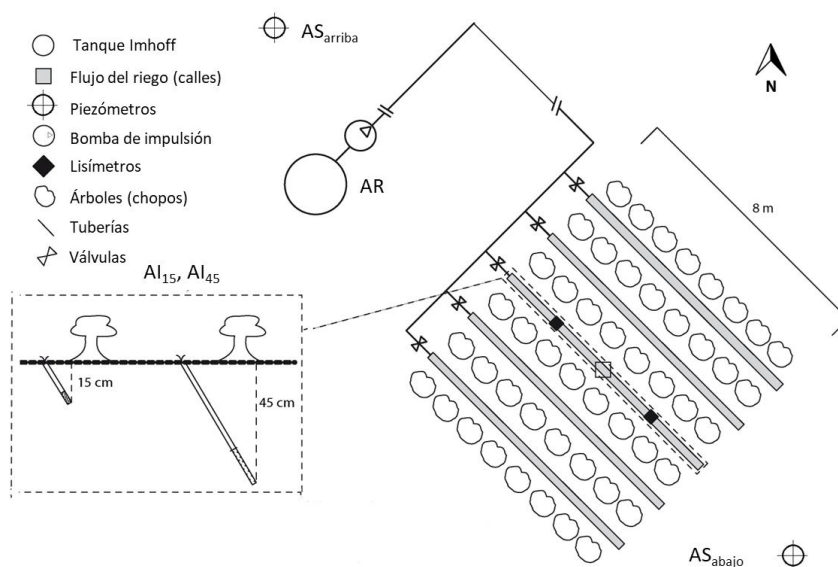
técnica es la más extendida (Robles-Molina *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2017) ya que puede ser aplicada a un mayor número de matrices que otras técnicas, optimizando las diferentes variables del proceso de SPE para lograr una recuperación aceptable de todos los compuestos estudiados (Robles-Molina *et al.*, 2014). Finalmente, una vez extraídos los compuestos deseados de las muestras, la técnica de LC-MS/MS y, en concreto, el analizador QqQ es el más habitual para llevar a cabo la cuantificación de CPEs en el medioambiente (Petrie *et al.*, 2016).

El objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología analítica por LC-MS/MS para la determinación simultánea de 40 CPEs con diferentes propiedades en matrices ambientales. El método se aplica a muestras de aguas y suelos procedentes del FV piloto instalado en IMDEA Agua (Alcalá de Henares, Madrid, España) con el fin de demostrar su aplicabilidad y evaluar la presencia y distribución de estos CPEs, en compartimentos de agua y suelo, durante el tratamiento de las aguas residuales del edificio de IMDEA Agua.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Estrategia de muestreo y caracterización de las matrices

El periodo de estudio durante el cual se realizaron las campañas de campo comprendió entre enero de 2018 y marzo de 2019. Se recogieron muestras de las matrices ambientales agua y suelo, como se explicó en el capítulo II de esta memoria: i) agua de riego (AR); ii) agua de infiltración a 15 y 45 cm de profundidad (AI<sub>15</sub> y AI<sub>45</sub>); iii) agua subterránea a 10 m de profundidad, aguas arriba y aguas abajo del FV (AS<sub>arriba</sub> (Pz7) y AS<sub>abajo</sub> (Pz9)); iv) muestra de suelo compuesta (integradas varias fracciones) a 15 cm de profundidad. En la **Figura III.1** se muestra un esquema del FV y de los puntos de muestreo de las matrices recogidas y empleadas para la puesta a punto del método de análisis que se presenta en este capítulo.



**Figura III.1.** Esquema del FV y ubicación de los puntos de muestreo de agua residual de riego (AR), agua de infiltración a 15 y 45 cm (AI<sub>15</sub> y AI<sub>45</sub>) y subterráneas aguas arriba (AS<sub>arriba</sub>) y aguas abajo (AS<sub>abajo</sub>) del FV

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de las muestras de agua recogidas en cada punto de muestreo (que se realizó conforme a lo descrito en el apartado 1 del capítulo II) mostraron variaciones de pH entre 7,8 y 8,2, con una conductividad eléctrica dentro del rango de 678-1037  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . El potencial redox fue siempre negativo para las muestras de AR (-188 a -384 mV) y positivo para las demás muestras de agua (29-219 mV). La DQO y COT estaban dentro del rango de 70 a 291 mg/L y de 23 a 38 mg/L, respectivamente, en las muestras de AR y AI, y eran más bajas en las muestras de AS (DQO=2,5-5 mg/L; COT=1,5-2,1 mg/L). En el análisis de las muestras de suelo se obtuvieron variaciones del pH dentro del rango de 8,1-8,5, una conductividad eléctrica de 140-176  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , una densidad aparente de 1,6 g/cm<sup>3</sup>, un contenido de materia orgánica de 1,7-1,9% y una capacidad de intercambio catiónico de 2543-3654 ng Na<sup>+</sup>/kg).

## 2.2. Selección de contaminantes de preocupación emergente

Se investigaron 40 CPEs (de diferentes clases) incluyendo 11 PTs. La selección de estos 40 compuestos se llevó a cabo mediante la combinación de diferentes criterios científico-técnicos, como se explica a continuación:

1. Patrón de consumo en España: se valoró con un punto a:
  - a. Los 15 principios activos de mayor consumo en envases según el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad en su Informe anual del Sistema Nacional de Salud (2016) y disponible en [www.msssi.gob.es](http://www.msssi.gob.es), y a
  - b. Los 10 compuestos genéricos más vendidos en las farmacias españolas en 2016 ([http://cincodias.com/cincodias/2016/12/02/empresas/1480709773\\_232091.html](http://cincodias.com/cincodias/2016/12/02/empresas/1480709773_232091.html))
2. Patrón de consumo en IMDEA Agua:
  - a. Se llevó a cabo un análisis de barrido (*screening*) de tres muestras de agua residual empleada para el riego en diferentes días (no consecutivos) y se valoraron todos los CPEs detectados con uno, dos o tres puntos en función de si el compuesto apareció en una, en dos o en las tres muestras.
  - b. Durante el mismo mes en el que se llevó a cabo el *screening*, se evaluó el patrón de autoadministración de las personas que trabajan en IMDEA mediante dos encuestas anónimas. Se valoraron con un punto los CPEs que aparecieron en una de las encuestas, o, con dos puntos, si aparecieron en las dos.
3. Criterios científicos de futuro para las líneas de investigación: En base a la experiencia desarrollada se dio un punto extra a compuestos pertenecientes a algunas clases:
  - a. Productos de transformación, porque la información sobre su generación y transporte es escasa en la bibliografía,
  - b. Hormonas, dado que varias pertenecen a la lista europea de observación y son los fármacos con un mayor efecto demostrado sobre las comunidades acuáticas. Por ejemplo, la testosterona sobre la que no existen



tantos datos publicados ni está en las listas de observación y cuyo efecto debería ser similar a otras más estudiadas como la estrona.

- c. Los antibióticos, aunque ya se encontraban representados por criterios anteriores (con la lista de observación, la aparición y el consumo).

De la lista final obtenida, se preseleccionaron 52 compuestos que, en base a los criterios anteriormente descritos, obtuvieron una puntuación de 3 o más. Se analizaron disoluciones de baja concentración de los patrones de los 52 CPEs por inyección directa en MS/MS, y se descartaron aquellos cuyos límites de detección no fueron aceptables (demasiado altos). Finalmente, se obtuvo una lista final de 40 CPEs que incluyen PTs, con propiedades fisicoquímicas muy diferentes, la cual que se presenta en la **Tabla III.1** (30 fármacos de distintos grupos terapéuticos, 4 compuestos “estilo de vida”, 5 hormonas y una droga ilícita). Más información (propiedades, estado de ionización, etc.) sobre los 40 CPEs seleccionados se encuentra recogida en el Anexo A.

**Tabla III.1.** Contaminantes (CPEs y PTs) seleccionados

Compuesto (acrónimo)	N° CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*
4-Aminoantipirina (4AA)	83-07-8	PT metamizol	N02 – analgésicos
4-Acetamidoantipirina (4AAA)	83-15-8	PT metamizol	N02 – analgésicos
4-Dimetilaminoantipirina (4DAA)	58-15-1	PT metamizol	N02 – analgésicos
4-Formilaminoantipirina (4FAA)	1672-58-8	PT metamizol	N02 – analgésicos
Acetaminofén (ACE)	103-90-2	Fármaco	N02 – analgésicos
Amoxicilina (AMO)	26787-78-0	Fármaco	J01 – antibacterianos
Atenolol (ATE)	29122-68-7	Fármaco	C07 – agentes betabloqueante
Ácido atenolico (ATE AC)	56392-14-4	PT atenolol	C07 – agentes betabloqueante
Atorvastatin (ATOR)	134523-00-5	Fármaco	C10 – reguladores lipídicos
Benzoilecgonina (BENZ)	519-09-5	PT cocaína	N01 – anestésicos
Cafeína (CAF)	58-08-2	Estimulante/Fármaco	N06 – psicoanalépticos
Carbamazepina (CAR)	298-46-4	Fármaco	N03 – antiepilépticos
Carbamazepina epóxido (CAREPOX)	36507-30-9	PT carbamazepina	N03 – antiepilépticos
Citalopram (CIT)	59729-32-7	Fármaco	N06 – psicoanalépticos
Claritromicina (CLA)	81103-11-9	Fármaco	J01 – antibacterianos
Codeína (COD)	76-57-3	Fármaco	N02 – analgésicos
Cotina (COT)	486-56-6	PT nicotina y fármaco	N07 – otros fármacos del sistema nervioso
Diclofenaco (DIC)	15307-79-6	Fármaco	M01 – antiinflamatorios y antireumáticos
Estrona (E1)	53-16-7	Hormona natural/Fármaco y PT E2	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital
17β-Estradiol (E2)	50-28-2	Hormona natural/Fármaco	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital
Enalapril (ENA)	75847-73-3	Fármaco	C09 – agentes del sistema renina-angiotensina
Eritromicina (ERI)	114-07-08	Fármaco	J01 – antibacterianos
Estriol (ESTRIOL)	50-27-1	PT E1	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital
17α-Ethinylestradiol (ETINIL)	57-63-6	Hormona natural/Fármaco	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital
Flecainida (FLE)	54143-55-4	Fármaco	C01 – terapias cardíacas
Furosemida (FURO)	54-31-9	Fármaco	C03 – diuréticos
Ibuprofeno (IBU)	15687-27-1	Fármaco	M01 – antiinflamatorios y antireumáticos
Ketoprofeno (KET)	22071-15-4	Fármaco	M01 – antiinflamatorios y antireumáticos
Lorazepam (LORZ)	846-49-1	Fármaco	N05 – psicolépticos
Metamizol (META)	68-89-3	Fármaco	N02 – analgésicos
Metformina (METFOR)	657-24-9	Fármaco	A02 – terapias diabetes
N4-acetilsulfametoxazol (N4ACE)	21312-10-7	PT sulfametoxazol	J01 – antibacterianos
Naproxeno (NAP)	22204-53-1	Fármaco	M01 – antiinflamatorios y antireumáticos
Nicotina (NIC)	54-11-5	Estimulante/Fármaco	N07 – otros fármacos del sistema nervioso
Ofloxacino (OFLO)	82419-36-1	Fármaco	J01 – antibacterianos
Omeprazol (OME)	73590-58-6	Fármaco	A02 – tratamiento trastornos relacionados con la acidez
Paraxantina (PAR)	611-59-6	PT cafeína	N06 – psicoanalépticos
Sulfametoxazol (SUL)	723-46-6	Fármaco	J01 – antibacterianos
Testosterona (TES)	58-22-0	Hormona natural/Fármaco	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital
Venlafaxina (VEN)	99300-78-4	Fármaco	N06 – psicoanalépticos

\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la Organización Mundial de la Salud. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

### 2.3. Reactivos, estándares y materiales

Para el desarrollo del método analítico, se utilizaron como disolventes y reactivos químicos acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), hidróxido de amonio (pureza del 32%), ácido fosfórico (pureza del 85%, Pharmpur), etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), hidróxido de sodio (NaOH) y ácido heptafluorobutírico (HFBA), todos adquiridos en Scharlab (Barcelona, España); ácido fórmico (pureza del 98%), fluoruro de amonio y acetato de amonio, suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania); ácido clorhídrico (pureza del 32-35%) de Fisher Scientific (EE.UU.) y dihidrógeno fosfato de sodio dihidratado, obtenido de Panreac AppliChem ITWReagents (Chicago, EE.UU.). El agua ultrapura se produjo mediante un sistema de purificación de agua MilliQ de Merck Millipore (Mildford, MA, EE.UU.).

Todos los estándares de los CPEs (pureza $\geq$ 98%) y los estándares internos marcados isotópicamente (ISs; pureza $\geq$ 95%) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania) y Alsachim (Illkirch Graffenstaden, Francia), excepto el citalopram (pureza 97,2%), que fue proporcionado por el Centro de Química Aplicada y Biotecnología de la Universidad de Alcalá (Madrid, España). Las disoluciones individuales de los CPEs se prepararon a una concentración de 2 mg/mL en MeOH, MeOH:agua 50:50 (v/v) o NaOH 0,1 M, dependiendo de la solubilidad de cada compuesto. Se almacenaron en viales ámbar a -20°C. Además, se prepararon disoluciones individuales de los ISs (500 mg/L) en MeOH. Las disoluciones de trabajo de CPEs se prepararon a 1 mg/L y se diluyeron según los requerimientos experimentales y en las condiciones iniciales de fase móvil.

El tratamiento de las muestras mediante SPE se realizó utilizando cartuchos OASIS HLB (sorbente polimérico universal de fase inversa que contiene un copolímero de equilibrio hidrófilo-lipófilo de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona, con un tamaño de partícula de 30  $\mu$ m) de 200 mg (6 mL) para las muestras de agua, y de 1 g (20 mL) para las muestras de suelo, ambos adquiridos de Waters (Mildford, MA, EE.UU.). Para la optimización del tratamiento de las muestras de agua, también se utilizaron cartuchos STRATA-X (copolímero de estireno y divinilbenceno, tamaño de partícula de 33  $\mu$ m) de 200 mg (6 mL) de Phenomenex (CA, EE.UU.). Las muestras de agua fueron filtradas previamente mediante filtros de fibra de vidrio de 0,7  $\mu$ m de luz proporcionados por Merck (Darmstadt, Alemania). El colector o sistema de vacío (*manifold*) empleado para la filtración y para las etapas de la SPE fue suministrado por Scharlab (Barcelona, España).

### 2.4. Método de tratamiento de las muestras

Las muestras de agua se clasificaron en dos grupos según su nivel de contaminación (principalmente orgánica): i) muestras de agua muy cargadas (AMC), que incluyen: AR y AI (DQO=70-291 mg/L; COT=23-38 mg/L), y ii) muestras de agua poco cargadas (APC) que incluyen las AS tanto aguas arriba como aguas abajo del FV (DQO=2,5-5 mg/L; COT=1,5-2,1 mg/L). Así, en función de la procedencia de las muestras de agua, fue necesario aplicar diferentes factores de preconcentración (FP) durante el tratamiento.

Las muestras de agua se filtraron con filtros de fibra de vidrio de 0,7  $\mu\text{m}$  y se ajustaron a un pH básico (9) con hidróxido de amonio al 32% (v/v). Se tomaron diferentes volúmenes de muestra (50 mL para muestras de agua muy cargadas (AR y AI) o 100 mL para muestras de agua poco cargadas (AS)), se enriquecieron con diferentes niveles de concentración de los ISs y se pasaron a través de un cartucho de SPE Oasis HLB previamente acondicionado con 6 mL de MeOH, seguido de 6 mL de agua ultrapura y 6 mL de agua ultrapura basificada a pH 10. Tras hacer pasar las muestras por gravedad, los cartuchos se lavaron con 10 mL de agua ultrapura y se secaron a vacío (5 bar) durante unos segundos para eliminar el agua remanente. Los analitos se eluyeron con tres alícuotas de 4 mL de MeOH cada una (3x4 mL), y el extracto final se evaporó hasta sequedad en un concentrador a vacío (Speed Vac, ThermoScientific, EE.UU.) operando a 45°C y 0,2 Torr. A continuación, los extractos se reconstituyeron en 1 mL para muestras de agua muy cargadas (AR y AI) o en 0,5 mL para para muestras de agua poco cargadas (AS) de MeOH:agua, (10:90, v/v), se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm (12g) (centrífuga MiniSpin, Eppendorf, EE.UU.), y finalmente se transfirieron a viales de vidrio ámbar para su análisis por LC-MS/MS (ver procedimiento resumido en la **Figura III.2**). Debido a la variabilidad de las concentraciones de los CPEs presentes en las muestras fue necesario realizar diferentes diluciones de los extractos en función de las necesidades experimentales.

Las muestras de suelo se secaron al aire y se trituraron manualmente para tener muestras representativas, de las cuales se tomaron alícuotas y se pasaron por un tamiz de 2 mm, se congelaron y se liofilizaron utilizando un liofilizador Coolvacuum (LyoMicron Technologies, S.L., Barcelona, España) para su almacenamiento en frascos de polietileno de alta densidad (HDPE) a temperatura ambiente hasta los análisis. Para finalizar, se molieron en un molino de bolas hasta obtener un polvo homogéneo. La SPE para las muestras de suelo se realizó de forma similar a las muestras de agua. Sin embargo, fue necesario un tratamiento previo de recuperación de los analitos mediante extracción sólido-líquido disolventes (extracción S-L) cuyo desarrollo se basó en el método propuesto por la EPA (EPA, 2007). Antes de llevar a cabo la extracción, se fortificó 1 g de suelo con una disolución mezcla conteniendo los diferentes ISs en metanol y se dejó toda la noche en nevera a 4°C para la evaporación del mismo. A continuación, se llevó a cabo una extracción secuencial en tres etapas utilizando ACN, agitando la mezcla en vórtex y en un baño de ultrasonidos durante 30 min a 37 Hz (Fisherbrand FB11201, Fisher Scientific, EE.UU.) y centrifugando durante 8 min a 3.000 rpm (Centrífuga, 5810R Eppendorf <sup>TM</sup>, Fisher Scientific, EE.UU.) al final de cada etapa. Este protocolo se detalla en la **Figura III.2**. Antes de la segunda extracción con ACN, se añadieron al suelo 15 mL de una disolución tampón de dihidrógeno fosfato de sodio (0,12 M) a pH 2, se agitó en vórtex, en ultrasonidos y se centrifugó. Los sobrenadantes de cada etapa se recogieron y se concentraron hasta un volumen final de 10 mL. A continuación, este volumen se diluyó hasta 100 mL con agua ultrapura conteniendo 250 mg de EDTA como agente estabilizador. En este paso, se comprobó el valor del pH y se ajustó a 3 con HCl. Los pasos de limpieza y preconcentración se realizaron a pH ácido, siguiendo un protocolo de SPE similar a las muestras de agua. Finalmente, los extractos de suelo se evaporaron y se reconstituyeron en 4 mL de MeOH:agua, 10:90 (v/v). Una alícuota (1 mL) se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm y se transfirió a un vial de vidrio ámbar para su análisis por LC-MS/MS.

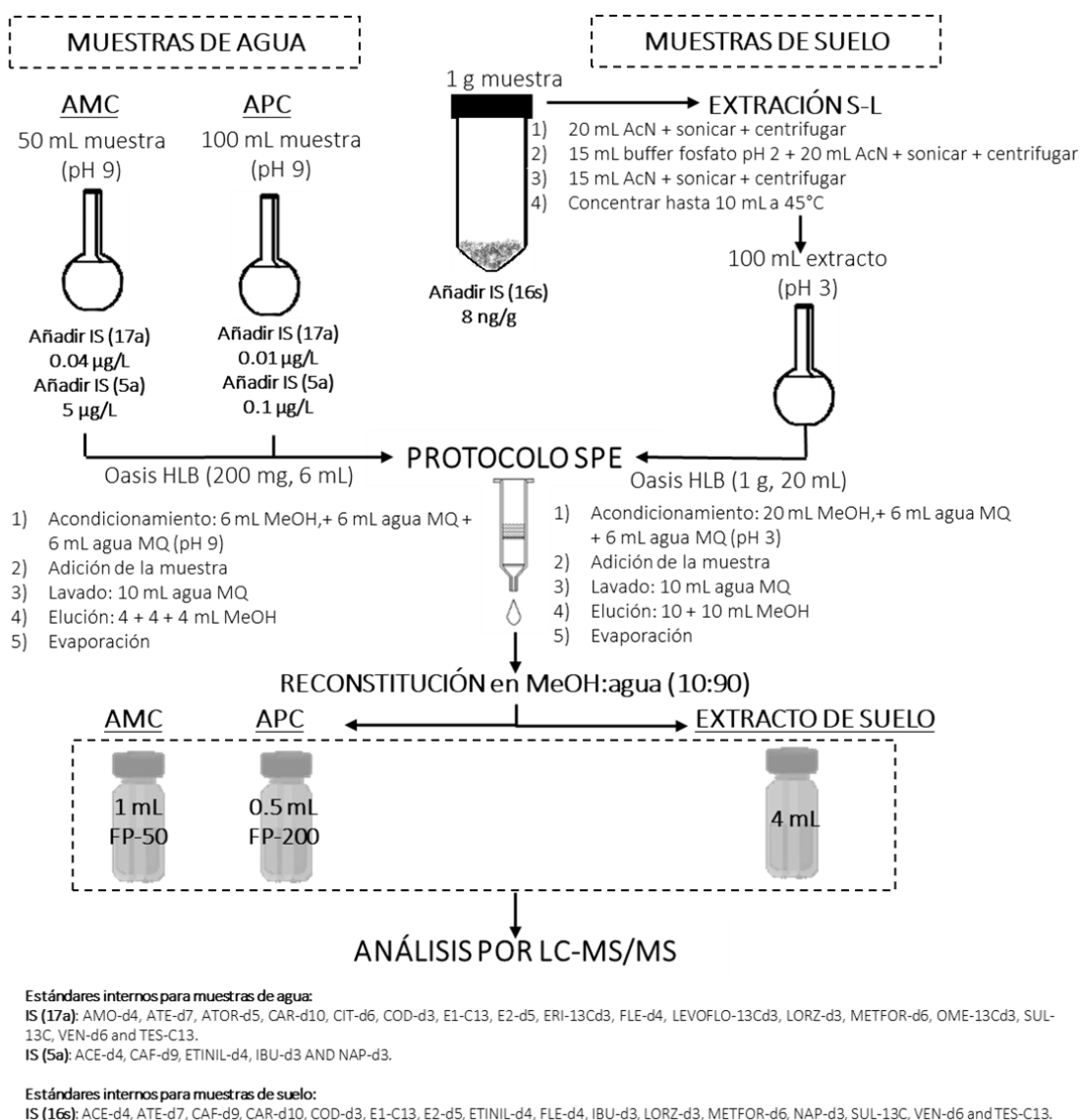


Figura III.2. Resumen esquemático del tratamiento de muestras de agua muy cargadas (AMC) y poco cargadas (APC) y muestras de suelo para la determinación de CPEs

## 2.5. Análisis de las muestras por LC-MS/MS

La cuantificación de los compuestos se llevó a cabo mediante LC-MS/MS con analizador QqQ equipado con una fuente de ionización ESI (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) con la tecnología Agilent Jet Stream e i-Funnel en modos de ionización positivo y negativo, ESI+ y ESI-, respectivamente.

La separación cromatográfica se realizó con dos columnas de LC. Para el modo de ESI+, se empleó una columna Kinetex Bifenilo (50 mm x 3 mm, tamaño de partícula 2,7 µm) con un guardacolumna de la misma composición (Phenomenex, Madrid, España) y fases móviles de 0,1% (v/v) de ácido fórmico en agua ultrapura (fase A) y 0,1% (v/v) de ácido fórmico en MeOH (fase B) utilizando un gradiente del 2 al 100% de fase B durante 30 min. Para el modo ESI-, se empleó una columna Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 3 mm, tamaño de partícula 2,7 µm) con un guardacolumna (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) y fases móviles de

fluoruro de amonio 1 mM en agua ultrapura (fase A) y MeOH:ACN 65:35% (v/v) (fase B) utilizando un gradiente del 5 al 100% de fase B durante 12 min. En ambos modos, las condiciones del 100% de fase B se mantuvieron durante 5 min y, tras el análisis, las columnas se reequilibraron durante 4 min utilizando la composición inicial de las fases móviles en cada caso. El flujo de fase móvil fue de 0,6 mL/min y la temperatura de las columnas se mantuvo a 40°C. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL.

Los parámetros de la fuente de ionización y del MS/MS optimizados fueron: la temperatura del “gas de secado” (250°C y 13 L/min) y del “sheat gas” o gas auxiliar (350°C y 11 L/min); la presión del nebulizador a 45 psi; y el voltaje del capilar a 4.000 V (ESI+) / -3.000 V (ESI-). Los datos se adquirieron en modo de monitorización de múltiples reacciones, MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), donde se aplicaron segmentos de tiempo de 2 minutos para cada transición MRM predefinida. De esta forma, fue posible aumentar el número de transiciones monitorizadas sin sacrificar la sensibilidad del análisis. Los parámetros optimizados para cada compuesto se resumen en la **Tabla III.2**.

**Tabla III.2.** Parámetros LC-MS/MS para los CPEs estudiados: tiempo de retención (TR), transiciones MRM seleccionadas para monitorización de ión cuantificador y cualificadores (Q, q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>), energías de colisión (EC) y relación (abundancia) entre el ión cualificador y el cuantificador (q/Q, %)

Compuestos en ESI +							
Compuesto	TR (min)	Ión Precursor [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Q (m/z)	EC <sub>Q</sub> (V)	q <sub>1</sub> ; q <sub>2</sub> (m/z)	EC <sub>q<sub>1</sub>;q<sub>2</sub></sub> (V)	q <sub>1</sub> /Q (%); q <sub>2</sub> /Q (%)
4AA	8.22	204.0	159.1	12	187.1	10	86
4AAA	11.10	246.1	228.0	12	204.1	12	33
4DAA	8.43	232.0	113.0	12	111.0	15	48
4FAA	11.17	232.2	214.0	12	203.9	12	50
ACE	2.58	152.0	109.9	20	65.1; 93.0	34; 24	64; 34
ACE-d4	2.52	156.0	113.9	16	69.1	36	25
ATE AC	8.56	267.8	145.1	30	191.0	14	62
AMO	3.76	365.9	113.8	18	133.8	26	24
		349.1(*)	-	-	114.0	16	61
AMO-d4	3.69	369.9	114.0	22	137.8	30	27
ATE	6.15	266.8	189.9	19	145.1; 225.0	31; 14	155; 58
ATE-d7	6.06	273.8	145.0	30	189.9	16	42
ATOR	23.88	559.0	440.1	22	276.0; 250.0	38; 48	13; 5
ATOR-d5	23.84	564.0	440.0	22	292.0	36	30
BENZ	12.36	290.1	168.0	18	105.0	30	34
CAF	10.50	195.0	138.0	19	110.0	23	20
CAF-d9	10.28	204.1	144.0	22	116.0	24	21
CAR	18.33	237.0	193.8	21	192.8	40	26
CAR-d10	18.12	247.5	204.0	20	201.9	38	18
CAREPOX	16.44	253.0	180.0	36	235.8; 209.9	12; 16	67; 39
CIT	16.79	325.0	108.9	20	261.9	19	76
CIT-d6	16.74	330.9	109.0	32	262.0	18	48
CLA	19.98	748.4	590.4	19	157.9	38	16
COD	9.21	300.0	215.0	32	225.0	27	65
COD-d3	9.15	302.8	214.9	26	198.9	26	60
COT	3.27	177.1	80.1	24	98.0	25	26
DIC	22.98	295.8	214.7	20	249.9; 277.6	12; 8	76; 22
ENA	16.48	377.2	234.0	22	377.2; 117.0	16; 44	27; 37
ERI	18.52	734.4	576.3	38	157.9	20	12
ERI-C13	18.45	738.3	161.9	28	119.9	44	3
FLE	15.85	415.1	398.0	24	300.9; 98.0	40; 30	49; 34
FLE-d4	15.75	419.0	402.0	26	98.0	26	30
KET	20.65	255.0	105.0	24	209.0	12	152
LORZ	19.58	321.1	271.0	24	228.9	36	34
LORZ-d4	19.51	324.7	278.8	22	306.8	20	34
METFOR	0.51	130.0	60.2	10	71.2	28	77
METFOR-d6	0.49	136.1	60.2	16	77.0	20	78
N4ACE	13.44	296.0	133.9	26	108.0	34	54
NAP	20.38	230.9	185.0	11	170.0	30	27
NAP-d3	20.29	233.9	188.0	16	169.6	30	14
NIC	1.75	163.1	130.0	30	131.9; 117.0	16; 34	114; 115

Compuestos en ESI + (continuación)							
Compuesto	TR (min)	Ión Precursor [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Q (m/z)	EC <sub>Q</sub> (V)	q <sub>1</sub> ; q <sub>2</sub> (m/z)	EC <sub>q<sub>1</sub>;q<sub>2</sub></sub> (V)	q <sub>1</sub> /Q (%); q <sub>2</sub> /Q (%)
OFLO	11.59	362.1	261.0	30	318.0	16	88
LEVOFLO-d <sub>3</sub> C <sub>13</sub>	11.54	365.8	321.9	18	260.8	36	84
OME	16.48	346.1	198.0	8	136.0; 168.0	36; 14	47; 15
OME-d <sub>3</sub> C <sub>13</sub>	16.64	349.9	197.8	8	135.9	36	45
PAR	7.55	181.0	124.1	22	96.1	30	7
SUL	11.95	253.9	92	31	155.8; 108.0	14; 28	68; 72
SUL-C <sub>13</sub>	11.91	259.5	98.1	26	161.8	20	65
VEN	14.59	278.2	58.0	18	260.0	8	39
VEN-d <sub>6</sub>	14.53	283.9	64.2	24	266.0	10	39
TES	23.17	289.0	97.0	30	108.9	22	70
TES-C <sub>13</sub>	23.15	292.2	100.0	24	111.9	24	76

Compuestos en ESI -							
Compuesto	TR (min)	Ión Precursor [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Q (m/z)	EC <sub>Q</sub> (V)	q <sub>1</sub> ;q <sub>2</sub> (m/z)	EC <sub>q<sub>1</sub>;q<sub>2</sub></sub> (V)	q <sub>1</sub> /Q (%); q <sub>2</sub> /Q (%)
E <sub>2</sub>	9.97	271.0	145.0	50	271.0	45	110
E <sub>2</sub> -d <sub>5</sub>	9.94	276.1	146.9	54	187.0	56	100
ESTRIOL	7.76	287.3	171.2	45	143.0	66	90
E <sub>1</sub>	10.18	269.1	145.0	46	143.0	56	34
E <sub>1</sub> -C <sub>13</sub>	10.18	273.1	148.0	40	146.0	70	33
ETINIL	10.17	295.2	145.0	50	143.0	66	74
ETINIL-d <sub>4</sub>	10.17	299.2	268.8	18	248.7	36	32
FURO	6.73	329.1	285.0	14	205.0	20	45
IBU	10.42	205.0	161.1	4	-	-	-
IBU-d <sub>3</sub>	10.40	208.0	164.1	4	-	-	-
META	5.35	310.0	191.0	14	171.9	24	35

(\*) [M(-NH<sub>3</sub>)+H]<sup>+</sup>

## 2.6. Parámetros de validación del método

Los límites de detección y cuantificación, la linealidad, la exactitud (expresada como porcentaje de recuperación, %R), la precisión (expresada como la desviación estándar relativa, RSD%) y las interferencias de la matriz, se evaluaron conforme a la Directiva 96/23/CE (CE, 2002) y SANTE/2020/12830 (CE, 2021).

Los límites instrumentales de detección (LOD<sub>i</sub>) y cuantificación (LOQ<sub>i</sub>) se establecieron como la concentración de analito que proporcionaba una relación señal/ruido (S/N) de 3 y 10, respectivamente, manteniendo la abundancia relativa entre los iones cualificadores (q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>) y el ión cuantificador (Q) dentro del rango de tolerancia recomendado (CE, 2002). Los límites de cuantificación del método (MQL) se estimaron considerando el factor de preconcentración aplicado durante el tratamiento de la muestra y las recuperaciones alcanzadas para cada compuesto.

Los estudios de recuperación se realizaron por triplicado a diferentes concentraciones en base a los niveles de CPEs encontrados en las matrices estudiadas. A las muestras de agua poco cargadas (APC) se les añadió una mezcla de los 40 CPEs objetivo a 1, 10 y 100 ng/L, a las muestras de agua muy cargadas (AR, AI), a 100 y 10.000 ng/L, y a las muestras de suelo, a 0,8 y 8 ng/g. No fueron necesarios niveles más altos de fortificación en los suelos ya que generalmente las concentraciones encontradas en los análisis preliminares eran muy bajas. La precisión del método se determinó a partir de los resultados de recuperación. Como la mayoría de los compuestos estudiados no se encuentran regulados para su análisis a nivel medioambiental, se consideró que las recomendaciones establecidas en las directrices europeas para métodos analíticos de plaguicidas (CE, 2021) eran útiles para establecer rangos de recuperación aceptables (dentro del rango del 70-120% con valores de RSD ≤ 20%).

Las recuperaciones absolutas obtenidas durante la validación del método se evaluaron para determinar la eficiencia del método de extracción y para distinguir, entre aquellos compuestos cuya recuperación no estaba comprendida en el rango 70-120% (considerado aceptable), cuáles sufrían de la ineficiencia del método y cuáles estaban afectados por la matriz (durante el tratamiento de la muestra y el análisis por LC-MS/MS). A veces, aunque se empleen diferentes estrategias de extracción, limpieza y elución, no son suficientes para poder abordar la amplia gama de compuestos con diferentes estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas en matrices complejas (Vanderford y Snyder, 2006). Debido a la falta de disponibilidad de blancos de muestra (sin contaminantes) para realizar las rectas de calibración con matriz, se realizaron dos estudios: i) evaluación de las recuperaciones de los CPEs con disoluciones de agua ultrapura siguiendo el mismo protocolo de SPE; ii) dilución de los extractos resultantes (1/50 para las muestras de agua muy cargadas (AR, AI) y 1/4 para las muestras de agua poco cargadas (AS) y los extractos de suelo).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Optimización del método LC-MS/MS

Los experimentos para la optimización de las transiciones MRM se realizaron mediante un análisis por inyección en flujo, FIA (*Flow Injection Analysis*), conectando un volumen muerto entre el inyector y la fuente ESI. Para ESI+, las fases móviles empleadas fueron agua ultrapura con 0,1% (v/v) de ácido fórmico (fase A) y MeOH con 0,1% (v/v) de ácido fórmico (fase B). Para ESI-, se utilizaron agua ultrapura con fluoruro de amonio 1 mM (fase A) y MeOH:ACN 65:35 (v/v) (fase B). En ambos modos se aplicó un método isocrático empleando una mezcla 50% fase A: 50% fase B, un flujo de 0,3 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL. En primer lugar, se inyectó una disolución de la mezcla de los estándares de los CPEs a 1 mg/L en modo de barrido completo de masas (50-1.000 m/z) para identificar los iones precursores. A continuación, se utilizó una disolución de 0,1 mg/L para identificar los iones producto aplicando cuatro energías de colisión (EC) iniciales: 10, 20, 30 y 40 V. A continuación, se optimizaron los parámetros de la fuente ESI y de la MS probando valores diferentes dentro de los rangos: gas de secado a 250-350°C a 5-11 L/min; gas de cobertura a 250-400°C a 8-12 L/min; presión del nebulizador a 25-50 psi; voltaje capilar (+/-) entre 2500 y 4500 V. Como resultado, la temperatura del gas de secado se fijó en 250°C a 13 L/min, el gas de cobertura en 350°C y 11 L/min, la presión del nebulizador en 45 psi y el voltaje capilar en 4.000 V (ESI+) y en -3.000 V (ESI-).

Las condiciones cromatográficas se optimizaron para ambos modos de ionización ESI ya que la eficiencia de ionización de un grupo de siete compuestos y sus ISs (E1, E2, ESTRIOIOL, ETINIL, IBU, FURO, META) fue significativamente mayor en ESI-. Se probaron dos columnas diferentes (Kinetex Biphenyl y Poroshell) y una variedad de composición de fases móviles empleando un gradiente lineal y los parámetros de fuente optimizados, en el modo MRM. Para ESI+, se emplearon agua ultrapura (fase A) y MeOH (fase B) con dos modificadores diferentes añadidos al 0,1% (v/v): ácido fórmico y HFBA. Para ESI-, se utilizaron dos fases acuosas (fase A) a diferentes pH con acetato de amonio (pH 8) y fluoruro de amonio (pH 6), y diferentes fases orgánicas (fase B) consistentes en mezclas MeOH:ACN en distinta proporción.



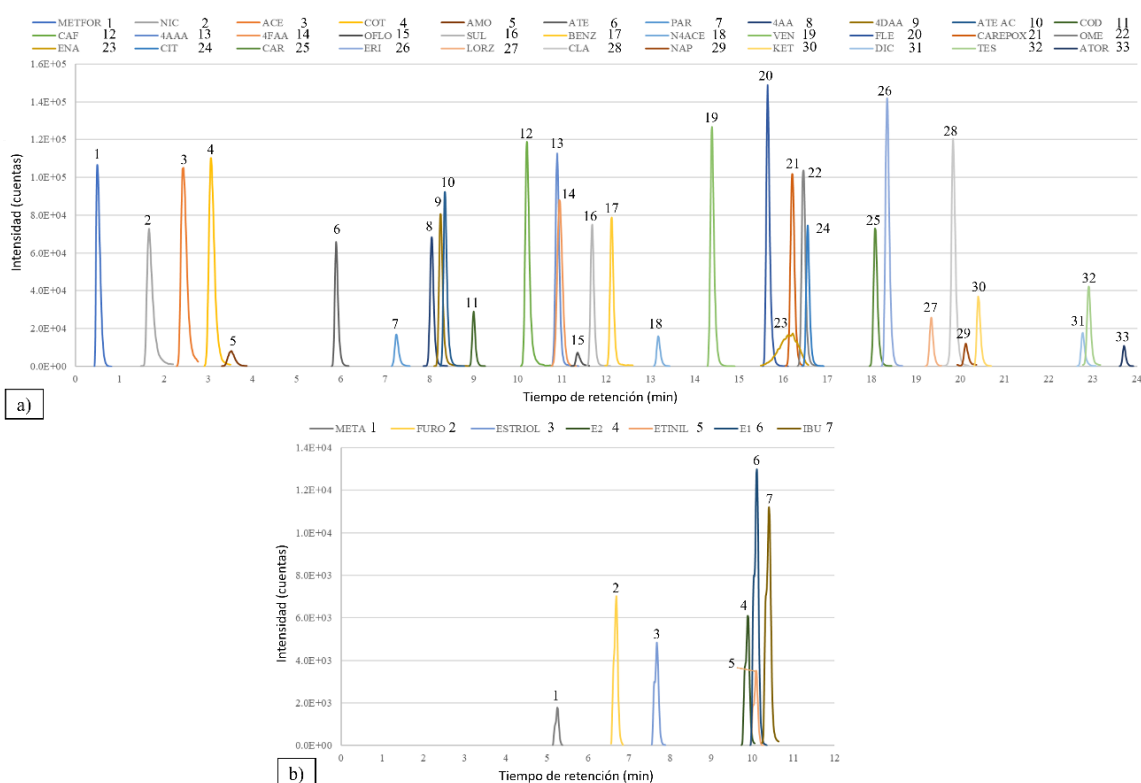
La columna Kinetex Bifenilo fue capaz de retener y eluir, en el gradiente inicial establecido de 30 minutos, todos los CPEs e ISs en ESI+. Únicamente la METFOR eluyó muy cerca del tiempo muerto de la columna (calculado teóricamente en 0,75 min) y no mostró una buena retención, resolución ni forma de pico cromatográfico. La METFOR presenta alta solubilidad en agua y polaridad, y es considerada un compuesto orgánico persistente y móvil (COP). Los retos que plantea el análisis de los COPs en las muestras medioambientales incluyen su escasa eficacia de extracción de las muestras y su débil retención en las columnas cromatográficas convencionales (Angeles y Aga, 2020). Al-Odaini *et al.* (2010) describieron que la adición de HFBA a las fases móviles retrasaba el tiempo de retención de la METFOR. En estas condiciones, se produjo un retraso de 0,5 a 1,5 minutos tras añadir HFBA al 0,1% (v/v) en lugar de ácido fórmico. Sin embargo, el uso de HFBA afectó negativamente a la sensibilidad de los demás compuestos, reduciendo notablemente su señal y, por tanto, fue descartado. Otros autores recomiendan emplear columnas HILIC (principalmente Zic-HILIC zwitterónicas) para separar compuestos muy polares (Van Nuijs *et al.*, 2010; Petrie *et al.*, 2016; Angeles y Aga, 2020). Desafortunadamente, el uso de columnas HILIC no fue adecuado para los otros CPEs porque una gran parte (43%) eluyó a altos porcentajes orgánicos del gradiente (>50%). Además, esta estrategia de analizar con dos columnas diferentes un mismo modo de ionización (ESI+) prolongaría mucho el tiempo de análisis, por lo que su aplicación para mejorar la determinación de un único compuesto no se justifica.

La columna Poroshell C18 dio mejores resultados para los CPEs evaluados en ESI-, especialmente para la FURO y el IBU. Los estudios en esta columna con fluoruro de amonio a pH 6 como fase móvil acuosa (A), dieron lugar a una mejor ionización de los compuestos y a una mayor resolución entre los picos cromatográficos (principalmente para las hormonas), en comparación las disoluciones tampón de acetato de amonio e hidróxido, aunque sean más comúnmente utilizados (Hindle, 2013). Esta columna C18 es muy recomendable para compuestos básicos con un pKa alto como las hormonas estudiadas porque presenta mayor capacidad de interacción hidrofóbica que una columna de Bifenilo. Además, un pH moderado (más alejado del límite de tolerancia de la columna, fijado en pH 2-8) reduce el desgaste del sistema de HPLC, mejora la vida útil de la columna y permite utilizar columnas distintas a las de alta tolerancia al pH, que son menos específicas (Hindle, 2013). Para la fase orgánica (B), se empleó la combinación MeOH:ACN en proporciones 65:35% porque se observó una mayor intensidad en la señal de las hormonas E1, E2 y ETINIL que con el MeOH puro.

Se realizó una prueba final a diferentes flujos (0,3, 0,4 y 0,6 mL/min) con las fases móviles seleccionadas durante la optimización anterior y los resultados mostraron una mejor resolución para los picos a 0,6 mL/min en ambas columnas. Gracias al uso de fases estacionarias con polaridades diferentes pero con la misma dimensión, fue posible establecer un flujo único para ambos modos de ionización.

La selección de las transiciones óptimas para cada CPE no se basó únicamente en la abundancia de los iones en el espectro de masas resultante del análisis FIA ya que, en algún caso, esto puede no corresponder con la sensibilidad del método LC-MS/MS debido al ruido. Así, el ión cuantificador Q se estableció como aquella con la mayor relación S/N, manteniendo la abundancia relativa entre los iones ( $q/Q$ ) dentro del rango de tolerancia establecido en la Directiva UE (CE, 2002). Como resultado, los iones moleculares protonados/desprotonados ( $[M+H]^+/[M-H]^-$ ) en ambos modos de ionización fueron los que mostraron la señal más intensa, excepto para AMO. En este caso, el ión seleccionado fue 349,1, m/z que correspondía a la pérdida de amoníaco ( $[M(-NH_3)+H]^+$ ) como también hicieron otros autores (Nägele,

2005). Para cada compuesto se seleccionaron al menos dos transiciones a monitorizar: la del ión cuantificador (Q) y la de los iones cualificadores ( $q_1$ ,  $q_2$ ). Para el 27,5% de los CPEs seleccionados (ACE, AMO, ATE, ATOR, CAREPOX, DIC, ENA, FLE, NIC, OME, SUL), fue posible monitorizar un segundo ión cualificador ( $q_2$ ), permitiendo así una identificación inequívoca. Los iones del precursor y de los productos (Q,  $q_1$  y  $q_2$ ), sus respectivas energías de colisión y abundancias relativas se muestran en la **Tabla III.2** junto con los tiempos de retención para cada compuesto. La **Figura III.3** presenta los cromatogramas MRM para los CPEs estudiados (disoluciones estándar de los CPEs a diferentes concentraciones dentro del rango de 0,3-10  $\mu\text{g/L}$  en MeOH:agua (90:10 v/v)).



**Figura III.3.** Cromatogramas MRM para los CPEs estudiados (disoluciones de los estándares de los CPEs a diferentes concentraciones en el rango 0.3-10  $\mu\text{g/L}$  preparados en MeOH:agua (10:90 v/v)) para los: a) 33 CPEs en condiciones de ESI+ con la columna Kinetex Bifenilo; b) 7 CPEs en condiciones de ESI- con la columna Poroshell C18

### 3.2. Optimización del tratamiento de muestra

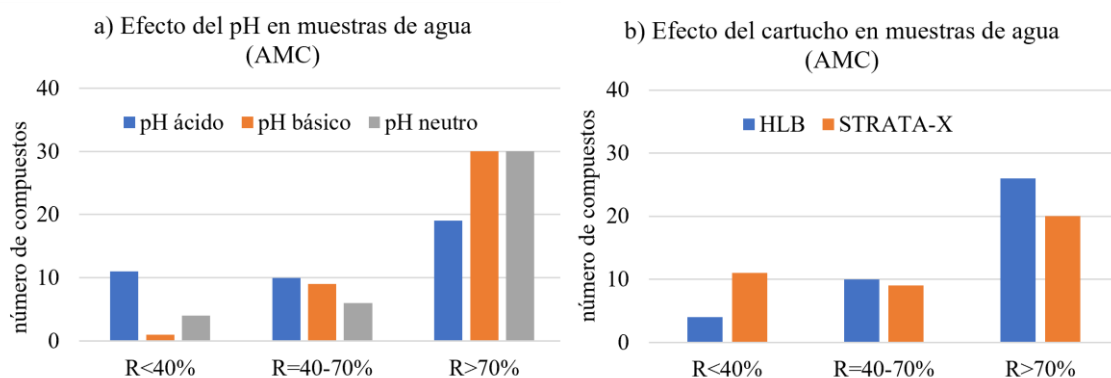
Para llevar a cabo la optimización del tratamiento de muestra, se utilizaron muestras representativas de agua de riego, de infiltración y aguas subterráneas, y muestras de suelo recogidas antes del inicio del periodo de muestreo en el FV piloto (antes de enero de 2018).

#### 3.2.1. Muestras de agua

En la mayoría de los casos, los bajos niveles de CPEs encontrados requieren la aplicación de protocolos de SPE para limpiar, extraer y concentrar estos contaminantes. En este estudio, se optimizó la extracción de CPEs de las muestras de agua tanto evaluando el efecto

de varias variables en la SPE (pH de la muestra, cartucho, etapa de limpieza y etapa de elución) como de las interferencias en los extractos resultantes aplicando diferentes factores de preconcentración (FPs).

Dado que los compuestos orgánicos pueden encontrarse como especies neutras, catiónicas, aniónicas o incluso zwitteriónicas, dependiendo del pH de la muestra, que es un parámetro crucial en la SPE pues controla las interacciones de los compuestos con el relleno de los cartuchos (Turiel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009; Baker y Kasprzyk-Hordern, 2011). En este estudio, se investigó el efecto del pH (ácido (2), básico (9) y neutro (7)) utilizando cartuchos HLB y muestras de agua fortificadas con todos los analitos a 100 ng/L. A pH ácido, un menor número de CPEs que a pH básico y neutro mostraron buena recuperación ( $R > 70\%$ ), pero algunos como NIC, OME, ERI y COT, no se recuperaron. Como se muestra en la **Figura III.4. a)**, la recuperación de la mayoría de los compuestos (30 de 40) fue similar a pH básico y neutro. El análisis simultáneo de un grupo de compuestos con diferentes características fisicoquímicas requiere generalmente un compromiso en la selección de las condiciones experimentales, lo que a veces significa no obtener el mejor rendimiento para cada compuesto individual (Al-Odaini *et al.*, 2010). Por ello, se descartaron las condiciones ácidas y se eligió como óptimo el pH básico ya que la extracción de NAP y ATE AC mejoró mucho en comparación con el pH neutro.



**Figura III.4.** Número de CPEs, entre los 40 estudiados, con diferentes rangos de porcentajes de recuperación en muestras fortificadas a 100 ng/L durante el estudio del efecto de a) pH de las muestras y b) cartuchos de SPE

Algunos de los CPEs tienen grupos funcionales ácidos o básicos que pueden interactuar con la parte hidrofílica o lipofílica del relleno (sorbente) del cartucho. Para la optimización de la SPE, se utilizaron dos tipos de cartuchos en función de su capacidad de adsorción hidrofílica-lipofílica: Oasis HLB y STRATA-X (ambos de 200 mg, 6 mL). Los grupos funcionales de su superficie permiten establecer una gran variedad de interacciones, siendo capaces de extraer compuestos con una amplia gama de polaridades (modo mixto) en comparación con los sorbentes basados en un único mecanismo específico (polar, no polar o sólo intercambio de iones) (Robles-Molina *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2017; Angeles y Aga, 2020). Los cartuchos Oasis HLB y STRATA-X son los más empleados en los análisis de CPEs en aguas residuales (Sadutto y Picó, 2020). Para evaluarlos, las muestras de agua fortificadas con todos los analitos (100 ng/L) se cargaron en cada cartucho, previamente acondicionado. Además, durante la optimización se probaron diferentes modificaciones en las etapas de lavado y elución de la SPE.

El cartucho HLB mostró, en general, una mayor recuperación de los CPEs (**Figura III.4. b)**. STRATA-X mejoró principalmente la recuperación de las hormonas E1, E2 y ETINIL (del 60% al

100% de media), pero disminuyó en más de la mitad la recuperación de siete CPEs (4AA, METFOR, ATE AC, META, OME, SUL, IBU), por lo que, para lograr un mejor compromiso, se seleccionaron los cartuchos HLB.

Las disoluciones empleadas en la etapa de lavado deben ser lo suficientemente fuertes como para eliminar las impurezas retenidas en el cartucho, pero sin arrastrar los analitos de interés. Normalmente se emplea agua ultrapura o agua con un bajo porcentaje de disolventes orgánicos (Sadutto y Picó, 2020). En este estudio se investigó el efecto del agua ultrapura y dos mezclas de agua:MeOH (90:10 y 80:20 v/v). Los resultados obtenidos condujeron a descartar la adición de MeOH al agua de lavado en el protocolo optimizado debido a las pérdidas producidas de casi todos los compuestos y, especialmente de N4ACE, SUL, AMO, META y ATE AC. Otros estudios también indican que existe un efecto negativo de la adición de MeOH ya que hace que la matriz sea menos polar, y ayuda a solubilizar compuestos más hidrofóbicos, por lo que da lugar a más pérdidas de masa de muchos de los CPEs (Almeida y Nogueira, 2006).

Dada la distinta polaridad de los CPEs estudiados, se utilizaron diferentes disolventes para la etapa de elución (MeOH, MeOH:ACN (50:50, v/v) y MeOH:acetona (50:50, v/v)), así como la incorporación de un aditivo (MeOH + 2% de ácido fórmico) con el fin de modificar el pH del medio y mejorar la elución de los compuestos retenidos. En este ensayo, se lograron mejores recuperaciones con MeOH 100% como eluyente (R=70-120% para el 68% de los CPEs). Sólo SUL y ETINIL mejoraron notablemente la recuperación con MeOH:ACN y MeOH + 2% de ácido fórmico, respectivamente. Por tanto, se empleó MeOH 100% como disolvente para la etapa de elución en el protocolo optimizado.

