

Estudio de la aplicación de la epidemiología de las aguas residuales para la estimación del consumo de drogas en España

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Agustina Trinidad Peloso

Máster en Genética, Física y Química Forense

Tutorizado por:

Dra. Miren López de Alda (tutora externa del IDAEA-CSIC)

Dra. Carme Aguilar (URV)



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



Tarragona, Junio 2020



RESUMEN

El incremento en el consumo de drogas de abuso (DOA) se ha convertido en un tema que ha suscitado gran interés y preocupación en la sociedad en los últimos años. Por ello, han surgido un gran número de estudios centrados en el consumo de estas sustancias. Este puede estimarse a partir del análisis de las aguas residuales urbanas, ya que las drogas consumidas por los seres humanos finalmente se excretan, principalmente a través de la orina, y terminan en las aguas residuales. Este enfoque se conoce como epidemiología de aguas residuales (WBE, *Wastewater-based epidemiology*).

WBE es una herramienta prometedora y complementaria a otras alternativas, como son las encuestas, para estimar el consumo de drogas por parte de la población en general. Esta herramienta se basa en el análisis cuantitativo de metabolitos específicos de determinados grupos de drogas ilícitas en aguas residuales como sería la cocaína, anfetaminas, cannabis o nuevas drogas psicoactivas. Este análisis se realiza mediante una extracción, normalmente, una extracción en fase sólida, y posteriormente un análisis cromatográfico, que generalmente se lleva a cabo por cromatografía de líquidos acoplada a un detector de espectrometría de masas. Este enfoque fue propuesto por primera vez por Daughton en 2001 y se ha ido aplicando en varios países hasta la actualidad. En 2011 se aplicó de forma coordinada, a nivel europeo para un estudio intercomparativo dirigido por la red SCORE (*Sewage analysis CORE group Europe*). Desde entonces esta red de científicos ha realizado análisis y recopilado datos sobre el consumo de drogas en un número creciente de ciudades europeas año tras año.

En este trabajo se realizará una revisión bibliográfica centrada en comentar distintos aspectos relacionados con la estrategia WBE con el fin de analizar sus ventajas y también sus puntos débiles.



ABSTRACT

In the last years, the increase in the use of drugs of abuse (DOA) has become an issue that has generated a wide interest and concern in society. Due to this, studies focused on the use of these substances have emerged. Through the analysis can be estimated from the analysis of urban wastewater as the drugs consumed by humans are eventually excreted through urine and end up in the wastewater. This approach is known as Wastewater-based epidemiology (WBE).

WBE is a promising tool and complementary to other alternatives, such as surveys, to estimate drug use by the general population. This tool is based on the quantitative analysis of specific metabolites of certain groups of illicit drugs in wastewater such as cocaine, amphetamines, cannabis or new psychoactive drugs. This analysis conducted with an extraction step, usually a solid phase extraction, and afterwards a chromatographic analysis is carried out, which is generally done by liquid chromatography coupled to a mass spectrometric detector. This approach was first proposed by Daughton in 2001 and has been applied in several countries to date. In 2011, it was used in a coordinated manner, at the European level, for an intercomparative study led by the SCORE network (Sewage analysis CORE group Europe). Since then this network of scientists has conducted analyses and collected data on drug use in an increasing number of European cities year after year.

This paper will be carried out through a bibliographical review focused on explaining the different aspects related to the WBE strategy in order to analyse its advantages and also its weak points.



ÍNDICE

1. Introducción.....	6
1.1. Drogas de abuso y epidemiología de aguas residuales.....	6
1.2. Biomarcadores de drogas en aguas.....	7
1.3. Metodología utilizada en WBE.....	9
2. Objetivos.....	12
3. Evolución de la determinación del consumo de drogas en la población.....	13
3.1. WBE en España: ESAR-NET.....	15
4. Estudios realizados sobre WBE.....	17
4.1. Primeros estudios sobre WBE y metodología de análisis.....	17
4.2. Coordinación de estudios a nivel europeo.....	19
4.3. Comparativa de estudios realizados en España.....	23
4.3.1. Preparación de la muestra.....	23
4.3.2. Análisis cromatográfico.....	26
5. Comparativa de estudios de estimación del consumo de drogas en basados en el análisis de aguas residuales a nivel europeo.....	27
5.1. Resultados de los estudios de la red SCORE y consumo de drogas en España.....	27
6. Incertidumbres del enfoque.....	31
6.1. Muestreo.....	31
6.2. Estabilidad de los biomarcadores.....	33
6.3. Método analítico.....	35
6.4. Cálculo del consumo de drogas en la población.....	35
7. Perspectivas de futuro.....	36
8. Conclusiones.....	37
9. Bibliografía.....	39



