

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Y

UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS



**MASTER OFICIAL EN HIDROLOGÍA
Y GESTIÓN DE RECURSOS HÍDRICOS**

PROYECTO DE FIN DE MASTER

**TRATAMIENTO FOTO-FENTON PARA LA REDUCCIÓN DE CONTAMINACIÓN POR
DROGAS DE ABUSO EN AGUAS FLUVIALES DE MADRID Y EVALUACIÓN
ECOTOXICOLÓGICA MEDIANTE NUEVOS MICROBIOENSAYOS.**

AUTOR:

Alma P. Migens Cuesta

DIRECTOR:

Dra. Ana Karina Boltés (UAH) y Dra. Myriam Catalá (URJC)

Alcalá de Henares, 14 de junio de 2013

Dña. Ana Karina Boltes, profesor ayudante Doctor de Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá, y Dña. Myriam Catalá, profesora titular de Biología Celular de la Universidad Rey Juan Carlos, como tutoras del proyecto de fin de máster titulado: “TRATAMIENTO FOTO-FENTON PARA LA REDUCCIÓN DE CONTAMINACIÓN POR DROGAS DE ABUSO EN AGUAS FLUVIALES DE MADRID Y EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA MEDIANTE NUEVOS MICROBIOENSAYOS”, damos nuestro Visto Bueno a la presentación y la lectura de la memoria del proyecto en la convocatoria de Junio de 2013.

Fdo.: Ana Karina Boltes

Fdo.: Myriam Catalá

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a Myriam Catalá por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, por todos los conocimientos que ha compartido conmigo y por su incansable dedicación, apoyo y comprensión. Especial reconocimiento a Yolanda Segura y al Departamento de Química Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos por proporcionarme la formación necesaria para la realización de este proyecto, así como prestarme su ayuda siempre que lo he necesitado. Por último quería agradecer a Sara, Alberto, Helena, Patricia, Eva y Raquel por todo el apoyo y ayuda prestada en el laboratorio.

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. METODOLOGÍA	8
3.1. Descripción de la zona de muestreo	8
3.2. Compuestos objetivo	8
3.2. Método de análisis.....	9
3.3. Tratamiento foto-Fenton para la degradación de drogas de abuso	10
3.3.1. Blancos de reacción.....	10
3.3.2. Tratamientos foto-Fenton.....	10
3.4. Test toxicológicos	12
3.4.1. Material	12
3.4.2. Actividad mitocondrial: toxicidad aguda y subcrónica.....	12
3.4. Análisis estadístico	12
4. RESULTADOS	13
4.1.1. Caracterización química de la muestra inicial (DRSP5).....	13
4.1.2. Caracterización química de los blancos de reacción.....	13
4.1.3. Caracterización química del proceso heterogéneo foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/l.....	15
4.1.4. Caracterización química del proceso heterogéneo foto-Fenton con catalizador Fe 0,6 g/l.....	16
4.1.5. Caracterización macroscópica.....	17
4.2. Caracterización toxicológica	18
4.2.1. Caracterización toxicológica de los blancos de reacción	18
4.2.2. Caracterización toxicológica del proceso heterogéneo foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/l.....	19
4.2.3. Caracterización toxicológica del proceso heterogéneo foto-Fenton con catalizador Fe 0,6 g/l.....	20
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES	24
7. BIBLIOGRAFÍA	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de la depuradora de Butarque (www.chtajo.es).....	8
Tabla 2: Compuestos objetivo, nº CAS y límite de detección	9
Tabla 3: Nomenclatura blancos de reacción realizados	10
Tabla 4: Nomenclatura tratamientos foto-Fenton realizados	11
Tabla 5: Límite de determinación y concentración de las drogas de abuso en la matriz inicial (DRSP5)	13
Tabla 6: Concentraciones de drogas de abuso (ng/l) después de los blancos de reacción	14
Tabla 7: Resumen eficacia eliminación blancos de reacción en función de los grupos de drogas ..	14
Tabla 8: Concentraciones de drogas de abuso (ng/l) después de los tratamientos foto-Fenton con catalizador 0,1 g/l	15
Tabla 9: Resumen eficacia eliminación foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/l en función de los grupos de drogas	16
Tabla 10: Concentraciones de drogas de abuso (ng/l) después de foto-Fenton con catalizador Fe 0,6 g/l	16
Tabla 11: Resumen eficacia eliminación foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/l en función de los grupos de drogas	17
Tabla 12: Caracterización macroscópica de las muestras de agua antes y después de los tratamientos	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la instalación experimental para el tratamiento foto-Fenton. 11

Figura 2: Toxicidad aguda y subcrónica de los blancos de reacción realizados especificados en porcentaje de variación mitocondrial (absorbancia a 492 nm) respecto al medio de cultivo DT (control). Las barras representan el error estándar. Las letras a y b representan los grupos estadísticos significativos definidos por el test Tukey. 18

Figura 3: Toxicidad aguda y subcrónica de los tratamientos foto-Fenton realizados especificados en porcentaje de variación mitocondrial (absorbancia a 492 nm) respecto al medio de cultivo DT (control). Las barras representan el error estándar. Las letras a, b y c representan los grupos estadísticos significativos definidos por el test Tukey. 19

INDICE DE ABREVIATURAS

6ACM: 6-acetil morfina

DRSP: punto de muestreo del río

EDDP: 2-etilen 1,5-dimetil 3,3-difenilpirrolidina

LSD: dietilamida del ácido lisérgico

MDMA: 3,4-metilendioximetanfetamina o éxtasis

MOA: métodos de oxidación avanzada

OH-THC: 11-hidroxi- Δ^9 THC

OXO-LSD: 2-oxo, 3-hidroxiLSD

THC: Δ^9 tetrahidrocannabinol

THC-COOH: 11-nor-9-carboxi- Δ^9 THC

COT: carbón orgánico total

1. RESUMEN

Las drogas de abuso y sus metabolitos han sido reconocidas como contaminantes emergentes recientemente. El desarrollo de nuevas técnicas analíticas ha permitido demostrar la presencia de estas sustancias en las aguas superficiales como consecuencia de su elevada producción y consumo. Las drogas de abuso se excretan de forma inalterada o como sus principales metabolitos en elevada concentración llegando a las estaciones depuradoras de aguas residuales, dónde no son totalmente eliminadas. Actualmente, se desconocen los efectos potenciales de estos componentes, tanto sobre el medio ambiente como sobre la salud humana, a medio y largo plazo, pero su potente psicoactividad no puede ser obviada.

Los procesos avanzados de oxidación fotoquímica son una alternativa interesante a tecnologías convencionales para el tratamiento de aguas contaminadas con estas sustancias. Entre ellos destaca el proceso heterogéneo foto-Fenton basado en la combinación del proceso Fenton convencional (catalizador de Fe^{II} y el peróxido de hidrogeno como agente oxidante) con radiación UV-visible, generando especies oxidantes adicionales. Con el fin de evaluar los posibles efectos que pueden ocasionar en el medio ambiente y la salud pública estos tratamientos, el análisis químico de las aguas debe ir complementado con estudios toxicológicos en organismos de relevancia ecológica.

Este trabajo investiga por primera vez la presencia de un total de 20 drogas de abuso y sus metabolitos pertenecientes a 6 clases químicas diferentes en Madrid, aguas abajo de la depuradora de Butarque (Río Manzanares). El tratamiento de estas sustancias mediante un proceso foto-Fenton será evaluado mediante caracterización química y toxicológica de las aguas con el objetivo de conocer la eficacia de eliminación de esta técnica.

Acorde a los resultados, el proceso foto-Fenton puede ser una herramienta útil para reducir la concentración de las drogas de abuso en los medios fluviales de forma significativa. La concentración de la mayoría las drogas de abuso estudiadas fue reducida satisfactoriamente a concentraciones inferiores del límite de detección del método analítico. La efectividad en los tratamientos foto-Fenton depende de numerosos parámetros, como son la concentración del catalizador o del oxidante añadido. Además, los test toxicológicos deben combinarse con los análisis químicos realizados, ya que los procesos de depuración mediante oxidación avanzada pueden generar otro tipo de sustancias no analizadas potenciales de producir toxicidad.

2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha generado un gran interés en torno a los conocidos contaminantes emergentes, los cuales incluyen diferentes tipos de sustancias como disruptores endocrinos, productos de cuidado personal, fármacos o drogas de abuso (Postigo et al., 2010). El estudio de los contaminantes emergentes se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA), o la Comisión Europea (Bolong et al., 2009). Son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos y nunca han sido regulados (Huerta-Fontela et al., 2008a).