Por último, se estudiaron tres FPs diferentes en función de la matriz de la muestra: FP-50, FP-100 y FP-200. En las muestras de agua muy cargadas (AR, AI), las recuperaciones con los diferentes FPs fueron similares para 24 (60-120%) y 4 de los 40 CPEs (<40%), pero el FP-50 mejoró la recuperación en al menos un 20% en comparación con el FP-100 y el FP-200 para los otros 12 CPEs (FLE, ENA, ESTRIOL, CAREPOX, ATE AC, VEN, N4ACE, DIC, FURO, CAR, E2, CLA). Por lo tanto, se seleccionó el FP-50 para el protocolo de SPE para muestras de agua muy cargadas (AR, AI). En las muestras de agua poco cargada (AS), los CPEs se recuperaron bien con todos los FPs probados. Como estas muestras (AS) presentaban concentraciones muy bajas de los CPEs estudiados, se eligió en este caso el FP-200 para alcanzar menores límites de detección metodológicos.

### 3.2.2. Muestras de suelo

Como estrategia para llevar a cabo los análisis del suelo, se estudiaron las condiciones optimizadas de la SPE incluyendo un paso previo de extracción S-L basado en el método EPA (2007), aunque éste sólo incluye 13 de los 40 compuestos seleccionados en este trabajo. Cuando se aplicó el método EPA a las muestras de suelo utilizando un protocolo ácido (pH 2) y uno básico (pH 10), se recuperaron 28 y 23 de los 40 CPEs, respectivamente. En medio ácido, de los otros 12 de los 40, siete no se recuperaron debido a ineficiencias en el método SPE (como se discutirá en el siguiente apartado) y los otros cinco (METFOR, COT, NIC, OME y 4DAA) no pudieron ser extraídos. El principal problema encontrado durante el desarrollo de métodos analíticos dirigidos para CPEs con una amplia gama de propiedades es la necesidad de encontrar un equilibrio que permita extraer dichos compuestos del suelo sin arrastrar

simultáneamente otros compuestos que están presentes en la matriz y pueden dar lugar a interferencias a lo largo del tratamiento. Por esta razón, el conjunto de CPEs en las muestras de suelo se redujo a un grupo representativo compuesto por 28 CPEs entre los que se incluyen fármacos de varias clases terapéuticas con diferentes propiedades ( $\log D_{ow}$  o  $\log P_{ow}$ , pKa) y estados de ionización (neutro, positivo, negativo, zwitterónico), considerando además la frecuencia de aparición de estos CPEs en las muestras de agua analizadas en este trabajo. Este grupo está formado por 4AAA, 4FAA, ACE, ATE, ATE AC, BENZ, CAF, CAR, CAREPOX, CLA, COD, DIC, E1, E2, ESTRIOL, ETINIL, ENA, FLE, FURO, IBU, KET, LORZ, N4ACE, NAP, PAR, SUL, VEN y TES.

Se evaluaron a continuación todas las etapas de la extracción S-L incluidos en el método de la EPA (1.-tampón fosfato ácido 0,12 M; 2.-ACN; 3.-tampón fosfato ácido 0,12 M con ACN; 4.-ACN). La primera etapa con la disolución tampón de fosfato no mejoró significativamente la eficacia de la extracción, por lo que se excluyó del protocolo para así simplificar el proceso y reducir el tiempo de tratamiento de las muestras y el consumo de reactivos. Después de la extracción, se recogieron los sobrenadantes y se concentraron hasta un volumen final de 10 mL (en lugar de 20 mL como en el método EPA) y luego se diluyeron hasta 100 mL (en lugar de 200 mL como en el método EPA).

Tras esta extracción secuencial, el proceso de SPE aplicado a las muestras de agua se adaptó a los extractos de suelo. Los cartuchos HLB, de mayor tamaño que los empleados para las muestras de suelo dado el mayor volumen de muestra a cargar conforme al proceso SPE optimizado en cada caso, fueron previamente acondicionados con MeOH y agua ultrapura a un pH ácido (3), y la etapa de lavado se realizó con 10 mL en lugar de los 20 mL propuestos por el método EPA. Finalmente, en la etapa de elución, se sustituyeron los 12 mL de MeOH propuestos por la EPA por 20 mL (10 + 10 mL), ya que la recuperación de algunos CPEs mejoró ligeramente.

La aplicación del método optimizado en base al de la EPA, permitió la recuperación de 21 CPEs no incluidos en el de la EPA, que no han sido estudiados en profundidad o son PTs identificados recientemente en la bibliografía. Además, se obtuvieron recuperaciones satisfactorias (>75%) para compuestos como los productos de transformación (4AAA, ATE AC y N4ACE) o las hormonas y sus derivados (E1, E2, ESTRIOL y ETINIL). Estos resultados complementan la información recogida en el método EPA y pueden ser muy útiles en futuros estudios.

### 3.3. Validación del método

#### 3.3.1. LOD, LOQ y linealidad

Los valores establecidos para el  $LOD_i$ ,  $LOQ_i$  y MQL para cada compuesto se presentan en la **Tabla III.3**. En las muestras de agua muy cargadas (AR, AI), se obtuvieron MQLs dentro del rango de 0,2-1 ng/L para 24 CPEs y, del rango de 1-5 ng/L, para 15 CPEs. En las muestras de agua poco cargadas (AS), los valores de MQL fueron más bajos que en muestras de agua muy cargadas (AR, AI): 10 CPEs dentro del rango de 0,05-0,1 ng/L, 28 CPEs dentro del rango de 0,1-1 ng/L y sólo 2 CPEs dentro del rango de 1-5 ng/L. En resumen, la metodología aplicada en el tratamiento de estas muestras de agua complejas (de bajo a alto contenido orgánico e

inorgánico) permitió alcanzar valores de MQLs de 0,05-5 ng/L, excepto para la CAF en las muestras de agua muy cargadas. Este CPE se encontró en concentraciones > 1.000 ng/L y, por tanto, su MQL fue lo suficientemente bajo como para permitir su cuantificación. Los MQLs obtenidos se encuentran dentro del rango de los indicados por otros autores para la mayoría de los contaminantes en matrices de agua similares (Nurmi y Pellinen 2011; Hermes *et al.*, 2018). En el caso de las muestras de suelo, se estableció un intervalo de MQL de 0,04-1,10 ng/g para todos los compuestos, excepto para la COD (Tabla III.4). El rango de concentraciones obtenido coincide con otros métodos multicomponente encontrados en la bibliografía para muestras de suelo similares (Golovko *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).

**Tabla III.3.** Resultados de la validación del método desarrollado en muestras de agua muy cargadas (AMC) y poco cargadas (APC) fortificadas a diferentes niveles de concentración (n=3). LOD<sub>i</sub> (ng/L): límite de detección instrumental; LOQ<sub>i</sub> (ng/L): límite de cuantificación instrumental; R (%): recuperación; RSD (%): porcentaje de desviación estándar relativo; MQL (ng/L): límite de cuantificación metodológico

Compuesto	LOD <sub>i</sub>	Matriz: LOQ <sub>i</sub>	AMC			APC						
			100 ng/L (*)		MQL	1 ng/L		10 ng/L		100 ng/L		MQL
			R	RSD		R	RSD	R	RSD	R	RSD	
4AA	3	10	72	2	0.30	92	3	78	7	69	2	0.07
4AAA	3	10	83	11	0.30	88	4	88	9	89	4	0.06
4DAA	3	10	83	4	0.30	69	1	86	6	90	7	0.07
4FAA	6	20	80	7	0.50	70	3	86	4	94	5	0.20
ACE	20	50	104(**)	7	1.5(*)	>120		85	10	100	2	0.30
AMO	10	50	95	14	3.0	114	19	110	3	98	1	0.30
ATE	3	10	100	4	0.5	108	4	100	4	99	1	0.05
ATE AC	10	30	95	7	0.70	115	2	90	4	90	5	0.20
ATOR	10	30	98	4	1.5	>120	13	91	7	85	6	0.20
BENZ	3	10	90	6	0.20	93	5	90	5	90	2	0.06
CAF	100	300	101(**)	9	13(*)	>120		101	14	101	2	1.5
CAR	3	10	84	7	0.30	116	12	86	6	91	4	0.06
CAREPOX	3	10	83	13	0.30	102	1	71	2	85	4	0.07
CIT	3	10	79	23	0.70	92	12	81	16	91	18	0.06
CLA	3	10	65	5	0.30	99	4	71	15	68	1	0.07
COD	3	10	93	6	0.30	105	6	90	5	95	5	0.06
COT	3	10	101(**)	2	0.20(*)	113	5	94	5	94	5	0.05
DIC	50	100	91	5	2.2	90	6	83	6	82	5	0.60
E1	6	20	86	6	0.60	106	9	114	6	87	6	0.10
E2	6	20	82	13	0.60	N.R.		111	12	81	6	0.10(*)
ENA	30	100	98	5	2.0	>120		96	2	94	3	0.60
ERI	3	10	94	6	0.40	N.R.		92	7	89	6	0.06(*)
ESTRIOL	6	20	84	8	0.50	102	7	95	6	92	13	0.10
ETINIL	10	30	87	12	0.80	N.R.		90	17	92	8	0.20(*)
FLE	30	100	88	7	4.0	>120		85	5	88	3	0.60
FURO	3	10	99	5	0.20	88	9	72	5	71	4	0.07
IBU	30	100	98(**)	8	2.0(*)	105	36	88	14	99	3	0.60
KET	20	50	81	6	1.20	79	7	90	5	90	4	0.30
LORZ	6	20	94	4	0.60	103	1	101	6	100	9	0.10
META	3	10	91	14	0.20	96	1	99	10	109	12	0.05
METFOR	6	20	97	5	4.0	>120		103	7	107	3	0.10
N4ACE	6	20	89	7	0.50	104	4	84	5	88	8	0.10
NAP	30	100	96(**)	6	2.0(*)	N.R.		94	3	83	6	0.60(*)
NIC	20	50	99(**)	11	1.0(*)	N.R.		80	14	90	9	0.30(*)
OFLO	300	1000	108	12	5.0	N.R.		105	13	99	14	5.0(*)
OME	10	30	94	7	0.70	109	2	98	7	96	3	0.20
PAR	20	50	80(**)	16	1.5(*)	91	23	86	8	45	9	0.60
SUL	3	10	85	6	0.30	118	13	90	9	93	8	0.06
TES	50	100	88	13	3.0	96	11	104	7	75	7	0.70
VEN	30	100	91	9	4.0	>120		79	8	84	8	0.70

N.R.: Recuperación no evaluable debido al bajo nivel de concentración y la ausencia de blancos de muestra.

(\*) Valores estimados de acuerdo a la metodología propuesta

(\*\*) Recuperación estudiada sólo a 10 µg/L debido a la elevada concentración en las muestras de AMC.

La linealidad del método se estableció mediante 12 puntos de calibración dentro del rango 10-20000 ng/L (el equivalente a 0,04-80 ng/g en el suelo) para todos los CPEs, excepto LORZ (20-5000 ng/L). Debido al amplio rango de concentraciones de los CPEs en las muestras de agua, se aplicaban dos rectas de calibración para lograr una cuantificación más precisa: desde el LOQ<sub>i</sub> a 100-500 ng/L y desde 100-500 a 20000 ng/L, para niveles bajos y altos, respectivamente. Como resultado, los coeficientes de correlación (r) fueron  $\geq 0,998$  para las rectas de calibración de todos los CPEs.

### 3.3.2. Exactitud y precisión

En la **Tabla III.3** se muestra la exactitud y la precisión del método desarrollado para las diferentes matrices de muestras de agua (AR, AI, AS) a los diferentes niveles de fortificación. En las muestras de muestras de agua muy cargadas (AR, AI), la recuperación fue aceptable (70-120%) para los 33 CPE a 100 ng/L (excepto CLA, 65%). Como se indica en la **Tabla III.3**, ACE, CAF, COT, IBU, NAP, NIC y PAR no pudieron ser evaluados al nivel más bajo porque estas muestras ya se encontraban muy concentradas ( $>1000$  ng/L). Las recuperaciones se validaron sólo a 10.000 ng/L (R=96-104%) y los extractos se analizaron diluidos. En las muestras de agua poco cargadas (AS), se obtuvieron recuperaciones aceptables (R=70-120%) para todos los CPEs a 10 y 100 ng/L, y para el 74% de los CPEs, a 1 ng/L. La falta de blancos de matriz dificultó el estudio de niveles más bajos para seis CPEs (15%). En todos los casos se demostró una buena precisión del método para todos los analitos.

La **Tabla III.4** muestra los resultados obtenidos de la recuperación y la precisión del método desarrollado para las muestras de suelo a los dos niveles de fortificación (0,8 y 8 ng/g). Para el 70% de los CPES estudiados, las recuperaciones variaron en el rango 70-120%. Se obtuvieron %R similares a ambos niveles, excepto para algunos compuestos (ACE, CAF, DIC, FLE, IBU, CAREPOX, CLA) que no pudieron ser evaluados al nivel más bajo porque sus LOQs estaban muy cerca de 0,8 ng/g. A pesar de la falta de homogeneidad en la distribución de los analitos en las muestras de suelo, que podría conducir a una elevada variabilidad de los porcentajes de recuperación respecto a los mostrados para las muestras de agua (EPA, 2002), se obtuvieron valores de precisión aceptables.

**Tabla III.4.** Resultados de la validación del método desarrollado en muestras de suelo fortificadas a los dos niveles de concentración (n=3). R (%): recuperación; RSD (%): porcentaje de desviación estándar relativo; MQL (ng/L): límite de cuantificación metodológico

Matriz: Compuesto	Suelo				MQL
	0.8 ng/g		8 ng/g		
	R	RSD	R	RSD	
4AAA	78	5	83	5	0.10
4FAA	64	12	50	2	0.10
ACE	N.R.		75	7	0.10 <sup>(*)</sup>
ATE	76	3	82	8	0.80
ATE AC	100	12	94	2	0.20
BENZ	61	7	75	2	0.30
CAF	N.R.		71	11	0.10 <sup>(*)</sup>
CAR	70	7	75	7	0.20
CAREPOX	N.R.		51	16	0.20 <sup>(*)</sup>
CLA	N.R.		50	22	0.10 <sup>(*)</sup>
COD	91	9	84	1	12
DIC	N.R.		39	4	0.10 <sup>(*)</sup>
E1	80	11	88	7	0.04
E2	84	10	89	12	0.05
ENA	88	1	59	4	0.10
ESTRIOL	114	8	88	12	0.05
ETINIL	80	16	77	9	0.05
FLE	N.R.		79	9	0.70 <sup>(*)</sup>
FURO	28	23	44	16	0.30
IBU	N.R.		73	10	0.20 <sup>(*)</sup>
KET	83	9	79	5	0.50
LORZ	68	6	95	10	0.10
N4ACE	90	3	83	9	0.10
NAP	75	22	67	22	0.30
PAR	35	14	35	14	1.10
SUL	88	20	88	13	0.09
TES	95	1	73	9	0.60
VEN	66	23	81	21	0.50

N.R.: Recuperación no evaluable debido al bajo nivel de concentración y la ausencia de verdaderos blancos de muestra.

(\*) Valores estimados de acuerdo a la metodología propuesta

La Conferencia Internacional de Armonización destaca que el objetivo de cualquier validación metodológica es demostrar que es "adecuado para su propósito" (CE, 2002). Teniendo en cuenta el elevado número de CPEs incluidos en este estudio y sus diferentes propiedades, además de la gran variabilidad en las concentraciones en los compartimentos ambientales muestreados, se consideraron satisfactorios los porcentajes de recuperación obtenidos con el método desarrollado.

### 3.3.3. Evaluación de las interferencias de matriz

Para evaluar las interferencias de la matriz se consideraron las recuperaciones absolutas de los CPEs al nivel de 100 ng/L. Así, en las muestras de muestras de agua muy cargadas (AR, AI) y poco cargadas (AS) respectivamente, 26 y 25 CPEs cumplieron los criterios de aceptación, 7 y 6 CPEs mostraron recuperaciones absolutas entre el 50-70%, 6 y 8 CPEs obtuvieron una R<50%, y sólo el OFLO mostró recuperaciones absolutas por encima del 120%. Los estudios de fortificación en agua ultrapura (sin matriz) y con matriz real de agua



demonstraron que sólo cinco CPEs (ACE, CAF, METFOR, NAP, PAR) estaban fuertemente afectados por las interferencias de la matriz (tanto en muestras de agua muy cargadas como poco cargadas). ACE, CAF y PAR son compuestos neutros y, por tanto, tienden a interactuar con las partes neutras de la materia orgánica presente en las muestras (Schaffer y Licha, 2015). Esta podría ser la causa del efecto de supresión de matriz observada para dichos CPEs. La METFOR fue el compuesto que peor se recuperó (R absoluta =10%) ya que su elución en el tiempo muerto provocó la interacción con sustancias inorgánicas que eluyen rápidamente, lo que hace muy difícil evitar los efectos de supresión para este compuesto mediante dilución de los extractos. Sin embargo, los niveles de concentración de METFOR en las muestras estaban asegurados por la linealidad del método LC-MS/MS y por el uso de ISs. Además, se llevó a cabo una prueba de intercomparación en diferentes condiciones cromatográficas (ácido fórmico frente a HFBA como modificadores), para un grupo de muestras representativas, con el fin de asegurar la fiabilidad de la cuantificación. Las concentraciones obtenidas añadiendo un 0,1% (v/v) de HFBA a las fases móviles (TR METFOR=2,5 min) fueron similares a los valores registrados con un 0,1% (v/v) de ácido fórmico (TR METFOR=0,5 min). En el caso de los demás compuestos que no cumplían los criterios de recuperación absoluta, los estudios de fortificación en agua ultrapura realizados fueron similares a aquellos con matriz real de agua fortificada para el 77% de los CPEs, lo que significa que el método de SPE presentaba ineficiencias para estos CPEs. Entre ellos, las mayores ineficiencias se registraron para OFLO (R absoluta >120%) y para CIT, AMO y ATOR (R absoluta <40%). La señal del OFLO podría mejorarse aplicando la SPE en medio ácido, como se describe en la bibliografía (Li, 2009). Sin embargo, en las condiciones ácidas de este estudio, su recuperación fue sólo del 40%, y no se justifica su aplicación porque las condiciones ácidas se habían observado inadecuadas para la mayoría de los CPEs durante el desarrollo del método de análisis. Los fármacos CIT y ATOR tienen enlaces carbono-flúor, que son más fuertes que los enlaces carbono-hidrógeno (O'Hagan, 2008) lo que los hace más estables e hidrofóbicos ( $\log K_{ow}(\text{CIT})=2,9$  y  $\text{ATOR}=1,9$ ) y, por tanto, podrían dificultar su extracción del suelo. La AMO se asocia con la materia orgánica, que a su vez puede unirse al relleno de los cartuchos HLB de forma irreversible dificultando su separación durante la etapa de elución (Cha *et al.*, 2006; Lahti y Oikari, 2011). Afortunadamente, se disponía de los ISs correspondientes para controlar las recuperaciones de todos los CPEs excepto 4AA, PAR, FURO, CLA y META.

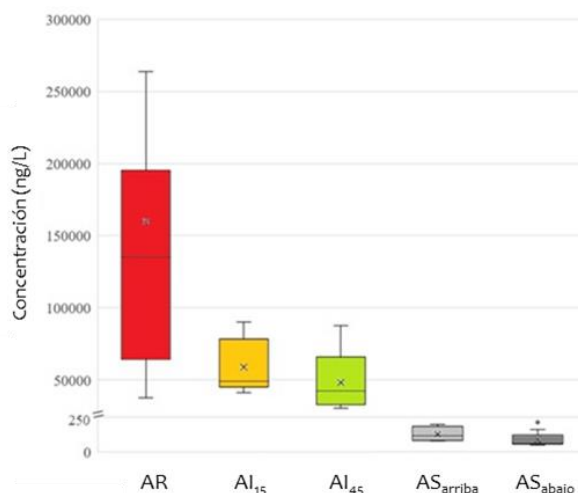
En las muestras de suelo, un menor número de compuestos (36%) que en las muestras de agua cumplieron los criterios de recuperación, hecho que revela la mayor complejidad de esta matriz. Sin embargo, en el análisis cuantitativo de trazas ambientales, la baja recuperación con buena repetibilidad no supone un obstáculo para una cuantificación fiable, ya que sólo se requiere una alta recuperación cuando la sensibilidad del método es baja (Al-Odaini *et al.*, 2010; De Santiago-Martín *et al.*, 2020). Se obtuvieron recuperaciones absolutas del 50-70% para el 32% de los CPEs, e inferiores al 50% para el otro 32% de los CPEs. Las ineficiencias del método SPE o las interferencias de la matriz del suelo durante el proceso SPE y el análisis LC-MS/MS de los extractos de la SPE ya fueron descritas en el párrafo anterior para el 61% de los CPEs que no cumplían los criterios. Para los siete compuestos restantes, la recuperación de ATE, COD y CAREPOX se mejoró realizando la extracción en medio básico, únicos tres compuestos de los 40 estudiados que se recuperaron mejor con el protocolo básico que fue descartado durante la optimización. Otros estudios (Horsing *et al.*, 2011; De Sousa *et al.*, 2015) también coinciden en esta observación. Así, sólo cuatro (4FAA, DIC, ENA e IBU) de los 28 CPEs validados para el método de extracción de suelos, se vieron estrictamente afectados por las interferencias de la matriz durante la extracción y/o el análisis. ENA se encuentra cargado

positivamente a pH 3, lo que sugiere que puede interactuar con las cargas negativas de la superficie de los minerales y/o la materia orgánica (Martínez-Hernández et al., 2014; Golovko et al., 2016), reteniéndose más fuertemente en el suelo y dificultándose por tanto su extracción. Los fármacos DIC e IBU son compuestos neutros a pH 3 y tienen una notable hidrofobicidad ( $\log K_{ow}=4,3$  y  $3,8$ , respectivamente). La desestabilización de las interacciones entre los CPEs y los compuestos que componen la matriz sólida es un reto durante los análisis multicomponente indispensables para estudiar las muestras sólidas ambientales (Ferhi et al., 2016). La materia orgánica y otros compuestos del suelo pueden competir con los CPEs por los sitios de unión reduciendo su retención (Drori et al., 2005; Dodgen y Zheng, 2016). Esto podría llevar a una recuperación relativamente pobre para compuestos hidrofílicos como el 4FAA. Afortunadamente, la disponibilidad de los ISs correspondientes, excepto para DIC, FURO y PAR, permitió corregir las pérdidas no controladas de CPEs durante el tratamiento de las muestras de suelo. Dada la variedad de los compuestos incluidos en este estudio multicomponente, se consideró aceptable el hecho de que algunos de ellos se recuperaran peor que otros con el método propuesto. En cualquier caso, los valores de concentración obtenidos exactos y precisos incluso para aquellos CPEs cuyo IS no estaba disponible porque se aplicaron recuperaciones validadas con una precisión (RSD) adecuada.

### 3.4. Aplicación a muestras medioambientales

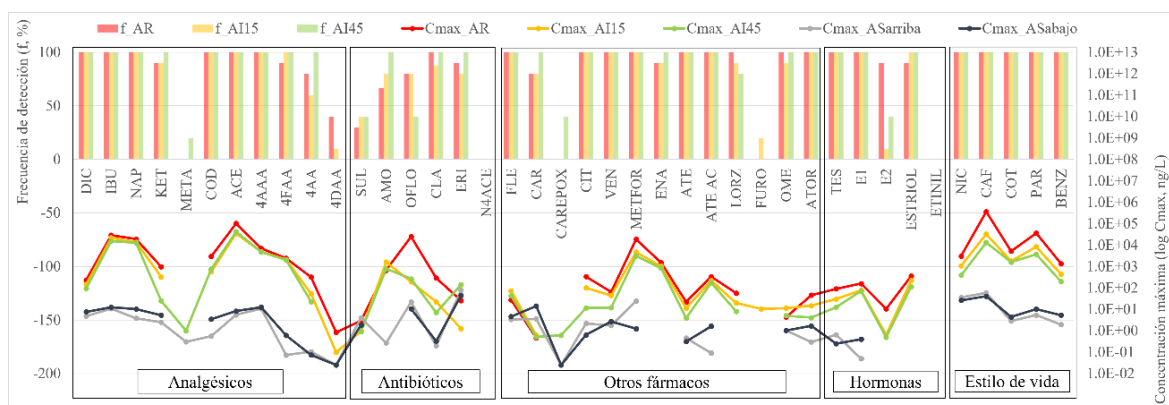
El método analítico multicomponente desarrollado se aplicó para controlar la operación en el FV piloto instalado en IMDEA Agua. Las muestras de AR, AI15 y AI45, recogidas durante el periodo enero 2018 – marzo 2019, fueron tratadas según el protocolo SPE para aguas muy cargadas (AMC), y las muestras de AS ( $AS_{arriba}$  y  $AS_{abajo}$ ) según el protocolo para aguas poco cargadas (APC).

Para representar de forma general la variabilidad de la concentración de CPEs en las diferentes matrices de agua estudiadas, se muestra la suma de las concentraciones de todos los analitos detectados en la **Figura III.5**. Los resultados mostraron que una alta proporción de la concentración disminuyó durante la infiltración a través de los primeros 15 cm de suelo, y continuó disminuyendo, aunque en menor medida, hasta la profundidad de 45 cm (68,7% de reducción en la mediana de la suma de las concentraciones de los CPEs en el AI45 con respecto al AR). La mayoría de los procesos de biodegradación tienen lugar en la parte superior de la zona no saturada, donde predominan el oxígeno y los microorganismos. Las concentraciones de los CPEs en las muestras de AS fueron significativamente más bajas (**Figura III.5**) que en las muestras de agua de AR y AI (reducción del 99,9% en la mediana de la suma de las concentraciones en  $AS_{abajo}$  frente al AI45). Las principales causas fueron: i) el agua se depura cada vez más a medida que se infiltra, y ii) las especies disueltas sufren dispersión mecánica y difusión molecular en el AS, lo que suaviza los picos de concentración (Appelo y Postma, 2005). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones  $AS_{arriba}$  y  $AS_{abajo}$ , lo que indica que el acuífero subyacente no se vio afectado como resultado de la operación en el FV. Otros autores también han estudiado la atenuación de los CPEs durante la infiltración a través de la zona no saturada y de la ausencia de un impacto sobre las aguas subterráneas en terrenos forestales a los que se aplicaron aguas residuales municipales (McEachran et al., 2016) y en otro filtro verde similar (Martínez-Hernández et al., 2018).



**Figura III.5.** Diagrama de cajas y bigotes (boxplot) para la suma de concentraciones de todos los CPEs en cada punto de muestreo durante el periodo de estudio (enero 2018-marzo 2019). Número de muestras por matriz: AR=10, AI15=10, AI45=5, ASarriba=4, ASabajo=10

La **Figura III.6** muestra la frecuencia de detección (f, %) para todos los CPEs en las muestras de AR y AI, así como la concentración máxima detectada (C<sub>máx</sub>, en base logarítmica, ng/L) en todas las matrices de agua analizadas. La frecuencia de detección osciló entre el 80 y el 100% en las muestras AR y AI15 para 33 de los 40 CPEs. Otros, como el 4DAA y el SUL, aparecieron con una frecuencia menor (<40%) o se detectaron sólo una vez durante el periodo de muestreo (META, CAREPOX y FURO). La hormona ETINIL y el PT N4ACE no se detectaron nunca en las muestras de AR o AI. Las concentraciones más altas (C<sub>máx</sub>>10000 ng/L) encontradas en las muestras de AR, AI15 y AI45 fueron para ACE, CAF, IBU, NAP y PAR. Estos valores se encuentran claramente relacionados con sus niveles de consumo, ya que se trata de medicamentos habituales (antiinflamatorios IBU y NAP, y analgésico ACE) utilizados para enfermedades comunes, y de un estimulante de consumo muy extendido, la CAF (Sistema Nacional de Salud, 2016), y su PT, la PAR. Los fármacos METFOR y OFLO también mostraron C<sub>máx</sub>>10000 ng/L en las muestras de AR, pero no en las de AI. Los CPEs más detectados tuvieron una C<sub>máx</sub> más alta en las muestras de AR que en las de AI, excepto FLE (C<sub>máx</sub>=27 ng/L para AR, 72 ng/L para AI15 y 43 ng/L para AI45).



**Figura III.6.** Frecuencia de detección (f, %, y-eje izquierdo) de todos los CPEs en el agua de riego (AR) y el agua de infiltración a 15 y 45 cm de profundidad (AI<sub>15</sub> y AI<sub>45</sub>), así como las concentraciones máximas detectadas (escala logarítmica, ng/L, y-eje derecho) en las muestras de AR, AI<sub>15</sub> y AI<sub>45</sub> y aguas subterráneas aguas arriba y aguas abajo del FV (AS<sub>arriba</sub> y AS<sub>abajo</sub>).

En las muestras de AS se detectaron, al menos una vez, 33 de los 40 CPEs estudiados. Sin embargo, sólo 26 mostraron concentraciones cuantificables ( $> \text{MQL}$ ). Los analgésicos, antibióticos y compuestos estilo de vida se detectaron en más del 50% de las muestras de AS. Las excepciones fueron NAP y META ( $\leq 25\%$ ), 4AA y 4DAA (sólo en AS<sub>abajo</sub>: 20% y 10%, respectivamente), AMO (25% en AS<sub>arriba</sub>, pero no se detectó en AS<sub>abajo</sub>) y N4ACE, que no se detectó en ninguna muestra. Otros CPEs se detectaron en todas las muestras de AS (ATE AC, OME y BENZ). Por el contrario, ENA, LORZ y FURO no se encontraron en ninguna muestra de AS. Las hormonas se identificaron en menos del 30% de las muestras, excepto TES en AS<sub>arriba</sub> (50%), y E<sub>2</sub>, ESTRIOLO y ETINIL, que no se detectaron en ningún caso. Los CPEs se encontraron generalmente en bajas concentraciones en el AS ( $< 60 \text{ ng/L}$ ). CAF y NIC se detectaron con la máxima frecuencia y presentaron dos de las concentraciones más altas en el AS. Esto coincide con varias revisiones a nivel mundial (Sui *et al.*, 2015), en Europa (Lapworth *et al.*, 2012; Gaston *et al.*, 2019) y en España (Jurado *et al.*, 2012). En el caso de los analgésicos y los compuestos estilo de vida, las mayores concentraciones en AR y AI implicaron mayores concentraciones en las muestras de AS, probablemente debido a su elevado consumo y a su presencia generalizada en el medioambiente (Aus der Beek *et al.*, 2016). Sin embargo, no se observó un patrón claro para los antibióticos. Sólo OFLO y CLA siguieron el patrón descrito anteriormente. La presencia de antibióticos en el AR estaba sesgada porque procede de un edificio de oficinas donde las personas enfermas probablemente no acuden a trabajar. Además, los antibióticos se consumen generalmente de forma esporádica para tratamientos específicos, mientras que los analgésicos se consumen de forma generalizada y no necesitan prescripción médica. Por ello, era esperable una mayor variabilidad de las concentraciones de antibióticos que de analgésicos. Estas particularidades de las aguas residuales estudiadas, junto con su presencia generalizada en las aguas subterráneas (Jurado *et al.*, 2012; Sui *et al.*, 2015), probablemente expliquen este comportamiento aleatorio de los antibióticos. Cabe destacar que, de los cuatro PTs del META, el 4FAA y el 4AAA estaban más concentrados en las muestras de AI y AS que el propio META, que se transformó rápidamente y no se detectó casi nunca en las muestras de AR. Esto confirma que el 4AAA y el 4FAA son más estables y persistentes que el 4AA y el 4DAA en la ruta de degradación del META, como ya había sido reportado anteriormente (Martínez-Hernández *et al.*, 2018).

Las concentraciones de CPEs en las muestras de suelo se determinaron mediante el método de análisis optimizado. Para aquellos CPEs que sufrían efectos de matriz o ineficacias y cuyos ISs no estaban disponibles (4FAA, CAREPOX, CLA, DIC, ENA, PAR), se controló la recuperación añadiendo una réplica de muestra estándares de los CPEs y se evaluó su similitud con el %R validado. La mitad de los 28 CPEs estudiados en los suelos no se detectaron en ninguna muestra. Para la otra mitad, las concentraciones fueron iguales o menores a sus correspondientes MQLs. Sólo ACE, PAR e IBU se cuantificaron en el rango de 1-5 ng/g, y CAF, ATE AC y FLE se detectaron en los niveles más altos (5-11 ng/g). ACE, CAF, IBU y PAR fueron también los CPEs más concentrados en las muestras de AR. La presencia de estos compuestos, tanto en las muestras de agua como en las de suelo, indica que una tasa de descarga elevada implica una presencia más frecuente en las muestras ambientales, independientemente de su biodegradabilidad o afinidad de sorción. El ATE AC es un PT que resulta de la hidrólisis no sólo del ATE (Helbling *et al.*, 2010), sino también del metoprolol (Jaeger *et al.*, 2019), que no se encuentra entre los CPEs incluidos en este estudio, por lo que su mayor contenido en el suelo no puede explicarse únicamente por la concentración de ATE en el agua. Por último, como se mencionó anteriormente, la concentración máxima de FLE fue mayor en las muestras de AI que en las de AR. A pH neutro, la FLE se encuentra cargada

positivamente. Esto significa que tendería a ser atraída por las cargas negativas que predominan en la superficie de las partículas de suelo. La variación de las concentraciones de FLE en el agua con el tiempo mostró un retraso en los picos de concentración entre AI15 y AI45 (datos no mostrados). La sorción reversible puede ser la razón de este retraso. Desafortunadamente, no se han encontrado más estudios sobre sorción-desorción o biodegradación de FLE en la bibliografía. Castro *et al.* (2018) indican que todavía existe una falta de información sobre algunos grupos terapéuticos de fármacos, particularmente sobre los betabloqueantes y varios antiarrítmicos como la flecainida. Al menos la  $C_{m\acute{a}x}$  de FLE en las muestras de AI45 se encontró dentro del rango en los efluentes de EDAR convencionales (Grabic *et al.*, 2012) y no alcanzó los 5 ng/L en ninguna muestra de AS.

En resumen, mediante el establecimiento de una metodología relativamente sencilla se lograron monitorizar un gran número de CPEs en los dos compartimentos ambientales estudiados, con una selectividad y sensibilidad adecuadas. Además, el estudio conjunto de muestras de agua de distinta naturaleza y de muestras de suelo, proporciona una información útil y complementaria, que permite evaluar de una forma más realista el destino de los CPEs en el FV y en otras investigaciones enfocadas a determinar la ocurrencia y el destino de estos contaminantes en el medio ambiente.

#### 4. Conclusiones

En este estudio, se desarrolló y validó un método por SPE-LC-MS/MS para determinar CPEs en matrices ambientales (muestras de agua muy cargadas -aguas de riego y de infiltración- y agua poco cargadas -aguas subterráneas- y muestras suelo) que permitan monitorizar la efectividad del tratamiento de aguas residuales con FVs.

El método multicomponente desarrollado es relativamente simple y permite la cuantificación de muchos CPEs en matrices acuosas (40) y sólidas (28). Al controlar las interferencias de la matriz, se obtienen valores razonables de recuperación y precisión, y se logra una cuantificación fiable para todos los compuestos objetivo. La sensibilidad del método queda demostrada por los MQLs  $< 1 \text{ ng/L}$  y  $< 1 \text{ ng/g}$  para la mayoría de los compuestos en las muestras de agua y de suelo, respectivamente.

La evaluación conjunta de los contaminantes en agua y suelo proporciona datos complementarios para controlar la atenuación de los CPEs y para evaluar su potencial lixiviación en el FV piloto. En todas las muestras ambientales analizadas se detectaron algunos de los CPEs más consumidos (ACE, CAF, IBU y PAR). Por otro lado, la mayoría de los CPEs se detectaron en el agua de infiltración y en el agua subterránea, pero sus concentraciones fueron menores que en las aguas residuales de riego. En general, la atenuación de la mayoría de los compuestos tuvo lugar durante la infiltración a través de los primeros 15 cm, probablemente debido a los procesos de biodegradación. Los compuestos de partida pueden convertirse en otros productos de degradación por lo que la transformación de los CPEs no siempre implica la atenuación del contaminante. Por lo tanto, es importante controlar tanto los compuestos de partida como sus PTs, como se ha demostrado en este estudio para el META y sus PTs.

## 5. Referencias

- Almeida, C., Nogueira, J.M.F., 2006. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1303-11. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.037>
- Al-Odaini, N.A., Zakaria, M.P., Yaziz, M.I., Surif, S., 2010. Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217, 6791–6806. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.033>
- Angeles, L.F., Aga, D.S., 2020. Catching the elusive persistent and mobile organic compounds: Novel sample preparation and advanced analytical techniques. *Trends in Environmental Analysis Chemistry*, 25, 00078. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00078>
- Appelo, C.A.J., Postma, D., 2005. *Geochemistry, Groundwater and Pollution* (D. Postma, & C.A.J. Appelo, Eds.) (2nd ed.). CRC Press. <http://doi.org/10.1201/9781439833544>
- Aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2016. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (4), 823-835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Aznar, R., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., Rodríguez, J. A., Tadeo, J. L., 2014. Occurrence and analysis of selected pharmaceutical compounds in soil from Spanish agricultural fields. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, 4772–4782. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2438-7>
- Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B., 2011. Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1218, 8036–8059. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.012>
- Castro, G., Carpinteiro, I., Rodríguez, I., Cela, R., 2018. Determination of cardiovascular drugs in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 410, 6807–6817. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1268-3>
- CE, 2002. Directive 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* 1221/8, 8-36.
- CE, 2018. Nature-Based Solutions ([https://research-and-innovation.ec.europa.eu/research-area/environment/nature-based-solutions\\_en](https://research-and-innovation.ec.europa.eu/research-area/environment/nature-based-solutions_en)) accessed 19 January 2023
- CE, 2021. Guidance Document on Pesticide Analytical Methods for Risk Assessment and Post-approval Control and Monitoring Purposes. SANTE/2020/12830, Rev.1 24. February 2021
- Cha, J.M., Yang, S., Carlson, K.H., 2006. Trace determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1115, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.086>

- Commission Implementing Decisions (EU) 2015/495 and 2018/840 of 5 June 2018 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 and repealing commission implementing decision (EU) 2015/495. *Off. J. Eur. Union*, 7.6.2018; L141, 9-12.
- Da Silva, J.J., Da Silva, B.F., Stradiotto, N.R., Petrovic, M., Gago-Ferrero, P., Gros, M., 2020. Pressurized Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS evaluation for the analysis of antibiotics in agricultural soils. *MethodsX*, 7, 101171. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101171>
- De Bustamante, I., Lillo, F.J., Sanz, J.M., De Miguel, A., Garcia, E., Carreño, F., Gómez, D., Martín, T., Martínez, F., Corvea, J.L., 2009. A comparison of different methodologies for designing land application systems: Case study at the Redueña WWTP. *Desalin. Water Treat.* 4, 98–102. <https://doi.org/10.5004/dwt.2009.362>
- De Miguel, A., Meffe, R., Leal, M., González-Naranjo, V., Martínez-Hernández, V., Lillo, J., Martín, I., Salas, J.J., De Bustamante, I., 2014. Treating municipal wastewater through a vegetation filter with a short-rotation poplar species. *Ecol. Eng.* 73, 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.059>
- De Santiago-Martín, A., Meffe, R., Teijón, G., Martínez-Hernández, V., López-Heras, I., Alonso Alonso, C., Arenas Romasanta, M., De Bustamante, I., 2020. Pharmaceuticals and trace metals in the surface water used for crop irrigation: Risk to health or natural attenuation? *Sci. Total Environ.*, 705, 135825. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135825>
- De Sousa, D.N.R., Martins Grosseli, G., Aparecido Mozeto, A., Lajarim Carneiro, R., Fadini, P.S., 2015. Ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of emerging contaminants in freshwater sediments. *J. Sep. Sci.*, 38, 3454–3460. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500644>
- Dodgen, L.K., Zheng, W., 2016. Effects of reclaimed water matrix on fate of pharmaceuticals and personal care products in soil. *Chemosphere* 156, 286-293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.109>
- Drori, Y., Aizenshtat, Z., Chefetz, B., 2005. Sorption-desorption behaviour of atrazine in soils irrigated with reclaimed wastewater. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 69, 1703. <http://doi.org/10.2136/sssaj2004.0345>
- EPA, 2007. Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, Washington D.C.
- EPA, 2002. Guidance on Choosing a Sampling Design for Environmental Data Collection for Use in Developing a Quality Assurance Project Plan (EPA QA/G-5S), Washington D.C.
- Ferhi, S., Bourdat-Deschamps, M., Daudin, J.J., Houot, S., Néliu, S., 2016. Factors influencing the extraction of pharmaceuticals from sewage sludge and soil: an experimental design approach. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 6153–6168. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9725-3>
- García, J., García-Galán, M.J., Day, J.W., Boopathy, R., White, J.R., Wallace, S., Hunter, R.G., 2020. A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresour. Technol.* 307, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>

- Gaston, L., Lapworth, D.J., Stuart, M., Arnscheidt, J., 2019. Prioritization Approaches for Substances of Emerging Concern in Groundwater: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 6107–6122. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8bo4490>
- Golovko, O., Koba, O., Kodesova, R., Fedorova, G., Kumar, V.,1, Grabic, R., 2016. Development of fast and robust multiresidual LC-MS/MS method for determination of pharmaceuticals in soils. *Environ Sci Pollut Res.*, 23, 14068–14077. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6487-6>
- Grabic, R., Fick, J., Lindberg, R.H., Fedorova, G., Tysklind, M., 2012. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 100, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.032>
- Helbling, D.E., Hollender, J., Kholer, H.P.E., Fenner, K., 2010. Structure-Based Interpretation of Biotransformation Pathways of Amide-Containing Compounds in Sludge-Seeded Bioreactors. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 6628–6635. <https://doi.org/10.1021/es101035b>
- Hermes, N., Jewell, K.S., Wick, A., Ternes, T.A., 2018. Quantification of more than 150 micropollutants including transformation products in aqueous samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using scheduled multiple reaction monitoring. *J. Chromatogr. A*. 1531, 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.020>
- Hindle, R., 2013. Improved Analysis of Trace Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS (EPA 539) using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS. Vogon Laboratory Services Ltd. Cochrane, Alberta, Canada.
- Horsing, M., Ledin, A., Grabic, R., Fick, J., Tysklind, M., Jansen, J.L., Andersen, H.R., 2011. Determination of sorption of seventy-five pharmaceuticals in sewage sludge. *Water Res* 45(15), 4470–4482. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.033>
- Jaeger, A., Posselt, M., Betterle, A., Schaper, J., Mechelke, J., Coll, C., Lewandowski, J., 2019. Spatial and Temporal Variability in Attenuation of Polar Organic Micropollutants in an Urban Lowland Stream. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 2383–2395. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8bo5488>
- Jeong, Y., Schäffer, A., Smith, K., 2017. Equilibrium partitioning of organic compounds to OASIS HLB as a function of compounds concentration, pH, temperature and salinity. *Chemosphere* 174, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.116>
- Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., López de Alda, M., Pujades, E., Barceló, D., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Sci. Total Environ.*, 440, 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.029>
- Lahti, M., Oikari, A., 2011. Pharmaceuticals in settleable particulate material in urban and non-urban waters. *Chemosphere* 85, 826-831. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.084>
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution.*, 163, 287-303. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>
- Lee, Y.J., Choi, J.H., Abd El-Aty, A.M., Chung, H.S., Lee, H.S., Kim, S.W., Rahman, M., Park, B.J., Kim, J.E., Shin, H.C., Shim. J.H., 2017. Development of a single-run analytical method for the



- detection of ten multiclass emerging contaminants in agricultural soil using an acetate-buffered QuEChERS method coupled with LC–MS/MS. *J. Sep. Sci.*, 40(2), 415-423. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600953>
- Li, B., Zhang, T., Xu, Z., Fang, H.H.P., 2009. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 645, 64. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.042>
- Li, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* 187, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015>
- Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Herrera, S., Arranz, E., De Bustamante, I., 2014. Sorption/desorption of non-hydrophobic and ionisable pharmaceutical and personal care products from reclaimed water onto/from a natural sediment. *Sci. Total Environ.*, 472, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.036>
- Martínez-Hernández, V., Leal, M., Meffe, R., De Miguel, A., Alonso-Alonso, C., De Bustamante, I., Lillo, J., Martín, I., Salas, J.J., 2018. Removal of emerging organic contaminants (EOCs) in a poplar vegetation filter (VF). *J. Hazard. Mater.*, 342, 482-491. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.035>
- McEachran, A.D., Shea, D., Bodnar, W., Nichols, E.G., 2016. Pharmaceutical occurrence in groundwater and surface waters in forests land-applied with municipal wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.*, 35 (4), 898-905. <https://doi.org/10.1002/etc.3216>
- Nägele, E., Moritz, R., 2005. Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MSn and Accurate Mass Determination by ESI TOF. *JASMS*, 16, 1670-1676. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.06.002>
- Noguera-Oviedo, K., Aga, D.S., 2016. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. *J. Hazard. Mater.*, 316, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.058>
- Nurmi, J., Pellinen, Y., 2011. Multiresidue method for the analysis of emerging contaminants in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1218, 6712– 6719. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.071>
- OECD, 2017. Diffuse Pollution, Degraded Waters: Emerging Policy Solutions, OECD Studies on Water. Paris, France: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264269064-en>
- O'Hagan, D., 2008. Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C–F bond. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 308-319. <https://doi.org/10.1039/B711844A>
- Oral, H.V., Carvalho, P., Gajewska, M., Ursino, N., Masi, F., Hullebusch, E.D. van, Kazak, J.K., Exposito, A., Cipolletta, G., Andersen, T.R., Finger, D.C., Simperler, L., Regelsberger, M., Rous, V., Radinja, M., Buttiglieri, G., Krzeminski, P., Rizzo, A., Dehghanian, K., Nikolova, M., Zimmermann, M., 2020. A review of nature-based solutions for urban water management in European circular cities: a critical assessment based on case studies and literature. *Blue-Green Syst.* 2, 112–136. <https://doi.org/10.2166/bgs.2020.932>
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and

- recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Petrie, B., Youdan, J., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2016. Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1431, 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.036>
- Rico, A., Arenas-Sánchez, A., Alonso-Alonso, C., López-Heras, I., Nozal, L., Rivas-Tabares, D., Vighi, M., 2019. Identification of contaminants of concern in the upper Tagus River basin (central Spain). Part 1: screening, quantitative analysis and comparison of sampling methods. *Sci. Total Environ.* 666, 1058–1070. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.250>
- Rizzo, L., Malato, S., Antakyali, D., Beretsou, V.G., Đolić, M.B., Gernjak, W., Heath, E., Ivancev-Tumbas, I., Karaolia, P., Lado Ribeiro, A.R., Mascolo, G., McArdell, C.S., Schaar, H., Silva, A.M.T., Fatta-Kassinos, D., 2019. Consolidated vs new advanced treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. *Sci. Total Environ.*, 655, 986–1008. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.265>
- Robles-Molina, J., Lara-Ortega, F.J., Gilbert- López, B., Garcia-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2014. Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1350, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.003>
- Sadutto, D., Picó, Y., 2020. Sample Preparation to Determine Pharmaceutical and Personal Care Products in an All-Water Matrix: Solid Phase Extraction. *Molecules* 25, 5204. <https://doi.org/10.3390/molecules25215204>
- Schaffer, M. y Licha, T., 2015. A framework for assessing the retardation of organic molecules in groundwater: Implications of the species distribution for the sorption-influenced transport. *Sci. Tot. Environ.*, 524–525, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.006>
- Sistema Nacional de Salud, 2016. Informe Anual del Sistema Nacional de Salud 2016. Informes, Estudios e Investigación 2017. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (1008 pp).
- Soil Survey Staff, 1999. *Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys*. En: Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 436 (2ªEd.)
- Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., Yu, G., 2015. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerging Contaminants* 1, 14–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.emcon.2015.07.001>
- Turiel, E., Bordin, G., Rodríguez, A.R., 2003. Trace enrichment of (fluoro)quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography-ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, 1008, 145. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00975-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00975-0)
- Van Nuijs, A.L.N., Tarcomnicu, I., Simons, W., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P.G., et al., 2010. Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 2211–2222. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4101-1>

- Vanderford, B. J., Snyder, S.A., 2006. Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 7312-7320. <https://doi.org/10.1021/es0613198>
- Varga, M., Dobor, J., Helenkár, A., Jurecska, L., Yao, J., Záray, G., 2010. Investigation of acidic pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Microchem. J.*, 95, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.010>
- Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., Prieto, A., 2012. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Anal. Chim. Acta*, 736, 7–29. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.016>

**CAPÍTULO IV.**  
**ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS PARA EXPLORAR EL**  
**IMPACTO DE ENMIENDAS AL SUELO**

## ARTÍCULO N°2

**Título original:** *Untargeted metabolomic analysis to explore the impact of soil amendments in a non-conventional wastewater treatment.* En: *Science of the Total Environment*, 870C,161890. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161890>)

**Autores:** Blanca Huidobro-López<sup>a,b</sup>, Carlos León<sup>c</sup>, Isabel López-Heras<sup>a</sup>, Virtudes Martínez-Hernández<sup>a</sup>, Leonor Nozal<sup>d</sup>, Antonio L. Crego<sup>d</sup>, Irene de Bustamante<sup>a,b</sup>

**Revista:** *Science of the Total Environment*

**Editor:** Damià Barceló

**Editorial:** Elsevier

**Año de publicación:** 2023

**ISSN:** 0048-9697

**Categoría:** Environmental Sciences

**Posición de la revista en la categoría:** 26/279

**Factor de impacto (2021):** 10,754

**Factor de impacto (5 años):** 10,237

**Cuartil:** Q1

El presente capítulo IV está basado en el artículo n°2 publicado.

## 1. Introducción

En todo el mundo se están detectando CPEs, como fármacos, productos de cuidado personal, hormonas y otras sustancias químicas, en concentraciones variables en ríos, lagos, aguas costeras, aguas subterráneas, sedimentos y suelos (WWAP, 2017; Snow *et al.*, 2020). Son muchas las posibles fuentes de CPEs que llegan al medio ambiente, pero la mayor contribución procede de las aguas residuales (Glassmeyer *et al.*, 2005). En poblaciones dispersas donde los tratamientos convencionales no son viables, las SBN, como los FVs, pueden convertirse en una alternativa para tratar las aguas residuales. En los filtros verdes, el agua residual pretratada se utiliza para regar un conjunto de árboles plantados (De Bustamante *et al.*, 2009) y las concentraciones de contaminantes presentes en la misma se reducen durante la infiltración mediante procesos de atenuación natural. Aunque se han observado resultados prometedores para la atenuación de CPEs en filtros verdes (Martínez-Hernández *et al.*, 2018), se tiene menos conocimiento sobre los PTs que pueden surgir. Los CPEs pueden sufrir procesos bióticos y/o abióticos de intercambio, degradación y transformación dando lugar a PTs, algunos de los cuales pueden ser productos derivados de la transformación directa de los CPEs de partida y otros indirectos, cuyas propiedades y toxicidad pueden diferir mucho de sus compuestos de partida (Michael *et al.*, 2014). Las acciones que maximizan los procesos de atenuación natural en los filtros verdes podrían minimizar la lixiviación no deseada tanto de los compuestos de partida como de los PTs. Se ha demostrado que el uso de madera como enmienda al suelo aumenta la actividad microbiana al proporcionar una fuente adicional de carbono orgánico (Meffe *et al.*, 2016; Martínez-Hernández *et al.*, 2020). Se ha observado una mejor atenuación de los antibióticos de las aguas residuales cuando se enmendó el suelo con biochar (Yao *et al.*, 2012; Ashworth e Ibekwe, 2020) demostrando su capacidad para retener contaminantes (Kah *et al.*, 2017; Martínez-Hernández *et al.*, 2020). Recientemente, en la bibliografía se describe que la adición de astillas de madera y biochar reducen las concentraciones y la lixiviación de productos farmacéuticos procedentes de la aplicación de biosólidos al suelo (Liu *et al.*, 2022). Sin embargo, los estudios que informan sobre la capacidad de estas enmiendas para atenuar no sólo los CPEs sino también los PTs son todavía escasos.

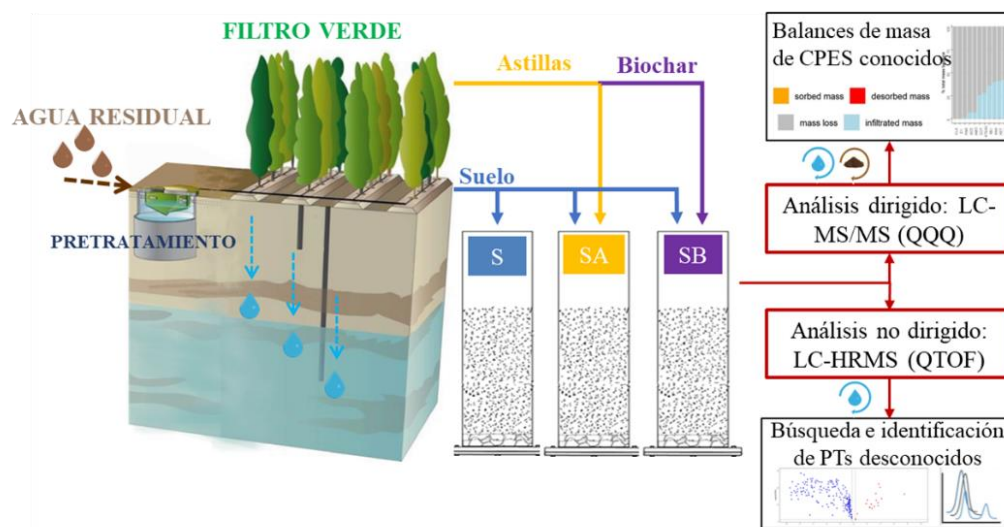
El análisis exhaustivo y cuantitativo de todos los metabolitos de un sistema fue definido por primera vez por Fiehn (2001, 2002) con el término metabolómica. Las posibilidades de la metabolómica han llevado a su uso en una enorme y amplia variedad de campos, y aunque su principal área de aplicación se encuentra en el descubrimiento de biomarcadores para las ciencias médicas y de la vida, también se ha descrito en otros campos como las ciencias ambientales (Schollée *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015; Kiss *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020). En estos trabajos, se emplean herramientas metabolómicas para comparar muestras de agua residual sin tratar y tratada, mediante diferentes estrategias metabolómicas para identificar metabolitos y/o productos de degradación de CPEs con el objetivo de evaluar la eficacia de los tratamientos aplicados. Existen principalmente dos tipos de enfoques que pueden establecerse en la metabolómica y que suelen denominarse análisis no dirigido y análisis dirigido.

Los análisis dirigidos, que implican la cuantificación de una serie de compuestos seleccionados, dependen de estándares individuales y por tanto no pueden abarcar todas las sustancias químicas potencialmente presentes (Moschet *et al.*, 2013). Sin embargo, con el análisis no dirigido, no se hace una preselección de compuestos y, por tanto, el análisis podría

revelar un espectro más completo de los PTs presentes (Wang *et al.*, 2020). El análisis no dirigido suele realizarse mediante LC-HRMS (Schymanski *et al.*, 2015; Albergamo *et al.*, 2019) porque su elevada exactitud y precisión en la determinación de las relaciones masa-carga ( $m/z$ ) de los iones detectados, junto con sus perfiles isotópicos característicos, permite centrar la búsqueda de compuestos desconocidos en unas pocas fórmulas moleculares (Milman, 2015). Las estructuras tentativas suelen asignarse a partir de la búsqueda de candidatos en bases de datos químicas, a menudo utilizando los espectros de fragmentación MS/MS (Albergamo *et al.*, 2019). A pesar de ello, la confirmación final de los PTs sigue siendo un reto, principalmente, por la falta de estándares e información estructural en las bases de datos (Kang *et al.*, 2020).

La aplicación de estas estrategias analíticas a muestras procedentes del tratamiento de aguas residuales permite una mejor comprensión del destino de los contaminantes en estos sistemas y, por tanto, una evaluación más correcta de la eficiencia del tratamiento. Aunque muchos trabajos abordan el comportamiento de los CPEs en tratamientos de aguas residuales convencionales y no convencionales, pocos determinan los productos formados por su (bio)degradación (Kiss *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Además, en el caso de otros tratamientos de aguas residuales no convencionales como los filtros verdes, a pesar de que existen algunos estudios sobre su capacidad para atenuar los CPEs (McEachran *et al.*, 2017; Martínez-Hernández *et al.*, 2018) su información al respecto es aún limitada.

En este trabajo se ensayaron en columnas a escala de laboratorio suelo y dos enmiendas (astillas y biochar), para evaluar la atenuación de CPEs y detectar posibles PTs. Así, los principales objetivos son: i) realizar un análisis dirigido de las muestras de agua y suelo, basado en LC-MS/MS, para estudiar el efecto del suelo natural y del suelo enmendado en el comportamiento de 11 CPEs seleccionados, y ii) desarrollar y aplicar una estrategia metabolómica no dirigida, basada en LC-HRMS para la búsqueda e identificación de PTs en las muestras de agua de las tres columnas de infiltración. Ambos resultados ayudarán a discutir las diferencias entre el suelo natural y el suelo enmendado en la eficiencia del tratamiento de las aguas residuales en FVs. La **Figura IV.1** resume los objetivos propuestos en este trabajo.



**Figura IV.1.** Resumen esquematizado de los objetivos de este trabajo

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Reactivos y estándares

Los disolventes y reactivos químicos utilizados fueron: ACN, MeOH, KCl (extra puro) y ácido acético, adquiridos en Scharlab (Barcelona, España); el ácido fórmico (pureza del 98%), fluoruro de amonio y formiato de amonio, en Merck (Darmstadt, Alemania); y ácido clorhídrico (pureza del 32-35%), en Fisher Scientific (EE.UU.). El agua ultrapura se obtuvo utilizando un sistema de purificación de agua milliQ de Merck Millipore (Mildford, MA, EE.UU.).

Para el experimento de infiltración, se preparó una disolución de agua residual sintética, imitando las concentraciones minerales medias del agua residual real empleada en el filtro verde, disolviendo los siguientes reactivos (pureza > 95%) en agua de grifo:  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (0,08 g/L),  $\text{KHCO}_3$  (0,04 g/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,09 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (0,02 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (0,03 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,015 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  (0,18 g/L) peptona (0,03 g/L), y extracto de carne (0,08 g/L), todos comprados en Scharlab (Barcelona, España).

Los 11 CPEs seleccionados fueron seis fármacos (paracetamol, amoxicilina, claritromicina, ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno), una hormona (estrona) y cuatro PTs (paraxantina, cotinina, ácido atenolol y 4-acetamidoantipirina). En su selección se tuvieron en cuenta los encontrados en el agua residual, empleada en el filtro verde piloto, en mayores concentraciones (>100 ng/L en alguna de las muestras analizadas en un estudio preliminar de muestras del FV), y priorizando aquellos compuestos menos estudiados y aquellos presentes en las listas de observación de la UE en ese momento (2015/495/UE), como estrona y claritromicina (aunque ninguna muestra recogida hasta ese momento había superado los 100 ng/L). Se descartaron algunos CPEs debido a su coste y disponibilidad (benzoilecgonina, codeína) y otros CPEs cuyos PTs correspondientes ya estaban incluidos y tenían una concentración media mayor (cafeína, nicotina, atenolol, metamizol). Por último, se descartó también la metformina porque era el compuesto que más interferencias sufría durante la cuantificación con el método analítico empleado (como se expresó en el capítulo III). La clase terapéutica, fórmula molecular, estado de ionización (pH 8) y otras propiedades fisicoquímicas de los 11 CPEs seleccionados se muestra en el Anexo A (marcados \*\* sobre la tabla de dicho anexo).

Los estándares de CPEs (pureza  $\geq 98\%$ ) se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania) y Alsachim (Illkirch Graffenstaden, Francia). Todas las disoluciones utilizadas en el análisis cuantitativo por LC-MS/MS se prepararon según se describió anteriormente en el capítulo III de esta memoria.

Se empleó un estándar de warfarina (Merck, Darmstadt, Alemania) para asegurar y controlar el buen funcionamiento del método de análisis no dirigido. Para la confirmación de los PTs identificados tentativamente, se adquirieron estándares (pureza > 90 %) de Cymit Química (Barcelona, España) y Merck (Darmstadt, Alemania). Se prepararon disoluciones individuales de estos estándares a 2.000 mg/L en MeOH y las disoluciones de trabajo para el análisis por LC-HRMS, en MeOH:agua 10:90 (v/v) o en agua ultrapura.



## 2.2. Caracterización de las enmiendas empleadas

Las enmiendas empleadas para el suelo fueron astillas procedentes de la poda de los chopos del propio FV y biochar obtenido de la pirólisis de dichas astillas según la metodología desarrollada por Martín *et al.*, (2017). Se llevó a cabo una caracterización en el Centro de Química Aplicada y Biotecnología de la UAH, cuya metodología y resultados se detallan a continuación.

La superficie específica de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y el tamaño de los poros se determinaron utilizando N<sub>2</sub> como adsorbente a 77 K y una presión relativa de 0,05-0,20 bar empleando un analizador de superficie de la serie Coulter SA3100 (Beckmann Coulter, Pasadena, CA, EE.UU.). Los contenidos de C, H, O y N se midieron utilizando un analizador elemental (LECO CHNS-932, Geleen, Países Bajos) con Argón como gas portador. El análisis del punto de carga cero (PZC) se realizó mediante el método de Scharzw (Noh y Scharzw, 1989). Se empleó un medidor de pH (Schott Instruments Handylab, Mainz Alemania) para las mediciones de pH. Los datos del infrarrojo por transformación de Fourier (FTIR) se obtuvieron utilizando un espectrómetro FTIR Cary 630 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) con 32 escaneos sobre 400-4000 cm<sup>-1</sup> a una resolución de 8 cm<sup>-1</sup>. La microscopía electrónica de barrido (SEM) de las muestras de biochar y astillas se realizó con un microscopio electrónico de barrido (DSM 950, Zeiss, Oberkochen, Alemania) a 15 kV y 8,0 nm.

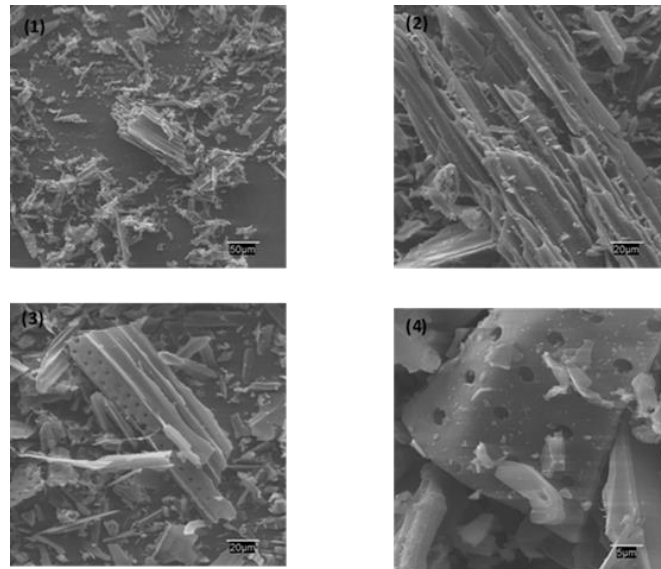
Ambas muestras (astillas y biochar) contienen aproximadamente un 6% en peso de hidrógeno, mientras que la cantidad de carbono es mayor en el caso del biochar (aproximadamente un 62% en peso) en comparación con las astillas, con un 45% en peso. El contenido de azufre es igual al 0,05% en peso para las astillas y disminuye ligeramente hasta el 0,02% en peso para el biochar. La relación H/C de las astillas y el biochar disminuye de 0,12 a 0,05, lo que indica que el biochar es más aromático. Por otra parte, la relación C/N es 2,50 veces mayor en el biochar que en las astillas (**Tabla IV.1**), lo que significa que permite una alta retención de N en el suelo.

**Tabla IV.1.** Análisis elemental, área superficial y punto de carga cero (PZC) correspondientes a los materiales empleados (astillas y biochar)

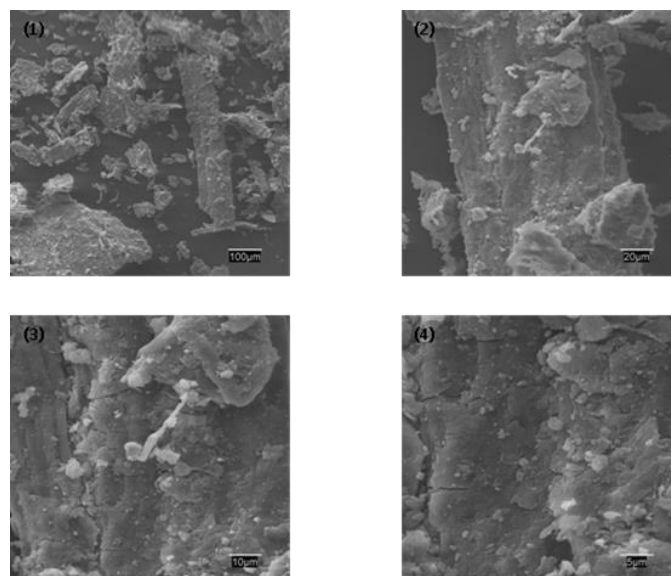
Muestras:		Astillas	Biochar
Análisis elemental	C (%)	46.4 ± 0.2	62.2 ± 0.4
	H (%)	5.80 ± 0.01	2.90 ± 0.1
	N (%)	0.90 ± 0.01	0.50 ± 0.09
	S (%)	0.050 ± 0.002	0.020 ± 0.001
Ratio molar	H/C	0.12	0.04
	C/N	51.76	131.5
S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)		1.60 ± 0.02	26.10 ± 0.09
Área superficial total (m <sup>2</sup> )		2.0 ± 0.2	11.3 ± 0.4
PZC		6.20 ± 0.02	7.20 ± 0.01
Tamaño de partícula muestra inicial		4-6	3-5

En cuanto al área BET (S<sub>BET</sub>), el biochar la aumentó de 1,6 a 26,1 m<sup>2</sup>/g en comparación con las astillas (**Tabla IV.1**). La pirólisis de las astillas desarrolló la textura de los poros en todo el rango de diámetros, en particular la microporosidad, abriendo nuevos poros y ampliando los existentes. La **Figura IV.2** muestra las micrografías SEM realizadas a varios aumentos (200×, 500×, 1000× y 2000×) del biochar. Esta muestra presenta estructuras tubulares con un tamaño medio ligeramente inferior a 20 μm, así como una reorganización de las fibras, siendo

más ordenadas que las astillas (**Figura IV.3**). El análisis morfológico sugiere que la muestra de biochar tiene una estructura heterogénea, mostrando una fase amorfa generada por la formación de gas durante el proceso de pirólisis, así como una fase más ordenada y estructurada, proporcionando una estructura porosa básica. En esta fase se observan estructuras tubulares perfectamente organizadas (**Figura IV.2**), así como la formación de poros de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, que confieren a este material una mayor capacidad de adsorción respecto a la materia prima no tratada (astillas), obteniendo valores de superficie específica de hasta más de 15 veces superiores (**Tabla IV.1**).



**Figura IV.2.** Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a (1) 200, (2) 500, (3) 1000 and (4) 2000 aumentos, correspondientes al biochar



**Figura IV.3.** Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a (1) 200, (2) 500, (3) 1000 and (4) 2000 aumentos, correspondientes a las astillas

Con respecto a la química superficial, los valores de PZC mostrados en la **Tabla IV.1** sugieren que las astillas y el biochar tienen una naturaleza ligeramente ácida y neutra,

respectivamente. Este análisis es relevante dado que los cambios en la química superficial de estos materiales también pueden afectar al proceso de adsorción de contaminantes por disociación de grupos funcionales en la superficie del adsorbente.

Tras el proceso de pirólisis, las principales bandas FTIR detectadas corresponden a las diferentes modificaciones producidas por la descomposición y deshidratación de los grupos presentes en la lignina y en la celulosa, así como a otros procesos causados por la alta temperatura del proceso, como la ruptura de enlaces, la eliminación de grupos carbonilo, la desmetilación, la desoxilación y el reordenamiento posicional de los grupos metoxilo (Pandey, 1999; Jankovic *et al.*, 2019) (**Tabla IV.2** y **Tabla IV.3**).

**Tabla IV.2.** Descripción de los grupos funcionales en las astillas

Longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3347.15	Banda O-H (enlace de hidrógeno)
2958.51	Banda C-H
1766.94	Banda C=O (no conjugado)
1625.12	Banda C=O (fuerte)
1502.12	Vibración de esqueleto aromático
1315.75	C-O de anillo siringílico
1226.29	C-O de anillo de guayacol
1028.75	Banda C-O (fuerte)

**Tabla IV.3.** Descripción de los grupos funcionales en el biochar

Longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3183.15	Banda O-H (enlace de hidrógeno)
2105.95	Banda C-C
1576.66	Vibración del C=C-O
1196.48	Vibración asimétrica de banda C-O-C

### 2.3. Experimento de infiltración en columnas: diseño experimental, muestreo y análisis dirigido

El experimento se llevó a cabo a escala de laboratorio en tres columnas de infiltración: una columna de suelo natural (S), una columna de suelo enmendado con un 3% en peso de astillas (SA) y una columna de suelo con un 3% de biochar (SB). El suelo, las astillas y el biochar se obtuvieron del propio FV tal y como se explicó en el capítulo II. La **Figura IV.4** muestra un esquema del montaje experimental, de la instrumentación instalada y la recogida de muestras de agua infiltrada. El experimento tuvo una duración total de 31 semanas.

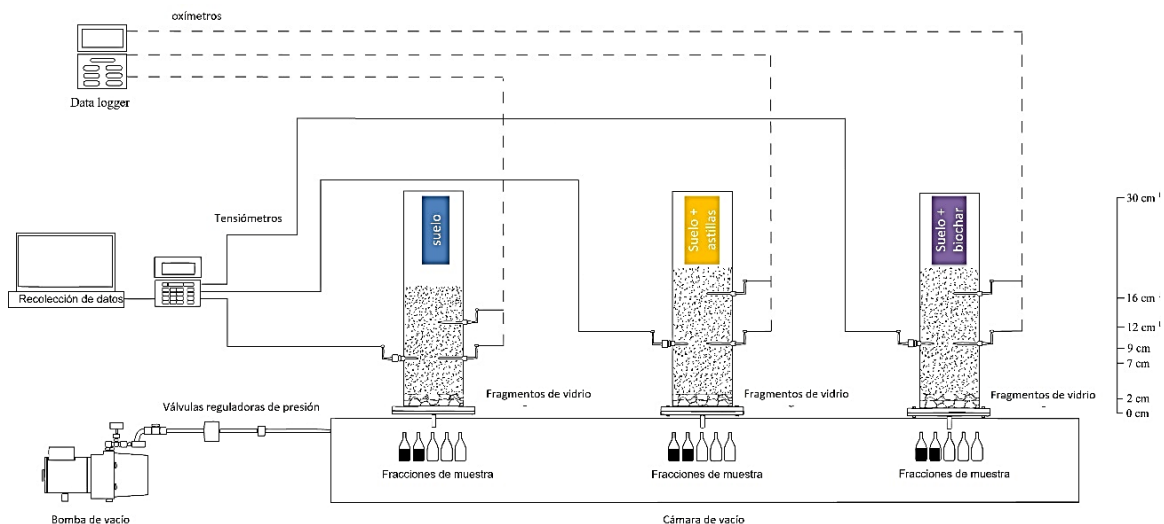
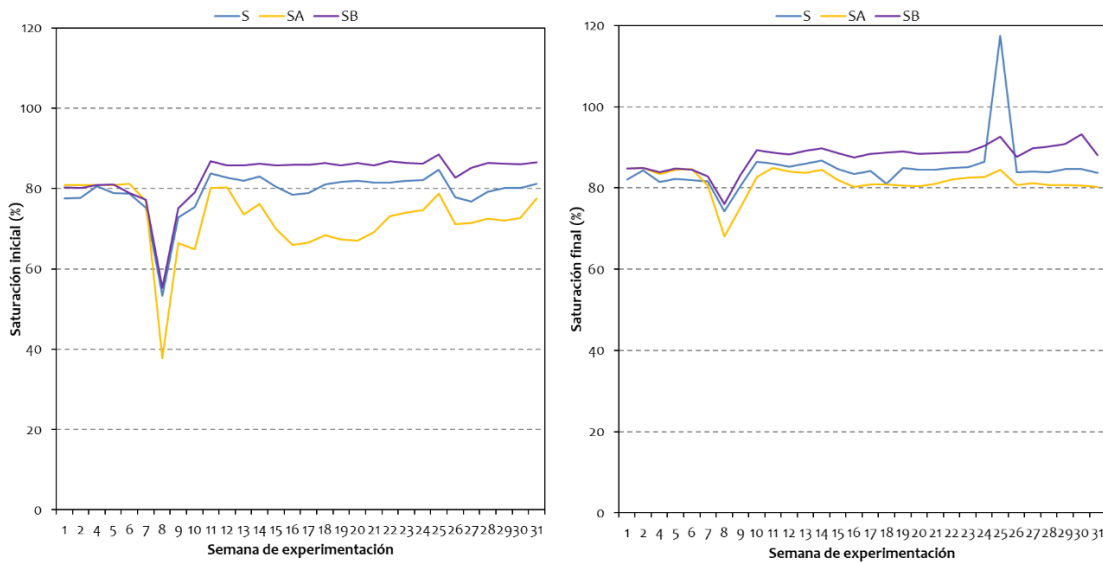


Figura IV.4. Montaje experimental

La columna S se rellenoó con 15 cm de suelo del FV que se compactó hasta alcanzar aproximadamente la densidad aparente ( $1,53 \text{ g/cm}^3$ ) y la porosidad total (0,49) medidas en el FV piloto. La columna SA se rellenoó con el mismo suelo mezclado con astillas, en una proporción del 3% en peso, alcanzando una altura de 18 cm por la introducción de las astillas, una mayor porosidad total (0,52) y una menor densidad aparente ( $1,34 \text{ g/cm}^3$ ). La columna SB se rellenoó con el mismo suelo mezclado con biochar, también en una proporción del 3% en peso, alcanzando una altura de 18 cm, una mayor porosidad total (0,51) y una menor densidad aparente ( $1,34 \text{ g/cm}^3$ ) que la columna de sólo suelo. Las columnas se fabricaron de acero inoxidable con 30 cm de longitud, 8,49 cm diámetro interno y 40 mm de espesor. Poseen una tapa inferior que se fija a los extremos mediante seis tornillos y cuya estanqueidad se logra con la colocación de un anillo de goma entre la tapa y el borde del extremo inferior de la columna. Además, entre la tapa y el anillo de goma se coloca una membrana de teflón (con luz de  $1,2 \text{ }\mu\text{m}$ ) para evitar la pérdida de suelo sin impedir el flujo de agua. El relleno de las columnas se realizó introduciendo en primer lugar, en el fondo de la columna, unos 2 cm (90 g) de fragmentos de vidrio técnico, con diámetros comprendidos entre 0,6 y 1,2 mm (NatureWorks, Minnesota, EEUU). El suelo, o suelo con enmienda, se depositó en intervalos de 2 cm y se distribuyó homogéneamente para evitar la generación de capas con diferente granulometría que podrían dar lugar a flujos preferenciales en las columnas.

La salida de las columnas se conectó a una cámara de vacío que aplicaba una succión constante, mediante una bomba de vacío, para simular las condiciones hidrodinámicas de la zona no saturada. La succión aplicada se reguló mediante dos válvulas y se midió en continuo con un manómetro digital. Todos los equipos se adquirieron de Soil Measurement Systems (Tuckson, AZ, EEUU). El nivel de saturación de las columnas se controló pesándolas semanalmente antes del inicio de cada evento de riego. Se trató de mantener constante la saturación inicial para que no existan grandes variaciones del flujo entre eventos. Cuando esto ocurre, los procesos de atenuación (sorción y (bio)degradación) son más fáciles de estudiar ya que los eventos son más reproducibles y podrían considerarse réplicas. El grado medio de saturación a lo largo de todos los ensayos fue de  $79 \pm 6$ ,  $72 \pm 8$  y  $83 \pm 6$  % para las columnas S, SA y SB, respectivamente, aunque su tendencia fue algo diferente debido a la modificación de la presión de succión al retirar la membrana inferior de las columnas, que se explica a continuación, como se observa en la Figura IV.5.



**Figura IV.5.** Evolución de la saturación inicial y final durante los ensayos de atenuación (semanas 1-23) y desorción (semanas 24-31)

El uso de la membrana colocada en el fondo de las columnas implicó el establecimiento de una succión de aproximadamente 250 mbar. Sin embargo, después de varias semanas de experimentación se observó una saturación de la membrana de la columna de suelo debida probablemente a la migración de sólidos finos al fondo de la misma, lo que condujo a retirar la membrana de todas las columnas y obligó a establecer un valor de succión menor, de aproximadamente 60 mbar, aunque luego se disminuyó hasta 20 mbar para mantener constante el grado de saturación de las columnas al inicio de cada evento, ya que a 60 mbar las columnas se secaban más que antes de retirar las membranas. La succión fue estable y constante a partir de entonces. Es de resaltar que cuando se realizaba el riego, los valores de succión en la cámara se veían aumentar, pero volvían a estabilizarse en la presión fijada tras la infiltración de las láminas de agua de riego en la superficie de las columnas. Cabe destacar que esta succión no se trata realmente de una succión del suelo, sino que es la presión es necesario ejercer para que el agua salga por el agujero inferior de las columnas.

Para controlar el oxígeno y la presión hidráulica de las columnas, se realizaron tres orificios en cada columna, dos tomas para los oxímetros (una a una profundidad de 18 cm, en la columna de suelo, y de 15 cm, en las otras, y otra a una profundidad de 23 y 21 cm en la columna de suelo y en las otras, respectivamente), y dos para los tensiómetros (a a una profundidad de 3 cm en todas las columnas y otra a una de 23 cm, en la columna de suelo, y de 21 cm en las otras columnas), tal y como se indicó en la **Figura II.8** del capítulo II. El oxímetro (Presens, Fibox 3, con un cable de 2 mm) determinaba el contenido de oxígeno por medida de la extinción de fluorescencia. Esta técnica se basa en la introducción de una fibra óptica con un colorante fluorescente adherido en su punta. Esta luz es devuelta por la fibra y detectada por el dispositivo de medida. En presencia de oxígeno, la fluorescencia se detiene y se puede medir y calibrar para detectar la concentración de oxígeno (Hetch y Kölling, 2002), que se recoge en continuo (cada 10 min) y se almacena en un datalogger. Los tensiómetros utilizados disponían de una protuberancia porosa de 67 mm de diámetro y 2,54 cm de longitud. La zona porosa se encontraba fijada a un tubo acrílico transparente de 6 cm de longitud que finalizaba en una válvula de tres llaves con un transductor de presión que convertía un diferencial de presión en una tensión que se registraba cada 2 min. Los tensiómetros se colocaron en los orificios de las columnas por medio de un racor mecánico

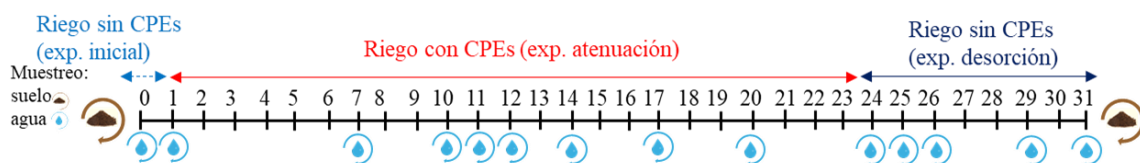
de 3/8" donde iba instalado un accesorio roscado envuelto en cinta de teflón para evitar cualquier fuga de agua. La señal de los tensiómetros se convertía en unidades de presión, utilizando la curva de calibración desarrollada antes de su instalación, y se recogía en continuo en otro datalogger (Campbell CR-1000).

En primer lugar, se llevaron a cabo 4 eventos (4 semanas) de riego con agua residual sin CPEs con el fin de acondicionar la columna y comprobar que la infiltración se producía de manera similar a lo observado en campo. Una vez se obtuvo una coincidencia razonable entre las dos escalas, se iniciaron los experimentos que se describen a continuación. Las muestras recogidas a la salida de las columnas durante estos ensayos no se recogieron en fracciones sino en una única botella de 500 mL. A continuación, se realizaron dos tipos de experimentos de infiltración en 31 eventos de riego con las columnas descritas anteriormente. Una vez a la semana, se regó cada columna con 500 mL (evento de riego) en un doble pulso de 250 mL cada uno (carga hidráulica 44 L/m<sup>2</sup>), con una diferencia de 4 h entre pulsos, siguiendo el mismo patrón de riego aplicado en el filtro verde piloto al inicio de la experimentación (enero de 2018). Durante los primeros 23 eventos, las columnas se regaron con agua residual sintética a la que se añadió una mezcla de 11 CPEs a 1 mg/L (AR<sub>CPE</sub>) para evaluar los procesos de atenuación (en adelante, "experimento de atenuación"). A continuación, para los siguientes 8 eventos (semanas 24-31), las columnas se regaron con el mismo agua residual sintética sin CPEs (AR) para evaluar su capacidad de sorción reversible (en adelante, "experimento de desorción"). En todos los eventos, durante las primeras 24 h después del primer pulso de riego, se recogió el agua de infiltración (AI<sub>CPE</sub>, cuando se regaba con CPEs o AI, cuando se regaba sin CPEs) en cinco fracciones de aproximadamente 100 mL y luego se almacenó a -20°C. Para evitar la posible (bio)degradación de los CPEs en el agua de infiltración antes de la recogida de las botellas, se colocaban fundas de hielo dentro de la cámara de vacío. Se realizó un ensayo con trazador para cada columna, después del evento 31, para determinar el tiempo de residencia del agua mediante la elaboración de curvas de rotura del trazador (Cl). Para ello se llevó a cabo un evento de riego de las columnas con 500 mL de una disolución de KCl (5 g/L) siguiendo el mismo protocolo de todos los experimentos anteriormente realizados que se eluyó a continuación en dos eventos más de riego. La concentración de cloruro en las muestras de agua infiltrada se midió mediante Cromatografía Iónica (930 Compact Ion Chromatography Flex con automuestreador 858 Professional Sample Processor) seguida de una valoración potenciométrica (Titrand 809 con automuestreador 814 USB Sample Processor) (Metrohm, Suiza). Por otro lado, se recogieron muestras compuestas de suelo natural y de suelo enmendado antes del empaquetamiento de la columna, y, al final del experimento, cuando se desmontaron las columnas, el material empacado a diferentes profundidades fue cortado en 5 (para la columna S) y 6 (para las columnas SA y SB) muestras. Estas muestras se pesaron, después se secaron en estufa a 100°C y se volvieron a pesar después. Por último, alícuotas de estas muestras se congelaron y liofilizaron para su almacenamiento a temperatura ambiente en frascos de polietileno de alta densidad. Más información sobre los experimentos en columnas ha sido descrita por Martínez-Hernández *et al.* (2020).

Las muestras de agua y suelo recogidas en todos los experimentos fueron analizadas para cuantificar los 11 CPEs siguiendo la metodología por LC-MS/MS descrita en el capítulo III. Por una parte, para las muestras de agua no fue necesario realizar la etapa de SPE previa que se detalla en dicho capítulo, únicamente se tomaron alícuotas de las muestras que se centrifugaron y se transfirieron a viales ámbar para su análisis por LC-MS/MS. Por otra parte, el método descrito en el capítulo III para las muestras sólidas se desarrolló para suelos

naturales (sin enmendar), por lo que, antes de analizar las muestras del relleno de las columnas, se llevó a cabo un estudio de recuperación de los CPEs en las dos matrices de suelo enmendado (suelo + 3% astillas y suelo + 3% biochar). Se evaluaron los dos mismos niveles de concentración a los que se realizó la validación del método de análisis de CPEs en suelo natural (0,8 y 8 ng/g). Sin embargo, debido a las propiedades del biochar como sorbente, la recuperación de los CPEs en la columna SB para el nivel bajo (0,8 ng/g) fue muy baja ( $R < 30\%$ ), por lo que se estudió un nivel superior (80 ng/g) para esta matriz. Tampoco se pudo evaluar al nivel más bajo la recuperación de ACE e IBU en la matriz suelo enmendado con biochar (0,8 ng/g), al igual que ocurría con el suelo natural, ya que, como se explicó en el capítulo III, los LOQs de estos CPEs están muy cerca de 0,8 ng/g. Los análisis se realizaron por triplicado y la precisión (expresada como RSD) fue aceptable. Se obtuvieron valores de recuperación entre 70 - 120% en ambas matrices para la mayoría de los CPEs, excepto para tres casos en el suelo enmendado con astillas: CLA y PAR (35%), lo cual ocurre también en el suelo natural (capítulo III) y KET ( $R = 58\%$ ).

Con los resultados obtenidos de la cuantificación de muestras de agua y suelo empleando el análisis dirigido, se realizó un balance de masa total por CPE en cada columna para estimar el porcentaje de masa total atenuada. Debido al gran número de muestras de agua recogidas a lo largo del experimento sólo se analizaron las fracciones de muestra indicadas en la **Figura IV.6**). Las muestras que no se analizaron, necesarias para establecer los balances de masa total, se determinaron, para el experimento de atenuación, considerando las concentraciones promedio y los porcentajes de atenuación de los eventos medidos, y, para el experimento de desorción, por interpolación lineal. Las concentraciones de CPEs por debajo del MQL se aproximaron a los valores  $MQL/2$ , mientras que las no detectadas se tomaron como cero. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de código abierto R y R-studio (R Development Core Team, 2008). La normalidad de los conjuntos de datos y la homogeneidad de las varianzas se verificaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. El nivel de significancia de las diferencias entre columnas en los valores medios de la atenuación de CPEs y la masa medida del suelo se investigó mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y por Kruskal-Wallis, para conjuntos de datos normales y no normales, respectivamente, utilizando comparaciones *posthoc* por el método de Bonferroni.



**Figura IV.6.** Resumen de las etapas de los ensayos (similar para las tres columnas) indicando las muestras analizadas para la cuantificación de los 11 CPEs y PTs seleccionados en agua y suelo. En cada semana muestreada se recogieron 5 fracciones de agua infiltrada en cada columna (excepto en las semanas 10 y 12 que sólo se recogieron las fracciones inicial (1ª) y final (5ª)). Nótese que el experimento inicial de riego sin CPEs se numeró como “0” aunque tuviera una duración de 4 semanas.

## 2.4. Estrategia metabolómica no dirigida

### 2.4.1. Análisis por LC-HRMS

Para llevar a cabo este estudio se utilizó la cromatografía líquida (HPLC 1290 Agilent) acoplada mediante una fuente de ionización por electronebulización (ESI) (DuoSpray Ion Source, SCIEX, Framingham, MA, USA) a un analizador híbrido cuadrupolo - tiempo de vuelo (QTOF) (triple TOF 5600 SCIEX).

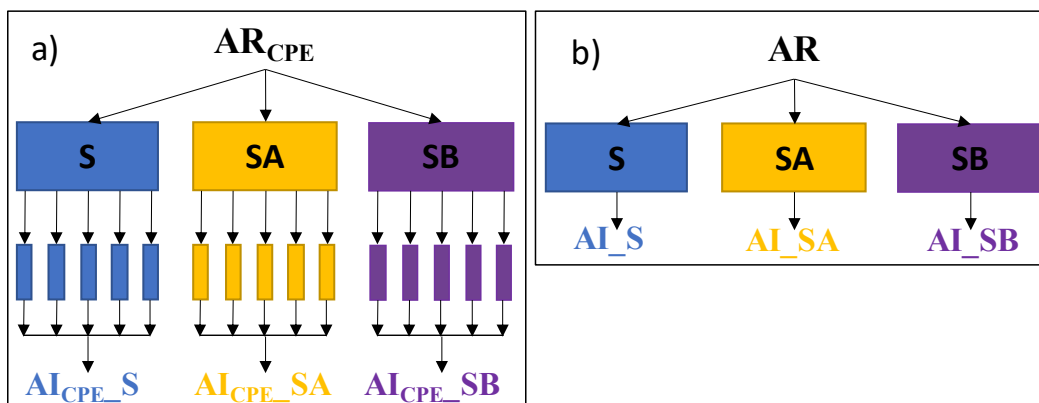
Se propusieron tres columnas diferentes para optimizar las condiciones de análisis: Atlantis dC18 (Waters, Milford, MA, EE.UU.), Kinetex Pentafluorofenil (F5) (Phenomenex, Torrance, CA) y Zic-HILIC (Merck, Darmstadt, Alemania). Todas las columnas tenían las mismas dimensiones (150 × 2,1 mm) y con tamaño de partícula de 3 µm. También se emplearon guardacolumnas (5 × 2,1 mm) de la misma composición que cada fase estacionaria. Las tres columnas cromatográficas se probaron en los dos modos de ionización de la fuente electronebulización, positivo (ESI+) y negativo (ESI-), con diferentes fases móviles pero un mismo gradiente binario lineal programado (0-100% de fase B en 20 min) entre dos etapas isocráticas (en ellas la fase móvil no varía su porcentaje, sino que se mantiene constante con el tiempo) diferentes (100% de fase A durante 2 min al principio y 100% de B durante 2 min al final del gradiente). Para las columnas Atlantis d18 y Kinetex F5, las fases móviles empleadas fueron, en ESI+, agua con ácido fórmico al 0,1% (pH 3,5) como fase A y ACN con ácido fórmico al 0,1% como fase B. En ESI-, acetato de amonio 50 mM en agua (pH 5,8, ajustado con ácido acético, 12% (v/v)) como fase A y 90:10 (v/v) ACN y 50 mM de acetato de amonio en agua (pH 5,8) como fase B. Para la columna Zic-HILIC las fases móviles fueron, en ESI+, 90:10 (v/v) ACN y 50 mM de formiato de amonio en agua (pH 3,2, ajustado con ácido fórmico) como fase A, y 50:40:10 (v/v/v) ACN, agua y 50 mM de formiato de amonio en agua (pH 3,2) como fase B. En ESI-, 90:10 (v/v) ACN y 50 mM de acetato de amonio en agua (pH 5,8, ajustado con ácido acético, 12% (v/v)) como fase A, y 50:40:10 (v/v/v) de ACN, agua y acetato de amonio 50 mM en agua (pH 5,8) como fase B. Tras el análisis, las columnas se reequilibraron durante 6 min. El flujo de las fases móviles empleado fue 0,4 mL/min, la temperatura del horno de la columna se mantuvo a 50°C y el automuestreador a 4°C con un volumen de inyección de 10 µL.

Se realizó un barrido completo en MS (*full scan*) con los siguientes parámetros: temperatura del capilar de 550°C; presión del nebulizador y del gas de secado (N<sub>2</sub>) a 55 y 30 psi, respectivamente; voltaje del electronebulización de 5.500 y -4.500 V (en ESI+ y ESI-, respectivamente); tiempo de acumulación de 0,5 s. Se registraron los espectros de masas en el rango de 70-1.000 m/z con un error de masa exacta < 10 ppm y una resolución de 30.000. La calibración se realizó cada 6 h empleando las disoluciones de calibración para ESI+ y ESI- de SCIEX Triple TOF Systems de 12 compuestos con masas comprendidas entre 144,1030 y 1521,9715 Da. Las inyecciones de las muestras se realizaron de forma aleatoria. Además, la monitorización MS/MS se llevó a cabo utilizando una energía de colisión de 35 ± 15 V y un tiempo de acumulación de 0,25 s. Se utilizó el software Analyst (SCIEX) para la adquisición de datos.



### 2.4.2. Preparación de las muestras para la estrategia metabolómica no dirigida

Para la búsqueda e identificación de PTs mediante la estrategia metabolómica no dirigida, se utilizaron muestras de agua del experimento de atenuación. Sólo se consideraron las muestras correspondientes a los eventos 12-23 tras un periodo de estabilización hidráulica (eventos 1-12). Por un lado, las cinco fracciones de agua recogidas en cada evento a la salida de cada columna ( $AI_{CPE\_S}$ ,  $AI_{CPE\_SA}$  e  $AI_{CPE\_SB}$ ) se combinaron en una sola muestra, tomando 10 mL de cada fracción (ver **Figura IV.7**). También se consideraron alícuotas de las correspondientes muestras de entrada ( $AR_{CPE}$ ) para identificar los compuestos presentes antes de la infiltración. Por otro lado, para descartar los compuestos procedentes del suelo o de las enmiendas y no de la transformación de los CPEs, se recogieron muestras de un evento de riego con agua residual sintética sin CPEs de los que se realizaron antes del experimento de atenuación, a la entrada (AR) y a la salida ( $AI\_S$ ,  $AI\_SA$ ,  $AI\_SB$ ) de las columnas, y se consideraron como blancos de muestra. Se tomaron alícuotas de todas estas muestras combinadas que se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 rpm (12g) (centrífuga MiniSpin, Eppendorf, EE.UU.) y se transfirieron a viales de vidrio ámbar antes de su análisis por LC-HRMS.



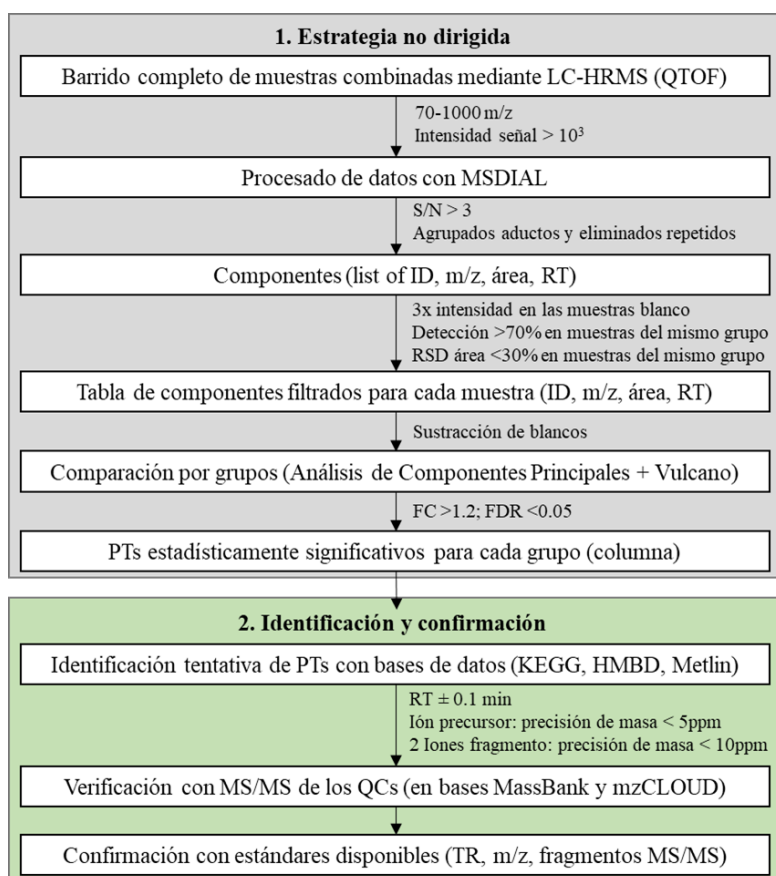
**Figura IV.7.** Combinación de muestras de las columnas S, SA y SB (y abreviaturas), empleadas en el estudio de identificación de PTs, procedentes de a) riego con CPEs (experimento de atenuación) y b) riego previo sin CPEs ("blancos de muestra")

Además, se prepararon cinco muestras control (QC) diferentes con una mezcla de igual volumen (0,5 mL) de todas las muestras combinadas de cada grupo de estudio  $AR_{CPE}+AI_{CPE\_S}$  (QC1),  $AR_{CPE}+AI_{CPE\_SA}$  (QC2),  $AR_{CPE}+AI_{CPE\_SB}$  (QC3),  $AI_{CPE\_S}+AI_{CPE\_SA}$  (QC4) e  $AI_{CPE\_S}+AI_{CPE\_SB}$  (QC5). Las muestras control se enriquecieron con 10  $\mu\text{g/L}$  de warfarina y se inyectaron, al principio de la secuencia y cada diez muestras, para evaluar el buen funcionamiento, la estabilidad y la reproducibilidad del método LC-HRMS no dirigido. También se analizaron por triplicado sólo los QCs en modo MS/MS.

### 2.4.3. Tratamiento de los datos

Las muestras de agua, combinadas según se ha explicado en el apartado anterior (2.4.2.), se analizaron por LC-HRMS empleando las condiciones optimizadas en el apartado 2.4.1. Los datos adquiridos del análisis fueron procesados por la estrategia no dirigida para la priorización de los compuestos definidos como "características diferenciadoras o

componentes” (del inglés, *features*) y el estudio estadístico. Los componentes son grupos de señales  $m/z$  que forman una entidad molecular independiente, incluyendo iones moleculares, aductos y perfiles isotópicos. El esquema del flujo de trabajo para la búsqueda e identificación de PTs en las muestras de agua se resume en la **Figura IV.8**.



**Figura IV.8.** Esquema de trabajo para la búsqueda e identificación de PTs en las muestras de agua

Se trataron todos los datos brutos obtenidos de los análisis de LC-HRMS y los espectros se convirtieron al formato de intercambio MS  $mzML$  en modo centroide con un umbral de 103 unidades de intensidad utilizando el convertidor ProteoWizard MS (Adusumilli *et al.*, 2017). El procesamiento de los datos se realizó con el software MSDIAL (versión 4.70) (Tsugawa *et al.*, 2020) para obtener una lista de las áreas de pico, tiempos de retención y relaciones  $m/z$  exactas. Se eliminaron posibles señales inespecíficas o de ruido (sólo se mantuvieron los picos con relación señal/ruido, S/N  $> 3$ ) y se agruparon los aductos (considerando  $[MH]^+$ ,  $[MNa]^+$ ,  $[MK]^+$ ,  $[MNH_4]^+$ ,  $[MH-H_2O]^+$ ,  $[2M+H]^+$ ). Esto dio lugar a una lista de componentes, cada una de los cuales se identificó con un número de identificación único (ID). A continuación, se aplicó el filtrado de datos, para seleccionar los iones de alta calidad, descartando los picos que no cumplieran los siguientes criterios: (i) intensidad tres veces superior a la de los blancos de muestra correspondientes, (ii) detección en al menos un 70% de las muestras pertenecientes al mismo grupo y (iii) con desviación estándar relativa (RSD) de los valores de área  $< 30\%$ . Los datos resultantes del cribado se normalizaron con respecto a la suma total de las áreas para minimizar la variación técnica. La tabla resultante de los componentes detectados en cada evento temporal, junto a su correspondiente tiempo de retención,  $m/z$  y área de pico obtenida para cada muestra, se sometió a un análisis estadístico.

El agua de infiltración de las diferentes columnas se comparó con el agua de riego por separado después de restar el blanco de cada columna, es decir,  $(AI_{CPE\_S} - AI\_S)$  frente a

(AR<sub>CPE</sub> - AR), (AI<sub>CPE\_SA</sub> - AI<sub>SA</sub>) frente a (AR<sub>CPE</sub> - AR), y (AI<sub>CPE\_SB</sub> - AI<sub>SB</sub>) frente a (AR<sub>CPE</sub> - AR). A continuación, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la distribución normal de los datos, y una corrección de pruebas múltiples de la tasa de descubrimiento falso (*False Discovery Rate*, FDR) de Benjamini-Hochberg para el nivel de significación de las pruebas. Por último, se utilizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para estudiar la variabilidad entre las muestras, y se generó un diagrama de dispersión de Volcán (*Volcano Plot*) para evaluar los componentes significativamente diferentes entre las comparaciones de grupos (FDR < 0,05) y con un factor de cambio (*Fold-change*, FC) relevante, expresado como la relación del área de pico del componente en el agua de riego/infiltración. Un FC > 1,2 implica un aumento del componente (formación de PT) mientras que un FC < 1/1,2 implica una disminución (atenuación). Se utilizó el software MetaboAnalyst (versión 4.0) (Chong *et al.*, 2018) para el análisis estadístico. Todos los datos brutos se encuentran en el repositorio de Metabolights en línea ([www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS6520](http://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS6520), de acceso restringido) y los datos tratados se pueden ver en las Tablas Suplementarias I-VI del artículo publicado (<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0048969723005053-mmc2.x>).