Las drogas de abuso y sus metabolitos se encuentran presentes en las aguas desde hace décadas, pero es ahora, en la actualidad, cuando se han empezado a cuantificar sus niveles en el medioambiente, reconociéndose como contaminantes potencialmente peligrosos, que pueden ocasionar daños en los ecosistemas (Zuccato & Castiglioni, 2009). A esto ha contribuido el desarrollo de nuevas técnicas analíticas (p. e. la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)), que permiten determinar concentraciones muy bajas de estos compuestos ($\mu\text{g-ng/L}$) en matrices muy complejas como son las muestras medioambientales (Bolong et al., 2009).

Mediante las técnicas analíticas se ha podido determinar la presencia de drogas de abuso y sus metabolitos en el medio acuático con dos objetivos principales: monitorear su concurrencia ambiental (Boleda et al., 2007; Huerta-Fontela et al., 2007; Postigo et al., 2008) y estimar el nivel de consumo de drogas de una población (Zuccato et al., 2005). El primer estudio fue de Zuccato et al. en el año 2005, donde se demostró que en el río Po (Italia) existía cierta concentración de cocaína en sus aguas, por lo que tuvo gran cobertura mundial. Como consecuencia, diferentes estudios en Europa han demostrado la presencia de las drogas de abuso en las aguas superficiales de Italia (Zucatto et al., 2008), Alemania (Hummel et al., 2006), Bélgica (Gheorghe et al., 2008; Van Nuijs et al., 2009), Gran Bretaña (Kasprzyk-Hordern et al., 2008), Irlanda (Bones et al., 2007) o Croacia (Terzic et al., 2010).

En España, se ha analizado la presencia de drogas de abuso en diferentes aguas superficiales o residuales en Cataluña (Boleda et al., 2009; Huerta-Fontela et al., 2008a), en la cuenca del río Ebro (Postigo et al., 2010), en la cuenca de Galicia (González-Marino et al., 2010), en el río Henares (Martínez Bueno et al., 2010), en el Parque de la Albufera en Valencia (Vázquez-Roig et al., 2010) y en el río Tajo a su paso por la provincia de Toledo (Valcárcel et al., 2012).

Otra particularidad de estos compuestos, es que debido a su elevada producción y consumo y a la continua introducción de los mismos en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos (Valcárcel et al, 2011). La UNODC (United Nation Office on Drugs and Crime, 2012) ha publicado recientemente el Informe Mundial de Drogas de 2012, indicando que en 2010, alrededor de 230 millones de personas por todo el mundo (5% de la población comprendida entre los 15 y 64 años de edad) han consumido drogas de forma ilícita al menos una vez en 2010. El número de consumidores de drogas ilegales en los últimos años ha aumentado considerablemente. La última encuesta en España sobre alcohol y drogas (EDADES, 2010) muestran una tendencia similar a la europea, donde un 32,1 % de la población ha consumido alguna vez cannabis a lo largo de su vida, convirtiéndola en la sustancia ilegal más consumida. Esto hace que España sea el cuarto país con mayor consumo de cannabis en el ranking europeo de países en el consumo de esta droga. La segunda droga más consumida es la cocaína donde el 10,2% de la población asegura haberla consumido en alguna etapa de su vida, seguida de otras drogas estimulantes.

La condición ilegal de la mayoría de estas sustancias impide la regulación de su venta y el control de sus residuos, pudiendo llegar al medio ambiente por diferentes rutas. Los residuos de las drogas de abuso persisten en la orina de sus consumidores y se incorporan a la red de aguas residuales, llegando a las estaciones depuradoras de agua de forma inalteradas o como sus principales metabolitos. Recientemente se ha demostrado que los sistemas de tratamiento convencional, basados principalmente en el uso de microorganismos, resultan inadecuados para destruir de forma efectiva este tipo de compuestos orgánicos, debido a su compleja estructura molecular y a las bajas concentraciones en las que se encuentran. Dependiendo de la tecnología de las plantas depuradoras o potabilizadoras, estas sustancias sólo son parcialmente eliminadas de las aguas, aunque la eficacia de eliminación depende de la sustancia (Bolong et al., 2009). Zuccato & Castiglioni en 2009 demostraron que la mayoría de los compuestos se eliminaban en más de un 70 % en las estaciones depuradoras y aun así las drogas de abuso han sido detectadas en los efluentes de estas (Zuccato et al., 2005; Huerta-Fontela et al., 2008a, Valcárcel et al., 2012). La concentración de drogas de abuso en aguas de consumo humano tras su potabilización también ha sido evaluada. Sustancias como benzoilecgonina, anfetamina o MDMA (éxtasis) fueron detectadas en concentraciones medias entre 4-150 ng/l en efluentes de estaciones potabilizadoras en el noreste de España a pesar de que los coeficientes de reducción de estas sustancias es elevado, entre un 70 – 90% (Huerta-Fontela et al., 2008b). La legislación española y europea no obliga a las estaciones depuradoras a realizar ningún tipo de análisis de estas sustancias a las aguas residuales tratadas ni establece unas concentraciones máximas admisibles en el medio ambiente, independientemente del uso que vaya a tener ese agua (regenerada, agua fluvial o potable) (Valcárcel et al, 2012).

Actualmente se desconocen los efectos potenciales de estos componentes tanto sobre el medio ambiente como sobre la salud humana, a medio y largo plazo, pero su potente psicoactividad no puede ser obviada. Estas sustancias biológicamente activas están diseñadas para ejercer efectos específicos en el organismo humano, y por tanto pueden tener numerosos efectos negativos en los ecosistemas (Postigo et al., 2010).

Debido al riesgo ecotoxicológico potencial de las drogas de abuso en los ecosistemas es necesario eliminarlas de las aguas fluviales y como solución a este problema la aplicación de procesos no biológicos, como procesos de oxidación avanzada (MOA), se han ido extendiendo en los últimos años. La eficacia de estas técnicas está basada en la generación de radicales hidroxilo, los cuales actúan como un potente agente oxidante con una elevada reactividad y baja selectividad para eliminar compuestos orgánicos. Los procesos avanzados de oxidación fotoquímica han experimentado una creciente atención en las últimas décadas como alternativa interesante a tecnologías convencionales para el tratamiento de aguas contaminadas (Rodríguez-Gil et al., 2010). Entre ellos destaca el proceso heterogéneo foto-Fenton, el cual ha sido estudiado ampliamente para la eliminación de contaminantes orgánicos. Este método está basado en la combinación del proceso Fenton convencional (catalizador de Fe^{II} y el peróxido de hidrogeno como agente oxidante) con radiación UV-visible, generando especies oxidantes adicionales. Uno de los puntos más importantes en este ámbito era la separación y recuperación del catalizador de las aguas tratadas. El uso de catalizadores heterogéneos, con estructura mesoporosa de matriz silíceo y con gran ordenación, SBA-15, facilita la separación de los mismos del medio de reacción, evitando la necesidad de procesos de coagulación-floculación posteriores para retirar el hierro del medio tratado. El relativo bajo coste y el uso de materias primas como sales de hierro y el peróxido de hidrógeno como oxidante, dan la posibilidad de integrar este proceso en operaciones normales (Melero et al., 2005).

La evaluación de la calidad de las aguas tratadas requiere de la aplicación de metodologías tanto químicas como biológicas con las que poder detectar no sólo los contaminantes presentes en ellas, sino también los posibles efectos que pueden ocasionar en el medio ambiente y la salud pública. Los ensayos biológicos se presentan como tests innovadores e indicadores reales y rápidos de los efectos tóxicos de las aguas (Farré et al., 2007). El escaso número de taxones utilizados en los bioensayos actualmente es una de las principales preocupaciones de la toxicología ambiental, ya que el uso de un rango adecuado de taxón supone conseguir resultados ecológicamente relevantes. Recientemente, un nuevo microbioensayo de fitotoxicidad aguda basado en el desarrollo de esporas de helecho ha sido publicado (Catalá et al., 2009). Los helechos son el segundo grupo más grande de plantas vasculares y debido a su carácter ripario, relativo al medio acuático, son buenos indicadores de presencia de compuestos tóxicos en las aguas. Este método combina relevancia biológica y ecológica con elevada sensibilidad y simplicidad, haciendo que sea una herramienta de

costes bajos para el monitoreo ecotoxicológico (Catalá et al., 2010; Feito et al., 2012; Esteban et al., 2013).

El área metropolitana de Madrid se encuentra en el centro de la península Ibérica en torno a su ciudad principal, Madrid. Es el área metropolitana más poblada de España (7,3 millones de habitantes) (www.ine.es) y la tercera de la Unión Europea, por detrás de París y Londres. Hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio sobre drogas de abuso en la cuenca del Tajo a su paso por Madrid, zona donde estas sustancias podrían no haber sido eliminadas completamente por las estaciones depuradoras y ser consideradas un peligro potencial tanto para el medio ambiente como la salud pública. En este contexto, los objetivos principales de este trabajo son determinar la presencia de drogas de abuso mediante caracterización química del agua en el río Manzanares y determinar la efectividad de eliminación de los procesos foto-Fenton en la degradación de drogas de abuso mediante su caracterización tras el tratamiento. Además, se pretende evaluar la toxicidad, tanto aguda como subcrónica, del agua tratada en función de las variables que intervienen en el tratamiento foto-Fenton.

3. METODOLOGÍA

3.1. Descripción de la zona de muestreo

El área metropolitana de Madrid está localizada en el centro de la península Ibérica, con una extensión de 4.610 km² y con una población estimada de 7,3 millones de habitantes en el año 2012, concentrada principalmente en la ciudad de Madrid. Es el área más densamente poblada en España y uno de los mayores de Europa con una densidad de población de 808,41 habitantes por km². Un total del 81,64 % de la población de la Comunidad de Madrid se encuentra concentrada en la ciudad de Madrid y los municipios del área metropolitana (www.ine.es).

En una fase previa a este proyecto (Mendoza et al., manuscrito en preparación), durante los meses de febrero y marzo de 2012, se muestrearon 7 puntos aguas abajo de diferentes depuradoras de agua residual. Estas depuradoras se localizaban a lo largo de los ríos Jarama y Manzanares y sus afluentes, pertenecientes a la cuenca del río Tajo. Las muestras fueron caracterizadas químicamente, y se demostró la presencia de drogas de abuso y benzodiacepinas en estas aguas superficiales.

En términos de concentración total por drogas de abuso, el punto con mayor concentración era DRSP5, aguas abajo del emisario de la depuradora de Butarque, en el río Manzanares, en el sur de la región de Madrid. Por ello, se eligió ese punto como objeto de estudio de este trabajo. Se recogieron nuevas muestras de agua a 100 metros aproximadamente aguas abajo del emisario de la depuradora de Butarque el día 16 de mayo de 2012. En total, se recogieron 15 litros en botellas de cristal ámbar de 1 litro.

La depuradora de Butarque (Tabla 1) se encuentra en el arroyo Butarque, afluente del río Manzanares, en la Comunidad de Madrid y es gestionada por el Canal de Isabel II Gestión, S.A. Dicho arroyo nace al oeste de la ciudad de Madrid, en el entorno de Boadilla del Monte, pasando después por los términos municipales de Alcorcón, Leganés y Madrid.

Tabla 1: Características de la depuradora de Butarque (www.chtajo.es)

Ciudad	Dirección	Población equivalente	Caudal tratado	Proceso
Madrid (distrito Villaverde)	C/ de los Rosales, 399	1.440.000 hab/eq	432.000 m ³ /día	BFA con reducción de nutrientes

BFA: Biológico de fangos activados.

3.2. Compuestos objetivo

Un total de 20 drogas de abuso y sus metabolitos pertenecientes a 6 clases químicas diferentes (Tabla 2) fueron encontrados en las aguas recolectadas.

Tabla 2: Compuestos objetivo, nº CAS y límite de detección

Grupo químico	Droga	Nº CAS	LDet^a (ng/l)
Ansiolíticos	Alprazolam	28981-97-7	3,60
	Diazepam	439-14-5	1,40
	Lorazepan	846-49-5	14,60
Cannabinoides	OH-THC ^b	36557-05-8	1,26
	THC	1972-08-3	6,81
	THC-COOH ^b	56354-06-4	4,19
Cocaínicos	Benzoilecgonina ^c	519-09-5	0,60
	Cocaetileno ^c	529-38-4	1,47
	Cocaína	50-36-2	0,13
Estimulantes tipo anfetamínico	Anfetamina	300-62-9	4,28
	Efredrina	24221-86-1	0,45
	MDMA	42542-10-9	1,26
	Metanfetamina	4846-07-5	1,28
LSD	LSD	50-37-3	1,80
	OXO-LSD ^d	No disponible	0,16
Opiáceos	6ACM ^e	2784-73-8	0,64
	EDDP ^f	66729-78-0	0,57
	Heroína	561-27-3	1,66
	Metadona	76-99-3	0,62
	Morfina	57-27-2	1,45

^a LDet: límite de determinación de la técnica

^b Metabolito de THC

^c Metabolito de la cocaína

^d Metabolito del LSD

^e Metabolito de la heroína

^f Metabolito de la metadona

3.2. Método de análisis

La muestra de agua superficial de código “DRSP5”, correspondiente al agua inicial sin tratamiento, y las aguas tratadas con foto-Fenton fueron filtradas a través de filtro de fibra de vidrio de 1 µm y filtro de membrana de nylon de 0,45 µm (Whatman International Ltd., Maidstone, England). Posteriormente fueron almacenadas en botellas PET ámbar de 250 ml a -4 °C hasta su análisis. El análisis de todas las muestras de agua se llevó a cabo por triplicado (n=3).

La tecnología de cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS) fue usada para realizar el análisis de los compuestos seleccionados antes y después del tratamiento foto-Fenton. Estos análisis fueron llevados a cabo en el laboratorio del departamento de Química Ambiental del IDAEA-CSIC siguiendo el método descrito en Martínez-Bueno et al. (2007).

Los análisis de carbono orgánico total (COT) se llevaron a cabo mediante medias de un analizador de gas infrarrojo modelo TOC-VSCH equipado con un ASI-V autosampler. Las medidas de

demanda química de oxígeno fueron llevadas a cabo utilizando dicromato de potasio como agente oxidante, seguido de la metodología descrita en el Método Estándar 5220D (APHA, 1998).

3.3. Tratamiento foto-Fenton para la degradación de drogas de abuso

3.3.1. Blancos de reacción

Se realizaron tres blancos de reacción con el objetivo de comprobar la eficacia de los reactivos que componen el tratamiento foto-Fenton independientemente:

- Fotólisis (UV-visible): ruptura homolítica de la molécula de peróxido de hidrógeno mediante la acción de la radiación ultravioleta. La muestra de agua de río inicial (DRSP-5) se introdujo en un reactor de vidrio Pirex donde incidió luz UV-visible de mercurio de media presión (Heraus TQ-150).

- Adsorción del catalizador de hierro (Fe^{2+}): se realizaron dos ensayos, utilizando un catalizador heterogéneo de hierro en diferentes concentraciones (0,1 g/l y 0,6 g/l). El catalizador heterogéneo de hierro utilizado estaba soportado sobre una matriz de sílice mesoporosa tipo SBA-15 con el objetivo de evaluar la adsorción de las drogas de abuso por parte del catalizador.

Tabla 3: Nomenclatura blancos de reacción realizados

Tratamiento control	Nomenclatura
Fotólisis	Fotólisis
Adsorción catalizador de Fe 0,1 g/l	ADS_01
Adsorción catalizador de Fe 0,6 g/l	ADS_06

3.3.2. Tratamientos foto-Fenton

Las reacciones de foto-Fenton se llevaron a cabo en un reactor de vidrio Pirex en presencia de una lámpara UV-visible de mercurio de media presión (Heraus TQ-150) tal y como se representa en la figura 1. La lámpara se encontraba rodeada por una camisa de cuarzo por la que circula una disolución acuosa de sulfato de cobre que evitaba el sobrecalentamiento de la suspensión y bloqueaba la radiación a longitudes de onda menores de 215 nm, imitando la radiación solar.