#### 2.4.4. Identificación de PTs

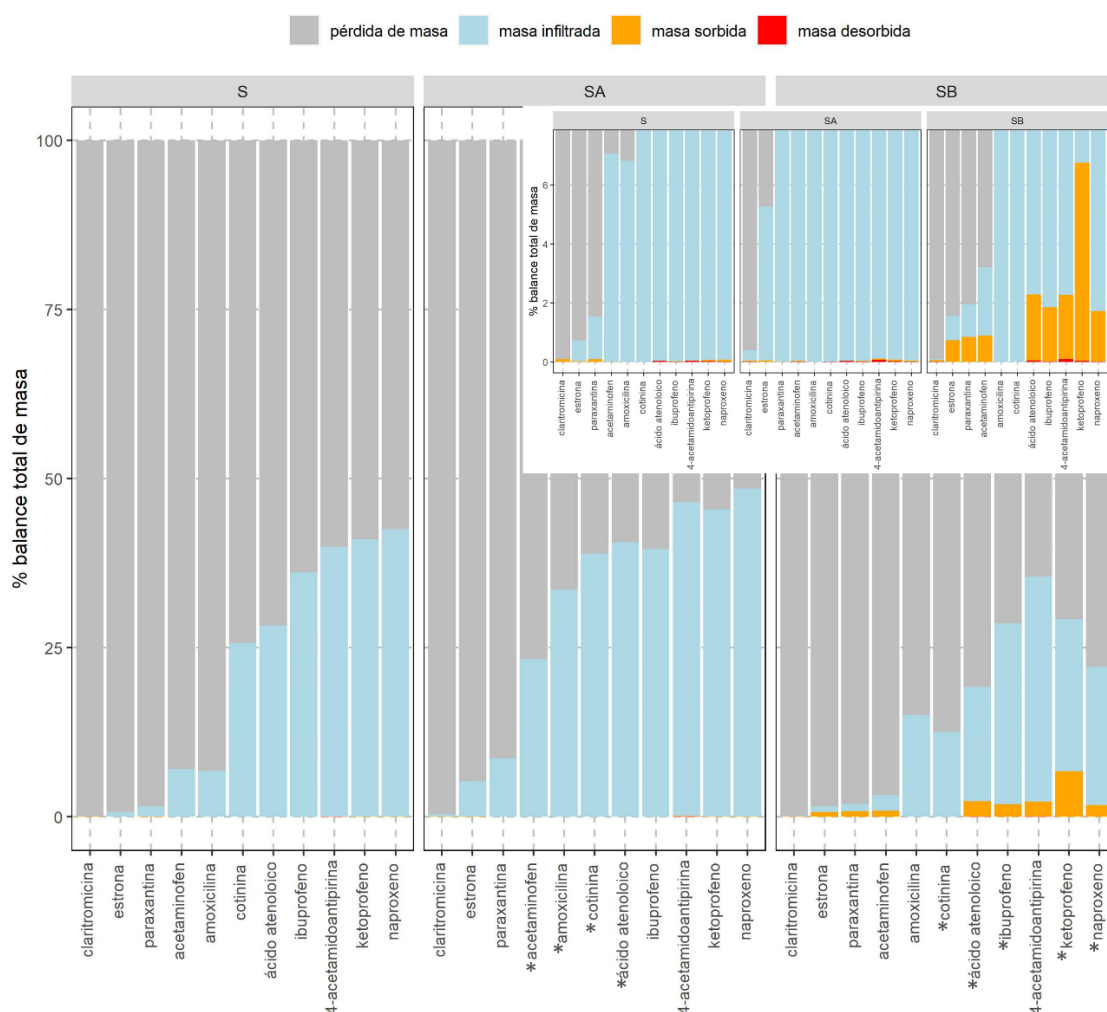
En primer lugar, se llevó a cabo una identificación tentativa de los componentes estadísticamente significativos haciendo coincidir las m/z exactas obtenidas con aquellas publicadas en las bases de datos seleccionadas, como KEGG (Kanehisa *et al.*, 2017), HMDB (Wishart *et al.*, 2018) y METLIN (Smith *et al.*, 2005) dentro de una ventana de precisión de masa de 10 ppm. A continuación, la identificación de estos compuestos se confirmó mediante el análisis de datos MS/MS de las muestras control con la biblioteca MassBank (MSDIAL) y la búsqueda mzCLOUD. Finalmente, la identificación inequívoca se alcanzó mediante la co-inyección de los QCs o las muestras con las disoluciones de los estándares disponibles comercialmente.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Evaluación de la atenuación de los CPEs en las columnas de suelo natural y suelo enmendado

Las concentraciones obtenidas del análisis de las muestras de aguas y suelos se emplearon para realizar un balance de masa para cada CPE en cada columna. En los balances de masa de CPEs, el término sorción engloba tanto los fenómenos de adsorción como de absorción. La sorción reversible representa la cantidad de masa que volvió al agua después de la prueba de desorción (masa desorbida) y la sorción irreversible comprende una parte medida (masa sorbida) y una parte que podría no ser extraíble con el método analítico utilizado. La masa atenuada representa esa masa sorbida irreversiblemente junto con la masa (bio)degradada (disminución del contenido de cada CPE en el agua tras la infiltración). Considerando todos los CPEs, los resultados del balance de masas obtenidos mediante la cuantificación empleando el método dirigido desarrollado en el capítulo II (ver **Figura IV.9**) muestran que la sorción reversible está limitada en todas las columnas (< 0,09% de la masa total). En S y SA, la sorción es insignificante (< 0,11% en el mejor caso), en comparación con la

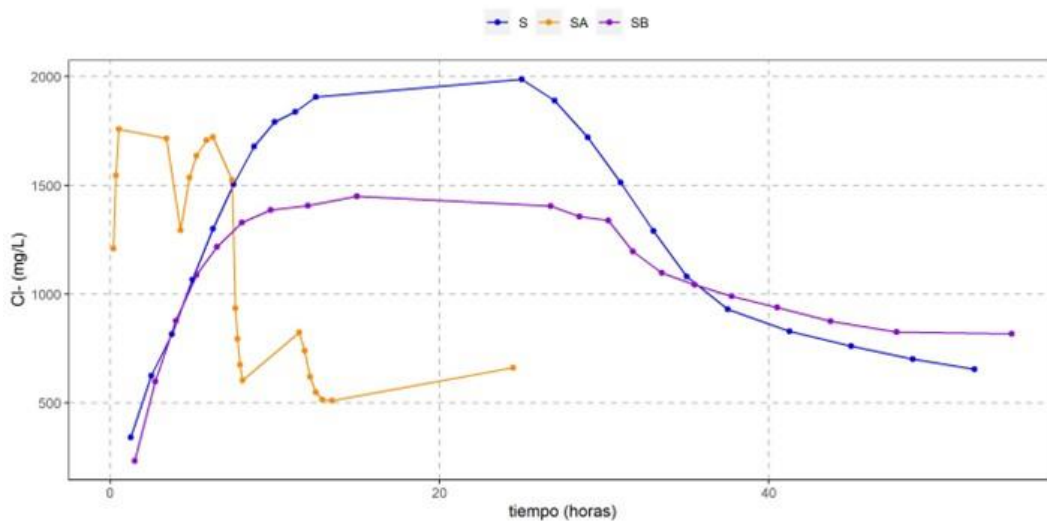
biodegradación. Sin embargo, cuando el suelo es enmendado con biochar, el papel de la sorción irreversible aumenta hasta 68 veces (6,8% en el mejor caso). Otros autores también describen una mayor sorción irreversible (o una desorción mucho más lenta) cuando se utiliza el biochar para retener plaguicidas (Yu *et al.*, 2010).



**Figura IV.9.** Balance de masa total (%) en cada columna obtenido mediante la cuantificación por el método dirigido LC-MS/MS. La pérdida de masa representa la masa no extraíble y/o (bio)degradada. \*=Diferencia significativa de atenuación con respecto a la columna S ( $\alpha = 0,05$ ). Nota: la amoxicilina y la cotinina muestran una masa sorbida = 0 porque no pudieron ser analizadas en las muestras de suelo con el método analítico empleado.

La atenuación disminuye en la columna SA para todos los CPEs. La incorporación de astillas modifica la estructura del suelo, aumentando su porosidad total (0,52 frente a 0,49 en la columna S), disminuyendo su densidad aparente (1,34 frente a 1,53 g/cm<sup>3</sup> en la columna S) y aumentando su caudal medio (0,25 frente a 0,10 mm/min en la columna S) como resultado de la probable formación de macroporos en el suelo tras la adición de astillas, permitiendo la infiltración de agua y el transporte de solutos (Christiansen *et al.*, 2004). Las curvas de rotura de los ensayos con trazador (**Figura IV.10**) muestran también un menor tiempo de retención en la columna SA que reduce el tiempo de contacto y, en consecuencia, la magnitud de los fenómenos de sorción y biodegradación (Ashworth e Ibekwe, 2020). Las diferencias entre los CPEs podrían estar relacionadas con la tasa de biodegradación que es específica de cada compuesto (Shu *et al.*, 2021). La estructura química de los CPEs puede ser un factor influyente en su biodegradabilidad (Bertelkamp *et al.*, 2014), y podría ser la causa

de la menor atenuación del ketoprofeno, la 4-acetamidoantipirina y el naproxeno en el suelo y el suelo enmendado con astillas. Un mayor carácter aromático les podría conferir una mayor estabilidad.



**Figura IV.10.** Reducción de la concentración del ión cloruro en las muestras recogidas a la salida de las columnas S, SA y SB durante los días siguientes al riego con el trazador

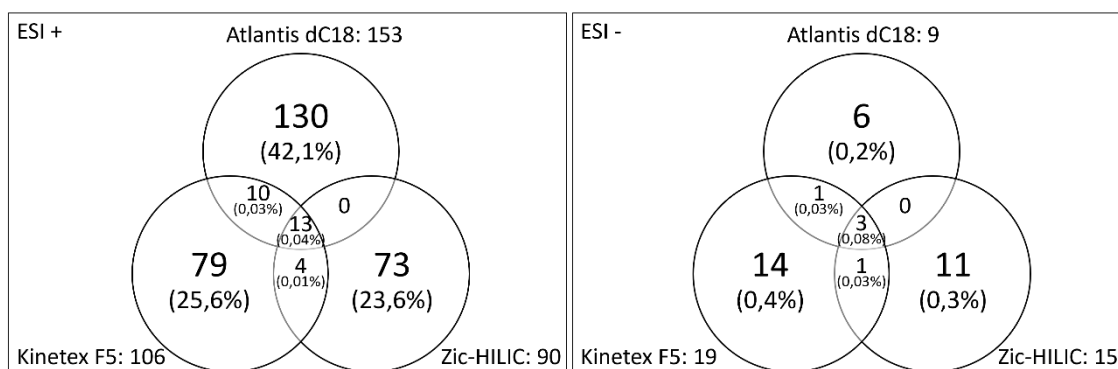
La incorporación de biochar también modifica la estructura del suelo, aumentando su porosidad total a 0,51 y disminuyendo su densidad aparente a 1,34 g/cm<sup>3</sup>. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la columna SA, la tasa de flujo promedio (0,12 mm/min) y la curva de avance del trazador no difieren mucho de la columna S. El análisis SEM de ambas enmiendas muestra que la morfología y la estructura del biochar aumentan la microporosidad del suelo enmendado sin impactar el flujo de infiltración pero aumentando su superficie específica 15 veces en comparación con las astillas (ver **Tabla IV.1**). Una mayor superficie específica implica una mayor capacidad de adsorción y atenuación de todos los CPEs, sin embargo, este aumento no puede ser descrito completamente por los procesos de sorción (**Figura IV.9**) y es probable que la (bio)degradación tenga un impacto mayor. La adición de biochar mejora el entorno fisicoquímico para los microbios (Ajayi y Horn, 2017) y estimula indirectamente su actividad por el aumento de la disponibilidad de nutrientes (Qiu *et al.*, 2009) y por los sitios de sorción que ofrece para el establecimiento de sus colonias. Se ha informado de una mayor atenuación de CPEs cuando se incorpora biochar al suelo en otros tratamientos no convencionales (Zhang *et al.*, 2014) y en biosólidos aplicados al suelo al 20% en peso seco (Liu *et al.*, 2022). En particular, en el experimento realizado, con sólo un 3% en peso de biochar la mayor mejora se produce para el ketoprofeno, lo cual es bastante prometedor teniendo en cuenta su persistencia (Martínez-Hernández *et al.*, 2018; Shu *et al.*, 2021). Ya no sólo influye el tipo de CPE, sino también la afinidad de sorción. El biochar aumenta las cargas positivas en la superficie del suelo en comparación con las astillas (PZC 7,2 frente a 6,2 de las astillas), aumentando la interacción con los compuestos cargados negativamente. Esta interacción puede mejorar indirectamente la biodegradación de los CPEs ya que implica una mayor afinidad para ser retenidos en la superficie celular de los microorganismos y, por tanto, una mayor oportunidad de ser biodegradados (Bertelkamp *et al.*, 2014). En la columna SB, la masa de ácido atenololico retenido fue significativamente mayor que en el resto de las columnas y esto también se tradujo en una mejora significativa de la atenuación. La superficie del biochar es rica en moléculas polares ionizables, principalmente grupos funcionales que contienen oxígeno (Caban *et al.*, 2020) lo que podrían

favorecer la retención del ácido atenolico ya que, al ser un zwitterion, interactúa tanto con cargas positivas como negativas. En general, la incorporación de biochar y su mayor capacidad de sorción mejora la atenuación de los CPEs directamente (sorción) o indirectamente al aumentar los tiempos de retención ((bio)degradación).

### 3.2. Desarrollo y aplicación de la estrategia no dirigida para la búsqueda de PTs en las columnas de suelo natural y suelos enmendados

Para el desarrollo de una estrategia óptima empleando la técnica de LC-HRMS, se probaron las tres columnas cromatográficas seleccionadas, junto con sus condiciones de análisis y los dos modos de ionización de la fuente del MS. En primer lugar, se analizó una disolución con los 11 estándares de CPEs y la warfarina, como referencia para seleccionar las condiciones cromatográficas, indicadas en el apartado experimental de este capítulo (ver 2.4.1.), en base a una forma de pico y resolución aceptables. En segundo lugar, se analizó una muestra combinada de agua de infiltración procedente de los experimentos de retención y otra representativa del agua de riego para seleccionar la opción que permitiera identificar el mayor número de componentes.

Los diagramas de Venn (**Figura IV.11**) muestran que la columna Atlantis d18 trabajando en ESI+ fue capaz de detectar el mayor número de componentes (> 42% de todos los detectados). La cantidad de m/z únicos detectados en el modo ESI- fueron muy pocos (< 0,5%) en comparación con los detectados en ESI+ y fue descartado. Otros autores también describen que la mayoría de los CPEs podrían ser detectados en el modo de ionización positiva (Schymanski *et al.*, 2015). Por lo tanto, dado que el objetivo es identificar el mayor número posible de componentes, no se justificó el uso de columnas distintas a la Atlantis d18.



**Figura IV.11.** Diagramas de Venn que muestran el número total de componentes identificados con fórmula molecular en las diferentes columnas cromatográficas (Atlantis d18, Kinetex y Zic-HILIC) y dos modos de ionización, positivo (ESI+) y negativo (ESI-)

Mediante el sistema LC-HRMS descrito anteriormente y el flujo de trabajo para obtener todas las diferentes muestras de la estrategia no dirigida (ver **Figura IV.7**), se obtuvieron las huellas metabólicas (perfiles completos de los metabolitos) del agua de infiltración de las tres columnas y se compararon con el agua de riego. En la **Figura IV.12** se presentan a modo de ejemplo los cromatogramas de iones totales (TIC) de los diferentes grupos de muestras analizadas de cada columna.

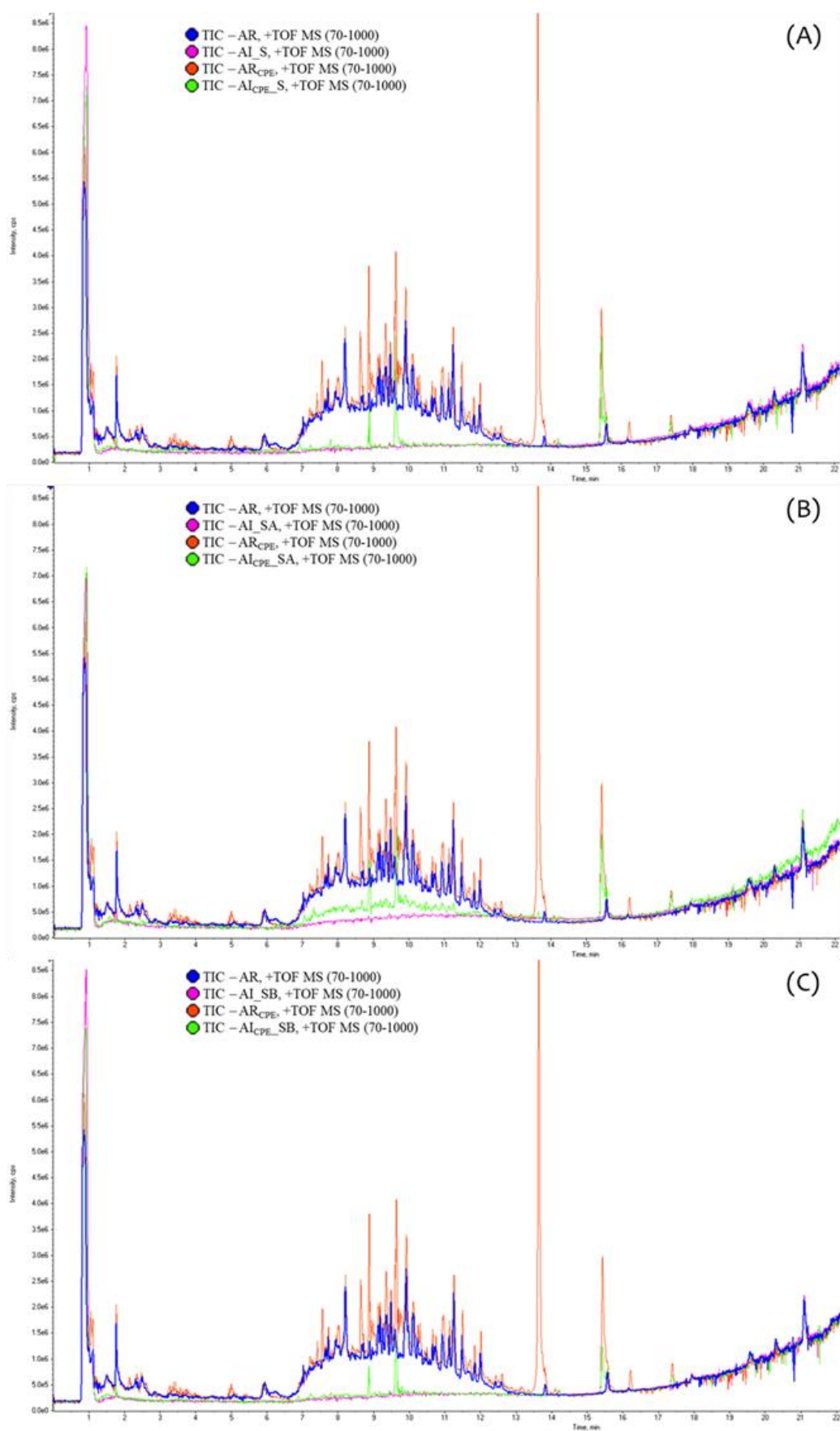
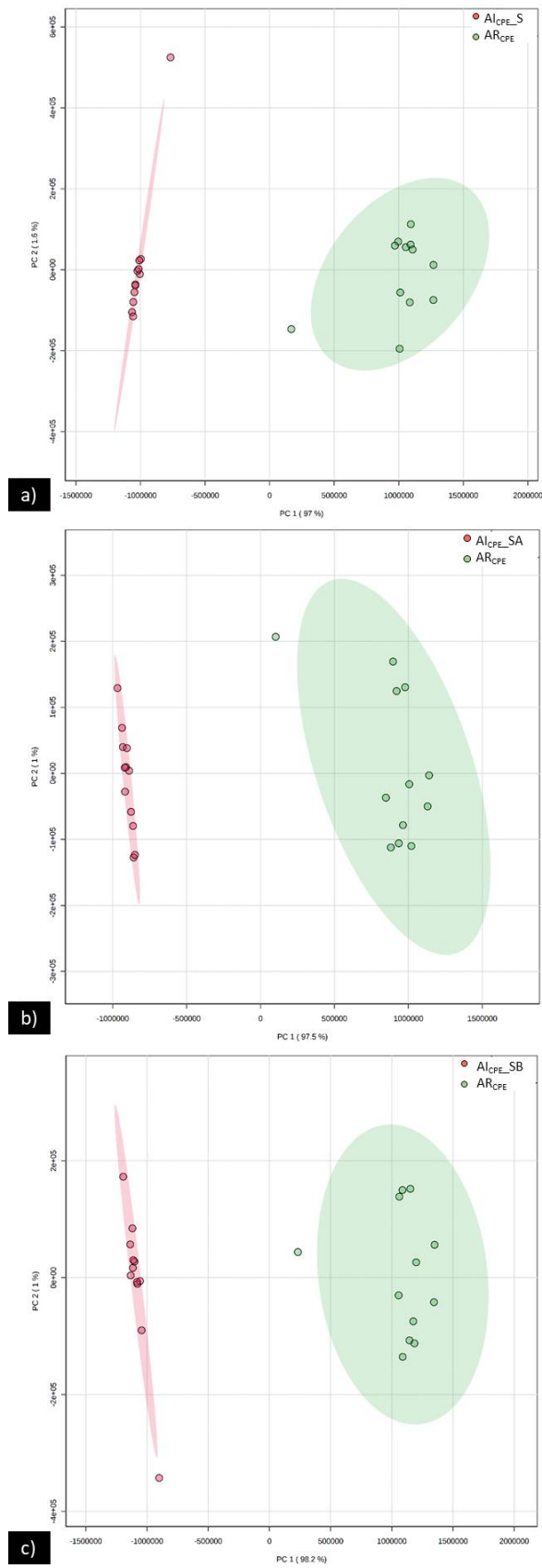


Figura IV.12. Comparativa de los TIC obtenidos de las muestras de agua empleadas en la estrategia de análisis no dirigido para un evento (semana 14) en la columna de suelo natural (A), suelo enmendado con astillas (B) o con biochar (C) de las muestras comparadas en la estrategia no dirigida obtenidos por LC-HRMS

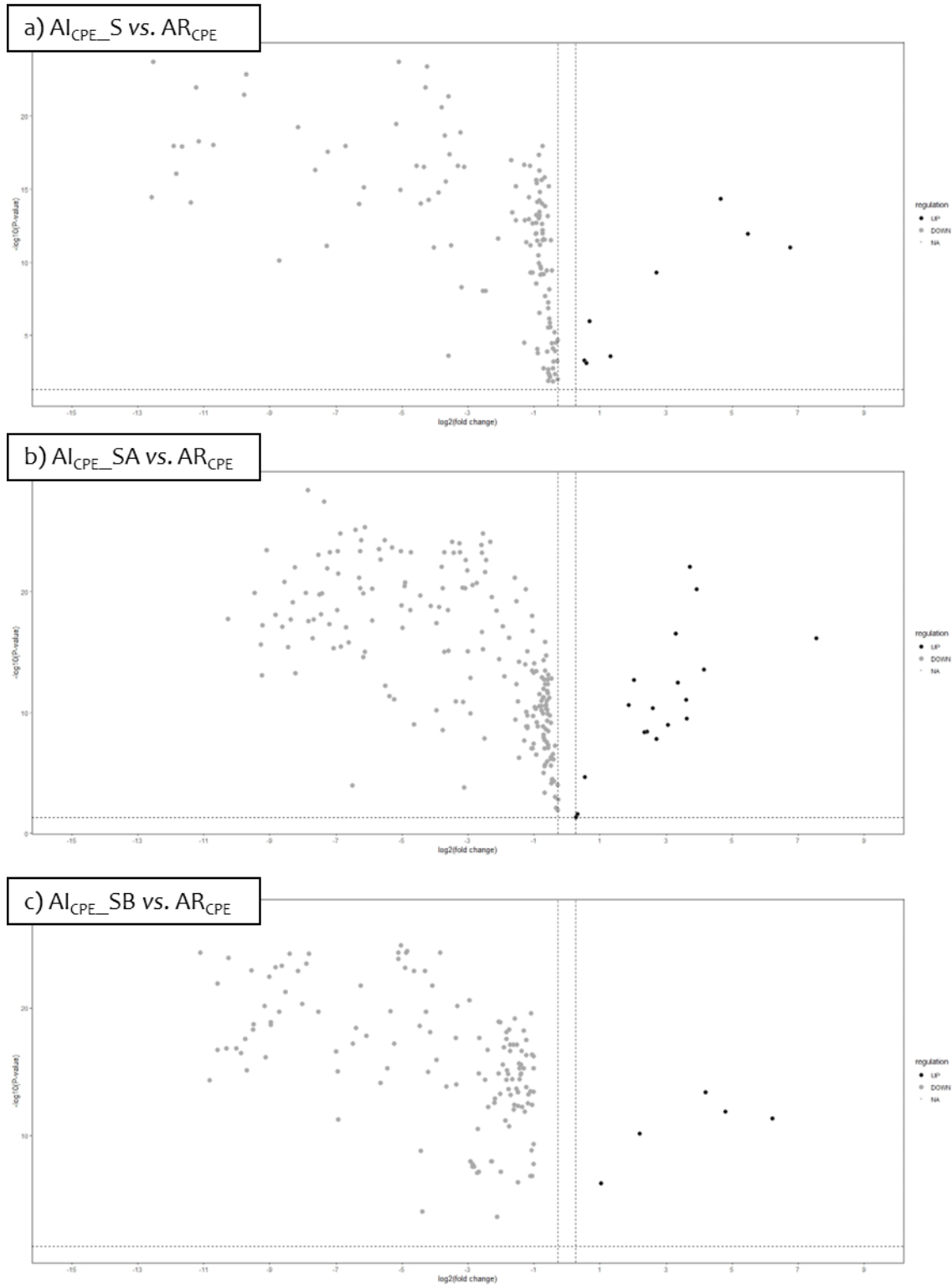
El procesamiento de los datos anteriores con MSDIAL y la posterior sustracción de blancos y filtrado de picos permitió la detección de 145, 228 y 162 componentes en las comparaciones  $Al_{CPE\_S}$  vs  $AR_{CPE}$ ,  $Al_{CPE\_SA}$  vs  $AR_{CPE}$  e  $Al_{CPE\_SB}$  vs  $AR_{CPE}$ , respectivamente (ver Tablas Suplementarias I-III). La matriz de datos resultante con los valores del área de los picos de cada componente en todas las muestras se sometió entonces a un análisis estadístico. Las diferencias globales entre los grupos de muestras de agua de riego y de infiltración se evaluaron primero mediante PCA. La elipse obtenida mediante el test de Hotelling  $t^2$  reveló un valor atípico (semana 22) que se eliminó del análisis posterior, pero las restantes permitieron obtener una separación muy clara, mostrando diferencias evidentes (y esperadas) entre las muestras de agua de infiltración y de riego, con al menos el 97% de la variabilidad explicada por PC1 en todas las comparaciones como se observa en la **Figura IV.13** para las columnas de a) suelo, b) suelo enmendado con astillas y c) suelo enmendado con biochar. La variabilidad en PC1 fue muy alta debido a la gran variabilidad de los componentes entre grupos (riego vs infiltración) como también puede verse en los datos de las Tablas Suplementarias I-III. Además, la agrupación significativa de las muestras de agua de riego y de agua de infiltración en el PCA demostró el buen funcionamiento, la estabilidad y la reproducibilidad del método. Asimismo, la desviación estándar relativa de la warfarina en los QCs ( $n = 30$  en un tiempo total de análisis de 100 h aproximadamente) fue de aproximadamente 0,08% y 6,7% para el tiempo de retención y el área de pico, respectivamente, con una error de masa de 1 ppm.





**Figura IV.13.** PCA de los componentes detectados en las comparaciones de muestras de riego ( $AR_{CPE}$ ) frente a infiltración ( $AI_{CPE}$ ) de la columna de a) suelo (S), b) suelo enmendado con astillas (SA) y c) suelo enmendado con biochar (SB). Las elipses se obtuvieron mediante el test  $t^2$  de Hotelling

Tras la aplicación de la prueba de Shapiro-Wilk, que mostró que los datos no tenían una distribución normal, se utilizaron Diagramas de Volcán (*Volcano Plots*) para evaluar las diferencias entre las muestras de agua de riego y de infiltración en las tres columnas (**Figura IV.14**). Debido a las grandes diferencias en los perfiles de los componentes, evidenciadas a partir del PCA, la gran mayoría de los componentes fueron significativos. De hecho, un total de 138, 217 y 143 componentes en las comparaciones  $Al_{CPE\_S}$  vs  $AR_{CPE}$ ,  $Al_{CPE\_SA}$  vs  $AR_{CPE}$  e  $Al_{CPE\_SB}$  vs  $AR_{CPE}$ , respectivamente, tenían  $FDR < 0,05$  y  $FC > 1,2$  o  $FC < 1/1,2$  (ver Tablas Suplementarias IV-VI). Sin embargo, la mayoría de los componentes detectados tenían una mayor concentración en las muestras de  $AR_{CPE}$  que en las de  $Al_{CPE}$  ( $FC < 1/1,2$ ), como puede verse en los Diagramas de Volcán (puntos de la izquierda en gris en la **Figura IV.14**). Aunque estos componentes no pueden considerarse PTs, estos resultados reflejan la capacidad de depuración del propio suelo.



**Figura IV.14.** Diagramas de Volcán (Volcano plots) para los diferentes componentes identificadas en las comparaciones entre las muestras de agua de infiltración ( $AI_{CPE}$ ) y de agua de riego ( $AR_{CPE}$ ) en a) columna S, b) columna SA, y c) columna SB, con respecto al factor de cambio (FC) y tasa de descubrimiento falso (FDR). Los puntos negros (derecha) son compuestos significativos con mayor concentración en el agua de infiltración que en las muestras de agua de riego ( $FC > 1,2$ ), mientras que los puntos grises (izquierda) son compuestos significativos con mayor concentración en el agua de riego ( $FC < 1/1,2$ ).

Sólo 8, 19 y 5 componentes mostraron una nueva formación o un aumento significativo después de la columna (FC > 1,2) en Al<sub>CPE\_S</sub>, Al<sub>CPE\_SA</sub>, Al<sub>CPE\_SB</sub> y respectivamente, los cuales pueden considerarse PTs (puntos de la derecha negros en la **Figura IV.14**). La mayoría de los componentes significativos se encontraron en más de una columna por lo que se identificaron tentativamente un total de 21 PTs únicos (presentados en la **Tabla IV.4**). El área de los picos de dichos componentes en las muestras de agua de riego y en el agua de infiltración se presenta en figuras (boxplot) el Anexo B. El menor número de PTs se detectó en la columna SB (sólo 5), lo que concuerda con la capacidad descrita del biochar para retener contaminantes debido a su elevada superficie (Kah *et al.*, 2017; Martínez-Hernández *et al.*, 2020), como también se observó en mediante la cuantificación de los 11 CPEs empleando el análisis dirigido (apartado anterior). Por otro lado, el mayor número de PTs significativos en la columna SA podría ser consecuencia del menor tiempo disponible para la mineralización y/o retención de los PTs formados durante la infiltración, en comparación con S y SB. También se encontraron productos intermedios de biodegradación incompleta de plaguicidas con tiempos de contacto disminuidos en una columna de biofilm fúngico (Hu *et al.*, 2020). Además, la incorporación de astillas provocó la existencia de una composición microbiana diferente (principalmente bacteriana y fúngica) a los suelos naturales sin enmendar (Grießmeier y Gescher, 2018; Li *et al.*, 2019) que podría haber dado lugar diferentes procesos bióticos y/o abióticos y, por lo tanto, a otros PTs. Para apoyar estas observaciones, se examinaron los datos brutos obtenidos del análisis HRMS de los 21 PTs antes del cribado estadístico (datos no mostrados). La mayoría de los PTs se detectaron en el propio suelo (16 de los 21, 76%), lo que sugiere que podrían formarse en todas las columnas, pero un mayor tiempo de contacto permitiría que se mineralizaran en el suelo (columna S) y se retuvieran y/o mineralizaran en el biochar (columna SB).

Tras el análisis estadístico, la identificación tentativa de los PTs se realizó no sólo comparando las masas exactas (m/z) y el perfil isotópico con bases de datos especializadas (METLIN, KEGG y HMDB), sino también el espectro de fragmentación MS/MS con bases de datos espectrales (mzCloud y MassBank). Para lograr una identificación inequívoca de los PTs tentativos (ver **Tabla IV.4**), se realizó una co-inyección con estándares. Se seleccionaron varios estándares con alta probabilidad estructural MS/MS (score > 80%) para cada componente. Sin embargo, algunos de ellos fueron descartados por no tener número CAS o por no estar disponibles comercialmente. Desafortunadamente, sólo representaban a 11 de los 21 PTs tentativos, y sólo 2 fueron confirmados inequívocamente (5- tioxo-S-prolinato de metilo y ácido 4-t-butylbenzoico).

**Tabla IV.4.** Productos de transformación (PTs) identificados en las columnas S, SA y SB junto con sus correspondientes tasas de falso descubrimiento (FDR) y factor de cambio relevante (FC) entre el agua de infiltración (AI<sub>CPE</sub>) y de riego (AR<sub>CPE</sub>). Niveles de identificación según Schymanski et al. (2014): Nivel 1 = estructura confirmada por el estándar de referencia; Nivel 2 = estructura más probable por coincidencia de espectros MS/MS de la librerías; Nivel 3 = candidatos tentativos por coincidencia de espectros en las librerías pero con información insuficiente para una sola estructura exacta; Nivel 4 = fórmula molecular inequívoca; Nivel 5 = masa exacta de interés.

ID	RT	m/z	Formula	Nombre PT	Identificación	FDR (en AI <sub>CPE</sub> )			FC (AI <sub>CPE</sub> /AR <sub>CPE</sub> )		
						S	SA	SB	S	SA	SB
507	8.27	160.0426	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S	5-tioxo-S-prolinato de metilo	Nivel 1	1.13·10 <sup>-12</sup>		1.37·10 <sup>-12</sup>	46.9		29.2
632	16.17	179.1056	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	Ácido 4-t-butilbenzoico	Nivel 1		2.61·10 <sup>-2</sup>			1.21	
3628	10.81	383.0913	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	Ácido 2-(1,2-dihidroxi-3-[(E)-3-(3,4-dihroxifenil)prop-2-enil]oxi-4-hidroxi-3,4-dihidro-2H-piran-6-carboxílico	Nivel 2		5.75·10 <sup>-21</sup>			15.8	
4041	7.62	404.0657	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>10</sub> S <sub>2</sub>	Gluconapoleiferina	Nivel 2		8.45·10 <sup>-12</sup>			12.7	
6615	14.06	607.3893	C <sub>34</sub> H <sub>54</sub> O <sub>9</sub>	Neofusapirona	Nivel 2		1.04·10 <sup>-9</sup>			8.80	
3905	13.00	397.1073	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S	Glucurónico 4-Hidroxiilevamisol	Nivel 2	7.32·10 <sup>-04</sup>	1.98·10 <sup>-13</sup>	5.47·10 <sup>-7</sup>	1.60	4.20	1.60
6464	11.91	590.3903	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	(3S,6R,12S)-6-bencil-3-butan-2-il-9-(6,7-dihidroxiocetil)-1,4,7,10-tetrazabicyclo[10,4,0]hexadecan-2,5,8,11-tetrona	Nivel 2	2.59·10 <sup>-04</sup>	4.14·10 <sup>-9</sup>		2.50	5.30	
6333	13.47	576.37478	C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	C-6 NBD Ceramida	Nivel 2		4.62·10 <sup>-2</sup>			1.21	
6376	9.64	581.1346	C <sub>33</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	Heveaflavona	Nivel 2	5.03·10 <sup>-04</sup>	2.52·10 <sup>-3</sup>		1.60	1.20	
3586	9.02	381.1120	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	Meticilina	Nivel 3		1.47·10 <sup>-8</sup>			6.70	
695	9.4	189.0651	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Cianometil-3-hidroxi-1H-indol-2(3H)-ona	Nivel 3	4.53·10 <sup>-15</sup>	2.56·10 <sup>-14</sup>	4.18·10 <sup>-14</sup>	26.5	18.1	19.6
2635	11.02	339.1025	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	2-Hidroxi-4-(2-hidroxi-etil)fenil beta-D-glucopiranosido	Nivel 3		8.38·10 <sup>-23</sup>			13.6	
7495	17.2	784.4464	C <sub>40</sub> H <sub>62</sub> O <sub>14</sub>	Withanoside V	Nivel 3	5.04·10 <sup>-10</sup>	3.03·10 <sup>-10</sup>	7.29·10 <sup>-11</sup>	6.7	12.7	4.8
852	7.62	208.0423	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Hidroxidopamina	Nivel 3		4.30·10 <sup>-11</sup>			6.5	
2302	7.62	321.0912	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> S	2-(6-metilpiridin-2-il)-N-pirimidin-4-iltieno[3,2-d]pirimidin-4-amina	Nivel 3		2.25·10 <sup>-11</sup>			3.7	
2337	7.59	323.1085	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Berberrubina	Nivel 3		2.15·10 <sup>-5</sup>			1.50	
2567	9.64	336.0201	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub>	Dicentrinona	Nivel 3	1.01·10 <sup>-06</sup>	1.91·10 <sup>-04</sup>		1.70	1.32	
508	10.42	160.0424	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S	Etil 3-isotiocianatopropionato	Nivel 4	9.70·10 <sup>-12</sup>		4.70·10 <sup>-12</sup>	115		79
1997	9.76	301.1202	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	N,N'-Etilenodisalicilamida	Nivel 4		6.75·10 <sup>-17</sup>			2.30	
3732	7.62	388.093	(*)	(*)	Nivel 5	3.10·10 <sup>-13</sup>	3.10·10 <sup>-13</sup>			11.0	
6168	11.9	558.365	(*)	(*)	Nivel 5		3.80·10 <sup>-9</sup>			5.60	

ID: número de identificación del componente; TR: tiempo de retención (min) en la Atlantis d18; m/z: relación masa-carga del ión más intenso del espectro del componente.

(\*) Desconocido

Por último, se aplicó la estrategia no dirigida para controlar los CPEs añadidos al agua de riego ( $AR_{CPE}$ ). De los 11 CPEs, nueve pudieron detectarse con éxito con el método desarrollado, ya que ionizan en modo ESI+ (todos excepto el ibuprofeno y la estrona). La búsqueda de los valores de FDR y FC para los nueve CPEs proporciona una evaluación semicuantitativa del rendimiento de cada columna (véase la **Tabla IV.5**). Los nueve CPEs disminuyen muy significativamente ( $FDR < 0,00024$ ) a través de todas las columnas. Además, los valores de FC demuestran que, en general, la mayor atenuación de los CPEs se produce en la columna SB, y la menor, en la columna SA, siendo la claritromicina y la amoxicilina los más atenuados y el ketoprofeno el menos atenuado en las tres columnas. La consonancia de estos resultados con los obtenidos de los balances de masa establecidos con el análisis cuantitativo (dirigido) confirman, al mismo tiempo, el funcionamiento adecuado de la estrategia no dirigida y una acertada estimación de los balances de masa establecidos.

**Tabla IV.5.** Valores de la tasa de descubrimiento falso (FDR) y del factor de cambio (FC) entre el agua de infiltración ( $AI_{CPE}$ ) y el agua de riego ( $AR_{CPE}$ ) en cada columna para los nueve CPEs detectados en ESI+ con la estrategia no dirigida.

CPEs estudiados	Columna S		Columna SA		Columna SB	
	FDR	FC	FDR	FC	FDR	FC
Claritromicina	$1.09 \cdot 10^{-22}$	$4.16 \cdot 10^{-4}$	$4.07 \cdot 10^{-24}$	0.01	$3.78 \cdot 10^{-23}$	$1.93 \cdot 10^{-3}$
Amoxicilina	$2.69 \cdot 10^{-14}$	$6.56 \cdot 10^{-3}$	$3.07 \cdot 10^{-19}$	0.04	$1.54 \cdot 10^{-18}$	0.01
Paraxantina	$3.89 \cdot 10^{-24}$	0.05	$1.32 \cdot 10^{-25}$	0.17	$3.62 \cdot 10^{-25}$	0.04
Acetaminofén	$4.40 \cdot 10^{-22}$	0.08	$5.77 \cdot 10^{-21}$	0.42	$1.25 \cdot 10^{-25}$	0.03
Cotina	$2.40 \cdot 10^{-4}$	0.08	$1.60 \cdot 10^{-4}$	0.11	$9.41 \cdot 10^{-5}$	0.05
Ácido atenoloico	$1.26 \cdot 10^{-13}$	0.42	$1.16 \cdot 10^{-10}$	0.59	$7.63 \cdot 10^{-16}$	0.29
Naproxeno	$2.23 \cdot 10^{-16}$	0.53	$4.48 \cdot 10^{-15}$	0.63	$5.16 \cdot 10^{-19}$	0.29
4-acetamidoantipirina	$3.16 \cdot 10^{-11}$	0.56	$4.55 \cdot 10^{-10}$	0.67	$4.11 \cdot 10^{-13}$	0.48
Ketoprofeno	$2.87 \cdot 10^{-12}$	0.59	$1.24 \cdot 10^{-10}$	0.67	$5.43 \cdot 10^{-16}$	0.37

## 4. Conclusiones

La combinación del análisis dirigido y de la estrategia metabolómica no dirigida se llevó a cabo para comprender el comportamiento de los CPEs en el agua y el suelo así como la formación de PTs desconocidos en el agua. Los resultados mostraron el gran potencial de la técnica LC-HRMS para una evaluación más completa de estos procesos.

Los balances de masa total muestran que más del 50% de la masa de los CPEs estudiados fue reducida durante la infiltración en las tres columnas. Sin embargo, su biodegradación no fue completa (mineralización) porque la aplicación de la estrategia metabolómica no dirigida a las muestras de agua reveló 21 PTs tentativos (dos de ellos fueron confirmados con estándares comerciales).

La sorción directamente no es el principal proceso que da lugar a la atenuación de los CPEs en ninguna de las columnas. Sin embargo, la mayor capacidad de sorción del biochar aumentó la atenuación de los 11 CPEs estudiados (especialmente de aquellos que poseen cargas negativas) en comparación con el suelo natural (sin enmienda), ya sea directamente (sorción) o indirectamente mediante el aumento de los tiempos de retención ((bio)degradación). Se detectaron menos PTs en esta columna, lo que podría significar una biodegradación más completa o una mayor retención (debido a las propiedades de sorción del biochar).

Aunque se detecta un mayor número de PTs significativos a la salida de la columna de suelo con astillas, esto no implica una mayor atenuación de los CPEs presentes en el agua de riego, dado el menor tiempo de contacto agua-suelo debido a la formación de macroporos en la columna cuando se incorporan las astillas. Es necesario realizar más estudios para controlar la hidrodinámica en el suelo cuando se emplean astillas de madera como enmienda.

## 5. Referencias

- Adusumilli, R., Mallick, P., 2017. Data Conversion with ProteoWizard msConvert. En: Comai L., Katz J., Mallick P. (eds) *Proteomics. Methods in Molecular Biology*, vol 1550. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6747-6\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6747-6_23)
- Ajayi, A.E., Horn, R., 2017. Biochar-induced changes in soil resilience: effects of soil texture and biochar dosage. *Pedosphere*, 27, 236–247. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60313-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60313-8)
- Albergamo, V., Schollée, J., Schymanski, E.L., Helmus, R., Timmer, H., Hollender, J., De Voogt, P., 2019. Nontarget Screening Reveals Time Trends of Polar Micropollutants in a Riverbank Filtration System. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 7584–7594. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01750>
- Ashworth, D.J. and Ibekwe, A.M., 2020. System of multi-layered environmental media for the removal of antibiotics from wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104206. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104206>
- Bertelkamp, C., Reungoat, J., Cornelissen, E. R., Singhal, N., Reynisson, J., Cabo, A. J., van der Hoek, J. P., y Verliefe, A. R. D., 2014. Sorption and biodegradation of organic micropollutants during riverbank filtration: A laboratory column study. *Water Res.*, 52, 231-241. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.068>
- Caban, M., Folentarska, A., Lis, H., Kobylis, P., Bielicka-Giełdoń, A., Kumirska, J., Ciesielski, W., Stepnowski, P., 2020. Critical study of crop-derived biochars for soil amendment and pharmaceutical ecotoxicity reduction. *Chemosphere* 248, 125976. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125976>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D.S., Xia, J., 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486–W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Christiansen, J.S., Thorsen, M., Clausen, T., Hansen, S., Refsgaard, J.C., 2004. Modelling of macropore flow of transport process at catchment scale. *J. Hydrology.*, 299, 136-158. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2004.04.029>
- De Bustamante, I., Lillo, F.J., Sanz, J.M., De Miguel, A., Garcia, E., Carreno, F., Gomez, D., Martin, T., Martinez, F., Corvea, J.L., 2009. A comparison of different methodologies for designing land application systems: Case study at the Reduena WWTP. *Desalin. Water Treat.* 4, 98–102. <https://doi.org/10.5004/dwt.2009.362>
- Decision (EU) 2015/495 of the European Commission of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for monitoring purposes at Union level in the field of water policy in accordance with Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and which com. *Official Journal of the European Union* L78/40

- Fiehn, O., 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genom.*, 2, 155-168. <http://dx.doi.org/10.1002/cfg.82>
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol.*, 48(1-2), 155-71. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- Glassmeyer, S.T., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Cahill, J.D., Zaugg, S.D., Werner, S.L., Meyer, M.T., Kryak, D.D., 2005. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ. Sci. Technol.*, 39(14), 5157-5169. <http://dx.doi.org/10.1021/es048120k>
- Grießmeier, V. and Gescher, J., 2018. Influence of the Potential Carbon Sources for Field Denitrification Beds on Their Microbial Diversity and the Fate of Carbon and Nitrate. *Front. Microbiol.*, 9, 1313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01313>
- Hecht, H., Kölling, M., 2002. Investigation of pyrite-weathering processes in the vadose zone using optical oxygen sensors. *Environ. Geol.* 42, 800–809. <https://doi.org/10.1007/s00254-002-0583-2>
- Hu, K., Torán, J., López-García, E., Barbieri, M.V., Postigo, C., López de Alda, M., Caminal, G., Sarrà, M., Blánquez, P., 2020. Fungal bioremediation of diuron-contaminated waters: Evaluation of its degradation and the effect of amendable factors on its removal in a trickle-bed reactor under non-sterile conditions. *Sci Tot Environ.*, 743, 140628. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140628>
- Huidobro-López, B., López-Heras, I., Alonso-Alonso, C., Martínez-Hernández, V., Nozal, L., de Bustamante, I., 2022. Analytical method to monitor contaminants of emerging concern in water and soil samples from a non-conventional wastewater treatment system. *J. Chromatogr. A*, 1671, 463006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463006>
- Jankovic, B., Manic, N., Dodevski, V., Popovic, J., Rusmirovic, J.D., Tomic, M., 2019. Characterization analysis of Poplar fluff pyrolysis products. Multi-component kinetic study. *Fuel*, 238, 111-128. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.10.064>
- Kah, M., Sigmund, G., Xiao, F., Hofmann, T., 2017. Sorption of ionizable and ionic organic compounds to biochar, activated carbon and other carbonaceous materials. *Water Research* 124, 673-692. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.070>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., Morishima, K., 2017. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs, *Nucleic Acids Research*, Volume 45, Issue D1, 353–361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- Kang, D., Doudrick, K., Park, N., Choi, Y., Kim, K., Jeon, J., 2020. Identification of transformation products to characterize the ability of a natural wetland to degrade synthetic organic pollutants. *Water Research*, 187, 116425. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116425>
- Kiss, A., Bergé, A., Domenjoud, B., Gonzalez-Ospina, A., 2017. Chemometric and high-resolution mass spectrometry tools for the characterization and comparison of raw and treated wastewater samples of a pilot plant on the SIPIBEL site. *Environ Sci Pollut Res*, 25(10), 9230-9242. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0748-x>



- Li, Z., Qiu, K., Schneider, R.L., Morreale, S.J., Xie, Y., 2019. Comparison of microbial community structures in soils with woody organic amendments and soils with traditional local organic amendments in Ningxia of Northern China. *PeerJ.*, 7, 6854. <https://doi.org/10.7717/peerj.6854>
- Liu, Y.Y., Ptacek, C.J., Beauchemin, S., MacKinnon, T., Blowes, D.W., 2022. Effect of composting and amendment with biochar and woodchips on the fate and leachability of pharmaceuticals in biosolids destined for land application. *Sci. Tot. Environ.*, 810, 151-193. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151193>
- Martín, M.T., Sanz, A.B., Nozal, L., Castro, F., Alonso, R., Aguirre, J.L., González, S.D., Matía, M.P., Novella, J.L., Peinado, M., Vaquero, J.J., 2017. Microwave-assisted pyrolysis of Mediterranean forest biomass waste: bioproduct characterization. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 127, 278–285. <https://doi.org/10.1016/J.JAAP.2017.07.024>
- Martínez-Hernández, V., Leal, M., Meffe, R., De Miguel, A., Alonso-Alonso, C., De Bustamante, I., Lillo, J., Martín, I., Salas, J.J., 2018. Removal of emerging organic contaminants in a poplar vegetation filter. *J. Hazard. Mater.*, 342, 482-491. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.035>
- Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Hernández-Martín, J, Alonso González, A., de Santiago-Martín, A., de Bustamante. I., 2020. Sustainable soil amendments to improve nature-based solutions for wastewater treatment and resource recovery. *Journal of Environmental Management* 261, 110255. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110255>
- McEachran, A.D., Shea, D., Nichols, E.G., 2017. Pharmaceuticals in a temperate forest-water reuse system. *Sci. Tot. Environ.*, 581–582, 705-714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.185>
- Meffe, R., De Miguel, A., Martínez-Hernández, V., Lillo, J., De Bustamante, I., 2016. Soil amendment using poplar woodchips to enhance the treatment of wastewater-originated nutrients. *J. Environ. Manage.* 180, 517-525. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.083>
- Michael, I., Vasquez, M., Hapeshi, E., Haddad, T., Baginska, E., Kümmerer, K., Fatta-Kassinos, D., 2014. Metabolites and transformation products of pharmaceuticals in the aquatic environment as contaminants of emerging concern. *Transformation products of emerging contaminants in the environment: analysis, processes, occurrence, effects and risks*, Vol. 1 (Nollet E & Lambropoulou D, eds), pp. 425–469. John Wiley & Sons, United Kingdom
- Milman, B.L., 2015. General principles of identification by mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 69, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.009>
- Moschet, C., Piazzoli, A., Singer, H., Hollender, J., 2013. Alleviating the Reference Standard Dilemma Using a Systematic Exact Mass Suspect Screening Approach with Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 85(21), 10312–10320. <https://doi.org/10.1021/ac4021598>
- Noh, J.S. y Schwarz, J.A., 1989. Estimation of the point of zero charge of simple oxides by mass titration. *J. of Colloid and Interf. Sci.*, 130(1), 159-162
- Pandey, K.K., 1999. A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *J. of App. Pol. Sci.*, 71, 1969–1975. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990321\)71:12<1969::AID-APP6>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990321)71:12<1969::AID-APP6>3.0.CO;2-D)

- Qiu, Y., Pang, H., Zhou, Z., Zhang, P., Feng, Y., Sheng, D.G., 2009. Competitive biodegradation of dichlofenil and atrazine coexisting in soil amended with a char and citrate. *Environ. Pollut.* 157, 2964–2969. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.06.003>
- R Development Core Team, 2008. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN: 3-900051-07-0.
- Schollée, J.E., Schimanski, E.L., Avak, S.E., Loos, M., Hollender, J., 2015. Prioritizing Unknown Transformation Products from Biologically-Treated Wastewater Using High-Resolution Mass Spectrometry, Multivariate Statistics, and Metabolic Logic. *Anal. Chem.*, 87(24), 12121–12129. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02905>
- Schymanski, E., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 2097–2098. <https://dx.doi.org/10.1021/es5002105>
- Schymanski, E.L., Singer, H.P., Slobodnik, J., Ipolyi, I.M., Oswald, P., Krauss, M., et al., 2015. Non-target screening with high resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 6237–6255. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8681-7>
- Shu, W., Price, G.W., Jamieson, R. y Lake, C., 2021. Biodegradation kinetics of individual and mixture non-steroidal anti-inflammatory drugs in an agricultural soil receiving alkaline treated biosolids. *Sci. Total Environ.* 755, 142520. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142520>
- Singh, R.R., Lester, Y., Linden, K.G., Love, N.G., Atilla-Gokcumen, G.E., Aga, D.S., 2015. Application of metabolite profiling tools and time-of-flight mass spectrometry in the identification of transformation products of iopromide and iopamidol during advanced oxidation. *Environ Sci Technol.*, 49(5), 2983–90. <https://doi.org/10.1021/es505469h>
- Smith C.A., O'Maille, G., Want, E.J., Qin, C., Trauger, S.A., Brandon, T.R., Custodio, D.E., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2005. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit.*, 27(6), 747–51. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39>
- Snow, D.D., Cassada, D.A., Biswas, S., Malakar, A., D'Alessio, M., Marshall, A.H.L., Sallach, J.B., 2020. Detection, occurrence, and fate of emerging contaminants in agricultural environments. *Water Environment Research*, 92(10), 1741-1750. <https://doi.org/10.1002/wer.1429>
- Tsugawa, H., Ikeda, K., Takahashi, M., Satoh, A., Mori, Y., Uchino, H., Okahashi, N., Yamada, Y., Tada, I., Bonini, P., Higashi, Y., Okazaki, Y., Zhou, Z., Zhu, Z-J., Koelmel, J., Cajka, T., Fiehn, O., Saito, K., Arita, M., Arita M., 2020. A lipidome Atlas in MS-DIAL 4. *Nature Biotechnology*, 38, 1159–1163. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0531-2>
- Wang, X., Yu, N., Yang, J., Jin, L., Guo, H., Shi, W., Zhang, X., Yang, L., Yu, H., Wei, S., 2020. Suspect and non-target screening of pesticides and pharmaceuticals transformation products in wastewater using QTOF-MS. *Environ. Int.*, 137, 105599. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105599>
- Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Marcu, A., Guo, A.C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., Serra-Cayuela, A., Liu, Y., Mandal, R., Neveu, V., Pon, A., Knox, C., Wilson, M., Manach, C., Scalbert, A., 2018. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.*, 46(D1), D608-D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>

- WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). 2017. The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource. Paris, UNESCO. Available online: <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/247153e.pdf>
- Yu, X., Pan, L., Ying, G., Kookana, R.S., 2010. Enhanced and irreversible sorption of pesticide pyrimethanil by soil amended with biochars. *J Environ Sci.*, 22(4), 615-620. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60153-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60153-4)
- Zhang, D., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environ. Pollut.*, 184, 620-639. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.009>

**CAPÍTULO V.**  
**ATENUACIÓN DE CONTAMINANTES DE**  
**PREOCUPACIÓN EMERGENTE EN EL FILTRO**  
**VERDE PILOTO BAJO DIFERENTES**  
**CONDICIONES DE OPERACIÓN**

### ARTÍCULO N°3

**Título original:** *Evaluation of contaminants of emerging concern attenuation through a vegetation filter managed using different operating conditions*

**Autores:** Blanca Huidobro-López<sup>a,b</sup>, Virtudes Martínez-Hernández<sup>a</sup>, Lucía Barbero<sup>a,b</sup>, Raffaella Meffe<sup>a</sup>, Leonor Nozal<sup>a,c</sup>, Irene de Bustamante<sup>a,b</sup>

**Revista:** Journal of Hazardous Materials

**Editor:** Zhen (Jason) He

**Editorial:** Elsevier

**Año de publicación:** 2023

**ISSN:** 0304-3894

**Categoría:** Environmental Sciences

**Posición de la revista en la categoría:** 9/279

**Factor de impacto (2021):** 14,224

**Factor de impacto (5 años):** 12,984

**Cuartil:** Q1

El presente capítulo V está basado en el artículo n°3 admitido por la revista y en estado de revisión.