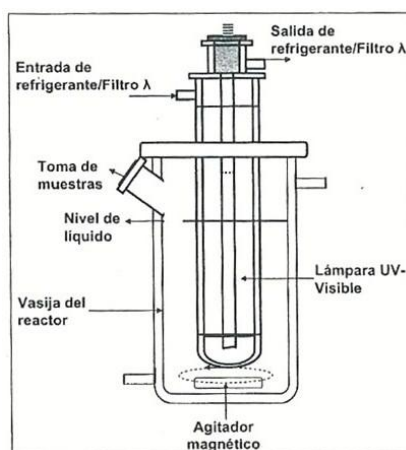


Figura 1: Esquema de la instalación experimental para el tratamiento foto-Fenton

En primer lugar, se preparó una disolución acuosa de 400 ml de la muestra a tratar. El catalizador se suspendió en la disolución acuosa y se ajustó el pH hasta un valor aproximado de 3 mediante una disolución de H_2SO_4 0,1M. Se utilizó un catalizador heterogéneo en diferente concentración de hierro soportado sobre una sílice mesoporosa tipo SBA-15. Finalmente se adicionó peróxido de hidrógeno en concentraciones estequiométricas del 25, 50 y 100 % (Tabla 3), dónde el 100 % era la cantidad estequiométrica necesaria para completar la mineralización del COT, siguiendo la reacción:

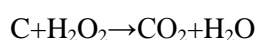


Tabla 4: Nomenclatura tratamientos foto-Fenton realizados

	Concentración de H_2O_2		
	100 %	50 %	25 %
Catalizador Fe 0,1 g/l	100%_0,1	50%_0,1	25%_0,1
Catalizador Fe 0,6 g/l	100%_0,6	50%_0,6	25%_0,6

La temperatura inicial de las muestras de agua en el reactor de vidrio era de 22°C. El tratamiento se llevó a cabo sin control de temperatura, por ello y debido a la radiación UV-visible, la temperatura aumentó hasta 37 °C durante el proceso, acelerando así la velocidad de degradación. La duración de los tratamientos fue de 6 horas, con el fin de asegurar el consumo total de peróxido de hidrógeno del medio. Tras 6 horas, las muestras fueron filtradas a través de membranas de nylon 0,22 µl para eliminar el catalizador heterogéneo antes de los análisis. Tras las 6 horas de reacción se midieron los parámetros de COT y de pH. El consumo total del peróxido de hidrógeno se confirmó usando un método de valoración.

La efectividad de eliminación de cada compuesto se calculó como una relación entre la concentración de droga hallada tras el tratamiento y la inicial encontrada en la muestra. En el caso de que la concentración del compuesto tras el tratamiento no se haya confirmado (n.c.) o detectado

(-) en la muestra de agua tratada, se usó el límite de detección (LDet), entendiendo esta efectividad como la mínima que se alcanzaría en la técnica.

3.4. Test toxicológicos

3.4.1. Material

Las esporas de *Polystichum setiferum*, helecho común de las zonas riparias, fueron recogidas en el río San Xusto, A Coruña (España) durante el verano de 2012. Se recogieron fragmentos de hoja madura pero con los esporangios cerrados. Posteriormente, se secaron las hojas durante una semana en papel de filtro para poder obtener las esporas, las cuales se almacenaron a 4 °C en oscuridad hasta su uso. Las esporas fueron tamizadas y suspendidas en medio de cultivo, esterilizadas y contadas tal y como se detalla en Catalá et al. (2009).

3.4.2. Actividad mitocondrial: toxicidad aguda y subcrónica

El ensayo de actividad mitocondrial se realizó de acuerdo a Catalá et al. (2009) modificado por Feito et al. (2012). El pH de las aguas del río y las muestras tratadas fue ajustado a $7 \pm 0,5$ y suplementadas con Tween 20 hasta el 0,01 %. Las alícuotas, que contenían 80.000 esporas y 1,4 ml del agua a estudiar, se incubaron durante 44 h para evaluar toxicidad aguda o 158 h para conocer toxicidad subcrónica (20 °C y 16 h de fotoperiodo). Posteriormente, se incubaron durante 2 horas con TTC (2,3,5-trifeniltretazolium) cuya reducción forma trifenil formazan. Esta sal se extrajo en 1.000 µl de hexano por agitación, permitiendo determinar la función mitocondrial de las células tratadas mediante la medición de la absorbancia.

3.4. Análisis estadístico

Los datos de absorbancia de las diferentes muestras fueron tratados estadísticamente mediante los programas R y R-Commander. Para cada tratamiento y tiempo de exposición se prepararon al menos 6 réplicas (n=6) de los bioensayos. Los datos aparecen expresados como la media \pm el error estándar. Para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos en cada tiempo se utilizó el análisis de varianzas ANOVA de dos factores. Previamente, se verificó que los datos cumplían los supuestos de normalidad (los datos siguen una distribución gaussiana), homocedasticidad (las varianzas de todas las muestras son iguales) e independencia (todas las observaciones son independientes unas de otras), necesarios para la aplicación de ANOVA. Dado que el supuesto de independencia se cumplía (los conjuntos de datos eran independientes unos de otros) para comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad se aplicaron el test de Shapiro-Wilk y el de Bartlett, respectivamente. Se consideró como significativo un p-valor $< 0,05$ en todos los casos.

4. RESULTADOS

El estudio está centrado en caracterizar química y toxicológicamente el agua en el río Manzanares aguas abajo de la depuradora de Butarque antes y después de los tratamientos por foto-Fenton para la degradación de drogas de abuso.

4.1. Drogas de abuso y caracterización química

4.1.1. Caracterización química de la muestra inicial (DRSP5)

Tabla 5: Límite de determinación y concentración de las drogas de abuso en la matriz inicial (DRSP5)
Nota: - (no determinado)

Drogas	LDet (ng/l)	DRSP5 (ng/l)	Drogas	LDet (ng/l)	DRSP5 (ng/l)
Ansiolíticos			Estimulantes tipo anfetamínico		
Alprazolam	3,60	6,79	Anfetamina	4,28	-
Diazepam	1,40	138,33	Efedrina	0,45	156,33
Lorazepam	14,60	123,00	MDMA	1,26	27,03
			Metanfetamina	1,28	1,90
Cannabinoides			LSD		
OH-THC	1,26	-	LSD	1,80	-
THC	6,81	-	OXO-LSD	0,16	-
THC-COOH	4,19	-			
Cocaínicos			Opiáceos		
Benzoilecgonina	0,60	7,22	6ACM	0,64	-
Cocaetileno	1,47	-	EDDP	0,57	97,53
Cocaína	0,13	7,27	Heroína	1,66	-
			Metadona	0,62	26,97
			Morfina	1,45	3,57

En la tabla 5 se recogen los resultados obtenidos de la caracterización química en la muestra inicial. Se detectaron todas las drogas de abuso objeto de estudio excepto las pertenecientes a los grupos de los cannabinoides y de los LSD. Además no se detectó heroína y 6ACM (opiáceos), anfetamina (estimulante tipo anfetamínico) y cocaetileno (cocaínicos).

4.1.2. Caracterización química de los blancos de reacción

Las muestras de agua analizadas tras los blancos de reacción (tabla 6) presentaron diferencias respecto a la matriz inicial. En las muestras donde se realizó fotólisis se detectaron sólo dos de los compuestos estudiados, el diazepam y el EDDP, éste último metabolito de la metadona, en concentraciones de 0,89 y 0,22 ng/l, respectivamente. Por otro lado, en las muestras donde se evalúa la adsorción de estas sustancias en el catalizador (ADS_0,1 y ADS_0,6), se detectaron 8 de los 20 compuestos estudiados, siendo los más abundantes la efedrina, compuesto estimulante del tipo anfetamínico, y la benzoilecgonina, metabolito de la cocaína, cuyas concentraciones fueron muy superiores a las iniciales tras los procesos de adsorción. Además de estos dos compuestos, MDMA y metanfetamina, estimulantes de tipo anfetamínico, también aumentó su concentración en caso de que el catalizador utilizado tenga una concentración de 0,1 g/l.

Tabla 6: Concentraciones de drogas de abuso (ng/l) después de los blancos de reacción

Drogas	FOTOLISIS		ADS_0,1		ADS_0,6	
	[ng/l]	Eficacia eliminación	[ng/l]	Eficacia eliminación	[ng/l]	Eficacia eliminación
Ansiolíticos						
Alprazolam	n.c.	>47%	n.c.	>47%	n.c.	>47%
Diazepam	0,89	>99%	52,4	62%	8,27	94%
Lorazepam	-	>88%	109,3	11%	73,3	40%
Cannabinoides						
OH-THC	-		-		-	
THC	-		-		-	
THC-COOH	-		n.c.		n.c.	
Cocaínicos						
Benzoilecgonina	n.c.	>92%	46,87	-549%	37,3	-417%
Cocaetileno	-		n.c.		n.c.	
Cocaína	n.c.	>98%	n.c.	>98%	n.c.	>98%
Estimulantes tipo anfetamínico						
Anfetamina	-		-		-	
Efedrina	n.c.	>99%	333,7	-113%	302,3	-93%
MDMA	-	>95%	27,37	-1%	14,0	48%
Metanfetamina	-	>33%	2,60	-37%	1,66	13%
LSD						
LSD	-		-		-	
OXO-LSD	-		-		-	
Opiáceos						
6ACM	-		-		-	
EDDP	0,22	99%	8,81	91%	1,06	99%
Heroína	-		-		-	
Metadona	n.c.	>98%	5,69	79%	0,72	97%
Morfina	-	>59%	-	>59%	n.c.	>59%

Nota: - (no detectado), n.c. (no confirmado).

En la tabla 7 se resume la eficacia de eliminación de los blancos de reacción por grupos de drogas y se puede observar que tras la fotólisis todos los grupos de drogas de abuso reducen su concentración en más de un 70 % aproximadamente.

Tabla 7: Resumen eficacia eliminación blancos de reacción en función de los grupos de drogas

Grupo de drogas	Eficacia media del tratamiento		
	Fotolisis	ADS_0,1	ADS_0,6
Ansiolíticos	74%	32%	56%
Cannabinoides	-	-	-
Cocaínicos	95%	-225%	-159%
Estimulantes tipo anfetamínico	68%	-51%	-11%
LSD	-	-	-
Opiáceos	83%	75%	83%

Por otro lado, destacar el efecto de los procesos de adsorción sobre los grupos de estimulantes de tipo anfetamínico y los cocaínicos, donde se ha detectado mayor concentración de drogas de abuso que la inicial o el porcentaje de reducción ha sido mínimo. Los ansiolíticos y los opiáceos presentan eficacias de eliminación muy dispares en función del tratamiento, pero sin superar el 85% de eliminación.

4.1.3. Caracterización química del proceso heterogéneo foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/l

En las muestras analizadas tras el tratamiento foto-Fenton con catalizador de hierro 0,1 g/l (tabla 8) no se detectó ninguno de los compuestos objetivo o no se pudo confirmar su presencia para todas las concentraciones de H₂O₂ añadidas.

Tabla 8: Concentraciones drogas de abuso (ng/l) después de los tratamientos foto-Fenton catalizador 0,1 g/l

Drogas	Fe[0,1 g/l] 25%H ₂ O ₂		Fe[0,1 g/l] 50%H ₂ O ₂		Fe[0,1 g/l] 100%H ₂ O ₂	
	[ng/l]	Eficacia eliminación	[ng/l]	Eficacia eliminación	[ng/l]	Eficacia eliminación
Ansiolíticos						
Alprazolam	n.c.	>47%	n.c.	>47%	n.c.	>47%
Diazepam	-	>99%	-	>99%	-	>99%
Lorazepam	-	>88%	-	>88%	-	>88%
Cannabinoides						
OH-THC	-		-		-	
THC	-		-		-	
THC-COOH	-		-		-	
Cocaínicos						
Benzoilecgonina	n.c.	>92%	n.c.	>92%	n.c.	>92%
Cocaetileno	-		-		-	
Cocaína	n.c.	>98%	n.c.	>98%	n.c.	>98%
Estimulantes tipo anfetamínico						
Anfetamina	-		-		-	
Efedrina	-	>99%	-	>99%	-	>99%
MDMA	-	>95%	-	>95%	n.c.	>95%
Metanfetamina	-	>32%	-	>33%	-	>32%
LSD						
LSD	-		-		-	
OXO-LSD	-		-		-	
Opiáceos						
6ACM	-		-		-	
EDDP	n.c.	>99%	n.c.	>99%	-	>99%
Heroína	-		-		-	
Metadona	-	>98%	n.c.	>98%	-	>98%
Morfina	-	>59%	-	>59%	-	>59%

Nota: - (no detectado), n.c. (no confirmado).

En la tabla 9 se resume la eficacia de eliminación del tratamiento foto-Fenton con el catalizador de hierro 0,1 g/l por grupos de drogas.

Tabla 9: Resumen eficacia eliminación foto-Fenton catalizador Fe 0,1 g/l en función de los grupos de drogas

Grupo de drogas	Eficacia media del tratamiento		
	25%_0,1	50%_0,1	100%_0,1
Ansiofíticos	78%	78%	78%
Cannabinoides	-	-	-
Cocaínicos	95%	95%	95%
Estimulantes tipo anfetamínico	76%	76%	76%
LSD	-	-	-
Opiáceos	85%	85%	85%

La eficacia de eliminación de esta técnica es superior en todos los casos al 75 % e independiente de la concentración de agua oxigenada añadida. Los grupos que presentan mayor eliminación de drogas de abuso son los cocaínicos y los opiáceos.

4.1.4. Caracterización química del proceso heterogéneo foto-Fenton con catalizador Fe 0,6 g/l

Tabla 10: Concentraciones de drogas de abuso (ng/l) después de foto-Fenton con catalizador Fe 0,6 g/l

Drogas	Fe[0,6 g/l] 25%H ₂ O ₂		Fe[0,6 g/l] 50%H ₂ O ₂		Fe[0,6 g/l] 100%H ₂ O ₂	
	[ng/l]	Eficacia eliminación	[ng/l]	Eficacia eliminación	[ng/l]	Eficacia eliminación
Ansiofíticos						
Alprazolam	n.c.	>47%	n.c.	>47%	n.c.	>47%
Diazepam	0,79	99%	-	>99%	-	>99%
Lorazepan	-	>88%	-	>88%	-	>88%
Cannabinoides						
OH-THC	-		-		-	
THC	-		-		-	
THC-COOH	-		-		-	
Cocaínicos						
Benzoilecgonina	n.c.	>92%	n.c.	>92%	n.c.	>92%
Cocaetileno	-		-		-	
Cocaína	n.c.	>98%	0,32	96%	n.c.	>98%
Estimulantes tipo anfetamínico						
Anfetamina	-		-		-	
Efedrina	-	>99%	-	>99%	-	>99%
MDMA	0,17	99%	n.c.	>95%	-	>95%
Metanfetamina	-	>33%	-	>33%	-	>33%
LSD						
LSD	-		-		-	
OXO-LSD	-		-		-	
Opiáceos						
6ACM	-		-		-	
EDDP	0,15	99%	-	>99%	-	>99%
Heroína	-		-		-	
Metadona	n.c.	>98%	-	>98%	-	>98%
Morfina	-	>59%	-	>59%	-	>59%

Nota: - : no detectado, n.c.: no confirmado.

En las muestras analizadas tras el tratamiento foto-Fenton con catalizador de hierro 0,6 g/l (tabla 10) se detectaron sólo 4 de los compuestos estudiados (cocaína, MDMA, diazepam y EDDP) a concentraciones inferiores de 0,80 ng/l.

En la tabla 11 se resume la eficacia de eliminación del tratamiento foto-Fenton con el catalizador de hierro 0,6 g/l por grupos de drogas. La eficacia de eliminación en este caso es superior al 75% en todos los grupos de drogas y variaciones ínfimas en función de la concentración de agua oxigenada añadida.

Tabla 11: Resumen eficacia eliminación foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/l en función de los grupos de drogas

Grupo de drogas	Eficacia media del tratamiento		
	25%_0,1	50%_0,1	100%_0,1
Ansiolíticos	78%	78%	78%
Cannabinoides	-	-	-
Cocaínicos	95%	95%	95%
Estimulantes tipo anfetamínico	76%	76%	76%
LSD	-	-	-
Opiáceos	85%	85%	85%

En las muestras analizadas tanto en el tratamiento foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/L como con catalizador Fe 0,6 g/l (Tablas 8 y 10) la mayoría de los compuestos se encontraron en una concentración por debajo del límite de detección con una reducción de su concentración en más de un 88%. Es importante destacar que debido a la no confirmación o no detección de muchas de las sustancias en estos tratamientos, la eficacia de eliminación se encuentra referida al límite de determinación, y por tanto, si la concentración inicial era muy próxima a este valor, el porcentaje de reducción es muy bajo y la eficacia debe ser entendida como la mínima alcanzada por este tratamiento.

4.1.5. Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica de la muestra del río, antes y después del tratamiento foto-Fenton se encuentra recogida en la tabla 12. Característicamente, los tratamientos de control de reacción realizados, específicamente ADS_0,1 y ADS_0,6, presentan los mismos niveles de COT que las muestras de tratamiento foto-Fenton con catalizador de Fe 0,1 g/L. Cabe destacar, que el tratamiento foto-Fenton con catalizador Fe 0,6 g/L, con resultados de eliminación de sustancias muy similares al otro tratamiento foto-Fenton, presenta niveles de COT ligeramente superiores. Por otro lado, el control de fotólisis es el que presenta menor reducción de COT.