## 1. Introducción

A medida que crece la demanda de agua, la cantidad de aguas residuales generadas y sus cargas contaminantes globales se encuentran en constante aumento en todo el mundo. Los CPEs han sido ampliamente detectados en aguas residuales urbanas tratadas y sin tratar en un rango de concentraciones que suele oscilar entre ng/L y µg/L (Blair *et al.*, 2015; Bayati *et al.*, 2021; Meffe *et al.*, 2021). Aunque estas sustancias no están reguladas por las legislaciones actuales, desde hace pocos lustros se han dedicado esfuerzos de investigación a comprender su destino y efectos ecológicos cuando son liberados al medio ambiente (Du *et al.*, 2014; Aus der Beek *et al.*, 2016; Helmecke *et al.*, 2020; Bayati *et al.*, 2021). Los productos farmacéuticos son una de las clases predominantes entre el variado grupo de sustancias que componen los CPEs debido a su consumo continuo y generalizado.

Aunque los tratamientos avanzados desarrollados en la actualidad pueden proporcionar altas eficiencias de atenuación de algunos CPEs, sus costes de aplicación siguen siendo inasequibles para poblaciones pequeñas y dispersas, y no siempre es posible una eliminación completa (Ahmed *et al.*, 2021). Los tratamientos de aguas residuales que siguen el enfoque de las SBN pueden ser una forma de superar esta dificultad al mismo tiempo que se obtienen otros beneficios cruciales para el desarrollo sostenible (WWAP, 2018). Mediante las SBN se fomentan los procesos que ocurren en la naturaleza para lograr una atenuación de la contaminación presente. Las SBN también mejoran la disponibilidad de agua (por ejemplo, mediante la retención de la humedad del suelo y la recarga de las aguas subterráneas) y mejoran la resiliencia ante los fenómenos extremos relacionados con el agua y el cambio climático (CE, 2018). Un FV es un sistema de tratamiento de aguas residuales con bajos costes de instalación y mantenimiento en el que las aguas residuales pretratadas se depuran durante la infiltración a través de la zona no saturada y de una plantación forestal. Estos sistemas siguen el enfoque de las SBN y valorizan el agua y los nutrientes presentes en las aguas residuales transformándolos en nuevos recursos, como agua más limpia y biomasa. El tratamiento es consecuencia de la acción combinada del conjunto suelo-plantas-microorganismos. Además, los FVs tienen otras muchas ventajas, mejoran el paisaje, generan nichos ecológicos, contribuyen a la mitigación del cambio climático capturando dióxido de carbono (De Miguel *et al.*, 2014; Pradana *et al.*, 2021) y cumplen con el objetivo de neutralidad energética, tal y como recomienda la reciente propuesta de la UE (COM(2022) 541 final) para la refundición de la Directiva de Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas (91/271/CEE). También hay que señalar que esta tecnología de bajo coste es de especial interés si se aprueba dicha propuesta, ya que incluye una disminución del tamaño mínimo de población requerido para la aplicación de la Directiva sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas de 2.000 a 1.000 habitantes equivalentes. En este contexto, se han publicado en los últimos años varios estudios que prueban SBN para tratamientos de aguas residuales en la eliminación de productos farmacéuticos y, más en general, CPEs (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011; McEachran *et al.*, 2017; Martínez-Hernández *et al.*, 2018; Ilyas *et al.*, 2020). Por ejemplo, los resultados obtenidos mediante la operación de un FV y publicados en 2018 por Martínez-Hernández *et al.* revelaron una persistencia moderada del antiinflamatorio ketoprofeno y un comportamiento más recalcitrante de metabolitos conocidos del metamisol (4-aminoantipirina, 4-acetamidoantipirina, 4-dimetilaminoantipirina y 4-formilaminoantipirina)

al compararlos con los observados para el compuesto de partida, lo que supone un riesgo potencial para los recursos de aguas subterráneas situados aguas abajo del FV. Ilyas *et al.* (2020) reconocieron que los antibióticos, como por ejemplo la amoxicilina, son más persistentes que otros productos farmacéuticos al investigar el tratamiento mediante humedales artificiales. Durante la aplicación al suelo de efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales, Karnjanapiboonwong *et al.* (2011) detectaron ocasionalmente hormonas y algunos de sus PTs ( $17\alpha$ -etinilestradiol,  $17\beta$ -estradiol, estrona y estriol) a mayor concentración en el agua infiltrada atribuyendo tal comportamiento a la desconjugación de conjugados hormonales inactivos y/o a una biodegradación limitada. También encontraron que la concentración mínima de estriol se detectaba en el suelo y, la máxima, en las aguas subterráneas. Su alta movilidad (el  $K_{ow}$  más bajo entre las hormonas estudiadas) fue propuesta como la causa de la escorrentía y el transporte subsuperficial del estriol. La eliminación incompleta plantea una preocupación creciente por la entrada de CPEs en los recursos de agua potable y otros riesgos ecológicos. De hecho, la aparición de CPEs en las aguas subterráneas causada por el vertido de aguas residuales tratadas en el suelo ha sido ampliamente descrita (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2014; McEachran *et al.*, 2017; Montagna *et al.*, 2020), apoyando el comportamiento persistente observado para algunos de ellos. Estos resultados indican que aún hay margen de mejora en el tratamiento de los CPEs mediante tecnologías de tratamiento de aguas residuales basadas en el enfoque SBN.

La eficacia de los FVs puede mejorarse aplicando estrategias que favorezcan los procesos naturales de atenuación que tienen lugar durante la infiltración del agua, principalmente la sorción y la (bio)degradación. Los materiales carbonosos se utilizan ampliamente como enmiendas orgánicas para mejorar la fertilidad del suelo, aumentar el rendimiento de los cultivos y restaurar los suelos degradados (Espinosa *et al.*, 2020; Menzies *et al.*, 2020). La incorporación al suelo de madera (en forma de astillas o virutas) ha demostrado ser también una medida eficaz para reducir la lixiviación de nitratos en los FVs ya que promueve la actividad microbiana al proporcionar una fuente adicional de carbono orgánico fácilmente lábil (Meffe *et al.*, 2016; Martínez-Hernández *et al.*, 2020). Las astillas y virutas de madera también proporcionan sitios de sorción para el establecimiento de la biota, así como para la retención de diferentes compuestos, mantienen la humedad del suelo y evitan ciclos prolongados de secado del suelo (Menzies *et al.*, 2020) favoreciendo así, tanto los procesos de biodegradación como los de sorción. Sin embargo, existe una carencia considerable de conocimiento sobre el impacto de este tipo de enmiendas al suelo en la atenuación de los CPEs presentes en las aguas residuales cuando se utiliza en FVs. Se han publicado recientemente algunos resultados prometedores sobre la eficacia de enmiendas leñosas al suelo. Liu *et al.* (2022) estudiaron el efecto de estas enmiendas en biosólidos (mezclados al 30% en peso) aplicados al suelo y encontraron una disminución de la lixiviación de fármacos y una reducción de su contenido en los propios biosólidos. Valhondo *et al.* (2020) emplearon una barrera reactiva de astillas de madera mezcladas con suelo en el fondo de una cuenca de infiltración en un sistema de recarga de acuíferos y descubrieron que la biodegradación y la sorción mejoraban para la mayoría de los CPEs, incluidos los productos farmacéuticos. Clyde *et al.* (2021) observaron un aumento de la atenuación de los CPEs al mezclar la arena con astillas de madera (50% en peso) en tratamientos *in-situ* de aguas residuales (fosas sépticas).

La disposición de las capas de suelo y de astillas puede ser un factor clave para mejorar la atenuación de contaminantes. De hecho, Ashworth e Ibekwe (2020) destacaron la importancia de emplear diferentes capas de enmiendas para mejorar la atenuación de antibióticos con diferentes propiedades. Espinosa *et al.* (2020) compararon la actividad microbiana en suelos franco-arenosos enmendados con astillas de madera en forma de capa por encima superficial y mezcladas (4% en peso). Observaron un aumento de la actividad microbiana responsable de los procesos de biodegradación en ambas configuraciones, sin embargo, no estudiaron los efectos sobre los CPEs.

El patrón y el método de riego en los FVs son medidas adicionales que, gestionadas adecuadamente, pueden favorecer los procesos de atenuación natural. Algunos autores han observado una mejora en la eficiencia en el tratamiento de contaminantes (nitrógeno, fósforo y materia orgánica) cuando las aguas residuales se riegan de forma intermitente (Li *et al.*, 2015), lo que demuestra que la dinámica de infiltración juega un papel importante en la atenuación. También se ha comprobado que el riego por goteo de suelos agrícolas reduce la lixiviación de patógenos (Chaidez *et al.*, 2014) y metales pesados (Cakmakci y Sahin, 2021) si se compara con el riego por inundación. Sin embargo, no se han encontrado estudios sobre cómo estos factores controlan el destino de los CPEs. De hecho, muchos autores han encontrado una mejor atenuación de CPEs cuando se alcanzan mayores tiempos de contacto suelo-agua (Zhang *et al.*, 2014; Banzhaf y Hebig, 2016; Ashworth e Ibekwe, 2020).

Aunque limitadas, las observaciones descritas hasta ahora en la bibliografía sugieren que, aunque las SBN, y más concretamente los FVs, representan tecnologías prometedoras para la eliminación de CPEs, surgen algunas preocupaciones sobre la lixiviación de compuestos más persistentes y móviles. El objetivo general es, por tanto, abordar esta preocupación proponiendo actuaciones sobre dos parámetros principales considerados cruciales para conseguir un rendimiento robusto del tratamiento en los FVs: el patrón y método de riego, y la "reactividad" del suelo. En este sentido, se investigan los efectos del manejo del agua de riego y la incorporación de la enmienda de astillas en la capacidad de atenuación de 39 CPEs seleccionados, que incluyen PTs. Es importante recordar que la selección de la enmienda al FV (astillas) no se realizó en base a los mejores resultados obtenidos a escala de laboratorio para la atenuación de CPEs, sino respecto a la menor lixiviación de nitratos observada (Martínez-Hernández *et al.*, 2020), ya que ésta representa un riesgo cuantitativamente mayor sobre las aguas subterráneas. El presente estudio también evalúa los impactos potenciales sobre los recursos hídricos subterráneos recordando que los compartimentos sobre y bajo tierra representan un conjunto indivisible. Cabe destacar la escasa información sobre la aplicación efectiva a largo plazo de estos sistemas. Este estudio hace frente a la limitación de datos en la actualidad, proporcionando una investigación que abarca casi cuatro años durante los cuales se han monitorizado múltiples matrices y compartimentos medioambientales. La **Figura V.1** esquematiza los objetivos planteados para este estudio.





Figura V.1. Resumen esquematizado de los objetivos propuestos en este capítulo

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Descripción de la operación en el filtro verde y la toma de muestras

La descripción de la zona en la que se instaló el FV (clima, tipo de suelo, etc.) se presenta en el capítulo II de esta memoria, junto al esquema del FV, los equipos empleados para su control y la toma de muestras de agua y suelo. También se describen las condiciones de operación de los tres periodos que se encuentran resumidos en la **Tabla V.1** junto a la frecuencia de muestreo para el agua de riego (AR), del agua infiltrada a través de la zona no saturada (AI) a las dos profundidades de estudio (15 cm, AI15, y 45 cm, AI45), de las aguas subterráneas (AS) y del suelo, que fue bimensual para las matrices de agua, y una vez al año para el suelo (abril de 2018 (P1), marzo de 2019 (P1), julio de 2020 (P2) y marzo de 2021 (P3)).

Tabla V.1. Resumen de los periodos de operación y las estrategias de muestreo de CPEs en las distintas matrices

		P1: 01/2018 - 03/2019	P2: 04/2019 - 06/2020	P3: 07/2020 - 10/2021
<b>Condiciones de operación en el FV</b>	<b>Enmienda</b>	Ninguna	Adición de astillas mezcladas con los 15 primeros cm de suelo	Adición de una capa superficial de astillas
	<b>Tipo riego</b>	inundación	inundación	goteo
	<b>Frecuencia de riego</b>	Semanal	Semanal	Diaria
<b>Monitorización muestras</b>	<b>AR, AI</b>	Bimensual	Bimensual	Bimensual*
	<b>AS**</b>	Bimensual	Bimensual	Bimensual
	<b>suelo</b>	Anual	Anual	Anual

\* muestra compuesta a partir de alícuotas de las muestras recogidas diariamente durante una semana

\*\* AS aguas arriba muestreo bimensual alternando Pz9 y Pz7 (cada uno de estos Pzs, por tanto, cuatrimestral)

Para mayor claridad, en la **Figura V.2** se muestra un resumen cronológico de las condiciones de operación en el FV y las muestras recogidas en el estudio.



**Figura V.2.** Resumen de la secuencia de cambios en el manejo del FV a lo largo de todo el periodo de estudio

Los CPEs estudiados para monitorizar en el FV se seleccionaron en base a los criterios establecidos en el capítulo III de esta memoria. Entre los 39 compuestos monitorizados, se incluyen 12 CPEs que los organismos oficiales han identificado como sustancias relevantes que pueden suponer un riesgo para el medio acuático y para las que se debe recopilar más información (listas de observación) o se han propuesto normas de calidad ambiental (NCA). En consecuencia, algunos de los CPEs señalados se han incluido en la última lista de observación publicada (Decisión de Ejecución (UE) 2022/1307) para la vigilancia de las aguas superficiales (SUL, VEN, OFLO y METFOR), y otros se han incluido en la reciente propuesta de la UE COM(2022) 540 final por la que se modifican las Directivas: i) 2000/60/CE (por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas), ii) 2006/118/CE (relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro) y iii) 2008/105/CE (sobre normas de calidad ambiental, NCA). Su frecuente presencia en el medioambiente, su elevado consumo, la clara sospecha de efectos sobre la biota y otros posibles impactos ambientales, como los expuestos en la Comunicación de la UE Enfoque de los productos farmacéuticos en el medio ambiente (COM(2019) 128 final) son la razón de su presencia en la reciente propuesta de la UE. Entre las sustancias objeto de este estudio, se propuso incluir ETINIL, E2, E1, ERI, CLA, DIC, CAR e IBU en la lista de sustancias prioritarias en las aguas superficiales y CAR y SUL para el seguimiento de las aguas subterráneas junto con las NCA recomendadas. La propuesta de la UE COM(2022) 540 final también exige que se aborde la contaminación del suelo y se publiquen datos de seguimiento, especialmente en el caso de los compuestos de los que existen pruebas de su tendencia a acumularse en la biota o los sedimentos (entre los que se encuentran CLA, DIC, ERI e IBU).

Las muestras de suelo y agua se analizaron según la metodología analítica por LC-MS/MS desarrollada en el capítulo III. Cabe destacar que el método empleado cumple con los MQL recomendados en la propuesta de la UE para el análisis (0,4-156000 ng/L) de los fármacos mencionados en aguas superficiales (METFOR, OFLO, ERI, CLA, SUL, VEN, E1 y E2). Sin embargo, para ETINIL (0,035 ng/L) en todas las matrices acuosas (AR, AI y AS) y para E1 y E2 en AR y AI, los niveles alcanzados de MQL están muy por encima de los incluidos en la propuesta de la UE. El seguimiento de estas hormonas esteroideas suele considerarse difícil porque los límites de detección de la mayoría de los métodos analíticos disponibles no logran alcanzar las concentraciones tan bajas establecidas en los criterios de calidad ambiental propuestos. El límite de detección y cuantificación del ETINIL es del orden de lo encontrado en la bibliografía (Barreiros *et al.*, 2016; Kase *et al.*, 2018).

## 2.2. Tratamiento de datos y estadística

El destino de los CPEs seleccionados en el FV se evaluó utilizando los resultados de concentración en las muestras de agua (AR, AI y AS) y el contenido en las muestras de suelo, siguiendo la trayectoria del flujo durante la infiltración. Las concentraciones de contaminantes presentes por debajo del MQL se aproximaron a  $MQL/2$ , mientras que las concentraciones por debajo del MDL se asumieron como 0. Los porcentajes de atenuación a 15 y 45 cm se calcularon en función de la masa de entrada-salida en cada evento de muestreo. Las masas de CPEs infiltrados a través del suelo se determinaron utilizando el volumen de infiltración estimado mediante el balance hídrico diario realizado en Barbero *et al.* (en preparación). Los porcentajes de atenuación se calcularon a 15 y 45 cm de profundidad respecto al agua de riego. Aquellos porcentajes negativos se consideraron como 0 para los cálculos basados en la atenuación.

Para tener una perspectiva global de la transferencia de CPEs entre los diferentes compartimentos ambientales también se realizaron balances de masa. Para ello, se tuvieron en cuenta la concentración de CPEs en el AR, el AI, el contenido medio en los primeros 15 cm del suelo de todas las campañas de muestreo, la densidad aparente del suelo medida ( $1576 \pm 90 \text{ kg/m}^3$ ) y el área del FV ( $48 \text{ m}^2$ ). No se tomaron muestras de raíces y hojas de los chopos en ningún momento del estudio. Sin embargo, se cree que el proceso de absorción por las plantas no es tan relevante como la atenuación natural que se produce durante la infiltración a través de la ZNS (Meffe *et al.*, 2021). Los balances de masas diarios se calcularon desde el primer muestreo de suelo (abril de 2018 - P1) hasta el último (marzo de 2021 - P3). Asimismo, dado que el muestreo de agua se realizó bimestralmente, los cálculos de masa de CPEs diarios en el AR y el AI se realizaron considerando los valores de concentración de la campaña de muestreo más próxima. También se calcularon los porcentajes de masa del AR de cada CPE presente en el AI (% infiltrado) y en el suelo (% acumulado en el suelo). A continuación, la masa (bio)degradada y/o no extraíble (% biodegradada) se estimó como  $100 - \% \text{ infiltrada} - \% \text{ acumulada en el suelo}$  (si procede). El balance de masa total estimado se calculó para cada matriz como la suma de los CPEs individuales.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software de código abierto R (R Development Core Team, 2008), para estudiar las diferencias significativas entre la concentración en las muestras de AR y de AI (a 15 y 45 cm), y entre los puntos de muestreo de aguas subterráneas  $AR_{\text{abajo}}$  (Pz11) y  $AS_{\text{arriba}}$  (Pz9 y Pz7). A continuación, se evaluaron las diferencias que pudieran existir en las concentraciones de CPEs y los porcentajes de atenuación de masa entre los periodos de operación (P1-P2-P3). La evaluación de las diferencias significativas (con un nivel de significación de  $\alpha < 0,05$ ) se realizó mediante pruebas paramétricas ANOVA seguidas de comparaciones *posthoc* por el método de Tukey (Tukey, 1949), cuando todos los conjuntos de datos cumplían los requisitos de normalidad y homocedasticidad, y mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de comparaciones *posthoc* utilizando el método de Hochberg (Hochberg, 1988), para los restantes conjuntos de datos. La normalidad de los datos se comprobó con las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, y la homocedasticidad con las pruebas de Levene y Fligner-Killeen. Además, para comprender el comportamiento general de los CPEs, también

se evaluó la relación entre la atenuación media y mediana y las propiedades fisicoquímicas de las sustancias con todos los datos sin y con diferenciación entre periodos de operación y considerando además por separado los CPEs con diferente estado de ionización. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (paramétricos) cuando los datos fueron normales y homocedásticos y los coeficientes de correlación de Spearman (no paramétricos) cuando los datos no cumplieron todos los requisitos de la prueba.

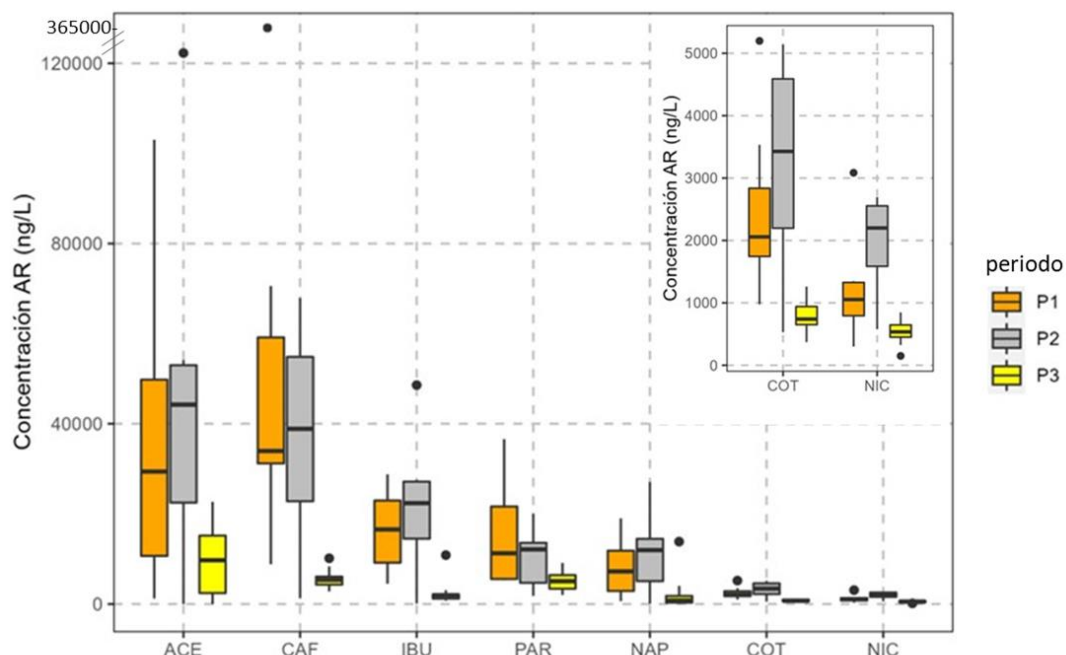
### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Agua de riego

Todos los CPEs se han detectado al menos una vez en el AR, excepto la hormona ETINIL (ver Anexo C). La mayoría de ellos, 31 de los 39, aparecen en más del 60% de las muestras, con nueve compuestos que muestran una concentración mediana superior a 100 ng/L (en orden descendente ACE>CAF>IBU>PAR>NAP>COT>NIC>ENA>METFOR). Al mismo tiempo, los PT del metamizol 4AAA y 4FAA, el antidepresivo CIT, la hormona E1 y el PT ATE AC muestran concentraciones medianas en el AR que se sitúan en el intervalo de 10-100 ng/L. El resto de sustancias se detectan a niveles inferiores a los 10 ng/L. Para los CPEs que muestran una frecuencia de detección inferior al 60% son los antibióticos AMO y SUL, el analgésico META, el diurético FURO y los PTs 4DAA, CAREPOX y N4ACE. Si se tiene en cuenta cada periodo de operación por separado, el número de CPEs detectados en todos los periodos con una concentración mediana superior a 100 ng/L se reduce a siete (ACE, CAF, IBU, PAR, NAP, COT, NIC), lo que indica que la aparición a niveles más altos de ENA y del antidiabético METFOR se limita esencialmente a P1 y P2 (ver los Anexos D, E y F).

Los niveles de concentración encontrados fueron similares en rango a los descritos en las aguas residuales tratadas por otro FV (Martínez-Hernández *et al.*, 2018), en diferentes lugares de aplicación de aguas residuales al suelo (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2014; McEachran *et al.*, 2016) y en otras SBN como humedales artificiales (Zhang *et al.*, 2014; Ilyas *et al.*, 2020; Bayati *et al.*, 2021), biofiltros (Devault *et al.*, 2021), tratamientos *in-situ* de aguas residuales (Clyde *et al.*, 2021) y lagunas de aireación (Blair *et al.*, 2015). Por otro lado, la concentración de la mayoría de los antibióticos (AMO, METFOR, SUL) y otros productos farmacéuticos (FLE, VEN, ATE y CAR) estudiados, en la bibliografía anteriormente mencionada, se ha descrito con niveles más altos (al menos un orden de magnitud) que en nuestro estudio. Los antibióticos son la clase farmacéutica que más se consume en todo el mundo (Patel *et al.*, 2019), sin embargo, en este estudio, se espera que su presencia en el agua de riego se encuentre sesgada, ya que es poco probable que las personas acudan a trabajar a la oficina cuando experimentan una infección. La presencia de los siete contaminantes mencionados anteriormente como más concentrados en el agua de riego en los tres periodos guarda relación con sus niveles de consumo, ya que son fármacos utilizados para enfermedades comunes (antiinflamatorios IBU y NAP, y analgésico ACE), y estimulantes generalizados (CAF y NIC) con sus respectivos PTs (PAR y COT) (Sistema Nacional de Salud, 2016). Sin embargo, las concentraciones en el AR experimentaron un descenso evidente

durante el último periodo operativo como se muestra en la **Figura V.3** para dichos siete CPEs con los niveles más altos (> 100 ng/L) y frecuencia de detección (> 60%) en los tres periodos.



**Figura V.3.** Boxplot con los rangos de concentración en el agua de riego (AR) para los siete CPEs con los niveles más altos (> 100 ng/L) y frecuencia de detección (> 60%) en los tres periodos de operación (P1-P2-P3).

Este cambio es atribuible al régimen de teletrabajo establecido como medida de contención sanitaria contra la pandemia del COVID-19. Por la misma razón, se produce un aumento importante del potencial redox *in-situ* y del oxígeno disuelto del AR después de marzo de 2020 (Redox AR  $-281 \pm 51$ ,  $-260 \pm 140$  y  $96 \pm 38$  mV para P1, P2 y P3, respectivamente; oxígeno disuelto AR  $1,16 \pm 0,7$ ,  $0,94 \pm 1,3$  y  $5,79 \pm 1,4$  mg/L para P1, P2 y P3, respectivamente), lo que puede influir en la atenuación de los CPEs en P3, como se detalla en el próximo apartado.

### 3.2. Atenuación de los contaminantes de preocupación emergente en el filtro verde

El rango de concentraciones (min-máx) en ng/L, la mediana (med) en ng/L, y la frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo de agua considerados se presentan en los Anexos C, D, E y F. Las concentraciones medianas de CPEs en el AI están en general por debajo de los rangos observados para el AR, lo que demuestra que el FV piloto es capaz de atenuar los contaminantes de las aguas residuales seleccionados. No es sorprendente que se observen concentraciones reducidas en el AI durante el P3 ya que estos datos se correlacionan con las menores concentraciones en el AR. Considerando sólo P1 y P2, los siete CPEs más concentrados y frecuentemente detectados en el AR, con la excepción de NIC y junto con METFOR, 4AAA y ATE AC muestran concentraciones medianas en el AI superiores a 100 ng/L a ambas profundidades. Para estos CPEs, las concentraciones medianas durante P3 a ambas profundidades están en el rango 1-84 ng/L, excepto NAP,

aunque sólo en la profundidad más baja (ver Anexos D, E y F). Para evaluar la calidad del agua infiltrada, las NCA sugeridas en la reciente propuesta de la UE (COM(2022) 540 final) pueden compararse con las concentraciones medidas a mayor profundidad de muestreo (45 cm). En este sentido, todas las muestras están por debajo de las NCA excepto: i) sólo una muestra de cinco y seis en P1 y P2 supera las NCA de DIC (40 ng/L), ii) más de la mitad de las muestras en P1 y P2 están por encima de lo establecido para E1 y E2 (pero menos de un orden de magnitud), y iii) casi todas las muestras de P1 y P2 están por encima de las NCA para IBU (mediana de 6218 y 7210 ng/L en P1 y P2, respectivamente, frente a 220 ng/L). En el caso de los CPEs no incluidos en la propuesta de la UE pero sí en la última lista europea de observación (2022/1307), se pueden utilizar los MQL máximos aceptables, ya que las futuras NCA, si las hubiera, nunca serán inferiores a estos valores. Este es el caso de METFOR, OFLO y VEN, cuyas concentraciones en las muestras nunca superan sus MQL propuestos (156000, 26 y 6 ng/L, respectivamente) durante todo el periodo de estudio.

La concentración de la mayoría de los CPEs se reduce durante la infiltración. De hecho, los procesos de atenuación afectan progresivamente a un mayor número de CPEs, y con significancia estadística, a medida que se aplican las medidas de gestión en el FV (8 en P1, 14 en P2 y hasta 20 en P3). Pocos CPEs aumentan su concentración durante la infiltración (con significación estadística); sin embargo, sus valores son bastante bajos (< 31 ng/L) y este comportamiento se limita a un determinado periodo operativo. Este es el caso de CAR y FLE en P1 y CLA y VEN en P3 a (pero sólo a 15 cm de profundidad). Blair *et al.* (2015) explicaron los picos de concentración de CPEs que se producen ocasionalmente en el efluente de un tratamiento aeróbico de aguas residuales por dos posibles razones: i) los CPEs quedan encerrados en la materia orgánica y se liberan cuando estas sustancias son descompuestas por los microorganismos; y/o ii) los PTs no específicos de los CPEs estudiados se transforman de nuevo en el compuesto de partida debido a reacciones producidas por la actividad microbiana. Los autores postulan que la combinación de estos procesos puede dar lugar a porcentajes de atenuación limitados, y que su magnitud es específica de cada compuesto. A pesar de su baja concentración en las muestras de AR, FLE, VEN y CLA se detectan en el suelo (ver **Tabla V.2**). Todos los compuestos están cargados positivamente a pH 8 y tienen una hidrofobicidad entre moderada y alta ( $\text{LogK}_{ow}$  1,8-2,8) tendiendo a ser atraídos por las superficies del suelo predominantemente negativas, como la materia orgánica y las arcillas, y potencialmente sorbidos por procesos de intercambio catiónico (Kodešová *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2019; Meffe *et al.*, 2021). Sin embargo, su presencia en muestras de suelo no significa que estén bien atenuados, ya que pueden producirse procesos de sorción reversibles condicionados por las concentraciones en el AR, lo que explicaría su atenuación fluctuante (Banzhaf y Hebig, 2016; Huidobro-López *et al.*, 2022). En la literatura aún falta información sobre algunas clases farmacéuticas, en particular para varios fármacos antiarrítmicos como el FLE (Castro *et al.*, 2018). Sólo Meffe *et al.* (2021) determinaron FLE y VEN en muestras de suelo a una concentración mayor en comparación con otros CPEs. Otros autores describieron la persistencia de FLE y VEN a tratamientos biológicos de aguas residuales (Xing *et al.*, 2018; Montagna *et al.*, 2020) lo que se atribuye a su alta hidrofobicidad y a su solubilidad moderada. Aunque la CLA puede biodegradarse en sistemas suelo-agua (Ilyas *et al.*, 2020), su afinidad para ser retenida en el suelo también fue confirmada por otros autores (Kodešová *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2020). La persistencia de la CAR ha sido

ampliamente documentada (Bertelkamp *et al.*, 2014; Banzhaf y Hebig, 2016; Martínez-Hernández *et al.*, 2018, Meffe *et al.*, 2021) y se atribuye principalmente a su escasa biodegradabilidad. Esta persistencia es en parte la razón de la inclusión de este contaminante en la propuesta de la UE COM(2022) 540 final para NC en aguas subterráneas.

No se observan diferencias significativas en términos de concentración de CPEs entre las dos profundidades de estudio (Al<sub>15</sub> e Al<sub>45</sub>) en ninguno de los tres periodos de operación. La mayor parte de los procesos de biodegradación tienen lugar en la capa más superficial de la zona no saturada, donde predominan el oxígeno y las bacterias activas (Martínez-Hernández *et al.*, 2018). Por lo tanto, es probable que la acción combinada de los procesos mediados biológicamente junto con la sorción abiótica provoque un descenso consistente de las concentraciones de CPEs del agua a través de los primeros 15 cm del suelo. Este hecho puede constituir la prueba de que los procesos de biodegradación son predominantes en la atenuación de los CPEs. De hecho, como se describirá más adelante, los cálculos de balance de masas considerando los contenidos de CPEs en el suelo revelan la predominancia de los procesos microbiológico (biodegradación).

El contenido de CPEs en las muestras de suelo se presenta en la **Tabla V.2**. La mayoría de los CPEs en (15 de 27) no se detectan nunca el suelo o se encuentran con un nivel inferior a sus MQL (de 0,04 a 1,1 ng/g, excepto COD (12 ng/g)). Otros CPEs se cuantifican en el suelo con contenidos que varían de 0,14 a 11,3 ng/g. Se observa que el producto de transformación ATE AC y el estimulante CAF son los compuestos que más se absorben en el suelo del FV.

**Tabla V.2.** Contenido de los CPEs (ng/g  $\pm$  desviación estándar (n=3)) en las muestras de suelo recogidas en cada campaña anual a lo largo de todo el periodo de operación.

Compuesto	Abr. 2018 (P1)	Mar. 2019 (P1)	Jul. 2020 (P2)	Mar. 2021 (P3)
4AAA	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
4FAA	N.D.	<0.16	N.D.	N.D.
ACE	1.45 $\pm$ 0.16	2.15 $\pm$ 0.35	0.93 $\pm$ 0.15	2.55 $\pm$ 0.61
ATE	N.D.	N.D.	<0.12	<0.04
ATE AC	9.6 $\pm$ 1.4	11.3 $\pm$ 2.0	4.7 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.2
CAF	10.9 $\pm$ 0.4	8.5 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.6
CAR	0.14 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	<0.04	<0.4
CAREPOX	N.D.	N.D.	0.12 $\pm$ 0.01	N.D.
CLA	0.27*	0.94 $\pm$ 0.84	5.5 $\pm$ 1.2	1.63 $\pm$ 0.03
COD	N.D.	N.D.	<0.15	N.D.
DIC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E1	N.D.	<0.12	<0.20	N.D.
E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ENA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ESTRIOL	N.D.	N.D.	<0.20	N.D.
ETINIL	N.D.	N.D.	<0.20	N.D.
FLE	6.96**	5.49*	5.21 $\pm$ 0.24	4.95 $\pm$ 0.08
FURO	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IBU	NA	5.15 $\pm$ 0.31	<0.93	N.D.
KET	N.D.	N.D.	<0.20	N.D.
LORZ	<0.2	N.D.	<0.08	<0.08
N4ACE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
NAP	<1.20	N.D.	N.D.	0.91 $\pm$ 0.13
PAR	2.2 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1
SUL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TES	N.D.	N.D.	<0.80	<0.40
VEN	N.D.	N.D.	5.7 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.4

\*n= 2; \*\*n= 1

N.D.=No detectado

NA=No analizado

Se observa una clara relación entre las concentraciones de CPEs en el agua y su contenido en el suelo. Esto es especialmente cierto en el caso de los siete compuestos con el rango de concentración más elevado en el AR. Entre ellos, ACE, CAF y PAR se cuantifican en todas las muestras con contenidos que oscilan entre 0,6 y 11 ng/g (Tabla V.2). La presencia de estos compuestos tanto en los compartimentos de agua como en el de suelo podría indicar que una tasa de liberación elevada implica una presencia más frecuente en las muestras ambientales. Sin embargo, NAP e IBU no se ajustan a tal interpretación, ya que estos analgésicos rara vez se encuentran en el suelo (McEachran *et al.*, 2017; Shu *et al.*, 2021). COT y NIC, no pudieron ser analizados en suelos con el método analítico empleado (capítulo III) por lo que no se pueden extraer conclusiones al respecto. Al mismo tiempo, ATE AC se detecta en muestras de suelo en un rango de contenido similar al de CAF, aunque este PT y sus compuestos de partida se encuentran en menor concentración que CAF en el agua de riego. Esto sugiere que no sólo las cargas máxicas sino también otros factores como la biodegradabilidad o la afinidad de sorción controlan el destino de algunos productos farmacéuticos. A pesar de la evidente sorción de ATE AC en el suelo, su atenuación durante la infiltración es prácticamente nula a lo largo de P1 y P2. Este comportamiento se explica probablemente por la rápida degradación de ATE en ATE AC, que tiene una estabilidad mayor que el compuesto original (Kodešová *et al.*, 2015; Meffe *et al.*, 2021). Además, ATE AC es un PT que también resulta de la hidrólisis de metoprolol (Helbling *et al.*, 2010; Aus der Beek *et*



al., 2016), un compuesto no investigado en este estudio. Por lo tanto, el mayor contenido de ATE AC en el suelo y su baja atenuación no puede explicarse sólo por la presencia de ATE en el agua. De todos modos, al observar los datos temporales, la atenuación de ATE AC se consigue en P3 sin aumentar su contenido en suelo, lo que podría indicar un aumento de su biodegradación durante este periodo.

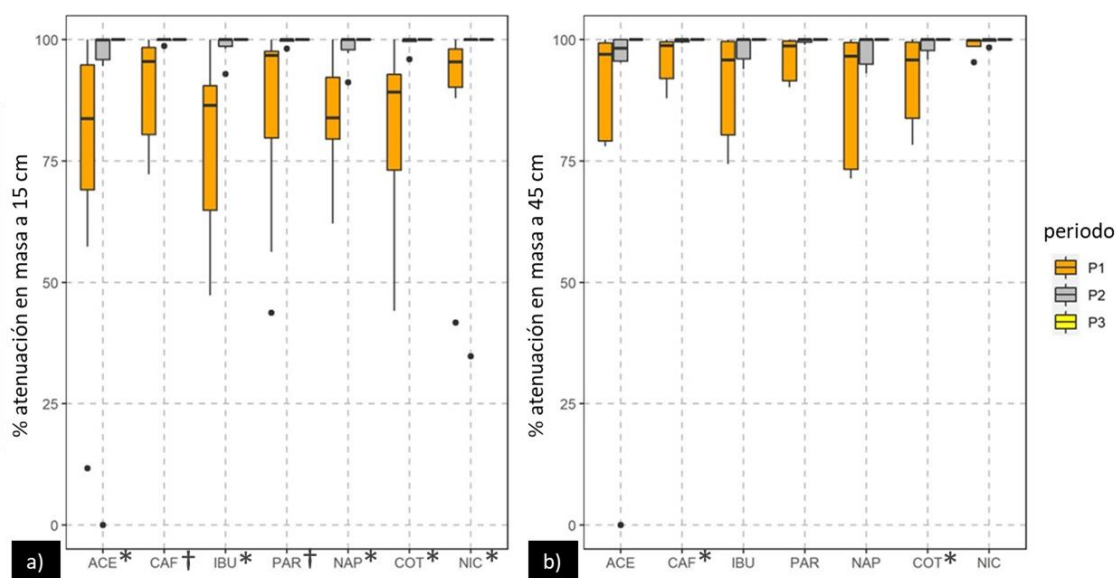
En cuanto a la evolución del contenido del suelo a lo largo del tiempo, los datos no muestran una tendencia clara. Los resultados del balance de masas, presentados en la **Tabla V.3**, sugieren que los procesos de sorción están subordinados a los procesos de (bio)degradación. También hay que aclarar que, en este caso, el término (bio)degradación puede incluir no sólo la (bio)degradación *stricto sensu*, sino también una parte que no pudo extraerse del suelo con el método de análisis empleado y una parte que puede haberse quedado unida a los tejidos vegetales (absorción por las plantas). Las mediciones realizadas en este estudio no pueden diferenciar entre estos procesos, sin embargo, los datos bibliográficos, los experimentos previos y las experiencias en la atenuación de productos farmacéuticos nos llevan a considerar que la absorción por las plantas es menos relevante en la pérdida de masa de CPEs observada.

**Tabla V.3.** Balance de masa referido a 1 m<sup>2</sup> del FV. Para la masa de CPEs en el suelo, se asumió un contenido medio uniforme para cada uno de ellos en la primera capa de 15 cm.

Parámetro	P1 [Abr. 2018-Mar. 2019]	P2 [Abr. 2019-Jun. 2020]	P3 [Jul. 2020-Mar. 2021]
Σ CPEs el agua de riego (mg/m <sup>2</sup> )	804.97	568.90	89.38
Σ CPEs en el agua de infiltración (mg/m <sup>2</sup> )	152.48	17.13	0.01
Σ CPEs en el suelo (mg/m <sup>2</sup> ) – inicial	7.63	8.62	7.39
Σ CPEs en el suelo (mg/m <sup>2</sup> ) – final	8.62	7.39	5.32
% (bio)degradado	80.93	96.99	99.99
% infiltrado	18.94	3.01	0.01
% acumulado en el suelo	0.12	-0.22	-2.33

Los procesos globales de sorción no parecen ser decisivos, ya que sólo el 0,12% de la masa del agua de riego se queda retenida en el suelo. Durante el P2 y el P3, el balance negativo de los contenidos en el suelo indica la desorción y/o (bio)degradación de los CPEs previamente sorbidos. El impacto de estos procesos en la eficiencia del tratamiento VF es insignificante. Esto es especialmente cierto cuando en el P3 la masa en el agua de infiltración es inferior a la disminución de la masa acumulada en el suelo. Además, este hecho se vio influido por los bajos volúmenes de infiltración de agua y las concentraciones de CPEs en el AR, como también refleja la masa total de CPE en el agua de infiltración en este periodo. La biodegradación también fue considerada como el principal proceso que controla las concentraciones de los CPEs seleccionados cuando se simuló la infiltración a través de suelo del FV a escala de laboratorio mediante experimentos en columnas (capítulo IV). Aunque la presencia de un equilibrio dinámico entre sorción-desorción, (bio)degradación y lixiviación podría ocultar los cambios en los contenidos del suelo (Meffe et al., 2021), lo más probable es que los CPEs presentes en el suelo sean degradados microbiológicamente.

Se puede alcanzar una mayor confianza en el porcentaje de atenuación cuando este valor se calcula utilizando datos de aquellos CPEs cuya frecuencia de detección y concentración en el agua de riego son elevadas (Clyde *et al.*, 2021). Por lo tanto, la discusión sobre la atenuación másica se centrará en los siete CPEs más recurrentes y concentrados en las muestras de AR (concentración mediana >100 ng/L y frecuencia de detección > 60% en los tres periodos de operación). Además, estos contaminantes son responsables de una mayor contribución al balance de masas. En la **Figura V.4** se muestran los rangos de porcentajes de atenuación de masa y la mediana en cada periodo de operación. La atenuación mediana de todos los CPEs ha aumentado progresivamente a lo largo de la secuencia de periodos, a ambas profundidades de muestreo, mientras que la atenuación calculada para cada evento de infiltración muestra una variabilidad menor. Estos resultados indican que las medidas de gestión aplicadas mejoran y consolidan el rendimiento del FV. El porcentaje de atenuación de los PTs estudiados (PAR y COT), considerado un valor mínimo ya que no tiene en cuenta la transformación del compuesto de partida en su PT, muestra una tendencia creciente con el transcurso de los tres periodos que también es destacable.



**Figura V.4.** Porcentajes de atenuación en masa para los siete CPEs, más concentrados y frecuentemente detectados en el agua de riego, a una profundidad de: a) 15 cm (Al15) y b) 45 cm (Al45). Tamaño de las muestras en a)  $n=10$  (P1),  $n=6$  (P2),  $n=10$  (P3) y en b)  $n=5$  (P1),  $n=6$  (P2),  $n=7$  (P3). Diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha < 0.05$ ): \* = en P3 vs P1; † = en ambas comparaciones P2 y P3 vs P1.

Durante el P1, cuando el suelo FV no está enmendado y el agua se aplica inundando los surcos de riego, CAF, PAR y NIC muestran una atenuación media superior (> 95%) si se compara con la obtenida para COT, IBU, NAP y ACE (84-90%), a 45 cm. Se ha descrito que CAF y PAR son más propensos que NAP e IBU a atenuarse en suelos (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011; Martínez-Hernández *et al.*, 2016; Meffe *et al.*, 2021) y en lagunas de aireación (Blair *et al.*, 2015). La NIC es el CPE más soluble entre los siete estudiados, y por lo tanto se encuentra más disponible para su biodegradación directa en la fase acuosa (Tiwari *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2019; Guzik *et al.*, 2019), pudiendo verse menos afectado por las interacciones con el suelo.

Las enmiendas de astillas aumentan la atenuación de los siete CPEs (**Figura V.4**). Como ya se ha descrito, las astillas de madera proporcionan carbono orgánico extra que promueve

la actividad microbiana (Meffe *et al.*, 2016; Martínez-Hernández *et al.*, 2020; Espinosa *et al.*, 2020). Al mismo tiempo, la madera contiene celulosa, lignina, curtientes u otros compuestos fenólicos que son compuestos activos de intercambio iónico (Shukla *et al.*, 2002) y, por tanto, las enmiendas al suelo con este material pueden contribuir a potenciar también la sorción de contaminantes. Como también han reportado otros autores (Gorski *et al.*, 2020; Espinosa *et al.*, 2020), las astillas de madera favorecen el desarrollo de colonias de biota (*biofilm*), un efecto positivo adicional para la eliminación de contaminantes. También se observó una mejora de la atenuación de estos siete CPEs durante la recarga de acuíferos enmendando el suelo con compost y astillas de madera (Valhondo *et al.*, 2020). Las enmiendas de astillas (al 20% en peso) también redujeron la lixiviación de IBU, NAP y CAF de biosólidos aplicados al suelo (Liu *et al.*, 2022). También se reportan grandes reducciones en las concentraciones de CPEs (incluyendo COT, ACE, PAR y CAF) cuando las astillas de madera se añaden como una capa sobre la superficie del suelo en el tratamiento *in-situ* de aguas residuales (Clyde *et al.*, 2021). Aunque no se dispone de estudios piloto en campo que investiguen los efectos de las diferentes configuraciones de las enmiendas sobre la eliminación de CPEs, los datos obtenidos en la presente investigación sugieren que, tanto si las astillas se añaden como capa superior como si se incorporan al suelo, se consigue el efecto de mejora de la actividad microbiana. Al mezclar las astillas con el suelo, ya sea mediante laboreo manual o mecánico, aumenta la macroporosidad y se favorece la aireación del suelo, como confirma el contenido volumétrico de agua medido en el agua de infiltración a 15 y 45 cm (Barbero *et al.*, en preparación). En general, muchos autores describen las condiciones aerobias como altamente eficaces para biodegradar la mayoría de los CPEs, incluidos los siete compuestos aquí discutidos (Xu *et al.*, 2009; Karnjanapiboonng *et al.*, 2011; Teerlink *et al.*, 2012; Bertelkamp *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2014; Blair *et al.*, 2015; Ilyas *et al.*, 2020; Clyde *et al.*, 2021). Sin embargo, el aumento de la macroporosidad va acompañado también de un incremento de la conductividad hidráulica que puede afectar negativamente a la atenuación reduciendo los tiempos de residencia durante la infiltración, como también se observó en un ensayo realizado a escala de laboratorio (capítulo IV). A pesar de ello, durante el escalado de este experimento piloto, no se observa la disminución de la atenuación como consecuencia de remover el suelo de los 15 primeros cm para mezclarlo con las astillas, ya que el suelo que se encuentra por debajo no está alterado y por tanto, la tasa de infiltración no varió. Teniendo en cuenta que las enmiendas que implican la mezcla suelo con astillas requieren una reposición más frecuente por su mayor degradación (Espinosa *et al.*, 2020), es preferible la aplicación de las astillas en forma de capa superficial.

En el P3, el cambio del patrón y el riego por goteo implican una disminución de las cargas hidráulicas que ha de compensarse con riegos más frecuentes para mantener el volumen semanal de agua residual tratada. Por lo tanto, durante este periodo se aplican al suelo ciclos de mojado-secado más recurrentes y cortos. Este cambio en la estrategia de operación conlleva una serie de múltiples beneficios que, junto con la disminución de la carga contaminante y el aumento del potencial redox y del oxígeno disuelto en el AR, derivado de la ausencia de trabajadores por la pandemia de COVID-19 durante este periodo, determinan un aumento de los porcentajes de atenuación. Las cargas hidráulicas más bajas son responsables de tiempos de residencia más largos que ayudan a la atenuación de los CPEs estudiados (Teerlink *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Banzhaf and Hebig, 2016; Ashworth and

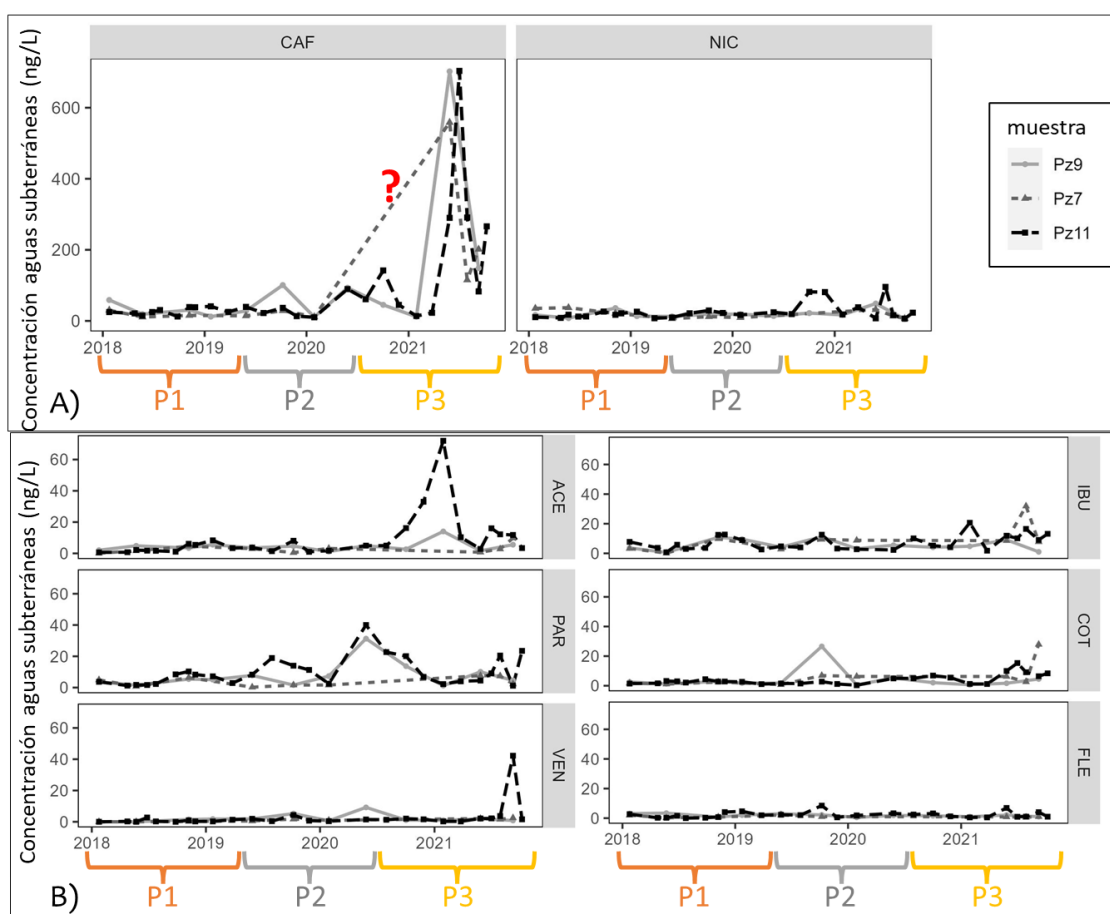
Ibekwe, 2020). Los resultados obtenidos fueron similares en un FV piloto descrito por Martínez-Hernández *et al.* (2018) y estuvieron en parte relacionados con cargas de riego reducidas (cinco veces inferiores a las aplicadas en este estudio). Falta información sobre el efecto del riego superficial por inundación frente al riego por goteo en la atenuación de CPEs. Sin embargo, sí existen estudios que demuestran que el riego por goteo impide que los patógenos (Chaidez *et al.*, 2014) y los metales pesados (Cakmakci y Sahin, 2021) se infiltren a través de los suelos agrícolas. Los riegos frecuentes mantienen una humedad mayor y más prolongada en la capa más superficial del suelo, en comparación con periodos anteriores (Barbero *et al.*, en preparación). Esto probablemente potencia las actividades microbianas (y coenzimas) y, por tanto, la biodegradación (Espinosa *et al.*, 2020).

Por último, en un intento de buscar los parámetros intrínsecos que más influyen en el comportamiento de los CPEs, se realiza un análisis de correlación de Spearman entre la atenuación media y mediana de los compuestos y algunos de sus parámetros fisicoquímicos (estado de ionización,  $K_{ow}$ , solubilidad y volumen de VdW), considerando todo el periodo de estudio y los periodos de operación por separado. Independientemente del estado de ionización, no pudimos observar ninguna correlación fuerte significativa entre la atenuación de los CPEs y las propiedades fisicoquímicas de las moléculas. La ausencia de una correlación directa no implica que estas propiedades no tengan un papel en la atenuación de los CPEs seleccionadas. Sin embargo, podría implicar que hay un mayor efecto de las condiciones de funcionamiento del FV que de las propiedades en sí, una condición que podría considerarse una característica ventajosa de los sistemas de FV. Como describen Bayati *et al.* (2021), las relaciones de un único parámetro carecen de precisión y este método tiene algunas limitaciones cuando se aplica a diferentes clases de contaminantes, probablemente debido a que intervienen varios factores al mismo tiempo.

### 3.3. Aguas subterráneas

Las concentraciones de los CPEs seleccionados, en todas las muestras de agua subterránea (AS), son significativamente inferiores a las medidas en el AI a 15 y 45 cm de profundidad durante todo el periodo de estudio (ver Anexos D, E y F). Durante la infiltración hacia niveles más profundos, los contaminantes experimentan un tratamiento adicional hasta alcanzar las aguas subterráneas, por dispersión mecánica y difusión molecular, que se encargan de suavizar los picos de concentración (Banzhaf y Hebig, 2016). Aunque los 39 CPEs estudiados se detectan en aguas subterráneas al menos una vez (con la excepción de FURO) (ver Anexo C), únicamente 21 muestran una frecuencia de detección > 60% y 15 de ellos aparecen con concentraciones cuantificables (> MQL). Sólo ocho contaminantes (ACE, CAF, COT, IBU, NIC, PAR, FLE y VEN) se encuentran con una concentración mediana > 1 ng/L en todas las muestras de AS, coincidiendo seis de ellos con los siete CPEs más recurrentes y concentrados en el AR (sólo NAP no se incluye). Su evolución temporal se muestra en la **Figura V.5** donde la CAF y la NIC son los únicos cuya concentración mediana supera los 10 ng/L en todas las muestras de AS. Tal incidencia es consecuencia de su consumo generalizado y es coherente con los hallazgos en muestras de aguas subterráneas de todo el mundo (Lapworth *et al.*, 2012; Sui *et al.*, 2015; McEachran *et al.*, 2016; Gaston *et al.*, 2019). De hecho, CAF se considera un marcador de contaminación para aguas subterráneas poco profundas

(McCance *et al.*, 2018; Brito Rupias *et al.*, 2021). La FLE y el VEN, que muestran un cierto nivel de persistencia en este FV y en otros sistemas de tratamiento de aguas residuales (Xing *et al.*, 2018; Ilyas *et al.*, 2020), se observan también en el acuífero subyacente apoyando la observación sobre su comportamiento recalcitrante en comparación con otros CPEs (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011; Montagna *et al.*, 2020). La **Figura V.5** muestra valores de concentración en Pz11 (AS<sub>abajo</sub>) para VEN (una muestra) y para ACE (dos muestras) que diverge de los valores generalmente detectados AS<sub>arriba</sub> del FV. Sin embargo, analizando los datos temporales no se encuentra ninguna explicación en la operación con el FV, ya que se producen al final de P3 después de más de un año con concentraciones muy bajas en el AR y volúmenes de infiltración también. Dado que el sondeo piezométrico se encuentra a 10 m de profundidad, es posible que este aumento inesperado de los valores de VEN y ACE se deba a una fuente externa que llega al punto de muestreo por difusión lateral.



**Figura V.5.** Evolución temporal de la concentración de los productos farmacéuticos con concentración media > 1 ng/L en todos los puntos de muestreo de AS (incluye seis de los CPEs más recurrentes y concentrados en las muestras de agua de riego). Nótese que se aplica una escala y diferente para CAF y NIC (A) que para los otros seis CPEs (B).

Los datos obtenidos de los piezómetros revelan que las aguas subterráneas aguas arriba (Pz9 y Pz7) y aguas abajo (Pz11) del FV no son estadísticamente diferentes en términos de concentraciones de CPEs durante todo el periodo de estudio. Es evidente que la calidad de las aguas subterráneas está condicionada por la zona circundante más que por el funcionamiento del FV. De hecho, el FV está situado a menos de 2 km del río Henares, en la zona de descarga del acuífero Detrítico Terciario de Madrid, cuyas aguas subterráneas se

mezclan con las del acuífero aluvial suprayacente (IGME, 1981). Por este motivo, no es de extrañar que la calidad del agua subterránea en los piezómetros monitorizados sea prácticamente idéntica.

En un intento de evaluar el estado de calidad de las aguas subterráneas, pueden utilizarse las NCA incluidas en la propuesta de la UE COM(2022) 540 final para estos compartimentos ambientales. Así, los datos obtenidos en este trabajo para CAR y SUL nunca superan sus NCA propuestas (250 y 10 ng/L, respectivamente). También se propone una NCA para la suma de todos los productos farmacéuticos individuales detectados y cuantificados, incluidos los PTs pertinentes (250 ng/L) que se supera ligeramente en unas pocas ocasiones (1 y 3 muestras de un total de 47 muestras, incluidas AS<sub>arriba</sub> y AS<sub>abajo</sub>). Por último, de acuerdo con la sugerencia de la nueva propuesta de la UE COM(2022) 540 final, de que no se encuentra estacionalidad para ninguno de los 39 CPEs estudiados durante todo el periodo de funcionamiento del FV ni en la atenuación en el FV ni en las concentraciones de CPEs encontradas en las aguas subterráneas analizadas. En la **Tabla V.4** se presenta un resumen de los resultados de concentración de los CPEs encontrados en las muestras de AS (considerando todos los piezómetros AS<sub>arriba</sub> y AS<sub>abajo</sub>), y de Al<sub>45</sub>, descritas en el apartado 3.2., respecto a las NCA consideradas a partir de la propuesta de directivas y listas de observación mencionadas.

**Tabla V.4.** Resumen de las normas de calidad ambiental (NCA) consideradas, en aguas de infiltración a 45 cm de profundidad (AI45) y en aguas subterráneas (AS), recogidas en la propuesta de Sustancias Prioritarias (SP) recientemente publicada y en la última lista de observación (LO) en la que se incluyen los CPEs seleccionados en este estudio.

CPE	MQL LO <sup>1</sup> (ng/L)	NCA considerada en propuesta SP <sup>2</sup> (ng/L)	MQL método (capítulo III)	NCA en AI45	NCA en AS <sup>3</sup>
ERI *	19	500	Todos < propuesto	Todas las muestras < NCA	-
DIC*	10	40	Todos < propuesto	Sólo 1 muestra e 5 y 6 en P1 y P2 > NCA	-
CLA*	19	130	Todos < propuesto	Todas las muestras < NCA	-
E1	0.4	0.36	MQL AS < propuesto pero AR y AI > propuesto	Más de la mitad de las muestras en P1 y P2 > NCA (pero menos de 1 orden de magnitud)	-
E2	0.4	0.18	MQL AS < propuesto pero AR y AI > propuesto	Más de la mitad de las muestras en P1 y P2 > NCA (pero menos de 1 orden de magnitud)	-
ETINIL	0.035	0.017	Todos MQL 1 orden de magnitud > propuesto	Todas las muestras < NCA	-
IBU*	-	220	Todos < propuesto	Casi todas las muestras de P1 y P2 > NCA (mediana 1.5 veces > NCA en P1 y P2)	-
CAR	-	2500 y 250 (AS)	Todos < propuesto	Todas las muestras < NCA	Todas las muestras < NCA
SUL	100	10 (AS) y NCA=MQL para el resto	Todos < propuesto	Todas las muestras < NCA	Todas las muestras < NCA
METFOR	156000	NCA =MQL de LO	Todos < propuesto	Todas las muestras < NCA	-
OFLO	26	NCA =MQL de LO	Todos < propuesto	Todas las muestras < NCA	-
VEN	6	NCA =MQL de LO	Todos < propuesto	Todas las muestras < NCA	-

<sup>1</sup>Lista de observación (LO) 2022 = Decisión EU 2022/1307 incluye valores para los valores de MQL máximos aceptables para SUL, METFOR, OFLO y VEN. El resto de los CPEs están incluidos en las listas de observación anteriores 2015/495, 2018/840 y 2020/1121.

<sup>2</sup>Propuesta de Sustancias Prioritarias (SP) = propuesta de la UE COM(2022) 540 final por la que se modifican las Directivas: i) 2000/60/CE, ii) 2006/118/CE y iii) 2008/105/CE. En AI45, la concentración de las NCA consideradas se corresponde con la media anual incluida en la propuesta de SP para su monitorización en aguas superficiales.

<sup>3</sup>Las NCA específicamente propuestos para CAR y SUL in AS están incluidas también en la propuesta de SP, junto a valores de NCA para la suma de todos los fármacos detectados y cuantificados en la monitorización incluyendo los PTs relevantes (no mostrado en la tabla).

\* Incluido en la propuesta de SP para reportar en muestras de sedimento: DIC no se detectó en ninguna muestra y el contenido de CLA e IBU está en el rango entre N.D.-5,5 ng/g en todas las muestras de suelo.

## 4. Conclusiones

Este estudio demuestra que las estrategias *ad-hoc* que implican enmiendas del suelo y la modificación del patrón de riego pueden dar lugar a una mejora del rendimiento de tratamiento en un FV incluso cuando se considera un conjunto de 39 CPEs con propiedades fisicoquímicas muy dispares. Analizar las diferentes matrices involucradas es crucial para interpretar los resultados y evaluar la atenuación de los CPEs en los FVs. La biodegradación es el principal proceso responsable de la disminución de las concentraciones de los CPEs durante la infiltración y se produce esencialmente a través de los 15 cm superiores del suelo durante todo el periodo de estudio. Las distintas estrategias de operación investigadas en el FV aumentan la biodegradación de los CPEs estudiados. La enmienda de astillas de madera, como potenciadora de la actividad microbiana, mejora eficazmente el rendimiento del FV independientemente de su forma de aplicación (como capa superficial o mezclada con el

suelo). Además, al remover el suelo para incorporar las astillas se promueve la aireación, lo que favorece aún más la atenuación de los CPEs. Unas bajas cargas hidráulicas acompañadas de una mayor frecuencia de riego para mantener los volúmenes de tratamiento, favorecen la atenuación de los CPEs seleccionados, ya que reducen los volúmenes de infiltración y aumentan los tiempos de residencia. Los contenidos limitados de CPEs en el suelo y los resultados de los balances de masa indican que la sorción no tiene un papel fundamental en la atenuación de estos contaminantes. Aunque se encuentran diferencias en la atenuación entre las CPEs, no se observa correlación con sus propiedades fisicoquímicas. Esto sugiere un mayor efecto de las condiciones de operación, lo que puede considerarse una característica ventajosa de los FVs.

El acuífero subyacente no se ve afectado negativamente por la operación en el FV, ya que las concentraciones en el agua subterránea aguas abajo del mismo no difieren significativamente de las detectadas aguas arriba. Esto también es válido para los compuestos que se comportan de forma persistente. De hecho, FLE y VEN, aunque en concentraciones muy bajas, aparecen en todas las matrices y en prácticamente todas las muestras, lo que refleja su comportamiento recalcitrante.

## 5. Referencias

- AEMET, Información elaborada por la Agencia Estatal de Meteorología. 2021: [Http://www.aemet.es/es/datos\\_abiertos/AEMET\\_OpenData](http://www.aemet.es/es/datos_abiertos/AEMET_OpenData)
- Ahmed, S.F., Mofijur, M., Nuzhat, S., Tasnim Chowdhury, A., Rafa, N., Alhaz Uddin, Md., Inayat, A., Mahlia, T.M.I., Ong, C.H., Chia, W.Y., Loke Show, P., 2021. Recent developments in physical, biological, chemical, and hybrid treatment techniques for removing emerging contaminants from wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 416, 125912. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125912>
- Ashworth, D.J. and Ibekwe, A.M., 2020. System of multi-layered environmental media for the removal of antibiotics from wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104206. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104206>
- Aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2016. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.*, 35 (4), 823-835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Banzhaf, S. and Hebig, K.H., 2016. Use of column experiments to investigate the fate of organic micropollutants – a review. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.*, 20(9), 3719–3737. <https://doi.org/10.5194/hess-2016-196>
- Barbero, L., Martínez-Hernández, V., Huidobro-López, B., Meffe, R., De Bustamante, I., en preparación. Soil amendments and water management to improve attenuation of wastewater originated nutrients through a vegetation filter.
- Barreiros, L., Queiroz, J.F., Magalhães, L.M., Silva, A.M.T., Segundo, M.A., 2016. Analysis of 17- $\beta$ -estradiol and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review. *Microchemical Journal*, 126, 243-262. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.12.003>



- Bayati, M., Ho, T.L., Vu, D.H., Wang, F., Rogers, E., Cuvelier, C., Huebotter, S., Inniss, E.C., Udawatta, R., Jose, S., Lin, C.H., 2021. Assessing the efficiency of constructed wetlands in removing PPCPs from treated wastewater and mitigating the ecotoxicological impacts. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 231, 113664. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113664>
- Bertelkamp, C., Reungoat, J., Cornelissen, E. R., Singhal, N., Reynisson, J., Cabo, A. J., van der Hoek, J. P., y Verliefde, A. R. D., 2014. Sorption and biodegradation of organic micropollutants during riverbank filtration: A laboratory column study. *Water Res.* 52, 231-241. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.068>
- Blair, B., Nikolaus, A., Hedman, C., Klaper, R., Grundl, T., 2015. Evaluation the degradation, sorption, and negative mass balances of pharmaceuticals and personal care products during wastewater treatment. *Chemosphere*, 134, 395-401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.078>
- Brito Rupias, O.J., Yoshinaga Pereira, S., Silva de Abreu, A.E., et al., 2021. Caffeine as a Pollution Marker for Shallow Groundwaters in a Peri-Urban Area of Campinas/São Paulo – Brazil. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-572813/v1>
- Cakmakci, T. and Sahin, U., 2021. Productivity and heavy metal pollution management in a silage maize field with reduced recycled wastewater applications with different irrigation methods. *Journal of Environmental Management*, 291, 112602. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112602>
- Castro, G., Carpinteiro, I., Rodríguez, I., Cela, R., 2018. Determination of cardiovascular drugs in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 410, 6807–6817. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1268-3>
- Chaidez, C., Soto, M., Jimenez, M., 2014. 9 - Water: waste, recycling and irrigation in fresh produce processing, Editor(s): J. Hoorfar, In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Global Safety of Fresh Produce*, Woodhead Publishing, 119-132. <https://doi.org/10.1533/9781782420279.2.119>.
- Clyde, P.M., Lee, C.S., Price, R.E., Venkatesan, A.K., Brownawell, B.J., 2021. Occurrence and removal of PPCPs from on site wastewater using nitrogen removing biofilters. *Water Research*, 206, 117743. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117743>
- Commission Implementing Decisions (EU) 2015/495 of 20 March 2015 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*, 24.3.2015, L78, 40-42.
- Commission Implementing Decisions (EU) 2022/1307 of 22 July 2022 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*, 26.7.2022, L197, 117-121.
- Communication COM(2019) 128 final from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee, *European Union Strategic Approach to Pharmaceuticals in the Environment*. Brussels, 11.3.2019
- De Bustamante, I., Lillo, F.J., Sanz, J.M., de Miguel, Á., García, E., Carreño, F., Gómez, D., Martín, T., Martínez, F. y Corvea, J.L., 2009. A comparison of different methodologies

- for designing land application systems: Case study at the Redueña WWTP. *Desalin. Water Treat.* 4, 98–102. <https://doi.org/10.5004/dwt.2009.362>
- De Miguel, A., Meffe, R., Leal, M., González-Naranjo, V., Martínez-Hernández, V., Lillo, J., Martín, I., Salas, J.J., de Bustamante, I., 2014. Treating municipal wastewater through a vegetation filter with a short-rotation poplar species. *Ecological Engineering* 73, 560-568. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.059>
- Devault, D.A., Amalric, L., Bristeau, S., Cruz, J., Tapie, N., Karolak, S., Budzinski, H., Lévi, Y., 2021. Removal efficiency of emerging micropollutants in biofilter wastewater treatment plants in tropical areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 10940–10966. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10868-z>
- Du, B., Price, A.E., Casan Scott, W., Kristofco, L.A., Ramirez, A.J., Chambliss, C.K., Yelderman, J.C., Brooks, B.W., 2014. Comparison of contaminants of emerging concern removal, discharge, and water quality hazards among centralized and on-site wastewater treatment system effluents receiving common wastewater influent. *Sci Tot Environ.*, 466-467, 976-984. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.126>
- EC (European Commission), 2018. Nature-Based Solutions ([https://ec.europa.eu/info/research-and-innovation/research-area/environment/nature-based-solutions\\_en](https://ec.europa.eu/info/research-and-innovation/research-area/environment/nature-based-solutions_en)) [online: june 2021]
- Espinosa, N.J., Moore, D.J.P., Rasmussen, C., Fehmi, J.S., Gallery, R.E., 2020. Woodchip and biochar amendments differentially influence microbial responses, but do not enhance plant recovery in disturbed semiarid soils. *Restoration Ecology*, 28(S4), S381-S392. <https://doi.org/10.1111/rec.13165>
- Gaston, L., Lapworth, D.J., Stuart, M., Arnscheidt, J., 2019. Prioritization Approaches for Substances of Emerging Concern in Groundwater: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 6107–6122. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04490>
- Gorski, G., Dailey, H., Fisher, A.T., Schrad, N., Saltikov, C., 2020. Denitrification during infiltration for managed aquifer recharge: Infiltration rate controls and microbial response. *Sci Tot Environ.*, 727, 138642. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138642>
- Guzik U. y Wojcieszynska D., 2019. Biodegradation of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Their Influence on Soil Microorganisms en Kumar A. y Sharma S. (Eds.), *Microbes and Enzymes in Soil Health and Bioremediation. Microorganisms for Sustainability (vol 16)*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9117-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9117-0_16)
- Helbling, D.E., Hollender, J., Kholer, H.P.E., Fenner, K., 2010. Structure-Based Interpretation of Biotransformation Pathways of Amide-Containing Compounds in Sludge-Seeded Bioreactors. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 6628–6635. <https://doi.org/10.1021/es101035b>
- Helmecke, M., Fries, E. & Schulte, C, 2020. Regulating water reuse for agricultural irrigation: risks related to organic micro-contaminants. *Environ Sci Eur.*, 32, 4. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0283-0>
- Hochberg, Y., 1988. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika*, 75, 800–803. <https://doi.org/10.2307/2336325>
- Huidobro-López, B., López-Heras, I., Alonso-Alonso, C., Martínez-Hernández, V., Nozal, L., de Bustamante, I., 2022. Analytical method to monitor contaminants of emerging concern in water and soil samples from a non-conventional wastewater treatment

- system. J. Chromatogr. A, 1671, 463006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463006>
- Huidobro-López, B., León, C., López-Heras, I., Martínez-Hernández, V., Nozal, L., Crego, A.L., De Bustamante, I., 2023. Untargeted metabolomic analysis to explore the impact of soil amendments in a non-conventional wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 870, 161890. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161890>
- IGME (Instituto Geológico y Minero de España), 1981. Estudio hidrogeológico de la cuenca hidrográfica del Tajo. Plan Nacional de Investigación de Aguas Subterráneas.
- Ilyas, H., Ilyas, M., Van Hullebusch, E.D., 2020. Pharmaceuticals' removal by constructed wetlands: a critical evaluation and meta-analysis on performance, risk reduction, and role of physicochemical properties on removal mechanisms. *J Water Health* 18 (3): 253–291. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.213>
- Karnjanapiboonwong, A., Suski, J.G., Shah, A.A., Cai, Q., Morse, A.N., Anderson, T.A., 2011. Occurrence of PPCPs at a wastewater treatment plant and in soil and groundwater at a land application site. *Water, Air, & Soil Pollut.* 216, 257-273. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0532-8>
- Kase, R., Javurkova, B., Simon, E., Swart, K., Buchinger, S., Könemann, S., Escher, B.I., Carere, M., Dulio, V., Ait-Aissa, S., Hollert, H., Valsecchi, S., Polesello, S., Behnisch, P., Di Paolo, C., Olbrich, D., Sychrova, E., Gundlach, M., Schlichting, R., Leborgne, L., Clara, M., Scheffknecht, C., Marneffe, Y., Chalon, C., Tusil, P., Soldan, P., Von Danwitz, B., Schwaiger, J., Moran Palao, A., Bersani, F., Perceval, O., Kienle, C., Vermeirssen, E., Hilscherova, K., Reifferscheid, G., Werner, I., 2018. Screening and risk management solutions for steroidal estrogens in surface and wastewater. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 343-358. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.013>
- Kodešová, R., Kočárek, M., Klement, A., Golovko, O., Koba, O., Fér, M., Nikodem, A., Vondráčková, L., Jakšík, O., Grabic, R., 2016. An analysis of the dissipation of pharmaceuticals under thirteen different soil conditions. *Sci Total Environ*, 544, 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.085>
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, 287-303. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>
- Li, Y., Li, H., Xu, X., Gong, X. & Y. Zhou, 2015. Application of subsurface wastewater infiltration system to on-site treatment of domestic sewage under high hydraulic loading rate. *Water Sci. Eng.* 8:1, 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.wse.2015.01.008>
- Liu, Y.Y., Ptacek, C.J., Beauchemin, S., MacKinnon, T., Blowes, D.W., 2022. Effect of composting and amendment with biochar and woodchips on the fate and leachability of pharmaceuticals in biosolids destined for land application. *J. Sci. Tot.*, 810, 151-193. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151193>
- Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Herrera, S. y de Bustamante, I., 2016. The role of sorption and biodegradation in the removal of acetaminophen, carbamazepine, caffeine, naproxen and sulfamethoxazole during soil contact: A kinetics study. *Sci. Total Environ.* 559, 232-241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.131>
- Martínez-Hernández, V., Leal, M., Meffe, R., De Miguel, A., Alonso-Alonso, C., De Bustamante, I., Lillo, J., Martín, I., Salas, J.J., 2018. Removal of emerging organic contaminants

- (EOCs) in a poplar vegetation filter (VF). *J. Hazard. Mater.*, 342, 482-491. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.035>
- Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Hernández-Martín, J., Alonso González, A., de Santiago-Martín, A. y de Bustamante, I., 2020. Sustainable soil amendments to improve nature-based solutions for wastewater treatment and resource recovery. *J. Environ. Manage.* 261, 110255. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110255>
- McCance, W., Jones, O.A.H., Edwards, M., Surapaneni, A., Chadalavada, S., Currell, M., 2018. Contaminants of Emerging Concern as novel groundwater tracers for delineating wastewater impacts in urban and peri-urban areas. *Water Res.*, 146, 118–133. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.013>
- McEachran, A.D., Shea, D., Bodnar, W., Nichols, E.G., 2016. Pharmaceutical occurrence in groundwater and surface waters in forests land-applied with municipal wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.*, 35 (4), 898-905. <https://doi.org/10.1002/etc.3216>
- McEachran, A.D., Shea, D., Nichols, E.G., 2017. Pharmaceuticals in a temperate forest-water reuse system. *Sci. Tot. Environ.*, 581–582, 705-714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.185>
- Meffe, R., de Miguel, A., Martínez-Hernández, V., Lillo, J. y de Bustamante, I., 2016. Soil amendment using poplar woodchips to enhance the treatment of wastewater-originated nutrients. *J. Environ. Manage.* 180, 517-525. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.083>
- Meffe, R., de Santiago-Martín, A., Teijón, G., Martínez Hernández, V., López-Heras, I., Nozal, L., de Bustamante, I., 2021. Pharmaceutical and transformation products during unplanned water reuse: Insights into natural attenuation, plant uptake and human health impact under field conditions. *Environ. Int.* 157. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106835>
- Menzies Puer, E.G., Schneider, R.L., Puer, W.T., Morreale, S.J., Walter, M.T., 2020. Returning degraded soils to productivity: Water and nitrogen cycling in degraded soils amended with coarse woody material. *Ecological Engineering*, 157, 105986. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105986>
- Montagna, M.T., De Giglio, O., Calia, C., Pousis, C., Triggiano, F., Murgolo, S., De Ceglie, C., Bagordo, F., Apollonio, F., Diella, G., Narracci, M., Acquaviva, M.I., Ferraro, G.B., Mancini, P., Veneri, C., Brigida, S., Grassi, T., De Donno, A., Di Iaconi, C., Caputo, M.C., Cavallo, R.A., La Rosa, G., Mascolo, G., 2020. Microbiological and Chemical Assessment of Wastewater Discharged by Infiltration Trenches in Fractured and Karstified Limestone (SCA.Re.S. Project 2019–2020). *Pathogens*, 9, 1010. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121010>
- National Health System, 2016. Informe Anual del Sistema Nacional de Salud 2016. Informes, Estudios e Investigación 2017. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (1008 pp).
- OECD, 2017. Diffuse Pollution, Degraded Waters: Emerging Policy Solutions, Studies on Water, OECD Publishing, Paris, France, 2017. <https://doi.org/10.1787/9789264269064-en>
- Park, J., Kim, C., Hong, Y., Lee, W., Chung, H., Jeong, D.W., Kim, H., 2020. Distribution and Removal of Pharmaceuticals in Liquid and Solid Phases in the Unit Processes of Sewage

- Treatment Plants. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17, 687. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030687>
- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C., Mohan, D., 2019. Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chem. Rev.*, 119, 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>
- Pradana, R., Hernández-Martín, J.A., Martínez-Hernández, V., Meffe, R., de Santiago-Martín, A., Barbón, A.P., de Bustamante, I., 2021. Attenuation mechanisms and key parameters to enhance treatment performance in vegetation filters: A review. *Journal of Environmental Management*, 300, 113752. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113752>
- Proposal COM(2022) 540 final for a directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy (2022/0344 (COD)). Brussels
- Proposal COM(2022) 541 final of the October 26th 2022 for a directive, of the European parliament and of the council, concerning urban wastewater treatment (recast), (2022/0343 (COD)). Brussels
- R Development Core Team, 2008. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN: 3-900051-07-0
- Shu, W., Price, G.W., Jamieson, R. y Lake, C., 2021. Biodegradation kinetics of individual and mixture non-steroidal anti-inflammatory drugs in an agricultural soil receiving alkaline treated biosolids. *Sci. Total Environ.* 755, 142520. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142520>
- Shukla, A., Zhang, Y., Dubey, P., Margrave, J.L., Shukla, S.S., 2002. The role of sawdust in the removal of unwanted materials from water. *J. Hazard Mater.*, 95(1-2), 137-152. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(02\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(02)00089-4)
- Soil Survey Staff. 1999. Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys en Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 436 (2ªEd.)
- Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., Yu, G., 2015. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerging Contaminants*, 1, 14-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.emcon.2015.07.001>
- Teerlink, J., Martínez-Hernández, V., Higgins, C.P., Drewes, J.E., 2012. Removal of trace organic chemicals in onsite wastewater soil treatment units: A laboratory experiment. *Water Res.* 46, 5174–5184. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.024>
- Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R.D., Buelna, G., 2017. Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresource Technology*, 224, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.042>
- Tukey, J., 1949. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, 5(2), 99–114. <https://doi.org/10.2307/3001913>

- Valhondo, C., Carrera, J., Martínez-Landa, L., Wang, J., Amalfitano, S., Levantesi, C., Diaz-Cruz, M.S., 2020. Reactive Barriers for Renaturalization of Reclaimed Water during Soil Aquifer Treatment. *Water*, 12, 1012. <https://doi.org/10.3390/w12041012>
- WWAP (United Nations World Water Assessment Programme) UN-Water, 2018. The United Nations World Water Development Report 2018: Nature-Based Solutions for Water. Paris, UNESCO.
- Xing, Y., Yu, Y., Men, Y., 2018. Emerging investigators series: occurrence and fate of emerging organic contaminants in wastewater treatment plants with an enhanced nitrification step. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, 4, 1412-1426. <https://doi.org/10.1039/c8ew00278a>
- Xu, J., Wu, L., Chang, A.C., 2009. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere*, 77, 1299-1305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.063>
- Zhang, D., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environ. Pollut.*, 184, 620-639. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.009>



**CAPÍTULO VI.**  
**DISCUSIÓN GENERAL**



Esta Tesis Doctoral se encuadra en el marco del proyecto FILVER+ cuyo objetivo fue aumentar la eficiencia de un FV maximizando la eliminación de diferentes contaminantes, mediante la adición de enmiendas. Así, dentro de este proyecto, la investigación realizada para la elaboración de esta memoria tenía por objeto el estudio de la atenuación de CPEs que están presentes en el agua residual aplicada al suelo del FV piloto, tanto a escala real de campo como a escala de laboratorio.

En primer lugar, se desarrolló y validó una metodología de análisis multicomponente en diferentes matrices (aguas y suelos) para la determinación de 40 CPEs, mediante SPE-LC-MS/MS. La selección de compuestos se realizó siguiendo los criterios científico-técnicos descritos en el capítulo III, siendo principalmente los compuestos de mayor consumo en España y frecuencia de aparición en muestras de agua recogidas en el FV. Gracias a esta metodología, se encontró que algunos de los CPEs detectados, con mayor frecuencia y en mayor concentración en la mayoría de muestras, eran fármacos de consumo muy extendido como los antiinflamatorios ibuprofeno y naproxeno, y el analgésico acetaminofén (paracetamol), utilizados para enfermedades comunes, y los estimulantes cafeína y nicotina, y sus PTs, la paraxantina, y la cotinina. Para llevar a cabo este estudio, que se presentó en el capítulo III, se utilizaron muestras procedentes de los primeros meses de operación en el FV tanto de suelo como de agua de riego, agua de infiltración y agua subterránea (aguas arriba y aguas abajo del FV). Para la puesta a punto del método de análisis se optimizaron diferentes condiciones de separación cromatográfica (composición de fases móviles y pH) y de tratamiento de las muestras, como la SPE, donde se estudiaron variables como el pH de la muestra y los cartuchos de extracción, con el objetivo de obtener las mejores condiciones de recuperación de todos los analitos, en el menor tiempo de análisis y con el menor consumo de disolventes. Finalmente, se seleccionaron dos columnas de separación cromatográfica con diferentes condiciones de análisis y se identificaron las transiciones MRM específicas para cada analito, lo que permitió seleccionar los iones precursores y los iones productos necesarios para lograr la mayor selectividad y sensibilidad mediante LC-MS/MS. Dado el gran número de compuestos seleccionados y su amplia gama de propiedades fisicoquímicas, así como la variabilidad de las matrices estudiadas y su complejidad, las recuperaciones absolutas del método de análisis para algunos compuestos fueron bajas. Puesto que no se dispone de una regulación sobre los métodos de análisis de los CPEs estudiados a nivel medioambiental, se consideró la recomendación establecida por las directrices europeas para plaguicidas (valores de recuperación adecuados en el rango 70-120% con una precisión  $\leq 20\%$ ). Para el análisis de las muestras de suelo, fue necesario realizar una etapa previa de extracción sólido-líquido con disolventes. En este caso, sólo se logró una recuperación aceptable 28 de los 40 compuestos estudiados, lo que refleja la mayor complejidad de esta matriz. Entre estos 28 CPEs, se encontraban aquellos con mayor frecuencia de aparición y concentración en las muestras de agua y que representaban a todas las clases de CPEs seleccionados para el estudio. Además, el método de análisis de suelos desarrollado incluye 21 sustancias que no habían sido incluidas en el método propuesto por la EPA, por lo que resultó de gran utilidad para ampliar el número de contaminantes cuya presencia es posible detectar.

Por otro lado, fue necesario evaluar las interferencias y el efecto matriz para llevar a cabo una correcta cuantificación de todos los analitos. El uso de patrones internos o la

cuantificación mediante un calibrado en matriz son algunas de las alternativas más utilizadas. Se debe tener en cuenta que muchos CPEs son ubicuos en la naturaleza, lo que impide disponer de blancos de matriz (muestras sin CPEs), y por tanto dificulta el estudio de recuperación a los niveles de concentración más bajos, como ocurrió en este trabajo para varios de los CPEs detectados con mayor frecuencia y concentración en el agua de riego (acetaminofén, cafeína, paraxantina y naproxeno). En todo caso, se obtuvieron valores aceptables de precisión y la sensibilidad del método de análisis quedó demostrada por los niveles alcanzados de MQLs  $< 1$  ng/L y  $< 1$  ng/g para la mayoría de los compuestos en las muestras de agua y de suelo, respectivamente, que fueron suficientes para la cuantificación de todos los CPEs en todas las muestras. Una limitación que surge durante el desarrollo de métodos multicomponente es la imposibilidad de alcanzar límites de cuantificación suficientemente bajos para todos los compuestos mediante una única metodología. Es el caso, en este trabajo y en otros (Barreiros *et al.*, 2016; Kase *et al.*, 2018) del 17 $\alpha$ -etinilestradiol, para el cual la Directiva Marco de Agua establece valores límite ambientales que son unas diez veces inferiores a los límites de cuantificación obtenidos mediante el método de análisis desarrollado.

Así, mediante el empleo de esta metodología se lograron monitorizar un gran número de CPEs en las muestras. Además, el estudio conjunto de muestras de agua de distinta naturaleza y de muestras de suelo, proporciona una información útil y complementaria, que permitió evaluar de una forma más realista el destino de los CPEs en el FV y que podría ser extrapolado a otras investigaciones enfocadas a evaluar estos contaminantes en el medio ambiente. Sin embargo, aunque resultó una estrategia fructífera para la evaluación de la atenuación en el suelo de un FV, es conocido que algunos CPEs que son degradados (biótica o abióticamente), no lo son por completo (hasta mineralización) generando una serie de PTs que, en muchas ocasiones, son más móviles y solubles que los compuestos originales. Por este motivo, el desarrollo de estrategias de análisis para la identificación de estos PTs desconocidos, resulta un complemento muy adecuado para la evaluación de la atenuación de CPEs. Dentro del trabajo presentado en el capítulo IV, se desarrolló y aplicó una estrategia metabolómica no dirigida empleando muestras procedentes del ensayo en columnas de infiltración a escala de laboratorio, donde las condiciones del medio y las concentraciones de los 11 CPEs incluidos en el agua de riego (iniciales) se podían controlar. El método desarrollado consistió en un análisis por LC-HRMS empleando un analizador QTOF, de alta resolución, seguido de un estudio estadístico y del empleo de librerías de compuestos (MSDIAL y mzCLOUD) para la identificación tentativa de los PTs generados. Para el desarrollo de la estrategia no dirigida, primero se evaluaron diferentes columnas cromatográficas y fases móviles a diferentes pHs, y se optimizaron los parámetros de la fuente de ionización para HRMS. El objetivo durante esta optimización fue detectar el mayor número de componentes (*features*), lo que fue un reto, dada la complejidad de las muestras. Así, una vez seleccionadas las mejores condiciones para el análisis, se procesaron las muestras combinadas de agua procedente de las tres columnas de laboratorio, rellenas de suelo natural, suelo mezclado con un 3% en peso de astillas y suelo con 3% de biochar. Los resultados obtenidos se sometieron a una estrategia de cribado estadístico que consistió en varias etapas que se indican a continuación. En primer lugar, se descartaron todas las señales con intensidad y relación S/N bajas y aquellos componentes con una frecuencia de aparición en las réplicas de

muestra insuficiente o no reproducible. A continuación, los PCA y los Diagramas de Volcán (*Volcano plot*) permitieron la evaluación de aquellos componentes significativamente distintos entre la entrada y la salida de las columnas, es decir, entre el agua de riego y el agua infiltrada. La utilización de la estrategia no dirigida condujo a la detección de un gran número de componentes (más de 100 en las tres columnas) siendo la mayoría encontrados en una proporción significativamente menor a la salida que a la entrada, lo que refleja la capacidad de atenuación del suelo relleno de las columnas. Únicamente se identificaron 21 componentes (en total de las tres columnas) mayores a la salida, es decir, que pudieran considerarse como productos derivados de los CPEs (es decir, productos de transformación y/o metabolitos). Debido a la falta de disponibilidad comercial de patrones, sólo dos pudieron ser confirmados de forma inequívoca.

A escala de laboratorio, el método de análisis dirigido (capítulo III) se empleó para cuantificar, en las muestras de agua y de suelo, los 11 CPEs añadidos al agua residual con el que se regaron las columnas. Los datos de concentración obtenidos de las muestras de agua y de suelo, junto a los volúmenes de infiltración medidos, permitieron estimar un balance total de masa, observándose que más del 50% de la masa de todos los CPEs estudiados se vio reducida en las tres columnas. En cuanto al diseño de los experimentos a escala de laboratorio hay dos aspectos que merece la pena discutir en este punto. Por un lado, se empleó una concentración de los 11 CPEs algo por encima de lo encontrado en las aguas residuales (1 mg/L) con el objetivo de que los PTs pudieran potencialmente encontrarse en concentraciones detectables que facilitaran su identificación mediante la estrategia metabolómica no dirigida. De lo contrario, si las concentraciones de los 11 CPEs a la entrada fueran aún más bajas, podría ocurrir que los productos de su degradación (en caso de ser incompleta) estuvieran en tan baja concentración que no se detectaran. Por otro lado, se empleó agua residual sintética para evitar la variabilidad del agua residual real del edificio de IMDEA que era la empleada en el FV. Se podría haber tomado una elevada cantidad de muestra de un mismo día de riego del FV para tener una misma composición de agua de riego (entrada) y congelarla para su utilización en cada una de las semanas del ensayo en columnas, pero supondría un riesgo por la posible degradación de los componentes en el agua, durante los procesos de congelación-descongelación, y por la posible modificación de los microorganismos existentes en el agua residual y, por consiguiente, en el suelo relleno de las columnas. Además, es de resaltar que los 11 CPEs seleccionados para ser añadidos al agua residual sintética empleada como riego para las columnas, también se evaluaron mediante el método de análisis no dirigido desarrollado obteniendo resultados similares a los obtenidos mediante el análisis cuantitativo dirigido. Esto resulta positivo ya que confirma la adecuada estimación de los balances de masa tota establecidos en cada columna.

En cuanto a las diferencias en el comportamiento de los CPEs y la formación de PTs desconocidos en el suelo natural (S) y el suelo enmendado con astillas (SA) o con biochar (SB), se observó que en la columna SB ocurrió la mayor atenuación de los CPEs del agua de riego y a la vez, se identificó el menor número de PTs (mediante la estrategia metabolómica no dirigida), lo que refleja la mayor capacidad de esta enmienda en la atenuación (sorción + (bio)degradación) de los contaminantes y sus posibles productos de transformación. Aunque el biochar favoreció la retención de los CPEs, especialmente de aquellos cargados negativamente, la sorción directamente no fue el principal proceso que dio lugar a la

atenuación de los CPEs en ninguna de las columnas. En la columna SA, aunque se esperaba un aumento de la actividad microbiana propiciada por el aporte extra de carbono orgánico que constituyen las astillas de madera, ésta se observó reducida con respecto a la observada en el suelo natural (S). En el ensayo de laboratorio, la adición de la enmienda de astillas mezclada con el suelo provocó un aumento de la macroporosidad que modificó sustancialmente la hidráulica de la columna y se tradujo en mayores flujos ya que, a diferencia de los ensayos a escala real (en el FV piloto), no existía una capa de suelo bajo los 15 cm de columna que limitase la velocidad de infiltración. Este podría ser uno de los motivos por los que no se observó una mejora en la atenuación en el suelo mezclado con astillas en laboratorio, y sí en el FV cuyo tiempo de contacto, en los primeros 15 cm donde se colocaron las astillas, estuvo condicionado por la velocidad de infiltración en la capa subyacente, como se comentó también en el capítulo V durante la discusión de resultados de los resultados del FV. Además, en la columna de SA se identificó significativamente el mayor número de PTs lo que, unido a los menores tiempos de residencia observados y confirmados por el ensayo con un trazador (NaCl), fue probablemente indicativo de un mayor número de reacciones de transformación que comenzaron, pero no finalizaron, dando por tanto lugar a un mayor número de productos intermedios. Otro motivo contemplado para encontrar mayor número de PTs que en las otras columnas no se habían identificado es la modificación de la biota del suelo como consecuencia de la adición de carbono orgánico de las astillas, distinto del anterior. Ambos efectos (mayor número de reacciones incompletas y diferencias en la biota existente) son indistinguibles en el trabajo realizado.

A escala de campo, el método desarrollado para el análisis dirigido de CPEs (capítulo III) también se empleó para valorar su atenuación en el FV piloto, en diferentes condiciones de operación, que difirieron en el tipo y la frecuencia de riego y en el uso de astillas como enmienda al suelo. A pesar de que en el ensayo a escala de laboratorio los CPEs estudiados se atenuaron más en el suelo enmendado con biochar que en el suelo enmendado con astillas, la enmienda al suelo del FV piloto (astillas) se seleccionó en base a los mejores resultados obtenidos para la eliminación de nitratos (Martínez-Hernández *et al.*, 2020), que constituyen un riesgo cuantitativamente mayor para las aguas subterráneas.

El ensayo en el FV piloto, tuvo una duración de casi cuatro años completos y se presentó en el capítulo V. En primer lugar, el FV se probó empleando riego superficial por inundación de cada una de las calles del FV, una vez por semana y sin añadir ninguna enmienda al suelo (periodo 1 de operación). Los resultados mostraron una capacidad de atenuación media de la concentración del 70% para todos los CPEs, aunque con grandes diferencias entre ellos, (como también se mostró en el capítulo III). Además, considerando el volumen de infiltración de agua obtenido mediante el balance hídrico que se estableció para el FV, la atenuación en masa de la suma de todos los CPEs en este periodo fue del 81%. A continuación, se mezclaron los 15 primeros centímetros de suelo con astillas procedentes de la poda de los propios chopos del FV (periodo 2 de operación). Esto produjo un aumento de la porosidad, que provocó el establecimiento de condiciones más aerobias en los primeros centímetros de suelo, que pudieron favorecer la biodegradación de los CPEs. La actividad microbiana responsable de la biodegradación de los CPEs también aumentó por la fuente extra de carbono orgánico que constituyó la adición de astillas. Los resultados mostraron un aumento general de la atenuación de hasta el 97% de la suma total de CPEs en este periodo, además

de una menor variabilidad de la misma que en el periodo 1. Por último, en el periodo 3 de operación, se adicionó una capa superficial de astillas al suelo y se modificaron el tipo y la frecuencia de riego. El riego pasó a realizarse por goteo de forma diaria sobre todas las calles en lugar de semanal sobre cada calle. Estos cambios condujeron a un aumento en la atenuación de los CPEs estudiados (significativamente en más casos que en los periodos anteriores) y los balances de masa estimados mostraron una atenuación de la suma de todos los CPEs de prácticamente el 100%. Esta mejora pudo ocurrir por la confluencia de varios factores:

- La aplicación del riego por goteo aumentó el tiempo de contacto entre el agua y el suelo lo que favorecería los fenómenos de biodegradación y sorción. Además, la menor aplicación de agua diaria podría generar una mayor difusión lateral de la misma que también ralentiza la infiltración.
- El reparto del agua aplicada en 5 días (riego diario en lugar de semanal sobre cada calle) hizo que se alternaran con mayor frecuencia en el suelo los ciclos de humectación y secado. Esto podría suponer, además, una reposición constante del oxígeno consumido por los microorganismos en la degradación de carbono orgánico y por tanto un favorecimiento de la actividad microbiana y, con ello, de la biodegradación de los CPEs.
- La capa superior de astillas supuso una fuente de carbono que favoreció la actividad microbiana que es la principal responsable de la atenuación de los CPEs (como ya se observó con la adición de astillas mezcladas al suelo en el periodo 2 de operación), además de constituir una capa de diferentes características (especialmente por diferentes grupos funcionales) que puede favorecer la atenuación de compuestos con diferentes propiedades.
- Aunque no intencionado, también ocurrió durante este periodo una disminución de las concentraciones de los CPEs en el agua de riego a la par que un aumento del contenido de oxígeno y una disminución del potencial redox a causa del menor número de trabajadores en el edificio como consecuencia del teletrabajo establecido por la pandemia del COVID desde marzo de 2020. Estos factores también podrían haber favorecido la atenuación de los CPEs en este periodo, pero su efecto no es distinguible del manejo llevado a cabo.

Por lo tanto, del estudio de las diferentes condiciones de operación se dedujo que la mejor forma entre las estudiadas de trabajar con el FV para el tratamiento de aguas residuales asimilables a urbanas podría ser mediante el empleo de una capa de astillas sobre el suelo y la aplicación del riego por goteo y diario en lugar de semanal.

Por otra parte, los bajos contenidos de CPEs en muestras de suelo y su prácticamente invariabilidad a lo largo de los casi cuatro años de estudio, así como el papel de la sorción en el balance de masa total de CPEs estimado en el FV demuestran que, tanto a escala de campo como de laboratorio, los fenómenos de sorción directamente no son el proceso principal responsable de la atenuación de los CPEs monitorizados. La biodegradación parece tener lugar principalmente en los primeros 15 cm de suelo ya que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de agua de infiltración a las dos profundidades de estudio (15 y 45 cm).

Por último, gracias al método de análisis dirigido desarrollado, también fue posible evaluar el impacto del FV en el acuífero subyacente durante los cuatro años de operación. Los resultados demostraron que, tras cuatro años de operación, no se había afectado la calidad de las aguas subterráneas, correspondiéndose está con la del fondo regional del acuífero en este sector.

Este trabajo refleja la adecuada capacidad que tienen los FVs para la atenuación de CPEs y PTs. Los resultados resultan prometedores ya que los FVs son una SBN que presenta grandes ventajas medioambientales y económicas. Como sistema de tratamiento de aguas, constituye una técnica de bajo coste y fácil instalación y mantenimiento, muy útil para poblaciones pequeñas y aisladas y, aún más, en el contexto de la propuesta de reducción, de 2000 a 1000 habitantes equivalentes, la población mínima para la cual es obligatoria la aplicación de la directiva de tratamiento de aguas residuales. Además de servir para depurar las aguas residuales, previamente tratadas, este sistema permite la recuperación de nutrientes contenidos en el agua residual por parte de la biota, del suelo y de la vegetación, así como la recarga de los acuíferos y consecuentemente la preservación de los recursos hídricos. Al ser básicamente una plantación forestal, genera nichos ecológicos, captura dióxido de carbono e incluso puede emplearse como método de obtención de biomasa. Esta biomasa podría emplearse para la fabricación de productos que no requieran madera de muy alta calidad o para enmendar el propio suelo del FV como se ha realizado en la presente Tesis Doctoral. Cabe destacar que el estudio de las muestras recogidas en el FV, también aporta información que puede ayudar a las Instituciones Europeas, los Estados Miembros y el público en general a obtener una imagen más precisa y actualizada del estado de las masas de agua en la UE, y más concretamente en la cuenca hidrográfica de la zona de estudio, tal como se solicita en la nueva propuesta de modificación de las directivas marco de agua.



**CAPÍTULO VII.**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**



Como resultado de la investigación realizada durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones que dan respuesta a los objetivos planteados en esta memoria.

Objetivo 1 (Desarrollar y validar una metodología de análisis sensible y selectiva para la determinación de una selección de CPEs en aguas y suelos mediante LC-MS/MS):

- Se desarrolló y validó la metodología analítica para la determinación de 40 CPEs en agua y 28 CPEs en suelo que permitió evaluar la eficiencia de su atenuación en FVs
- La LC-MS/MS se consideró una herramienta ideal para el análisis multicomponente en matrices medioambientales por su excelente sensibilidad y selectividad
- Los parámetros de validación del método fueron satisfactorios, obteniéndose valores de recuperación y precisión adecuados y alcanzándose límites de cuantificación suficientes para el análisis de las muestras de aguas y suelo procedentes del FV piloto (MQLs < 1 ng/L y < 1 ng/g para la mayoría de los compuestos en las muestras de agua y de suelo, respectivamente)

Objetivo 2a (Estudiar el comportamiento de los CPEs seleccionados en un ensayo a escala de laboratorio simulando el FV con suelo natural (sin enmendar) y enmendado (con astillas de madera o con biochar) e identificar los PTs desconocidos generados mediante un análisis metabolómico no dirigido):

- Se redujo más del 50% de la masa de todos los CPEs estudiados en las tres columnas (suelo, suelo con astillas y suelo con biochar).
- La sorción directamente no es el principal proceso que da lugar a la atenuación de los CPEs en ninguna de las columnas debido a los bajos contenidos encontrados en suelo y a los balances de masa estimados.
- La mayoría de los componentes detectados mediante la estrategia no dirigida se encontraron en una proporción significativamente menor a la salida que a la entrada de las columnas, lo que refleja la elevada capacidad de atenuación del suelo en sí mismo.
- Se identificaron únicamente 21 componentes que pudieran considerarse PTs y sólo dos de ellos fueron ser confirmados con estándares.
- En la columna de suelo con biochar ocurrió la mayor atenuación de los CPEs estudiados y a la vez, se identificó el menor número de PTs, lo que refleja la mayor capacidad de la enmienda con biochar en la atenuación (sorción + (bio)degradación) de contaminantes.
- En la columna de suelo con astillas, se observó una reducción de la atenuación de los CPEs, debido al mayor flujo provocado por la macroporosidad generada al mezclar las astillas con el suelo (esto no ocurre a escala de campo por la capa subyacente de suelo que limita la velocidad de infiltración). Además, se identificó significativamente el mayor número de PTs lo que se atribuyó a un posible un mayor número de reacciones incompletas y a una probable mayor diferenciación en la biota existentes.