Tabla 12: Caracterización macroscópica de las muestras de agua antes y después de los tratamientos

	pH	COT	% COT
DRSP5	6,6	60,6	---
Fotólisis	3,1	12,8	78,9
ADS_0,1	3,1	9,76	83,9
ADS_0,6	3,2	8,36	86,2
Fe[0,1 g/l] 100% H₂O₂	3,1	8,91	85,3
Fe[0,1 g/l] 50% H₂O₂	3,0	8,83	85,4
Fe[0,1 g/l] 25% H₂O₂	3,1	8,76	85,5
Fe[0,6 g/l] 100% H₂O₂	2,9	10,32	83,0
Fe[0,6 g/l] 50% H₂O₂	3,2	10,36	82,9
Fe[0,6 g/l] 50% H₂O₂	3,0	12,5	79,4

4.2. Caracterización toxicológica

La caracterización toxicológica se basa en la reducción de la actividad mitocondrial de las esporas en los diferentes tratamientos respecto al control (medio de cultivo Dyer Tween) representado en porcentaje. La reducción de la actividad mitocondrial corresponde a la reducción de la respiración total de ese conjunto de esporas. Este descenso de la respiración total observada puede ser debido a la reducción del número total de esporas por muerte de unas pocas o disminución general de la respiración media de todas las esporas. En ambos casos, esa disminución de la actividad mitocondrial puede ser consecuencia de la toxicidad generada por las drogas de abuso y otras sustancias presentes en las aguas, por lo que podemos hablar de posible toxicidad aguda y subcrónica, en función del tiempo de exposición.

4.2.1. Caracterización toxicológica de los blancos de reacción

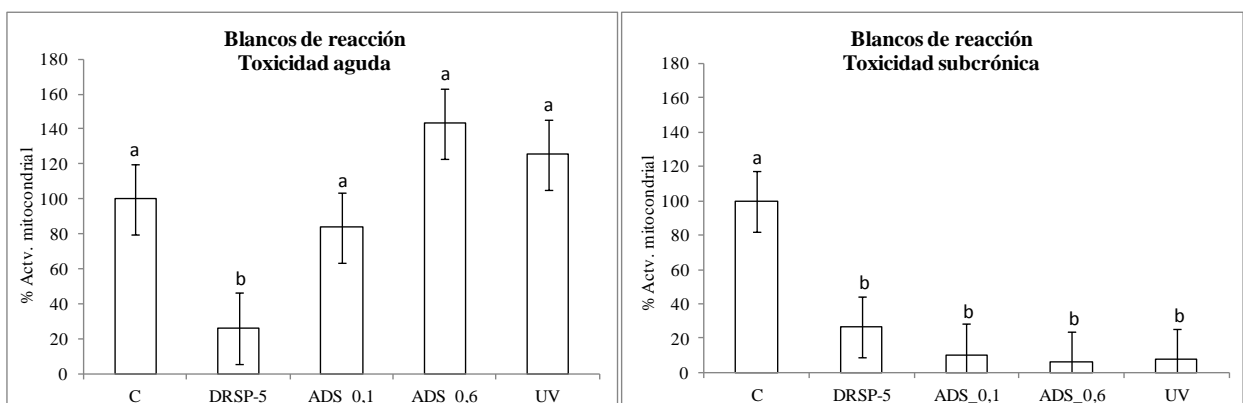


Figura 2: Toxicidad aguda y subcrónica de los blancos de reacción realizados especificados en porcentaje de variación mitocondrial (absorbancia a 492 nm) respecto al medio de cultivo DT (control, C). Las barras

representan el error estándar. Las letras a y b representan los grupos estadísticos significativos definidos por el test Tukey.

En la figura 2 se representa el análisis de toxicidad realizado en las aguas tratadas tras los blancos de reacción. En primer lugar, destacar que independientemente del tipo de toxicidad, aguda o subcrónica, existe una reducción estadísticamente significativa de más del 70 % de la actividad mitocondrial de las esporas cultivadas en medio de cultivo (control) y las que se encontraban en la muestra inicial, DRSP5, siendo esta última de gran toxicidad. Por otro lado, los blancos de reacción, fotólisis y procesos de adsorción, en tiempos de exposición cortos (toxicidad aguda), se encuentran en el mismo grupo de significación que el control, mientras que sí existen diferencias significativas ($p < 0,005$) con la actividad mitocondrial de las esporas de helecho en el agua inicial (DRSP-5). Si la exposición a estas aguas se prolonga en el tiempo (toxicidad subcrónica) observamos que sí existe toxicidad, ya que todos los tratamientos presentan una disminución de la actividad mitocondrial significativa respecto al control.

4.2.2. Caracterización toxicológica del proceso heterogéneo foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/l

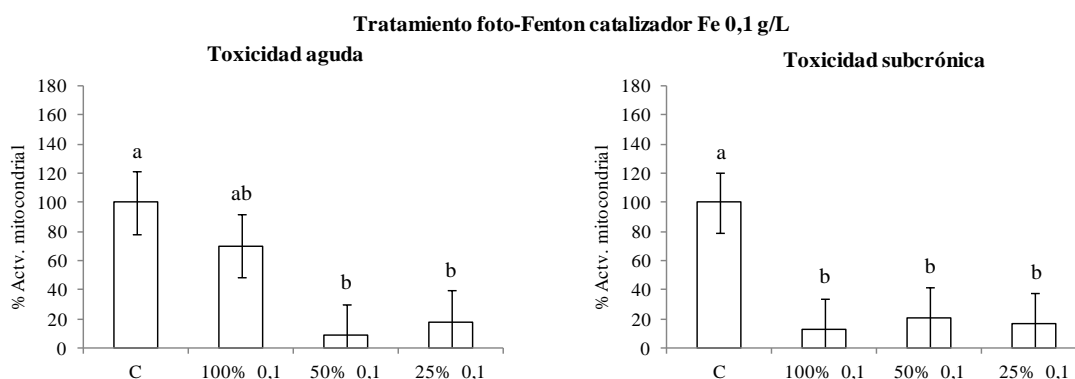


Figura 3: Toxicidad aguda y subcrónica del tratamiento foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/l especificado en porcentaje de variación mitocondrial (absorbancia a 492 nm) respecto al medio de cultivo DT (control). Las barras representan el error estándar. Las letras a y b representan los grupos estadísticos significativos definidos por el test Tukey.

El análisis toxicológico en los tratamientos foto-Fenton con catalizador Fe 0,1 g/l, mostrado en la figura 3, presenta elevada disparidad entre las concentración de H_2O_2 (100%, 50% ó 25%) con tiempos de exposición cortos (44 horas - toxicidad aguda). Independientemente de la concentración de agua oxigenada añadida existe una toxicidad residual, aunque sólo es significativa en el caso de añadir el 50% o 25% de H_2O_2 .

En el análisis de toxicidad subcrónica, todos los tratamientos foto-Fenton con el catalizador Fe 0,1 g/l generan toxicidad sobre las esporas de helecho de forma significativa ($p < 0,005$) reduciendo su actividad mitocondrial hasta más de un 60%.

4.2.3. Caracterización toxicológica del proceso heterogéneo foto-Fenton con catalizador Fe 0,6 g/l

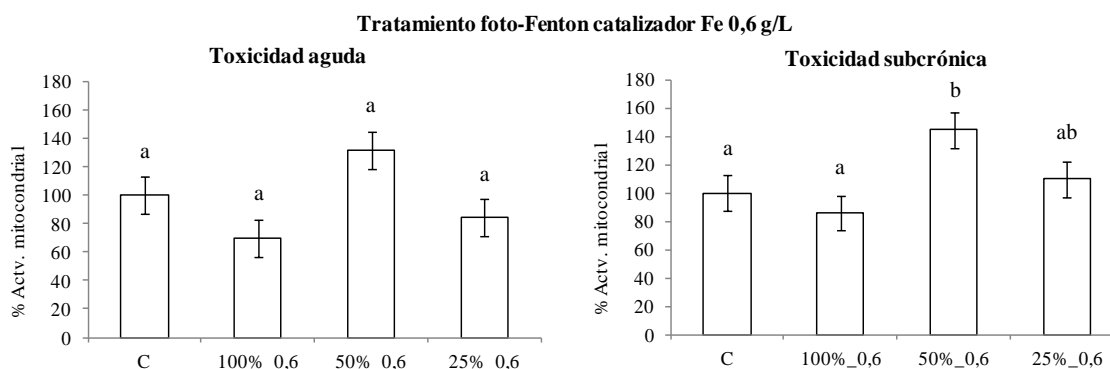


Figura 4: Toxicidad aguda y subcrónica del tratamiento foto-Fenton con catalizador Fe 0,6 g/l especificado en porcentaje de variación mitocondrial (absorbancia a 492 nm) respecto al medio de cultivo DT (control). Las barras representan el error estándar. Las letras a y b representan los grupos estadísticos significativos definidos por el test Tukey.

En los procesos foto-Fenton realizados con el catalizador de Fe 0,6 g/l mostrados en la figura 4, al evaluar la actividad mitocondrial en tiempos de exposición cortos, ninguno presenta toxicidad.