Objetivo 2b (Realizar un experimento a escala de campo de un FV piloto en diferentes condiciones de operación y estudiar el comportamiento de los CPEs seleccionados durante un periodo de unos cuatro años):

- El empleo de una capa de astillas sobre el suelo y la aplicación del riego diario por goteo condujeron a la mayor atenuación de los CPEs estudiados, principalmente gracias a la fuente de carbono que suponen las astillas y al mayor tiempo de retención hidráulica por la estrategia de riego aplicada.
- Los fenómenos de sorción directamente no son el proceso principal responsable de la atenuación de los CPEs monitorizados en el FV piloto por las mismas causas que se observaron a escala de laboratorio (bajos contenidos en suelo y los resultados de los balances de masa estimados). La biodegradación, con un papel más importante, debió ocurrir principalmente en los primeros 15 cm de suelo ya que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de agua de infiltración a las dos profundidades de estudio (15 y 45 cm).
- El FV no tuvo un impacto negativo, durante todo el periodo de estudio, en el acuífero subyacente ya que no se observaron diferencias significativas en la concentración aguas arriba y aguas abajo en términos de los CPEs estudiados.

Por último, tras la realización de los trabajos presentados en esta tesis, se han detectado una serie de aspectos que podrían estudiarse en el futuro para mejorar o completar el conocimiento sobre la atenuación de contaminantes de preocupación emergente empleando FVs, que se enumeran a continuación, para finalizar este capítulo.

En relación al **análisis dirigido** desarrollado para la detección y cuantificación de los 40 CPEs, no se plantean mejoras ya que se trata de un método multicomponente en el que ya se ha alcanzado el mejor compromiso entre las diferentes condiciones de análisis estudiadas. Sin embargo, respecto a la **estrategia no dirigida** desarrollada y su aplicación, se podría:

- Identificar el origen de los PTs identificados con el fin de conocer aquellos compuestos entre los estudiados que son más biodegradables en las condiciones del ensayo (es decir, en las condiciones del tratamiento propuesto) lo cual sería difícil de asegurar dada la baja disponibilidad de estándares comerciales (en algunos casos podría solicitarse su síntesis, pero sería muy caro) y que las rutas de degradación de algunos fármacos son muy similares.
- Desarrollar o tratar de adaptar la estrategia no dirigida para la identificación de PTs en las muestras de suelo y evaluar el suelo antes y después de los experimentos de riego con CPEs.
- Aplicar la estrategia no dirigida desarrollada a muestras del FV: el estudio sería más difícil de evaluar dada la gran cantidad de variables en la escala real, especialmente las relacionadas con las concentraciones iniciales de los CPEs y a las bajas concentraciones de algunos de los compuestos de partida, lo que podría llevar a no detectar algunos productos de degradación. Además, sería prácticamente imposible comparar entre eventos y entre periodos de operación en el FV dado que los ensayos son consecutivos, no paralelos como en las columnas a escala de laboratorio, y, por tanto, existiría una gran variabilidad de muchos parámetros (temperatura, riego, estado vegetativo de los chopos, cobertura general, lluvias, etc.).

Respecto a la **operación en el FV** piloto, y como líneas futuras de investigación, en términos de CPEs, se sugieren las siguientes:

- Visto el favorecimiento de la biodegradación que provoca en campo la adición de la enmienda de astillas, y el favorecimiento de la sorción que provoca la adición de la

enmienda de biochar, resulta interesante realizar una prueba piloto mezclando astillas y biochar para el FV o únicamente biochar.

- También sería interesante muestrear a más profundidad que 45 cm pero a menor profundidad que la altura de la lámina de agua subterránea (inicio del acuífero), que en la zona de estudio oscila entre los 4 y los 6 metros. Por ejemplo, una profundidad de 1 metro sería interesante porque permitiría evaluar la capacidad potencial real de atenuación de este sistema (más allá de la dilución o dispersión sin afectación al acuífero).
- Como futura investigación con un FV piloto se podría recoger y analizar las hojas y raíces de los chopos, así como de las astillas obtenidas tras la poda de los mismos, para evaluar si existe acumulación de CPEs y PTs en ellas, aunque se cambien las condiciones de operación en el FV.
- Para justificar la mejora de la biodegradación observada en el FV sería interesante poder evaluar la biodegradación de una manera más precisa que mediante la determinación de la materia orgánica biodegradable (aromática) transformada (evaluación del carbono orgánico recalcitrante, SUVA).

**CAPÍTULO VIII.**  
**ANEXOS**



**Anexo A:** Tabla de CPEs y PTs seleccionados (incluyendo las abreviaturas empleadas) para el desarrollo del método analítico, sus propiedades fisicoquímicas y su estructura química.

Compuesto (acrónimo)	Nº CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*	Fórmula molecular	Estructura química*	Masa molecular (Da)	Estado de ionización <sup>a</sup>	pKa más ácido/básico	LogK <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Solubilidad (mg/mL)	Volumen de VdW (Å <sup>3</sup> )
4-Aminoantipirina (4AA)	83-07-8	PT metamizol	No2 – analgésicos	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O		203,11	[0]	0.07	0.33	9.56	185,38
4-Acetamidoantipirina (4AAA)**	83-15-8	PT metamizol	No2 – analgésicos	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		245,12	[0]	12.52 / -0.76	0.15	5.54	222.06
4-Dimetilaminoantipirina (4DAA)	58-15-1	PT metamizol	No2 – analgésicos	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O		231,14	[0]	3.66	1.15	9.97	220.71
4-Formilaminoantipirina (4FAA)	1672-58-8	PT metamizol	No2 – analgésicos	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		231,11	[0]	12.66 / -0.75	0.11	9.81	205.27
Acetaminofén (ACE)**	103-90-2	Fármaco	No2 – analgésicos	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>		151,06	96%[0], 4%[-]	9.46	0.8	11.53	138.08

Volumen de VdW=Volumen de Van der Waals

<sup>a</sup> Estado de ionización a pH 8: [0]=neutro; [+]=carga positiva; [-]=carga negativa.

<sup>b</sup> LogK<sub>ow</sub> se refiere al LogP<sub>ow</sub>, para los CPEs neutros, y LogD<sub>ow</sub>, para los cargados. LogD<sub>ow</sub> y LogP<sub>ow</sub> representan el logaritmo en base 10 del coeficiente de reparto octanol/agua.

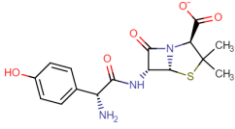
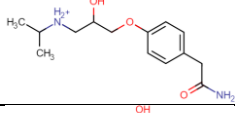
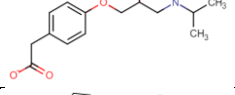
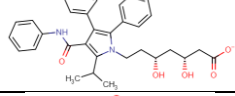
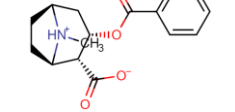
El estado de ionización, LogD<sub>ow</sub>, LogP<sub>ow</sub>, solubilidad y volumen de VdW a 25°C y pH 8, así como los valores de pKa se obtuvieron de la plataforma Chemicalize.org.

\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la OMS. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

\*\*Incluido en el agua residual sintética del ensayo en columnas a escala de laboratorio.

**Compuesto en negrita:** Incluido en el método de análisis desarrollado para suelo.

**Anexo A (continuación):** Tabla de CPEs y PTs seleccionados (incluyendo las abreviaturas empleadas) para el desarrollo del método analítico, sus propiedades fisicoquímicas y su estructura química.

Compuesto (acrónimo)	N° CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*	Fórmula molecular	Estructura química*	Masa molecular (Da)	Estado de ionización <sup>a</sup>	pKa más ácido/básico	LogK <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Solubilidad (mg/mL)	Volumen de VdW (Å <sup>3</sup> )
Amoxicilina (AMO)**	26787-78-0	Fármaco	J01 – antibacterianos	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S		365,10	85%[-], 12%[+/-], 3%[2-]	3.23 / 7.22	-3.04	0.12	307.12
Atenolol (ATE)	29122-68-7	Fármaco	C07 – agentes betabloqueante	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		266,16	98%[+], 2%[0]	14.08 / 9.67	-1.24	338.24	261.34
Ácido atenolico (ATE AC)**	56392-14-4	PT atenolol	C07 – agentes betabloqueante	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>		267,15	98%[+/-], 2%[-]	3.54 / 9.67	-1.25	9.17	258.65
Atorvastatin (ATOR)	134523-00-5	Fármaco	C10 – reguladores lipídicos	C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> FO <sub>5</sub>		558,25	[-]	4.31	2.09	0.24	511.55
Benzoilecgonina (BENZ)	519-09-5	PT cocaína	N01 – anestésicos	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>		289,13	96%[+/-], 4%[-]	3.15 / 9.54	-0.6	2.17	264.85

Volumen de VdW=Volumen de Van der Waals

<sup>a</sup> Estado de ionización a pH 8: [0]=neutro; [+]=carga positiva; [-]=carga negativa.

<sup>b</sup> LogK<sub>ow</sub> se refiere al LogP<sub>ow</sub>, para los CPEs neutros, y LogD<sub>ow</sub>, para los cargados. LogD<sub>ow</sub> y LogP<sub>ow</sub> representan el logaritmo en base 10 del coeficiente de reparto octanol/agua.


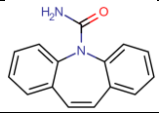
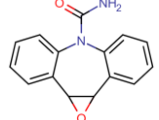
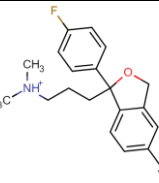
El estado de ionización, LogD<sub>ow</sub>, LogP<sub>ow</sub>, solubilidad y volumen de VdW a 25°C y pH 8, así como los valores de pKa se obtuvieron de la plataforma Chemicalize.org.

\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la OMS. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

\*\*Incluido en el agua residual sintética del ensayo en columnas a escala de laboratorio.

**Compuesto en negrita:** Incluido en el método de análisis desarrollado para suelo.

**Anexo A (continuación):** Tabla de CPEs y PTs seleccionados (incluyendo las abreviaturas empleadas) para el desarrollo del método analítico, sus propiedades fisicoquímicas y su estructura química.

Compuesto (acrónimo)	Nº CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*	Fórmula molecular	Estructura química*	Masa molecular (Da)	Estado de ionización <sup>a</sup>	pKa más ácido/básico	LogK <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Solubilidad (mg/mL)	Volumen de VdW (Å <sup>3</sup> )
<b>Cafeína (CAF)</b>	58-08-2	Estimulante/ Fármaco	No6 – psicoanalépticos	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		194,08	[0]	-1.16	-0.55	70.9	164.26
<b>Carbamazepina (CAR)</b>	298-46-4	Fármaco	No3 – antiepilépticos	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O		236,09	[0]	15.96	2.77	0.04	210.15
<b>Carbamazepina epóxido (CAREPOX)</b>	36507-30-9	PT carbamazepina	No3 – antiepilépticos	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		252,09	[0]	15.96	2.58	0.109	214.99
<b>Citalopram (CIT)</b>	59729-32-7	Fármaco	No6 – psicoanalépticos	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O		324,16	96%[+], 4%[0]	9.78	1.98	2.83	303.78

Volumen de VdW=Volumen de Van der Waals

<sup>a</sup> Estado de ionización a pH 8: [0]=neutro; [+]=carga positiva; [-]=carga negativa.

<sup>b</sup> LogK<sub>ow</sub> se refiere al LogP<sub>ow</sub>, para los CPEs neutros, y LogD<sub>ow</sub>, para los cargados. LogD<sub>ow</sub> y LogP<sub>ow</sub> representan el logaritmo en base 10 del coeficiente de reparto octanol/agua.

El estado de ionización, LogD<sub>ow</sub>, LogP<sub>ow</sub>, solubilidad y volumen de VdW a 25°C y pH 8, así como los valores de pKa se obtuvieron de la plataforma Chemicalize.org.

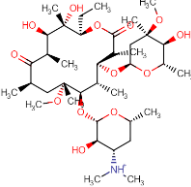
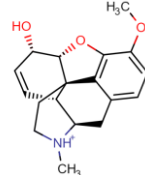
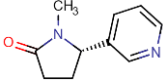
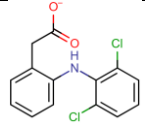
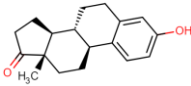
\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la OMS. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

\*\*Incluido en el agua residual sintética del ensayo en columnas a escala de laboratorio.

**Compuesto en negrita:** Incluido en el método de análisis desarrollado para suelo.



**Anexo A (continuación):** Tabla de CPEs y PTs seleccionados (incluyendo las abreviaturas empleadas) para el desarrollo del método analítico, sus propiedades fisicoquímicas y su estructura química.

Compuesto (acrónimo)	N° CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*	Fórmula molecular	Estructura química*	Masa molecular (Da)	Estado de ionización <sup>a</sup>	pKa más ácido/básico	LogK <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Solubilidad (mg/mL)	Volumen de VdW (Å <sup>3</sup> )
<b>Claritromicina (CLA)**</b>	81103-11-9	Fármaco	J01 – antibacterianos	C <sub>38</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>13</sub>		747,48	90%[+], 10%[0]	12.46 / 9	2.2	31.28	744.46
<b>Codeína (COD)</b>	76-57-3	Fármaco	No2 – analgésicos	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>		299,15	95%[+], 5%[0]	13.78 / 9.19	0.1	73.76	273.17
<b>Cotina (COT)**</b>	486-56-6	PT nicotina y fármaco	No7 – otros fármacos del sistema nervioso	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O		176,09	[0]	4.79	0.21	51.3	165.32
<b>Diclofenaco (DIC)</b>	15307-79-6	Fármaco	M01 – antiinflamatorios y antireumáticos	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>		295,02	[-]	4	0.85	150.7	236.85
<b>Estrona (E1)**</b>	53-16-7	Hormona natural/Fármaco y PT E2	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>		270,16	[0]	10.33	4.31	0.02	263.03

Volumen de VdW=Volumen de Van der Waals

<sup>a</sup> Estado de ionización a pH 8: [0]=neutro; [+]=carga positiva; [-]=carga negativa.

<sup>b</sup> LogK<sub>ow</sub> se refiere al LogP<sub>ow</sub>, para los CPEs neutros, y LogD<sub>ow</sub>, para los cargados. LogD<sub>ow</sub> y LogP<sub>ow</sub> representan el logaritmo en base 10 del coeficiente de reparto octanol/agua.

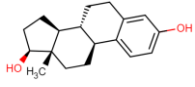
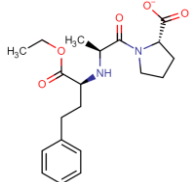
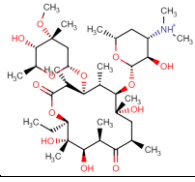
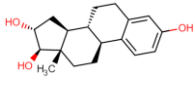
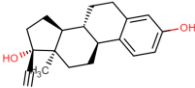
El estado de ionización, LogD<sub>ow</sub>, LogP<sub>ow</sub>, solubilidad y volumen de VdW a 25°C y pH 8, así como los valores de pKa se obtuvieron de la plataforma Chemicalize.org.

\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la OMS. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

\*\*Incluido en el agua residual sintética del ensayo en columnas a escala de laboratorio.

**Compuesto en negrita:** Incluido en el método de análisis desarrollado para suelo.

**Anexo A (continuación):** Tabla de CPEs y PTs seleccionados (incluyendo las abreviaturas empleadas) para el desarrollo del método analítico, sus propiedades fisicoquímicas y su estructura química.

Compuesto (acrónimo)	Nº CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*	Fórmula molecular	Estructura química*	Masa molecular (Da)	Estado de ionización <sup>a</sup>	pKa más ácido/básico	LogK <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Solubilidad (mg/mL)	Volumen de VdW (Å <sup>3</sup> )
<b>17β-Estradiol (E2)</b>	50-28-2	Hormona natural/Fármaco	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		272,18	[0]	10.33 / -0.88	3.74	0.03	269.74
Enalapril (ENA)	75847-73-3	Fármaco	C09 – agentes del sistema renina-angiotensina	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		376,20	[-]	3.67 / 5.2	-1.22	81.49	357.14
Eritromicina (ERI)	114-07-08	Fármaco	J01 – antibacterianos	C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>13</sub>		733,46	92%[+], 8%[0]	12.45 / 9	1.55	43.27	727.13
<b>Estriol (ESTRIOL)</b>	50-27-1	PT E1	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>		288,17	[0]	10.33	2.67	0.07	278.62
<b>17α-Etinilestradiol (ETINIL)</b>	57-63-6	Hormona natural/Fármaco	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		296,18	[0]	10.33 / -1.66	3.9	0.00	291.61

Volumen de VdW=Volumen de Van der Waals

<sup>a</sup> Estado de ionización a pH 8: [0]=neutro; [+]=carga positiva; [-]=carga negativa.

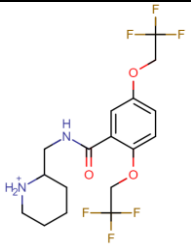
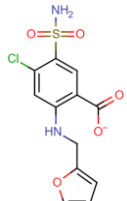
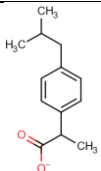
<sup>b</sup> LogK<sub>ow</sub> se refiere al LogP<sub>ow</sub>, para los CPEs neutros, y LogD<sub>ow</sub>, para los cargados. LogD<sub>ow</sub> y LogP<sub>ow</sub> representan el logaritmo en base 10 del coeficiente de reparto octanol/agua. El estado de ionización, LogD<sub>ow</sub>, LogP<sub>ow</sub>, solubilidad y volumen de VdW a 25°C y pH 8, así como los valores de pKa se obtuvieron de la plataforma Chemicalize.org.

\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la OMS. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

\*\*Incluido en el agua residual sintética del ensayo en columnas a escala de laboratorio.

**Compuesto en negrita:** Incluido en el método de análisis desarrollado para suelo.

**Anexo A (continuación):** Tabla de CPEs y PTs seleccionados (incluyendo las abreviaturas empleadas) para el desarrollo del método analítico, sus propiedades fisicoquímicas y su estructura química.

Compuesto (acrónimo)	Nº CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*	Fórmula molecular	Estructura química*	Masa molecular (Da)	Estado de ionización <sup>a</sup>	pKa más ácido/básico	LogK <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Solubilidad (mg/mL)	Volumen de VdW (Å <sup>3</sup> )
<b>Flecainida (FLE)</b>	54143-55-4	Fármaco	C01 – terapias cardíacas	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		414,14	96%[+], 4%[0]	13.68 / 9.62	1.57	0.15	331.94
<b>Furosemina (FURO)</b>	54-31-9	Fármaco	C03 – diuréticos	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S		330,01	98%[-], 2%[2-]	4.25 / -1.52	-1.58	330.74	252.01
<b>Ibuprofeno (IBU)**</b>	15687-27-1	Fármaco	<b>M01</b> – antiinflamatorios y antireumáticos	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>		206,13	[-]	4.85	0.85	83.21	211.8

Volumen de VdW=Volumen de Van der Waals

<sup>a</sup> Estado de ionización a pH 8: [0]=neutro; [+]=carga positiva; [-]=carga negativa.

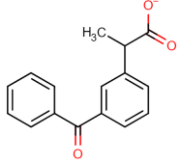
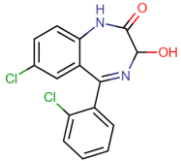
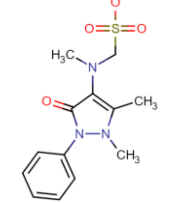
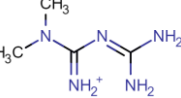
<sup>b</sup> LogK<sub>ow</sub> se refiere al LogP<sub>ow</sub>, para los CPEs neutros, y LogD<sub>ow</sub>, para los cargados. LogD<sub>ow</sub> y LogP<sub>ow</sub> representan el logaritmo en base 10 del coeficiente de reparto octanol/agua. El estado de ionización, LogD<sub>ow</sub>, LogP<sub>ow</sub>, solubilidad y volumen de VdW a 25°C y pH 8, así como los valores de pKa se obtuvieron de la plataforma Chemicalize.org.

\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la OMS. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

\*\*Incluido en el agua residual sintética del ensayo en columnas a escala de laboratorio.

**Compuesto en negrita:** Incluido en el método de análisis desarrollado para suelo.

**Anexo A (continuación):** Tabla de CPEs y PTs seleccionados (incluyendo las abreviaturas empleadas) para el desarrollo del método analítico, sus propiedades fisicoquímicas y su estructura química.

Compuesto (acrónimo)	N° CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*	Fórmula molecular	Estructura química*	Masa molecular (Da)	Estado de ionización <sup>a</sup>	pKa más ácido/básico	LogK <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Solubilidad (mg/mL)	Volumen de VdW (Å <sup>3</sup> )
<b>Ketoprofeno (KET)**</b>	22071-15-4	Fármaco	M01 – antiinflamatorios y antireumáticos	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>		254,09	[-]	3.88	0.18	254.29	233.68
<b>Lorazepam (LORZ)</b>	846-49-1	Fármaco	N05 – psiclépticos	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		320,01	[0]	10.61	3.53	0.002	247.35
Metamizol (sal de sodio o dipirona) (META)	68-89-3	Fármaco	N02 – analgésicos	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S Na		311,36	[-]	-1.42 / -0.54	-2.25		262.55
Metformina (METFOR)	657-24-9	Fármaco	A02 – terapias diabetes	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>		129,10	80%[+], 20%[+]	12.3	-5.37	8301	123.58

Volumen de VdW=Volumen de Van der Waals

<sup>a</sup> Estado de ionización a pH 8: [0]=neutro; [+]=carga positiva; [-]=carga negativa.

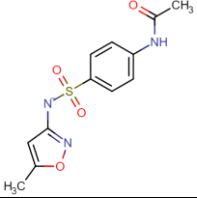
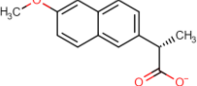
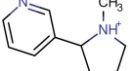
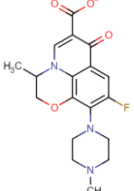
<sup>b</sup> LogK<sub>ow</sub> se refiere al LogP<sub>ow</sub>, para los CPEs neutros, y LogD<sub>ow</sub>, para los cargados. LogD<sub>ow</sub> y LogP<sub>ow</sub> representan el logaritmo en base 10 del coeficiente de reparto octanol/agua. El estado de ionización, LogD<sub>ow</sub>, LogP<sub>ow</sub>, solubilidad y volumen de VdW a 25°C y pH 8, así como los valores de pKa se obtuvieron de la plataforma Chemicalize.org.

\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la OMS. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

\*\*Incluido en el agua residual sintética del ensayo en columnas a escala de laboratorio.

**Compuesto en negrita:** Incluido en el método de análisis desarrollado para suelo.

**Anexo A (continuación):** Tabla de CPEs y PTs seleccionados (incluyendo las abreviaturas empleadas) para el desarrollo del método analítico, sus propiedades fisicoquímicas y su estructura química.

Compuesto (acrónimo)	N° CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*	Fórmula molecular	Estructura química*	Masa molecular (Da)	Estado de ionización <sup>a</sup>	pKa más ácido/básico	LogK <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Solubilidad (mg/mL)	Volumen de VdW (Å <sup>3</sup> )
<b>N4-acetilsulfametoxazol (N4ACE)</b>	21312-10-7	PT sulfametoxazol	J01 – antibacterianos	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S		295,06	[-]	5.88 / 0.38	-0.06	127.99	241.31
<b>Naproxeno (NAP)**</b>	22204-53-1	Fármaco	M01 – antiinflamatorios y antireumáticos	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>		230,09	[-]	4.19	-0.36	230.26	213.06
Nicotina (NIC)	54-11-5	Estimulante/ Fármaco	N07 – otros fármacos del sistema nervioso	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>		162,12	80%[+], 20%[0]	8.58	0.48	664.64	164.2
Ofloxacino (OFLO)	82419-36-1	Fármaco	J01 – antibacterianos	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		361,14	95%[-], 5%[+/-]	5.35 / 6.72	-1.02	40.63	309.96

Volumen de VdW=Volumen de Van der Waals

<sup>a</sup> Estado de ionización a pH 8: [0]=neutro; [+]=carga positiva; [-]=carga negativa.

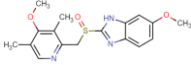
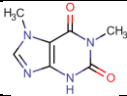
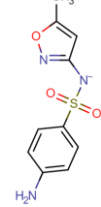
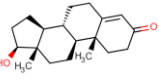
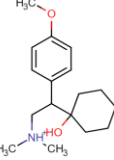
<sup>b</sup> LogK<sub>ow</sub> se refiere al LogP<sub>ow</sub>, para los CPEs neutros, y LogD<sub>ow</sub>, para los cargados. LogD<sub>ow</sub> y LogP<sub>ow</sub> representan el logaritmo en base 10 del coeficiente de reparto octanol/agua. El estado de ionización, LogD<sub>ow</sub>, LogP<sub>ow</sub>, solubilidad y volumen de VdW a 25°C y pH 8, así como los valores de pKa se obtuvieron de la plataforma Chemicalize.org.

\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la OMS. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

\*\*Incluido en el agua residual sintética del ensayo en columnas a escala de laboratorio.

**Compuesto en negrita:** Incluido en el método de análisis desarrollado para suelo.

**Anexo A (continuación):** Tabla de CPEs y PTs seleccionados (incluyendo las abreviaturas empleadas) para el desarrollo del método analítico, sus propiedades fisicoquímicas y su estructura química.

Compuesto (acrónimo)	N° CAS	Tipo de CPE	Subgrupo ATC*	Fórmula molecular	Estructura química*	Masa molecular (Da)	Estado de ionización <sup>a</sup>	pKa más ácido/básico	LogK <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	Solubilidad (mg/mL)	Volumen de VdW (Å <sup>3</sup> )
Omeprazol (OME)	73590-58-6	Fármaco	A02 – tratamiento trastornos relacionados con la acidez	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S		345,11	95%[0], 5%[-]	9.29 / 4.77	2.43	0.11	301.14
Paraxantina (PAR)**	611-59-6	PT cafeína	N06 – psicoanalépticos	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		180,06	[0]	10.91 / -1.1	0.24	19.75	146.51
Sulfametoxazol (SUL)	723-46-6	Fármaco	J01 – antibacterianos	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S		253,05	[-]	6.16 / 1.97	-0.11	111.47	204.7
Testosterona (TES)	58-22-0	Hormona natural/Fármaco	G03 – hormonas sexuales y moduladores del sistema genital	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>		288,21	[0]	-0.88	3.37	0.01	293.36
Venlafaxina (VEN)	99300-78-4	Fármaco	N06 – psicoanalépticos	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>		277,20	90%[+], 10%[0]	14.42 / 8.91	1.78	6.61	289.28

Volumen de VdW=Volumen de Van der Waals

<sup>a</sup> Estado de ionización a pH 8: [0]=neutro; [+]=carga positiva; [-]=carga negativa.

<sup>b</sup> LogK<sub>ow</sub> se refiere al LogP<sub>ow</sub>, para los CPEs neutros, y LogD<sub>ow</sub>, para los cargados. LogD<sub>ow</sub> y LogP<sub>ow</sub> representan el logaritmo en base 10 del coeficiente de reparto octanol/agua. El estado de ionización, LogD<sub>ow</sub>, LogP<sub>ow</sub>, solubilidad y volumen de VdW a 25°C y pH 8, así como los valores de pKa se obtuvieron de la plataforma Chemicalize.org.

\*ATC: Código de clasificación anatómica-terapéutica-química asignado por el Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de la OMS. A – tracto alimentario y metabolismo; C – sistema cardiovascular; G – sistema genitourinario y hormonas sexuales; J – antiinfecciosos de uso sistémico; M – sistema musculoesquelético; N – sistema nervioso.

\*\*Incluido en el agua residual sintética del ensayo en columnas a escala de laboratorio.

**Compuesto en grinta:** Incluido en el método de análisis desarrollado para suelo.

**Anexo B:** Diagramas de cajas y bigotes (boxplot) para los PT identificados tentativamente en las tres columnas de infiltración en laboratorio.

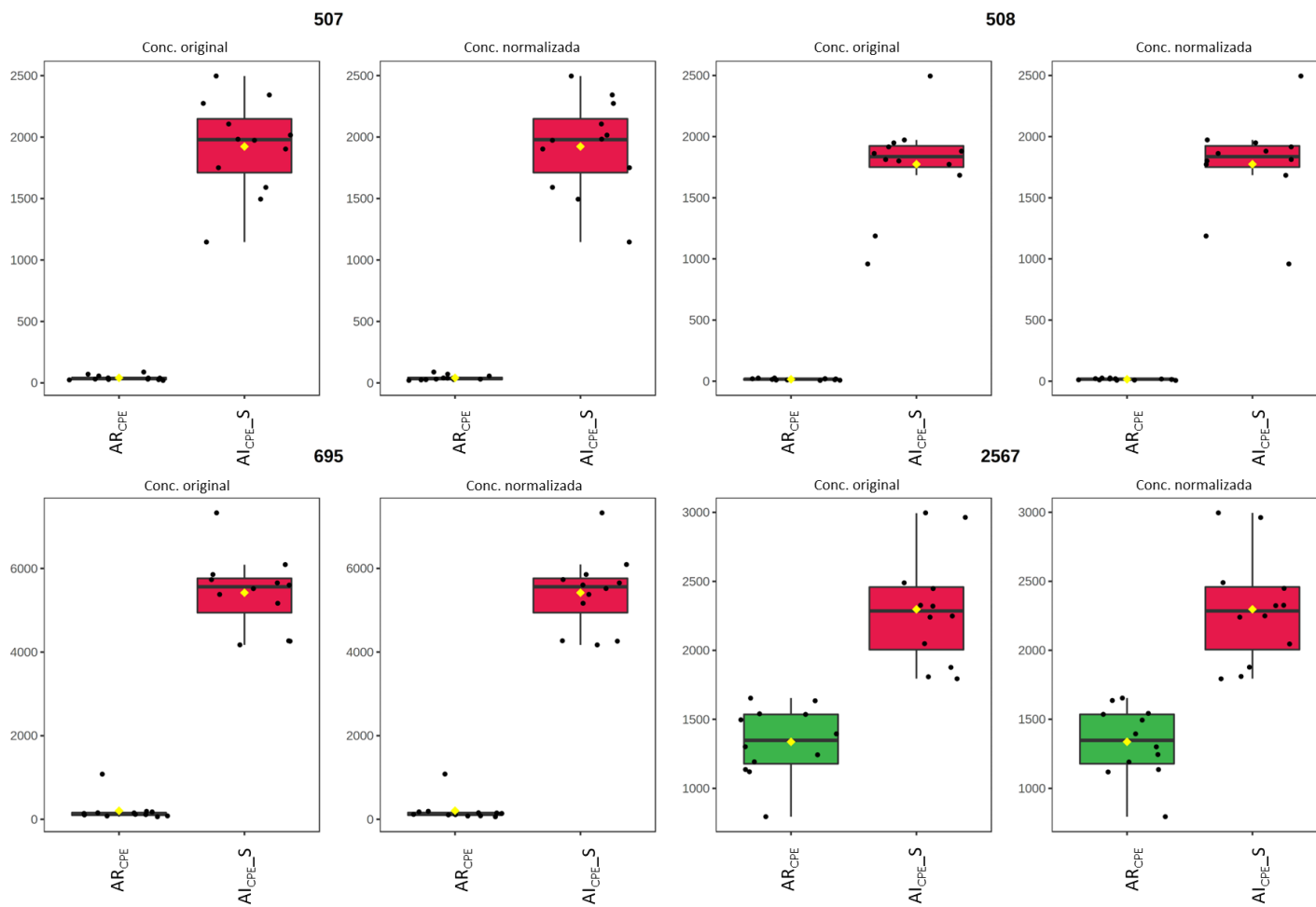


Figura B.1. Áreas de los componentes identificados (nombrados según su ID) en la columna de suelo (S)

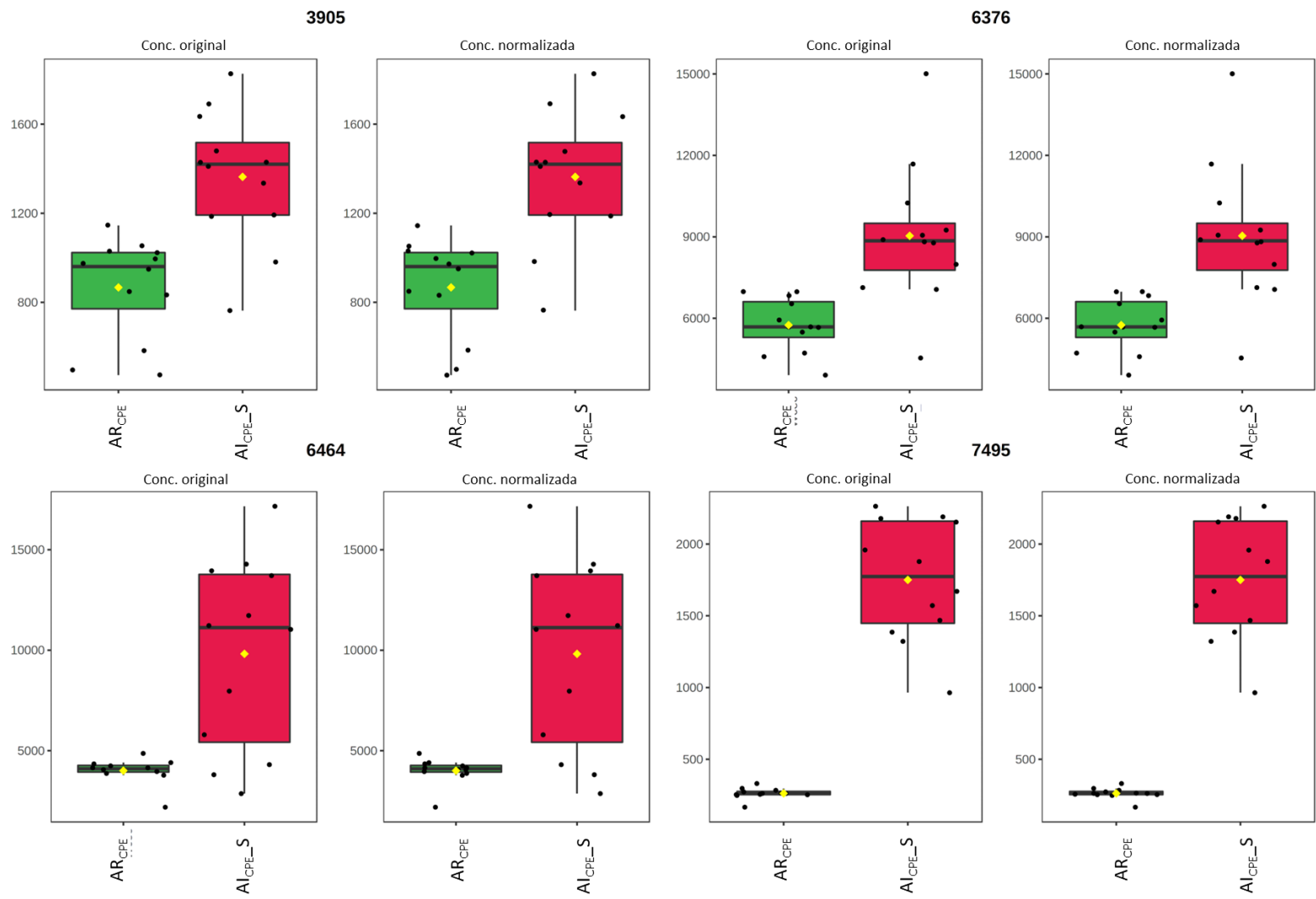


Figura B.1 (continuación). Áreas de los componentes identificados (nombrados según su ID) en la columna de suelo (S)



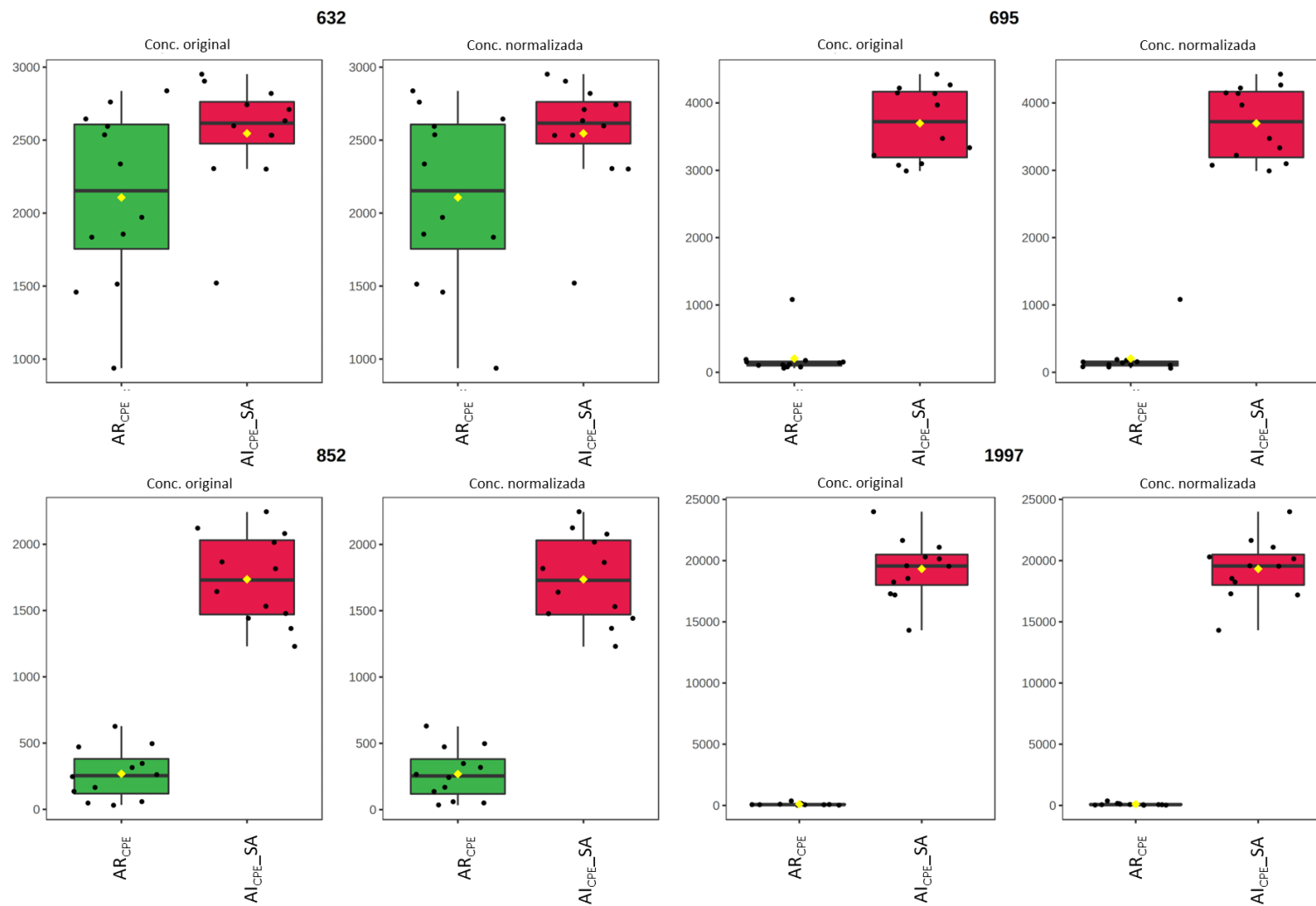


Figura B.2. Áreas de los componentes identificados (nombrados según su ID) en la columna de suelo con astillas (SA)

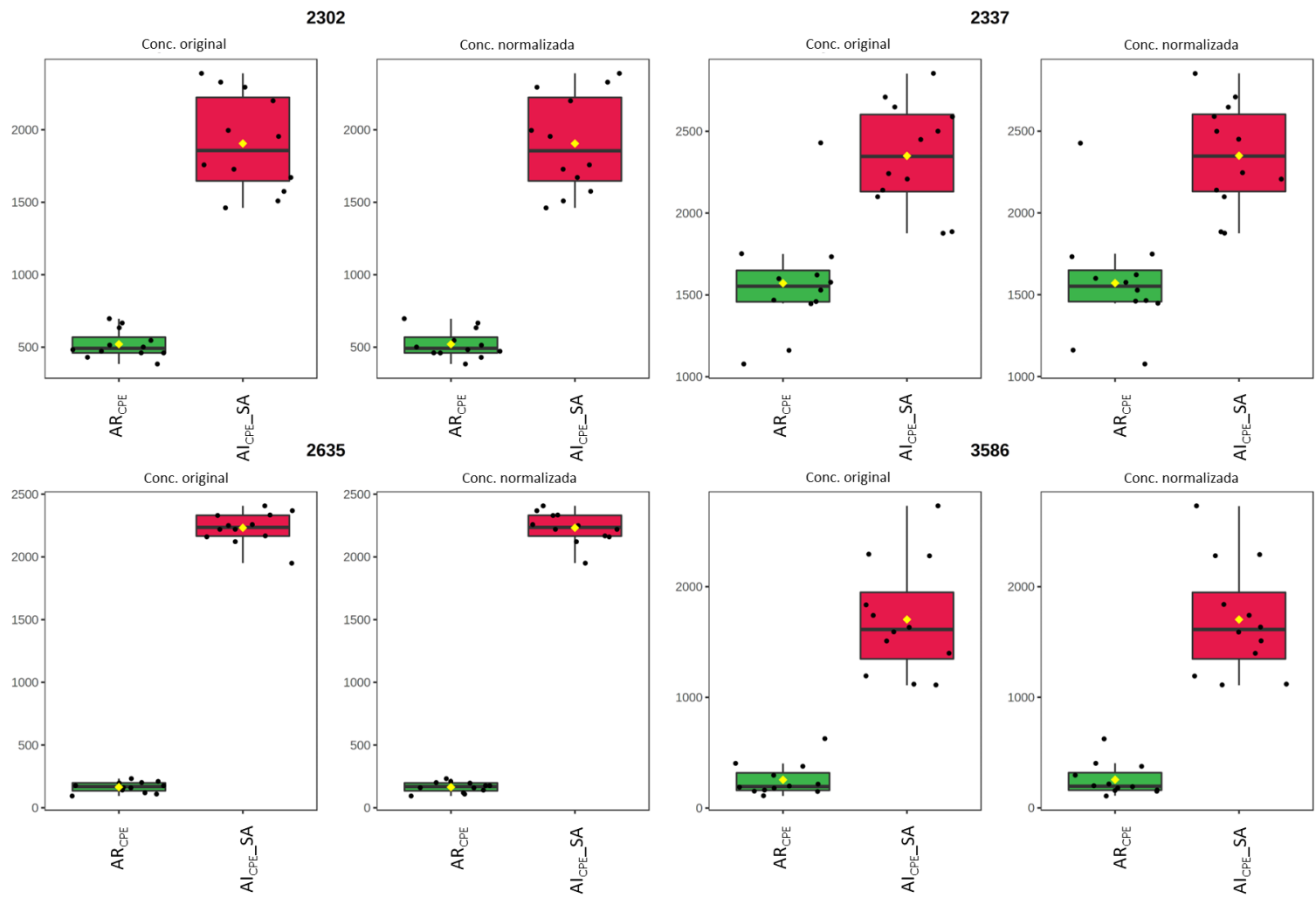


Figura B.2 (continuación). Áreas de los componentes identificados (nombrados según su ID) en la columna de suelo con astillas (SA)

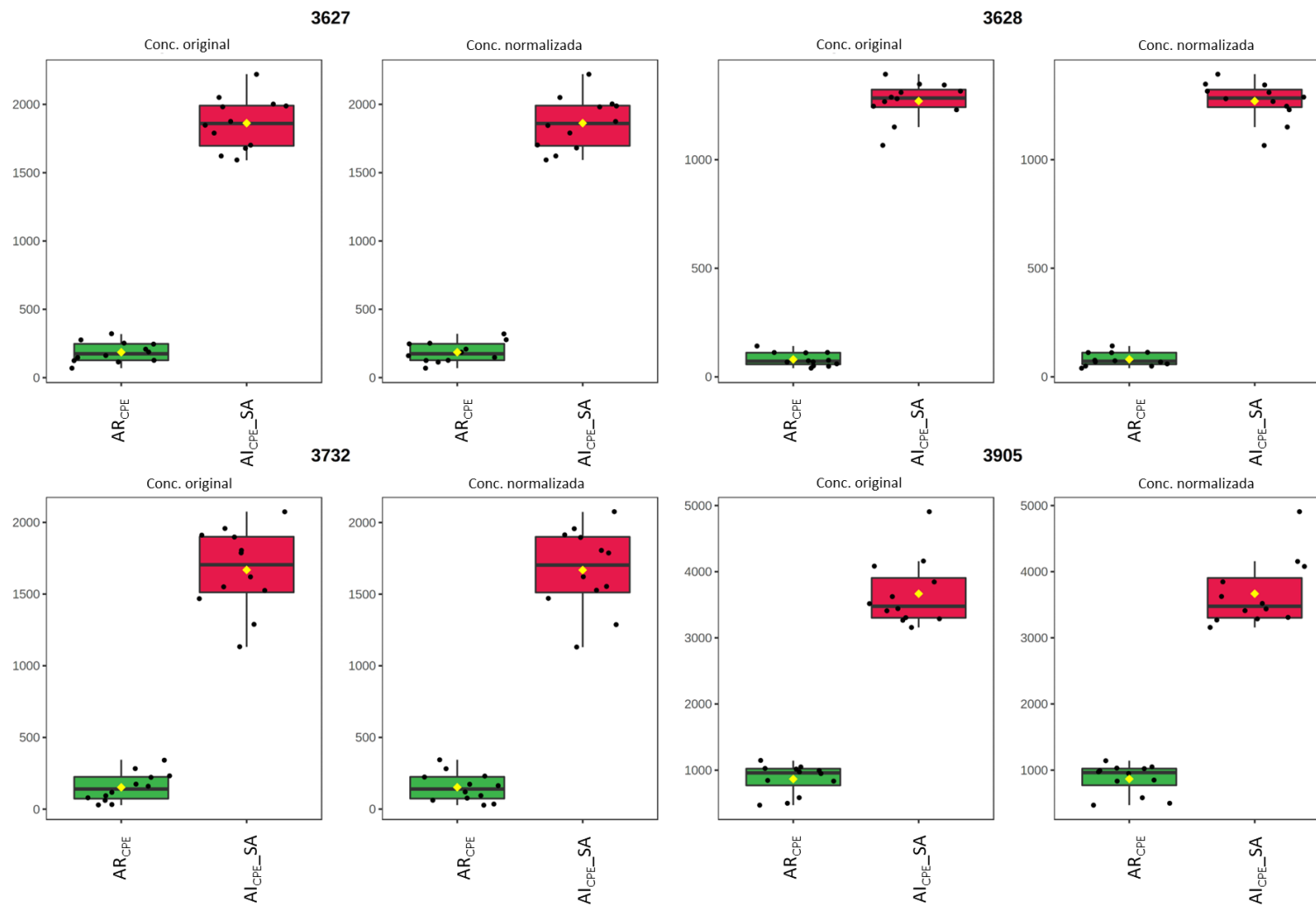


Figura B.2 (continuación). Áreas de los componentes identificados (nombrados según su ID) en la columna de suelo con astillas (SA)

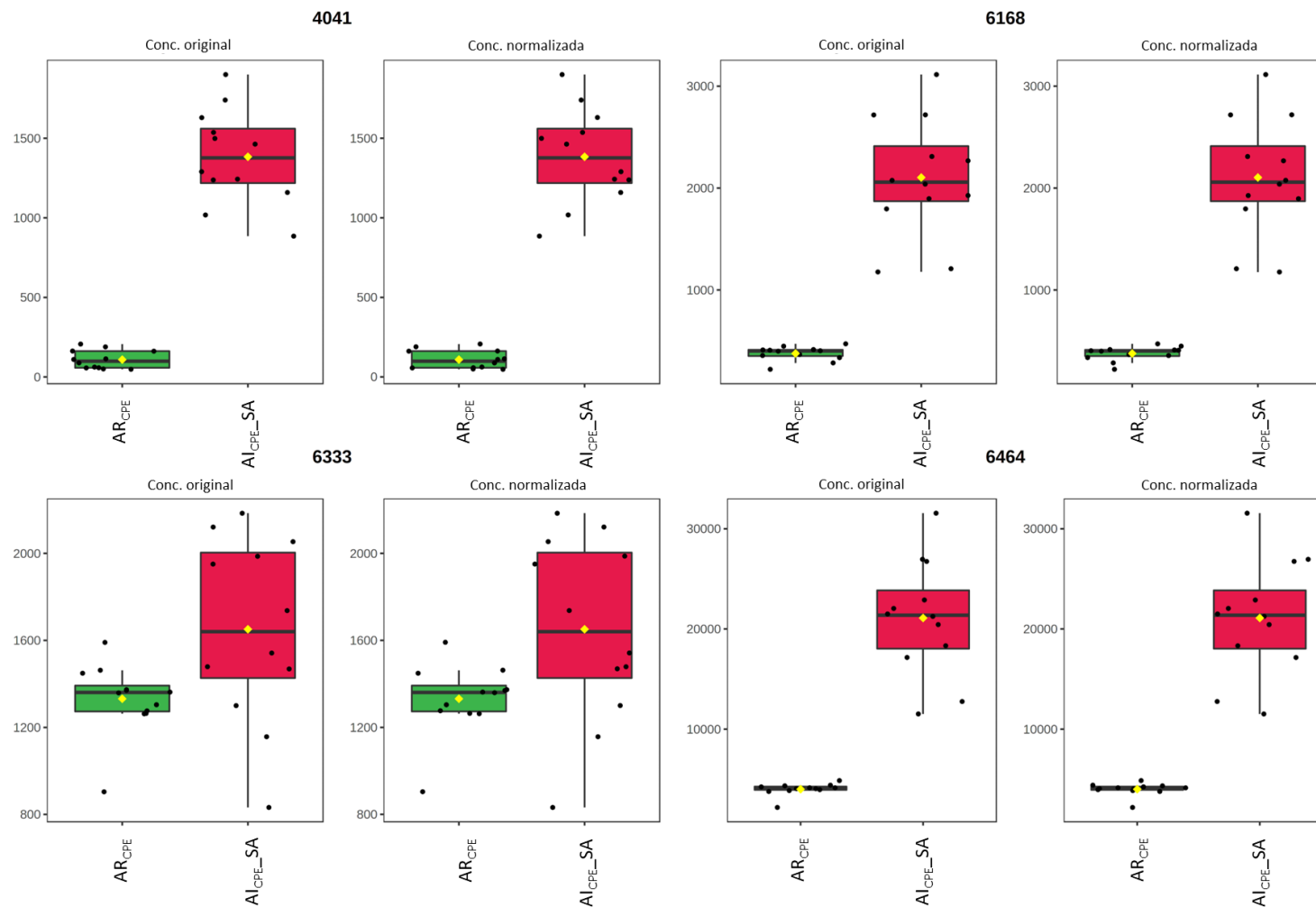


Figura B.2 (continuación). Áreas de los componentes identificados (nombrados según su ID) en la columna de suelo con astillas (SA)