A mayores tiempos de exposición, el proceso que implica la adición del 50% de H₂O₂ es el único tratamiento que presenta toxicidad, aumentando en más de un 40% la actividad mitocondrial de las esporas. A pesar de que las esporas de helecho tengan una tasa de respiración superior al control, este suceso puede ser considerado toxicidad y es conocido como hormesis, donde la presencia de una sustancia tóxica provoca una estimulación de la actividad de la célula (Calabrese, 2008; Calabrese & Brain, 2009).

5. DISCUSIÓN

Este trabajo investiga, por primera vez, la presencia y concentración de veinte drogas de abuso en las aguas superficiales del Manzanares en la región metropolitana de Madrid, el área más densamente poblada en España y una de las mayores en Europa. Los resultados obtenidos en términos de concentraciones de drogas en Madrid son superiores a los encontrados en otros estudios, tanto europeos (Zuccato et al, 2008; Gheorghe et al, 2008; Kasprzyk-Hordern et al., 2008) como españoles (Boleda et al., 2009; Postigo et al, 2010; Vazquez-Roig et al., 2010; Valcárcel et al., 2012). Las dos únicas sustancias con menor concentración que en el resto de estudios son la efedrina, estimulante de tipo anfetamínico, y la benzoilecgonina, cuyas concentraciones son similares a las de la cocaína, cuando las concentraciones del metabolito suelen ser superiores (Postigo et al, 2010; Vazquez-Roig et al., 2010; Valcárcel et al, 2012). Esta muestra se caracteriza por una concentración relativamente elevada de los compuestos alprazolam, lorazepam y diazepam (ansiolíticos) y metadona y EDDP (opiáceos).

De esta forma se confirma que las drogas de abuso no son eliminadas en su totalidad por las depuradoras de aguas residuales modelo (Mendoza et al., manuscrito en preparación; Zuccato et al., 2005; Huerta-Fontela et al., 2008a). Por ejemplo, Zuccato & Castiglioni en 2009, demostraron que no todas las drogas de abuso son eliminadas con la misma efectividad. Mientras que la anfetamina y la metanfetamina se reducen entre un 70 – 90 %, al igual que la cocaína y sus metabolitos, siendo su concentración en el efluente del orden de ng/l, el coeficiente de reducción del éxtasis de las aguas residuales es menor del 50 % siendo su concentración de decenas de ng/l. Por otro lado, sustancias como la metadona y sus metabolitos son altamente resistentes, eliminadas sólo en un 9% de las aguas residuales.

Los resultados obtenidos, provenientes de aguas fluviales, permiten conocer las concentraciones reales a las que se encuentran expuestos los diferentes seres vivos acuáticos. Los datos de ecotoxicidad de concentraciones relevantes para el medio ambiente de contaminantes emergentes son escasas y casi exclusivamente referidas a letalidad en organismos adultos sanos (González et al., 2012). La presencia de drogas de abuso en el medio fluvial supone un riesgo toxicológico potencial para el medio ambiente, sobre todo a largo plazo. La disminución prácticamente total de la actividad mitocondrial o incluso un aumento de los ratios de crecimiento, hormesis, pueden ser consecuencia de mecanismo de defensa cuando los organismos se encuentran expuestos a concentraciones subletales de tóxicos (Calabrese, 2008). Al igual que en este trabajo, los resultados de toxicidad hallada en las mismas aguas por Rodríguez-Gil et al. (2010) reflejan la misma toxicidad pero por fármacos. Si esto fuera así, se podría afirmar que la presencia de contaminantes emergentes y el hecho de no eliminarlos de este medio, suponen un peligro grave no sólo para la fauna y la flora de estos ecosistemas, sino también para el ser humano.

Los métodos de oxidación avanzada, pueden ayudar a resolver el problema, aunque no todos consiguen eliminar dicha toxicidad. La efectividad de los procesos foto-Fenton dependen de la concentración de sales de hierro del catalizador heterogéneo y de la concentración de peróxido de hidrógeno añadida. Una baja concentración en el catalizador, supone la no completa eliminación de sustancias en el agua que provocan tanto toxicidad aguda como subcrónica. Por otro lado, las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno indican que el 100% estequiométrico provoca una leve toxicidad a largo plazo, probablemente debida a su consumo incompleto durante la reacción. Los niveles de todas las drogas de abuso tras 6 horas de tratamiento foto-Fenton heterogéneo se encuentran debajo de los límites de detección, lo que demuestra la aplicación potencial de esta tecnología para la eliminación de estas sustancias. Recientemente, dos procesos fotocatalíticos solares, uno de ellos basado en fotocatalisis heterogénea usando óxido de titanio y otra basada en el sistema foto-Fenton usando sales de hierro (II), han sido evaluadas en una planta piloto para la eliminación de cocaína y metadona (Postigo et al., 2011a, 2011b). Los resultados de este estudio revelan que el tratamiento foto-Fenton es ligeramente más eficiente que la fotocatalisis heterogénea de TiO_2 .

La caracterización química de todas las muestras tras los procesos foto-Fenton determinaba reducciones superiores al 90% en la concentración de la mayoría de las drogas de abuso, aunque la caracterización toxicológica demostró una reducción significativa de los ratios de crecimiento de las esporas de helecho. Este hecho sugiere la presencia de otros tóxicos que no han sido analizados, probablemente de naturaleza inorgánica, que alteran el desarrollo de la planta. Otra posibilidad es que los compuestos al resultar sólo parcialmente degradados, formen subproductos aún más tóxicos que los compuestos originales (Bolong et al., 2009).

La legislación estatal, Real Decreto 509/1996 de 15 de marzo, establece unos requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas donde es necesaria la medición de los parámetros DBO_5 , COT o DOT. Este parámetro no es representativo para conocer la eficacia de degradación de las drogas de abuso, ya que la concentración de estas sustancias supone un porcentaje ínfimo del carbono orgánico total de las aguas, en relación a otras sustancias, debido a su baja concentración. Así se puede observar cómo cuando los valores de reducción de COT de todas las muestras son superior al 80% y muy homogéneo independientemente del tratamiento realizado, la caracterización química de los procesos ofrece unas efectividades totalmente diferentes. Este hecho indica la presencia de otras sustancias adicionales disueltas en las muestras de río que aumenta las concentraciones de COT. Este tipo de sustancias pueden desempeñar un papel crucial en la degradación de las drogas de abuso por MOA debido a la competición por las especies con radicales libres (Radjenovic et al., 2009).

Es importante tener en cuenta que el estudio se encuentra limitado a una EDAR modelo y un punto determinado de los ríos de Madrid. A pesar de que los resultados son semejantes a otros estudios

realizados en cuencas similares, en futuros estudios habría que ampliar el rango de muestras de agua analizadas tras el emisario de diferentes depuradoras en la cuenca. Además, sería conveniente recoger las muestras en diferentes épocas del año, subsanando la limitación de temporalidad de este estudio, donde tanto los hábitos de los consumidores de drogas como la dinámica fluvial podrá variar los resultados obtenidos. Finalmente, para completar la caracterización toxicológica y poder asegurar toxicidad de las aguas sería necesario complementar el estudio, con cuantificación de DNA y autofluorescencia de la clorofila, dos biomarcadores que clarificarían los resultados obtenidos en la actividad mitocondrial.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman la presencia de drogas de abuso en el río Manzanares a lo largo del área metropolitana de Madrid. Cocaínicos, estimulantes de tipo anfetamínico, ansiolíticos, opiáceos, LSD y cannabinoides han sido los grupos de drogas encontrados en estas aguas fluviales en diferentes concentraciones en un rango desde 1,90 a 156,33 ng/l.

Las drogas de abuso no son eliminadas en su totalidad del medio fluvial, ya que las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales o las potabilizadoras no están diseñadas para eliminar este tipo de contaminantes. La presencia de drogas de abuso en el medio fluvial supone un riesgo toxicológico potencial para el medio ambiente, sobre todo a largo plazo produciendo un aumento de los ratios de crecimiento, resultado de un incremento de actividad como mecanismo de defensa debido a la exposición a concentraciones subletales de tóxicos.