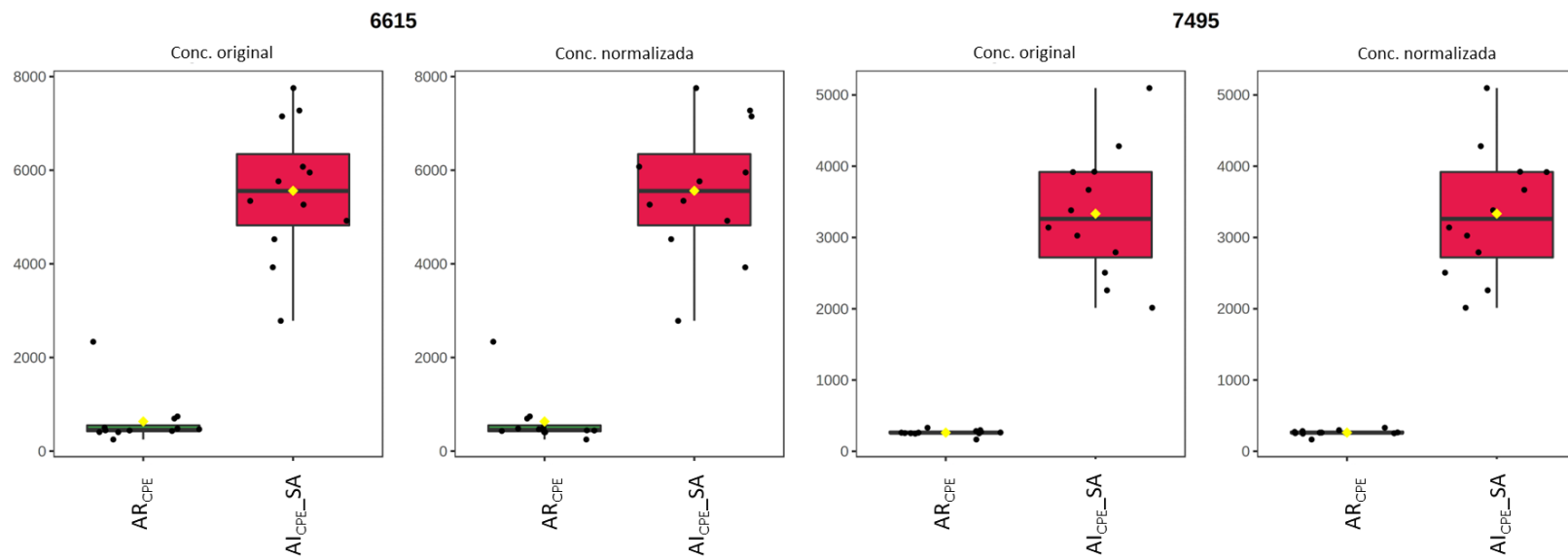


Figura B.2 (continuación). Áreas de los componentes identificados (nombrados según su ID) en la columna de suelo con astillas (SA)

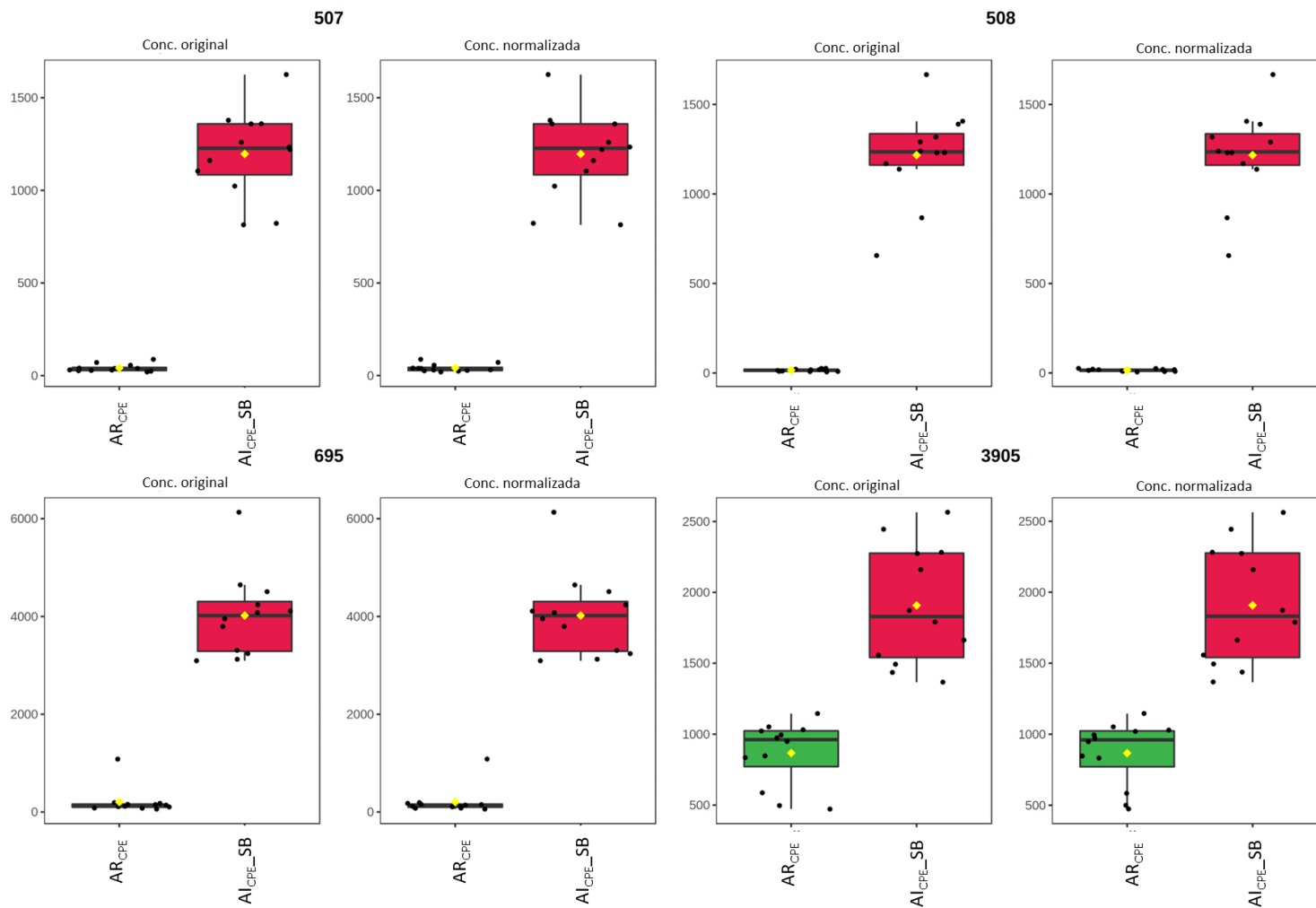


Figura B.3. Áreas de los componentes identificados (nombrados según su ID) en la columna de suelo con biochar (SB)

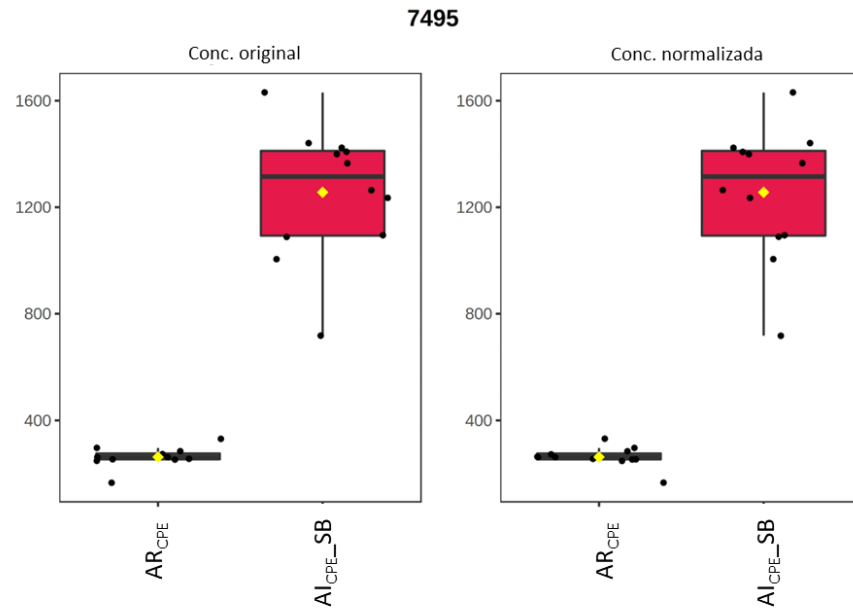


Figura B.3 (continuación). Áreas de los componentes identificados (nombrados según su ID) en la columna de suelo con biochar (SB)

**Anexo C:** Tabla con el rango de concentración (mínimo-máximo) en ng/L, mediana (med) en ng/L, y frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo considerando todos los datos sin dividir por periodos (desde el inicio del P1 hasta el final del P3).

CPE	AR		Al15		Al45		Pz9(ASarriba)		Pz7(ASarriba)		Pz11(ASabajo)	
	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.
4AA	N.D.-669 (8.5)	77	N.D.-53.1 (0.8)	73	N.D.-22.9 (1.3)	72	N.D.-0.3 (N.D.)	33	N.D.-0.1 (N.D.)	22	N.D.-0.4 (N.D.)	23
4AAA	1.6-16010 (90.4)	100	0.4-8135 (67.3)	100	0.1*-9577 (115)	100	0.03*-10.9 (0.2)	100	0.03*-0.5(0.08)	100	0.03*-12.7 (0.1)	100
4DAA	N.D.-2.0 (N.D.)	27	N.D.-0.1* (N.D.)	19	N.D.-0.1*	11	N.D.-0.03* (N.D.)	33	N.D.-0.03* (N.D.)	11	N.D.-0.03* (N.D.)	8
4FAA	N.D.-6940 (52.5)	96	2.8-3724 (62.4)	100	1.6-4623 (91.8)	100	N.D.-0.5 (0.1*)	92	N.D.-0.4 (0.1*)	67	0.03*-2.2 (0.07*)	77
ACE	N.D.-122282 (17420)	96	N.D.-34660 (1832)	88	N.D.-42230 (4374)	89	1.2-14.0 (4.1)	100	0.1*-9.8 (2.8)	100	0.6-72.0 (4.4)	100
AMO	N.D.-1361 (0.3*)	54	N.D.-1610 (0.3*)	54	N.D.-3134 (1.7)	50	N.D.-12.5 (N.D.)	17	N.D.-12.5 (N.D.)	11	N.D.-2.7 (N.D.)	4
ATE	N.D.-22.3 (0.4*)	92	N.D.-11.6 (0.6)	88	N.D.-4.0 (1.0)	89	N.D.-0.5 (0.1)	92	0.03*-0.3 (0.1)	100	N.D.-0.6 (0.2)	92
ATE AC	0.9-334 (83.2)	100	N.D.-340 (42.7)	96	0.1*-357 (34.8)	100	N.D.-0.3 (0.04*)	83	N.D.-0.1* (0.03*)	56	N.D.-1.6 (0.2)	92
ATOR	0.2-45.6 (5.6)	100	N.D.-15.0 (1.0*)	81	N.D.-4.1 (0.8*)	83	N.D.-1.0 (0.3)	83	N.D.-1.2 (0.2)	67	N.D.-3.2 (0.2)	58
CAF	1257-363025 (14534)	100	3-33129 (2113)	100	3-13216 (782)	100	10.9-702 (37.9)	100	10.9-559 (28.9)	100	10.1-704 (37.6)	100
CAR	N.D.-90.0 (0.6)	88	N.D.-22.2 (0.6)	88	N.D.-16.1 (0.9)	94	0.03*-3.6 (0.06)	100	N.D.-2.1 (0.03*)	67	N.D.-14.4 (0.03*)	81
CAREPOX	N.D.-5.0 (0.2*)	54	N.D.-9.4 (N.D.)	46	N.D.-4.4 (0.1*)	56	N.D.-0.2 (0.03*)	67	N.D.-0.2 (0.08)	89	N.D.-2.6 (0.03*)	62
CIT	3.6-639 (89.5)	100	0.2*-100 (4.6)	100	0.5*-19.8 (5.9)	100	N.D.-3.8 (0.8)	92	N.D.-1.0 (0.3)	89	N.D.-5.4 (0.2)	88
CLA	N.D.-292 (0.9)	92	N.D.-22.3 (4.3)	96	0.4-10.4 (2.1)	100	N.D.-0.4 (0.1)	75	N.D.-1 (0.03*)	56	N.D.-1.0 (0.06*)	85
COD	1.3-2967 (14.3)	100	N.D.-579 (1.5)	73	N.D.-766 (0.8)	67	N.D.-0.6 (0.1)	75	N.D.-1.2 (0.1)	67	N.D.-3.5 (0.1)	69
COT	371-5198 (1499)	100	4.6-1943 (312)	100	3.5-1635 (258)	100	0.6-26.6 (1.9)	100	0.7-28.0 (2.7)	100	0.3-15.3 (2.9)	100
DIC(**)	0.4*-235 (8.2)	100	N.D.-389 (10.0)	92	N.D.-187 (4.7)	89	N.D.-4.8 (0.3*)	80	N.D.-2.7 (0.3*)	71	N.D.-7.6 (0.3*)	74
E1	2.3-354 (88.7)	100	N.D.-78.3 (1.3)	85	N.D.-71.6 (1.6)	83	N.D.-0.5 (0.03*)	50	N.D.-1.4 (N.D.)	33	N.D.-59.6 (N.D.)	35
E2	N.D.-18.2 (4.1)	73	N.D.-1.3 (N.D.)	19	N.D.-1.3 (N.D.)	33	N.D.-0.3 (N.D.)	33	N.D.-1.7 (N.D.)	11	N.D.-0.3 (N.D.)	4

N.D.: No detectado

Número de muestras ( $n_{IRW}=26$ ,  $n_{INW15}=26$ ,  $n_{INW45}=18$ ,  $n_{Pz9}=12$ ,  $n_{Pz7}=9$ ,  $n_{Pz11}=26$ ).

\*Por debajo del MQL

(\*\*)Se descartaron algunos valores de DIC analizados en el P3 porque no cumplían con los criterios de validación metodológicos ( $n_{IRW}=20$ ,  $n_{INW15}=20$ ,  $n_{INW45}=14$ ,  $n_{Pz9}=10$ ,  $n_{Pz7}=7$ ,  $n_{Pz11}=20$ ).



**Anexo C (continuación):** Tabla con el rango de concentración (mínimo-máximo) en ng/L, mediana (med) en ng/L, y frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo considerando todos los datos sin dividir por periodos (desde el inicio del P1 hasta el final del P3).

CPE	AR		AI15		AI45		Pz9(AS <sub>arriba</sub> )		Pz7(AS <sub>arriba</sub> )		Pz11(AS <sub>abajo</sub> )	
	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.
ENA	N.D.-2110 (242)	81	N.D.-1030 (89.9)	54	N.D.-834 (37.7)	56	N.D.	0	N.D.	0	N.D.-0.3* (N.D.)	8
ERI	N.D.-35.1 (0.1*)	69	N.D.-2.9 (0.1*)	54	N.D.-143 (N.D.)	44	N.D.-78.0 (0.03*)	83	N.D.-36.9 (0.03*)	78	N.D.-44.7 (0.07)	88
ESTRIOL	N.D.-728 (19.7)	96	N.D.-222 (2.7)	62	N.D.-115 (1.875)	56	N.D.-0.3 (N.D.)	8	N.D.	0	N.D.-0.3 (N.D.)	8
ETINIL	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.-0.3 (N.D.)	11	N.D.	0
FLE	10.0-78.2 (18.0)	100	2.6-71.8 (25.0)	100	0.6*-42.6 (18.2)	100	0.5*-3.4 (2.0)	100	0.3*-2.1 (1.0)	100	0.03*-8.5 (1.7)	100
FURO	N.D.-51.5 (N.D.)	23	N.D.-24.3 (N.D.)	19	N.D.-48.6 (N.D.)	28	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
IBU	98.6-48576 (9181)	100	1.1*-25431 (4427)	100	22.8-24096 (2454)	100	0.6-11.2 (4.5)	100	0.1*-31.9 (8.6)	100	0.7-20.6 (5.5)	100
KET	N.D.-2237 (12.4)	92	N.D.-759 (3.3)	85	N.D.-1349 (2.8)	72	N.D.-2.5 (0.3)	83	N.D.-1.5 (0.2*)	67	N.D.-7.0 (0.3)	81
LORZ	N.D.-91.6 (7.0)	96	N.D.-74.6 (5.3)	88	N.D.-82.2 (3.5)	83	N.D.-0.4 (N.D.)	17	N.D.-0.3 (N.D.)	11	N.D.-3.8 (N.D.)	15
META	N.D.-35.4 (N.D.)	15	N.D.-53.1 (N.D.)	19	N.D.-27.6 (N.D.)	28	N.D.-0.3 (N.D.)	8	N.D.	0	N.D.	0
METFOR	5.8-25483 (102)	100	5.4-8100 (230)	100	4.7-6089 (131)	100	N.D.-323 (10.0)	67	N.D.-41.3 (6.9)	78	N.D.-200 (0.7)	69
N4ACE	N.D.-2.9 (N.D.)	8	N.D.-1.7 (N.D.)	8	N.D.-3.3 (N.D.)	11	N.D.-0.2 (N.D.)	25	N.D.-0.5 (N.D.)	22	N.D.-0.2 (N.D.)	19
NAP	33.9-27065 (3617)	100	N.D.-16748 (864)	96	N.D.-15208 (774)	83	N.D.-11.3 (N.D.)	42	N.D.	0	N.D.-21.9 (N.D.)	35
NIC	150-3085 (803)	100	6.0-4572 (106)	100	N.D.-993 (77.1)	94	5.4-48.7 (16.8)	100	6.4-37.1 (14.0)	100	6.4-95.6 (18.6)	100
OFLO	N.D.-24756 (19.4)	92	N.D.-195 (7.4)	88	N.D.-400 (6.8)	83	1.1*-22.2 (2.5*)	100	1.5*-6.7 (2.5*)	100	0.5*-432 (2.5*)	100
OME	0.1*-9.5 (2.0)	100	N.D.-11.4 (0.7)	77	N.D.-9.9 (0.6*)	89	0.1*-5.2 (0.3)	100	0.1*-4.0 (0.3)	100	N.D.-2.8 (0.2)	96
PAR	1803-36582 (6237)	100	3.3-8438 (494)	100	0.6*-3750 (161)	100	1.2-31.3 (5.3)	100	0.3*-7.6 (2.3)	100	1.2-40.0 (7.7)	100
SUL	N.D.-3.0 (0.1)	50	N.D.-1.4 (N.D.)	35	N.D.-1.4 (N.D.)	28	N.D.-4.0 (N.D.)	42	N.D.-2.0 (N.D.)	44	N.D.-1.9 (0.03*)	65
TES	N.D.-90.6 (6.0)	88	N.D.-30.3 (N.D.)	42	N.D.-13.1 (N.D.)	33	N.D.-1.1 (N.D.)	33	N.D.-0.3* (N.D.)	22	N.D.-2.9 (N.D.)	27
VEN	1.0*-64.8 (9.6)	100	0.5*-44.5 (17.7)	100	0.3*-41.5 (15.8)	100	N.D.-9.2 (1.3)	83	N.D.-2.5 (10.9)	78	N.D.-42.2 (1.1)	88

N.D.: No detectado

Número de muestras ( $n_{IRW}=26$ ,  $n_{INW15}=26$ ,  $n_{INW45}=18$ ,  $n_{Pz9}=12$ ,  $n_{Pz7}=9$ ,  $n_{Pz11}=26$ ).

\*Por debajo del MQL

**Anexo D:** Tabla con el rango de concentración (mínimo-máximo) en ng/L, mediana (med) en ng/L, y frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo durante el P1.

CPE	AR_P1		Al15_P1		Al45_P1		Pz9(ASarriba)_P1		Pz7(ASarriba)_P1		Pz11(ASabajo)_P1	
	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.
4AA	N.D.-322 (10.8)	80	0-53.1 (0.9)	60	0.25*-22.9 (4.4)	100	N.D.-0.1 (0.04*)	50	N.D.-0.08 (N.D.)	33	N.D.-0.08 (N.D.)	20
4AAA	1.59-7031 (90.4)	100	3.13-4968 (151)	100	41.0-4755 (3172)	100	0.03*-10.9 (0.05*)	100	0.03*-0.061 (0.06*)	100	0.03*-12.7 (0.11)	100
4DAA	N.D.-0.85 (N.D.)	40	N.D.-0.1* (N.D.)	10	N.D.	0	N.D.-0.03* (0.01*)	50	N.D.-0.03* (N.D.)	33	N.D.-0.03* (N.D.)	10
4FAA	N.D.-2421 (37.4)	90	4.34-2117 (62.4)	100	33.8-2032 (1226)	100	0.03*-0.07 (0.05*)	100	N.D.-0.06 (N.D.)	33	N.D.-0.6 (0.03*)	60
ACE	1219-103035 (29389)	100	2402-34660 (17754)	100	5175-42230 (13081)	100	2.06-5.56 (4.14)	100	0.13*-4.54 (1.68)	100	0.63-8.36 (1.96)	100
AMO	N.D.-678 (0.65*)	60	N.D.-1610 (43.6)	80	3.32-788 (35.2)	100	N.D.-0.27 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.	0
ATE	0.1*-22.3 (0.56)	100	0.1*-11.6 (0.6)	100	0.1*-3.97 (0.75)	100	0.09-0.46 (0.11)	100	0.09-0.15 (0.14)	100	N.D.-0.32 (0.12)	90
ATE AC	40.5-334 (102)	100	33.2-222 (135)	100	34.1-174 (117)	100	0.03*-0.09* (0.04*)	100	0.03*-0.13* (0.06*)	100	0.224-1.63 (0.58)	100
ATOR	0.3*-45.6 (4.69)	100	0.5*-14.9 (3.15)	100	0.5*-4.1 (2.3)	100	N.D.-0.3 (0.225)	75	N.D.-0.3 (N.D.)	33	N.D.-1.7 (N.D.)	40
CAF	8829-363025 (41151)	100	5167-33129 (10972) <sup>a</sup>	100	3976-13216 (6542) <sup>a</sup>	100	12.1-58.8 (24.8)	100	10.9-30.1 (15.5)	100	12.4-41 (25.1)	100
CAR	N.D.-0.46 (0.15*)	80	N.D.-0.63 (0.19*)	80	0.27-0.52 (0.42) <sup>a</sup>	100	0.03* -3.6 (0.91)	100	0.03*-2.08 (0.03*)	100	N.D.-14.4 (0.03*)	70
CAREPOX	N.D.	0	N.D.	0	N.D.-0.62 (N.D.)	40	N.D.-0.03* (N.D.)	25	0.03*-0.03* (0.03*)	100	N.D.-0.03* (N.D.)	20
CIT	24.9-338 (136)	100	0.21-100 (14.4) <sup>a</sup>	100	6.60-11.8 (7.61) <sup>a</sup>	100	0.19-2.23 (1.07)	100	0.03*-0.54 (0.03*)	100	N.D.-0.65 (0.1)	90
CLA	0.1*-292 (2.39)	100	N.D.-22.3 (8.56)	90	0.41-7.05 (0.80)	100	0.03*-0.2 (0.13)	100	N.D.-0.2 (0.03*)	67	N.D.-0.33 (0.06*)	90
COD	10.6-2967 (42.2)	100	1.61-579 (22.8)	100	5.88-766 (11.5)	100	N.D.-0.57 (0.12)	75	N.D.-1.22 (0.07)	67	N.D.-3.49 (0.14)	70
COT	976-5198 (2057)	100	697-1810 (1448) <sup>a</sup>	100	487-1599 (842) <sup>a</sup>	100	1.31-2.83 (2.19)	100	1.11-2.47 (1.75)	100	1.10-4.43 (2.76)	100
DIC	1.0*-235 (6.24)	100	1.0*-149 (3.38)	100	1.0*-95.8 (4.16)	100	0.13*-4.84 (0.91)	100	0.13*-2.69 (0.25*)	100	N.D.-7.6 (0.25*)	80
E1	50.9-160 (122)	100	1.3-78.3 (43.2) <sup>a</sup>	100	10.2-71.6 (37.9) <sup>a</sup>	100	N.D.-0.05* (N.D.)	25	N.D.-0.05* (N.D.)	33	N.D.-0.40 (N.D.)	20
E2	N.D.-10.6 (4.93)	90	N.D.-0.65 (N.D.) <sup>a</sup>	10	N.D.-0.5 (N.D.) <sup>a</sup>	40	N.D.	0	N.D.-1.67 (N.D.)	33	N.D.	0

N.D.: No detectado

Número de muestras (n<sub>IRW</sub>=10, n<sub>INW15</sub>=10, n<sub>INW45</sub>=5, n<sub>Pz9</sub>=4, n<sub>Pz7</sub>=3, n<sub>Pz11</sub>=10).

\* Por debajo del MQL

<sup>a</sup>Significativamente distinta de la concentración en el agua de riego

**Anexo D (continuación):** Tabla con el rango de concentración (mínimo-máximo) en ng/L, mediana (med) en ng/L, y frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo durante el P1.

CPE	AR_P1		Al15_P1		Al45_P1		Pz9(ASarriba)_P1		Pz7(ASarriba)_P1		Pz11(ASabajo)_P1	
	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.
ENA	N.D.-1501 (659)	90	N.D.-1030 (545)	90	9.88-834 (266)	100	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
ERI	N.D.-25.8 (0.1*)	90	0-1.25 (0.2*)	80	0.1-143 (0.3*)	100	0.03*-78.0 (10.6)	100	0.03*-36.9 (0.03*)	100	0.03*-44.7 (0.06)	100
ESTRIOL	N.D.-355 (30.3)	90	2.51-222 (11.7)	100	4.61-115 (46.4)	100	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
ETINIL	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
FLE	1.0*-27.8 (13.8)	100	6.8-71.8 (30.9) <sup>a</sup>	100	9.35-42.6 (18.6)	100	0.75-3.42 (2.6)	100	0.25*-1.98 (0.75)	100	0.03*-4.64 (1.19)	100
FURO	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
IBU	4498-28798 (16548)	100	4955-21970 (9153)	100	2832-15415 (6218)	100	0.64-10.8 (6.62)	100	0.14*-9.85 (3.26)	100	0.68-12.7 (4.76)	100
KET	N.D.-978 (8.52)	90	N.D.-325 (11.2)	90	1.61-25.2 (5.18)	100	0.25*-2.52 (0.81)	100	N.D.-1.53 (0.25*)	67	N.D.-5.4 (0.13*)	70
LORZ	1.67-57.0 (16.5)	100	N.D.-19.9 (9.32)	90	N.D.-8.12 (2.47) <sup>a</sup>	80	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
META	N.D.	0	N.D.	0	N.D.-1.0 (N.D.)	20	N.D.-0.31 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.	0
METFOR	20.4-19000 (209)	100	38.7-4726 (461)	100	85.6-3103 (88.9)	100	N.D.-24.4 (4.16)	75	N.D.-1.25 (0.03*)	67	N.D.-1.25 (0.13)	80
N4ACE	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
NAP	652-19025 (7238)	100	405-13700 (4856)	100	970-12770 (3901)	100	0-3.88 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.-10.4 (N.D.)	10
NIC	300-3085 (1053)	100	80.4-1081 (213) <sup>a</sup>	100	1.0-396 (87) <sup>a</sup>	100	7.84-36.0 (15.1)	100	21.1-37.1 (35.2)	100	7.51-26.3 (14.9)	100
OFLO	N.D.-24756 (10)	80	N.D.-195 (8.41)	70	N.D.-265 (N.D.)	40	2.5*-22.2 (4.29*)	100	2.5*-6.7 (2.5*)	100	0.48*-5.01 (2.5*)	100
OME	0.52*-4.36 (1.54)	100	N.D.-11.4 (1.85)	90	0.7*-5.05 (1.56)	100	0.15*-1.04 (0.21)	100	0.12*-1.23 (0.48)	100	0.03*-1.04 (0.22)	100
PAR	5286-36582 (11259)	100	829-8438 (3753) <sup>a</sup>	100	896-3750 (3083) <sup>a</sup>	100	1.57-5.44 (4.36)	100	0.80-6.37 (4.89)	100	1.26-10.3 (3.3)	100
SUL	N.D.-2.99 (N.D.)	30	N.D.-0.97 (N.D.)	40	N.D.-0.92 (N.D.)	40	N.D.-4.04 (0.63)	50	N.D.-2.05 (0.03*)	67	0-1.88 (0.03*)	80
TES	1.0*-90.6 (12.6)	100	0.25*-30.3 (12.0)	100	4.97-12.7 (8.76)	100	N.D.-0.65* (0.13*)	50	N.D.-0.25* (0.25*)	67	N.D.-0.25* (N.D.)	30
VEN	1.0*-64.8 (22.7)	100	0.5*-44.5 (6.67)	100	0.5*-12.1 (4.96)	100	N.D.-1.77 (0.74)	50	N.D.-0.25* (N.D.)	33	N.D.-2.72 (0.3*)	70

N.D.: No detectado

Número de muestras (n<sub>IRW</sub>=10, n<sub>INW15</sub>=10, n<sub>INW45</sub>=5, n<sub>Pz9</sub>=4, n<sub>Pz7</sub>=3, n<sub>Pz11</sub>=10).

\* Por debajo del MQL

<sup>a</sup>Significativamente distinta de la concentración en el agua de riego

**Anexo E:** Tabla con el rango de concentración (mínimo-máximo) en ng/L, mediana (med) en ng/L, y frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo durante el P2.

CPE	AR_P2		Al15_P2		Al45_P2		Pz9(ASarriba)_P2		Pz7(ASarriba)_P2		Pz11(ASabajo)_P2	
	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.
4AA	8.55-669 (204)	100	1.22-11.8 (11.5) <sup>a</sup>	100	1.03-14.9 (11.5) <sup>a</sup>	100	N.D.-0.33 (N.D.)	25	N.D.-0.15 (N.D.)	33	0-0.42 (0.03*)	50
4AAA	61.5-16010 (3973)	100	57.5-8135 (2105)	100	86.2-9577 (1748)	100	0.11-0.76 (0.15)	100	0.03*-0.09 (0.08)	100	0.03*-0.56 (0.06*)	100
4DAA	N.D.-2.0 (N.D.)	33	N.D.	0	N.D.-0.1* (N.D.)	17	N.D.-0.03* (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.	0
4FAA	54.1-6940 (1289)	100	97.5-3724 (681.5)	100	94.9-4623 (709.5)	100	N.D.-0.51 (0.18)	75	N.D.-0.17 (0.13*)	67	N.D.-0.79 (0.33)	83
ACE	N.D.-122282 (44248)	83	N.D.-17283 (4428) <sup>a</sup>	83	N.D.-15006 (7866) <sup>a</sup>	83	1.16-4.94 (4.07)	100	0.5-3.16 (3.03)	100	1.01-8.07 (2.73)	100
AMO	N.D.-1361 (8.8)	83	N.D.-1567 (127)	83	N.D.-3134 (51.4)	67	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
ATE	0.42-21.5 (2.78)	100	N.D.-3.46 (1.10)	83	0.50-3.49 (2.78)	100	0.03*-0.11 (0.10)	100	0.03*-0.1 (0.1)	100	0.10-0.57 (0.44)	100
ATE AC	0.94-333 (93.3)	100	1.32-340 (108)	100	3.48-357 (177)	100	N.D.-0.29 (0.06*)	75	N.D.-0.07* (N.D.)	33	0.03*-0.25 (0.03*)	100
ATOR	0.81*-9.76 (2.39)	100	N.D.-4.15 (0.38*)	50	N.D.-0.81* (0.76*)	67	N.D.-0.96 (0.23)	75	N.D.-0.3 (0.3)	67	N.D.-1.77 (N.D.)	17
CAF	1257-67909 (38867)	100	109-3651 (2113) <sup>a</sup>	100	155-2756 (1003) <sup>a</sup>	100	10.9-101 (60.6)	100	11.5-28.9 (14.3)	100	10.1-89.5 (29.5)	100
CAR	N.D.-90 (0.89)	83	N.D.-22.2 (2.77)	83	N.D.-16.1 (1.82)	83	0.03-0.11 (0.06)	100	N.D.-0.1 (0.08)	67	N.D.-0.16 (0.03*)	83
CAREPOX	N.D.-5.0 (1.93)	83	N.D.-3.0 (0.26)	50	N.D.-0.58 (N.D.) <sup>a</sup>	17	N.D.-0.17 (0.08)	75	N.D.-0.1 (0.1)	67	N.D.-0.75 (0.07*)	67
CIT	26-639 (154)	100	3.44-11.2 (6.50) <sup>a</sup>	100	4.09-19.8 (6.34) <sup>a</sup>	100	N.D.-0.95 (0.40)	75	N.D.-1.02 (1.02)	67	N.D.-0.39 (0.09)	67
CLA	0.95-10.4 (10.4)	100	4.23-20.7 (10.4)	100	3.17-10.4 (10.4)	100	N.D.-0.41 (0.08)	75	N.D.-1.0 (0.09)	67	0.03*-0.43 (0.03*)	100
COD	3.99-241 (9.16)	100	N.D.-280 (1.62)	83	N.D.-3.01 (1.14) <sup>a</sup>	83	N.D.-0.42 (0.11)	75	N.D.-0.63 (N.D.)	33	N.D.-2.30 (0.08)	67
COT	530-5140 (3427)	100	52.5-1943 (312) <sup>a</sup>	100	15.6-1635 (400) <sup>a</sup>	100	0.63-26.6 (3.52)	100	0.73-6.90 (6.28)	100	0.34-4.96 (1.53)	100
DIC	3.4-73.3 (14.6)	100	3.16-42.5 (8.78)	100	3.57-41.5 (10.7)	100	N.D.-1.15 (0.25*)	75	N.D.-2.33 (0.25*)	67	0.25-0.751 (0.25*)	100
E1	38.9-354 (123)	100	0.35*-26.1 (1.72) <sup>a</sup>	100	1.01-17.3 (3.34) <sup>a</sup>	100	N.D.-0.26 (0.06*)	50	N.D.-1.39 (N.D.)	33	N.D.-59.6 (N.D.)	33
E2	N.D.-18.2 (3.22)	83	N.D.-1.25 (N.D.)	33	N.D.-1.34 (0.16)	50	N.D.-0.25 (0.04*)	50	N.D.	0	N.D.	0

N.D.: No detectado

Número de muestras (n<sub>IRW</sub>=6, n<sub>INW15</sub>=6, n<sub>INW45</sub>=6, n<sub>Pz9</sub>=4, n<sub>Pz7</sub>=3, n<sub>Pz11</sub>=6).

\* Por debajo del MQL

<sup>a</sup>Significativamente distinta de la concentración en el agua de riego

**Anexo E (continuación):** Tabla con el rango de concentración (mínimo-máximo) en ng/L, mediana (med) en ng/L, y frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo durante el P2.

	AR_P2		Al15_P2		Al45_P2		Pz9(ASarriba)_P2		Pz7(ASarriba)_P2		Pz11(ASabajo)_P2	
ENA	1.0*-2110 (1330)	100	N.D.-803 (206) <sup>a</sup>	83	N.D.-695 (250) <sup>a</sup>	83	N.D.	0	N.D.	0	N.D.-0.25* (N.D.)	33
ERI	N.D.-35.1 (0.87)	67	N.D.-2.86 (0.1*)	83	N.D.-2.36 (N.D.)	33	N.D.-0.75 (0.15)	75	N.D.-0.53 (0.1)	67	0.03*-3.53 (0.44)	100
ESTRIOL	1.66-728 (274)	100	N.D.-11.8 (1.43) <sup>a</sup>	50	N.D.-32.1 (1.38) <sup>a</sup>	50	N.D.-0.25 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.-0.25 (N.D.)	17
ETINIL	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
FLE	18.7-78.2 (24.2)	100	18.8-37.3 (27.4)	100	17.0-27.4 (19.6)	100	0.55*-2.99 (2.03)	100	1.0-2.13 (1.0)	100	0.55*-8.49 (2.19)	100
FURO	N.D.-51.5 (9.19)	83	N.D.-24.3 (14.4)	67	N.D.-41.0 (10.6)	67	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
IBU	98.6-48576 (22376)	100	55.2-25431 (6397)	100	57.4-24096 (7210)	100	3.1-11.2 (4.82)	100	2.83-9.44 (8.80)	100	2.3-12.6 (3.64)	100
KET	3.8-2237 (858)	100	0.5-759 (473)	100	0.5*-1349 (431)	100	N.D.-0.91 (0.36)	75	N.D.-0.91 (0.91)	67	N.D.-7.0 (0.3*)	83
LORZ	0.2*-91.6 (27.5)	100	7.3-74.6 (9.6)	100	4.45-82.2 (9.77)	100	N.D.-0.45 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.	0
META	N.D.-35.4 (9.13)	67	N.D.-53.1 (28.0)	67	N.D.-27.6 (24.2)	67	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
METFOR	16.8-25483 (5339)	100	26.1-8100 (3976.5)	100	71-6089 (2160)	100	N.D.-15.7 (N.D.)	25	N.D.-11.48 (6.9)	67	N.D.	0
N4ACE	N.D.-2.92 (N.D.)	17	N.D.-1.63 (N.D.)	17	N.D.	0	N.D.-0.2 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.	0
NAP	53.8-27065 (11962)	100	36.9-16748 (5536)	100	32.2-15208 (6369)	100	N.D.-9.61 (2.46)	75	N.D.	0	N.D.-4.5 (1.83)	83
NIC	578-2693 (2200)	100	32.9-4572 (104)	100	0.5*-993 (79.5) <sup>a</sup>	100	12.5-19.0 (16.4)	100	6.43-12.0 (9.39)	100	9.53-29.3 (21.9)	100
OFLO	20.2-262 (57.7)	100	3.67*-29.9 (5.51) <sup>a</sup>	100	3.67*-40.8 (10.3) <sup>a</sup>	100	1.14-2.59 (2.39*)	100	2.13*-3.03* (2.16*)	100	1.14*-4.92* (1.51*)	100
OME	1.53-5.73 (3.45)	100	N.D.-1.36 (0.59*) <sup>a</sup>	67	N.D.-1.96 (0.88) <sup>a</sup>	83	0.08*-0.64 (0.30)	100	0.08*-4.07 (0.3)	100	0.08*-0.67 (0.08)	100
PAR	1803-20077 (12125)	100	32.5-1408 (494) <sup>a</sup>	100	37.5-1189 (267) <sup>a</sup>	100	1.62-31.3 (7.55)	100	0.25*-1.62 (1.62)	100	2.48-40.0 (12.7)	100
SUL	N.D.-1.49 (N.D.)	33	N.D.-0.63 (N.D.)	17	N.D.-0.33 (N.D.)	17	N.D.-0.38 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.-0.35 (0.02*)	50
TES	1.0*-37.2 (6.0)	100	N.D.-15.7 (N.D.)	17	N.D.-13.1 (N.D.)	17	N.D.-1.09 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.	0
VEN	7.16-46.4 (15.1)	100	17.4-33.9 (22.7)	100	15.3-24.5 (19.5)	100	0.64*-9.19 (3.52)	100	0.5*-1.7 (0.9)	100	0.39*-4.33 (1.10)	100

N.D.: No detectado

Número de muestras (n<sub>IRW</sub>=6, n<sub>INW15</sub>=6, n<sub>INW45</sub>=6, n<sub>Pz9</sub>=4, n<sub>Pz7</sub>=3, n<sub>Pz11</sub>=6).

\* Por debajo del MQL

<sup>a</sup>Significativamente distinta de la concentración en el agua de riego

**Anexo F:** Tabla con el rango de concentración (mínimo-máximo) en ng/L, mediana (med) en ng/L, y frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo durante el P3.

CPE	AR_P3		Al15_P3		Al45_P3		Pz9(AS <sub>arriba</sub> )_P3		Pz7(AS <sub>arriba</sub> )_P3		Pz11(AS <sub>abajo</sub> )_P3	
	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.
4AA	N.D.-47.6 (1.23)	60	N.D.-2.83 (0.12*)	70	N.D.-1.11 (N.D.)	29	N.D.-0.24 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.-0.33 (N.D.)	10
4AAA	1.89-432 (38.2)	100	0.38-177 (3.76)	100	0.1*-4.28 (2.33)	100	0.11-0.31 (0.21)	100	0.19-0.48 (0.22)	100	0.03*-4.06 (0.16)	100
4DAA	N.D.-0.1* (N.D.)	10	N.D.-0.1* (N.D.)	40	N.D.-0.1* (N.D.)	14	N.D.-0.03* (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.-0.03* (N.D.)	10
4FAA	2.31-172 (24.7)	100	2.76-415 (10.5)	100	1.61-15.7 (4.14)	100	0.05*-0.173 (0.08*)	100	0.16-0.35 (0.18)	100	N.D.-2.21 (0.15*)	90
ACE	6.0-22692 (9717)	100	N.D.-383 (14.3) <sup>a</sup>	80	N.D.-741 (84.5) <sup>a</sup>	86	1.64-14.0 (4.10)	100	0.75-9.79 (2.80)	100	2.86-72.0 (12.0)	100
AMO	N.D.-13.1 (N.D.)	30	N.D.-0.3* (N.D.)	10	N.D.	0	N.D.-12.5 (N.D.)	25	N.D.-12.5 (N.D.)	33	N.D.-2.747 (N.D.)	10
ATE	N.D.-0.89 (0.24)	80	N.D.-2.16 (0.48)	80	N.D.-3.50 (0.27)	71	N.D.-0.20 (0.11)	75	0.10-0.26 (0.25)	100	N.D.-0.32 (0.15)	90
ATE AC	1.35-149 (30.6)	100	N.D.-29.9 (4.11) <sup>a</sup>	90	0.1*-6.56 (4.67) <sup>a</sup>	100	N.D.-0.08* (0.05*)	75	N.D.-0.08* (N.D.)	33	N.D.-0.29 (0.08*)	80
ATOR	0.20*-34.0 (18.1)	100	N.D.-5.47 (0.68*) <sup>a</sup>	80	N.D.-0.98* (0.5*) <sup>a</sup>	86	0.19*-0.67 (0.33)	100	0.19*-1.22 (0.19*)	100	0.17*-3.24 (0.36)	100
CAF	2789-10150 (5348)	100	3.0*-289 (34.6) <sup>a</sup>	100	3.0*-217 (44.9) <sup>a</sup>	100	11.7-702 (96.9)	100	115-559 (202)	100	13.7-704 (112)	100
CAR	0.42-2.17 (0.88)	100	0.42-5.09 (1.0)	100	0.62-3.08 (1.0)	100	0.03*-1.12 (0.14)	100	N.D.-0.25 (N.D.)	33	N.D.-0.25 (0.114)	90
CAREPOX	N.D.-2.28 (0.38)	90	N.D.-9.39 (0.33)	90	0.1-4.43 (0.63)	100	0.03*-0.15 (0.06*)	100	0.08-0.19 (0.10)	100	0.03*-2.55 (0.19)	100
CIT	3.65-117 (13.5)	100	0.5*-4.29 (2.76) <sup>a</sup>	100	0.5*-6.85 (4.03) <sup>a</sup>	100	0.63-3.76 (1.00)	100	0.13-1.02 (0.59)	100	0.19-5.44 (1.02)	100
CLA	N.D.-2.6 (0.54)	80	0.95-4.1135 (2.85) <sup>a</sup>	100	0.38-2.24 (0.95) <sup>b</sup>	100	N.D.-0.13 (0.03*)	50	N.D.-1.0 (N.D.)	33	N.D.-1.0 (0.07*)	70
COD	1.30-83.5 (8.43)	100	N.D.-0.63 (N.D.) <sup>a</sup>	40	N.D.-0.5 (N.D.) <sup>a</sup>	29	N.D.-0.20 (0.08)	75	0.10-0.19 (0.18)	100	N.D.-0.86 (0.07)	70
COT	371-1261 (740)	100	4.56-53.2 (24.3) <sup>a</sup>	100	3.51-37.7 (13.6) <sup>a</sup>	100	0.70-4.55 (1.90)	100	2.66-27.9 (6.26)	100	1.20-15.3 (6.65)	100
DIC(**)	0.42*-12.3 (4.1)	100	N.D.-6.8 (0.5*)	50	N.D.-1.0* (N.D.)	33	N.D.-1.7 (0.9*)	50	N.D.	0	N.D.-2.3 (0.9*)	75
E1	2.28-122 (34.4)	100	N.D.-1.03 (0.21*) <sup>a</sup>	60	N.D.-0.5 (0.07*) <sup>a</sup>	57	N.D.-0.5 (0.1*)	75	N.D.-0.05* (N.D.)	33	N.D.-0.5* (0.04*)	50

N.D.: No detectado

Número de muestras ( $n_{IRW}=10$ ,  $n_{INW15}=10$ ,  $n_{INW45}=7$ ,  $n_{Pz9}=4$ ,  $n_{Pz7}=3$ ,  $n_{Pz11}=10$ ).

\*Por debajo del MQL

<sup>a</sup>Significativamente distinta de la concentración en el agua de riego

<sup>b</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre Al15 y Al45

(\*\*)Se descartaron algunos valores de DIC analizados en el P3 porque no cumplían con los criterios de validación metodológicos ( $n_{IRW}=4$ ,  $n_{INW15}=4$ ,  $n_{INW45}=3$ ,  $n_{Pz9}=4$ ,  $n_{Pz7}=1$ ,  $n_{Pz11}=4$ ).

**Anexo F (continuación):** Tabla con el rango de concentración (mínimo-máximo) en ng/L, mediana (med) en ng/L, y frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo durante el P3.

CPE	AR_P3		Al15_P3		Al45_P3		Pz9(ASarriba)_P3		Pz7(ASarriba)_P3		Pz11(ASabajo)_P3	
	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.
E2	N.D.-8.50 (0.83)	50	N.D.-0.5* (N.D.) <sup>a</sup>	20	N.D.-0.5* (N.D.) <sup>a</sup>	14	N.D.-0.25 (0.06*)	50	N.D.	0	N.D.-0.25 (N.D.)	10
ENA	N.D.-118 (1.0*)	60	N.D. <sup>a</sup>	0	N.D. <sup>a</sup>	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
ERI	N.D.-0.97 (0.05*)	50	N.D.-0.1* (N.D.) <sup>a</sup>	10	N.D.-0.12* (N.D.) <sup>a</sup>	14	N.D.-0.39 (0.12)	75	N.D.-0.57 (0.03*)	67	N.D.-0.37 (0.06*)	70
ESTRIOL	2.63-20.8 (6.86)	100	N.D.-6.18 (N.D.) <sup>a</sup>	30	N.D.-3.12 (N.D.) <sup>a</sup>	29	N.D.	0	N.D.	0	N.D.-0.25 (N.D.)	10
ETINIL	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.-0.25 (N.D.)	33	N.D.	0
FLE	2.63*-37.3 (7.61)	100	2.63*-29.2 (12.6)	100	0.63*-35.3 (9.89)	100	1.00-2.10 (1.32)	100	0.63-1.0 (0.85)	100	0.5*-6.90 (1.16)	100
FURO	N.D.-4.28 (N.D.)	10	N.D.-13.3 (N.D.)	10	N.D.-48.6 (N.D.)	14	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
IBU	74.0-10851 (1953)	100	1.09*-202 (64.8) <sup>a</sup>	100	22.8-78.7 (57.0) <sup>a</sup>	100	1.00-9.12 (4.40)	100	7.78-31.9 (8.57)	100	1.78-20.7 (10.1)	100
KET	N.D.-63.7 (12.3)	90	N.D.-8.01 (0.5*) <sup>a</sup>	70	N.D.-1.37 (N.D.) <sup>a</sup>	29	N.D.-0.34 (0.12*)	75	N.D.-0.31* (0.13*)	67	N.D.-1.51 (0.38)	90
LORZ	N.D.-14.6 (1.01)	90	N.D.-3.04 (0.56*)	80	N.D.-7.59 (0.85)	71	N.D.-0.13 (N.D.)	25	N.D.-0.34 (N.D.)	33	N.D.-3.80 (N.D.)	40
META	N.D.	0	N.D.-1.53 (N.D.)	10	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
METFOR	5.76-447 (30.3)	100	5.40-454 (27.6)	100	4.69-1102 (48.9)	100	23.4-323 (43.5)	100	12.1-41.3 (18.0)	100	10.1-200 (46.5)	100
N4ACE	N.D.-0.41* (N.D.)	10	N.D.-1.70 (N.D.)	10	N.D.-3.32 (N.D.)	29	N.D.-0.05* (0.03*)	50	N.D.-0.52 (0.18)	67	N.D.-0.25 (0.03*)	50
NAP	33.9-13841 (783)	100	N.D.-995 (173) <sup>a</sup>	90	N.D.-229.2 (1) <sup>a</sup>	57	N.D.-11.3 (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.-21.9 (N.D.)	30
NIC	149 -847 (535)	100	6.0-139 (81.6) <sup>a</sup>	100	N.D.-434 (72.7) <sup>a</sup>	86	5.4-48.7 (19.5)	100	6.68-31.9 (14.0)	100	6.43-95.6 (21.1)	100
OFLO	0.25*-55.7 (12.6)	100	0.25*-32.2 (8.31)	100	0.25*-400 (10.0)	100	1.55*-8.49 (2.86*)	100	1.55*-3.70 (2.26*)	100	1.55*-432 (2.54*)	100
OME	0.13*-9.52 (1.62)	100	N.D.-1.82 (0.22*) <sup>a</sup>	70	N.D.-9.95 (0.3*)	86	0.08*-5.2 (0.70)	100	0.08*-1.043 (0.08*)	100	N.D.-2.85 (0.29)	90

N.D.: No detectado

Número de muestras (n<sub>IRW</sub>=10, n<sub>INW15</sub>=10, n<sub>INW45</sub>=7, n<sub>Pz9</sub>=4, n<sub>Pz7</sub>=3, n<sub>Pz11</sub>=10).

\*Por debajo del MQL

<sup>a</sup>Significativamente distinta de la concentración en el agua de riego

<sup>b</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre Al15 y Al45

(\*\*)Se descartaron algunos valores de DIC analizados en el P3 porque no cumplían con los criterios de validación metodológicos (n<sub>IRW</sub>=4, n<sub>INW15</sub>=4, n<sub>INW45</sub>=3, n<sub>Pz9</sub>=4, n<sub>Pz7</sub>=1, n<sub>Pz11</sub>=4).

**Anexo F (continuación):** Tabla con el rango de concentración (mínimo-máximo) en ng/L, mediana (med) en ng/L, y frecuencia de detección (f.d., %) para todos los CPEs en los diferentes puntos de muestreo durante el P3.

CPE	AR_P3		Al15_P3		Al45_P3		Pz9(ASarriba)_P3		Pz7(ASarriba)_P3		Pz11(ASabajo)_P3	
	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.	Rango (med)	f.d.
PAR	2007-9122 (5067)	100	3.28-64.9 (12.0) <sup>a</sup>	100	0.57*-74.8 (8.74) <sup>a</sup>	100	1.22-13.7 (7.34)	100	2.30-7.62 (7.42)	100	1.20-23.5 (7.99)	100
SUL	N.D.-1.35 (0.27*)	80	N.D.-1.35 (N.D.)	40	N.D.-1.35 (N.D.)	29	N.D.-3.19 (0.14)	50	N.D.-0.15 (0.05*)	67	N.D.-0.47 (0.15)	60
TES	N.D.-12.8 (1.0*)	70	N.D. <sup>a</sup>	0	N.D. <sup>a</sup>	0	N.D.-0.25* (N.D.)	25	N.D.	0	N.D.-2.94 (N.D.)	40
VEN	1.0*-19.4 (8.34)	100	10.8-29.2 (19.7) <sup>a</sup>	100	0.24*-41.5 (16.4)	100	0.84-1.88 (1.00)	100	1.56-2.48 (2.05)	100	0.25*-42.2 (1.80)	100

N.D.: No detectado

Número de muestras ( $n_{IRW}=10$ ,  $n_{INW15}=10$ ,  $n_{INW45}=7$ ,  $n_{Pz9}=4$ ,  $n_{Pz7}=3$ ,  $n_{Pz11}=10$ ).

\*Por debajo del MQL

<sup>a</sup>Significativamente distinta de la concentración en el agua de riego

<sup>b</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre Al15 y Al45

(\*\*)Se descartaron algunos valores de DIC analizados en el P3 porque no cumplían con los criterios de validación metodológicos ( $n_{IRW}=4$ ,  $n_{INW15}=4$ ,  $n_{INW45}=3$ ,  $n_{Pz9}=4$ ,  $n_{Pz7}=1$ ,  $n_{Pz11}=4$ ).