Los tratamientos de foto-Fenton pueden ayudar a resolver este problema ya que alcanzan un elevado grado de mineralización, más del 70 % en todas las muestras. La concentración de la mayoría las drogas de abuso estudiadas fue reducida satisfactoriamente a concentraciones inferiores al límite de detección del método analítico, mientras que otros compuestos, como cocaína, MDMA o EDDP, permanecían en concentraciones muy bajas. La efectividad de los procesos foto-Fenton depende de la concentración de sales de hierro del catalizador heterogéneo y de la concentración de peróxido de hidrógeno añadida. La realización de este tratamiento de forma incompleta, supone la generación de otros compuestos que confieren al agua una elevada toxicidad. Debido a esto, la combinación más efectiva es el tratamiento foto-Fenton con catalizador de Fe 0,6 g/l aunque no se puede asegurar la concentración de peróxido de hidrógeno.

Los resultados de la caracterización toxicológica demuestran que a pesar de los elevados índices de eficacia dados por la caracterización química, existen una serie de procesos que generan toxicidad en el medio. Esto refleja la importancia de la combinación de los test toxicológicos con los análisis químicos, ya que son unas herramientas esenciales para evaluar la eficacia de las nuevas tecnologías de tratamiento de aguas basadas en los procesos de oxidación avanzada. El nuevo bioensayo desarrollado ha sido una herramienta eficiente y sensible en este contexto y puede ser útil en otras situaciones.

Hay que tener en cuenta el riesgo potencial para la salud humana y para el medio ambiente que supone la presencia de las drogas de abuso en el medio fluvial. Es importante seguir estudiando la presencia de estas sustancias, su ecotoxicología y sus posibles efectos en la salud pública.

7. BIBLIOGRAFÍA

- APHA (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington D.C.
- Boleda R., Galcerán T., Ventura F. (2007). Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1175: 38-48.
- Boleda R., Galcerán T., Ventura F. (2009). Monitoring of opiates, cannabinoids and their metabolites in wastewater, surface water and finished water in Catalonia, Spain. *Water res*; 43 (4): 1126-36.
- 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.
- Bones J., Thomas K.V., Paull B. (2007). Using environmental analytical data to estimate levels of community consumption of illicit drugs and abuse pharmaceutical. *J Environ Monit* 9 (7): 701-7.
- Calabrese E.J. (2008). Hormesis: why is important to toxicology and toxicologist. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1451-1474.
- Calabrese E.J., Blain R.B. (2009). Hormesis and plant biology. *Environ. Pollut.* 157, 42-48.
- Catalá M., Esteban M., Rodríguez-Gil J.L., Quintanilla L.G. (2009). Development of a Naturally Miniaturised Testing Method Based on the Mitochondrial Activity of Fern Spores: a New Higher Plant Bioassay. *Chemosphere* 77, 7: 983-8.
- Catalá M., Esteban M., Quintanilla L.G. (2010). Working with Ferns: Mitochondrial Activity of Fern Spores for the Evaluation of Acute Toxicity in Higher Plant Development. *Ed. Springer, New York* 237-247.
- EDADES (2010). Encuesta domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España 2009/2010. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Disponible en: www.mspsi.es. Consultado en Enero 2013.
- Esteban M., Fernández Rodríguez J., Díaz López G., Nuñez M., Valcárcel Y., Catalá M. (2013). New microbioassays based on biomarkers are more sensitive to fluvial water micropollution than standard testing methods. *Ecotoxicol Environ Saf.*

- Farré, M., Martínez, E., Barceló, D. (2007). Validation of interlaboratory studies on toxicity in water samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(4): 283–292.
- Feito R., Valcárcel Y., Catalá M. (2012). Biomarker assessment of toxicity with miniaturized bioassays: diclofenac as a case study. *Ecotoxicology*. 21: 289-296.
- Gheorghe A., van Nuij A., Pecceu B., Bervoets L., Jorens P.G., Blust R., et al. (2008) Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*; 391(4):1309–19
- González S., López-Roldán R., Cortina J.L. (2012). Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: a review. *Environ. Pollut.* 161, 83–92.
- González-Mariño I., Rodríguez I., Quintana J. B., Cela R. (2010). Matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of triclosan and methyl triclosan in sludge and sediments. *Anal Bioanal Chem*; 398 (5):2289-97.
- Huerta-Fontela M., Galcerán MT., Ventura F. (2007). Ultrapformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters. 79: 3821-9.
- Huerta-Fontela M., Galcerán MT., Martín-Alonso J., Ventura F. (2008a). Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. *Sci Total Environ* 397 (1-3): 31-40.
- Huerta-Fontela M., Galcerán MT., Ventura F. (2008b). Stimulatory drugs of abuse in surface waters and their removal in a conventional drinking water treatment plant. *Environ Sci Technol*; 42:6809-16.
- Hummel D., Löffler D., Fink G., Turner T.A. (2006). Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 40(23): 7321-8.
- Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. (2008). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res* 42(13): 3498-518.
- Martínez Bueno M.J., Agüera A., Gómez M.J., Hernando M.D., García-Reyes J.F., Fernández-Alba A.R. (2007). Application of liquid chromatography/quadrupole-linear Ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Anal Chem*. 15; 79(24): 9372-84.

- Martínez Bueno M.J., Hernando M.D., Herrera S., Gómez M.J., Fernández-Alba A., Bustamante I. et al. (2010). Pilot survey of chemical contaminants from industrial and human activities in river waters in Spain. *Int J Environ Anal Chem*; 90(3):321-4.
- Melero J.A., Martínez F., Calleja G., Molina R. (2005). Heterogeneous photo-Fenton degradation of phenolic aqueous solutions over iron-containing SBA-15 catalyst. *Applied Catalysis* 60:185-194.
- Postigo C., López de Alda M.J., Barceló D. (2008). Fully automated determination in the low nanogram per liter level of different classes of drugs of abuse in sewage water by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 80(9): 3123-34.
- Postigo C., López de Alda M.J., Barceló D. (2010). Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation. *Environ Int.* 36 (1): 75-84
- Postigo C., Sirtori C., Oller I., Malato S., Maldonado M.I., López de Alda M., Barceló D. (2011a). Photolytic and photocatalytic transformation of methadone in aqueous solutions under solar irradiation: kinetics, characterization of major intermediate products and toxicity evaluation. *Water Res.* 15;45(16): 4815-26.
- Postigo C., Sirtori C., Oller I., Malato S., Maldonado M.I., López de Alda M., Barceló D. (2011b). Photolytic and photocatalytic transformation of cocaine in aqueous solutions under solar irradiation: kinetics, characterization of major intermediate products and toxicity evaluation. *Appl CatalB Environ.* 104(1-2): 37-48.
- Radjenovic J., Jelic A., Petrovic M., Barceló D. (2009). Determination of pharmaceuticals in sewage sludge by pressurized liquid extraction (PLE) coupled to Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Anal Bioanal Chem*;393(6-7): 1685-95.
- Rodríguez-Gil J.L., Catalá M., González Alonso S., Romo Maroto R., Valcárcel Y., Segura Y., Molina R., Melero J.A., Martínez F. (2010) Heterogeneous photo-Fenton treatment for de reduction of pharmaceutical contamination in Madrid rivers and ecotoxicological evaluation by miniaturized fern spores bioassay. *Chemosphere.* 80: 381-388.
- Terzic S., Senta I., Ahel M. (2010). Illicit drugs in wastewater of the city of Zagreb (Croatia) – estimation of drug abuse in a transition country. *Environ Pollut* 158(8): 2686-93.
- UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). World Drug Report 2008. Disponible en: www.unodc.org. Consultado en Enero 2013.

- Valcárcel Y., González Alonso S., Rodríguez-Gil J.L., Gil A., Catalá M. (2011) Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*. 84: 1336-1348.
- Valcárcel Y., Martínez F., González Alonso S., Segura Y., Catalá M., Molina R., Montero-Rubio J.C., Mastroianni N., López de Alda M., Postigo C., Barceló D. (2012) Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus River basin: Heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. *Environ Int*. 41: 35-43.
- Van Nuijs ALN., Pecceu B., Theunis L., Dubois N., Charlier C., Jorens PG., Bervoets L., Blust R., Neels H., Covaci A. (2009). Cocaine and metabolites in waste and surface water across Belgium. *Environ Pollut* 157 (1): 123-9
- Vazquez-Roig P, Andreu V, Blasco C, Pico Y. (2010) SPE and LC-MS/MS determination of 14 illicit drugs in surface waters from the Natural Park of L'Albufera (Valencia, Spain). *Anal Bioanal Chem*; 397(7):2851–64.
- Zuccato E., Castiglioni S. (2009). Illicit drugs in the environment. *Phil. Trans. R. Soc. A* 367, 3965-3978.
- Zuccato E., Chiabrando C., Castiglioni S., Calamari D., Bagnati R., Schiarea S., Fanelli R. (2005). Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ. Health* 4, 14.
- Zuccato E., Chiabrando C., Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R.. (2008). Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ Health Perspect* 116: 1027-32.