1. INTRODUCCIÓN

1.1. DROGAS DE ABUSO Y EPIDEMIOLOGIA DE AGUAS RESIDUALES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define una droga como "Toda sustancia terapéutica o no, que introducida en el organismo por cualquier vía de administración (inhalación, ingestión, fricción, administración parenteral, endovenosa), produce una alteración, de algún modo, del natural funcionamiento del sistema nervioso central del individuo y es, además, susceptible de crear dependencia, ya sea psicológica, física o ambas, de acuerdo con el tipo de sustancia, la frecuencia del consumo y la permanencia en el tiempo" (1). Actualmente, existe el concepto de droga de abuso (DOA), que es un término dado a las drogas consumidas en exceso de forma persistente o esporádica, que no es consecuente ni está relacionada con una práctica médica aceptable, cuyo abuso generalmente puede conducir al daño físico y mental y, en ciertas ocasiones, a la dependencia y adicción (2).

El consumo de drogas es una preocupación creciente en todo el mundo. El Informe Mundial sobre Drogas de 2019 señala que aproximadamente 271 millones de personas en todo el mundo toman drogas, con un consumo anual de miles de toneladas (3).

Las drogas de abuso se excretan, a través de la orina o las heces, e ingresan al sistema de aguas residuales después de su consumo en forma de compuesto original o metabolito (4). Por ello, en los últimos años se ha empezado a estudiar y a evaluar la presencia de este tipo de compuestos en las aguas residuales en plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR). Gracias al cálculo de las concentraciones de los metabolitos o del compuesto original de estas drogas se puede conocer la cantidad de una droga consumida por la población que vierte sus productos de excreción en los sistemas de alcantarillado urbano que llegan a las EDARs (5).

Esta estrategia innovadora para evaluar el consumo de drogas en grandes poblaciones fue presentado por primera vez como Epidemiología de las Aguas Residuales (*Wastewater-based epidemiology* (WBE)) en 2001 e implantado por primera vez en 2005 usando cocaína como droga (6). WBE se basa en el análisis de aguas residuales mediante un método analítico para poder determinar contaminantes y biomarcadores, es decir, sustancias presentes en estas aguas como consecuencia de su excreción por



parte de la población (4). De ese modo se puede estudiar la distribución y la frecuencia de algunas sustancias como son por ejemplo las drogas de abuso.

Por lo tanto, conocer la cantidad de una sustancia en las aguas residuales puede proporcionar información cualitativa o cuantitativa sobre la exposición media de la población a esa sustancia. También, con esta información es posible realizar evaluaciones de tendencias espaciales o temporales, y obtener respuestas a eventos dentro de una región, por ejemplo el consumo de drogas durante un festival de verano. La estrategia WBE se realiza en base a la población y no es invasivo, por lo que se respeta la privacidad de las personas. Es una estrategia que proporciona estimaciones en tiempo real y de hecho el observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA, *European Monitoring Centre for Drugs Addiction*) ha incluido WBE como una herramienta complementaria a los métodos tradicionales para estimar el uso de drogas en Europa (7,8).

1.2. BIOMARCADORES DE DROGAS EN AGUAS

Las sustancias de abuso más investigadas actualmente en Europa bajo el concepto de WBE y sus biomarcadores medidos en el agua residual para estimar su consumo se puede resumir en la siguiente Tabla 1 (7):

Tabla 1: Metabolitos de las drogas utilizados como biomarcadores de su consumo en aguas residuales a nivel europeo

Grupo de drogas	Biomarcador
Cocaínicos	Benzoilecgonina (BE), cocaína (COC), cocaetileno(CE)
Anfetaminas	Anfetamina (AM), metanfetamina (MA), efedrina (EPH), 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA o éxtasis)
Opiáceos	6-acetilmorfina (6AM), morfina (MOR), 2-etildeno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), metadona (METH), heroína (HER)
LSD	Dietialmida de ácido lisérgico (LSD), 2-oxo-3hidroxi-LSD (OH-LSD)



Cannabinoides	11-nor-9-carboxi-9-tetrahidrocannabinol (THC-COOH), 11-hidroxil-9-tetrahidrocannabinol (OH-THC), 9-tetrahidrocannabinol (THC)
Alcohol	Sulfato de etilo
Tabaco	Cotinina e hidroxil-cotinina

Los grupos más estudiados de drogas corresponden a los cocaínicos, anfetaminas, opiáceos, LSD y cannabinoides, y el alcohol y el tabaco se han estudiado en menor medida (9, 10, 11).

Como biomarcadores se utilizan los compuestos que se excretan en mayor proporción y que son más exclusivos de la droga en cuestión. Para algunas drogas, se determina el compuesto principal y para otras sus metabolitos, en función de la tasa de excreción y la estabilidad que tengan en las aguas. Así por ejemplo, en el caso del éxtasis o MDMA, la metanfetamina y la anfetamina se han estudiado principalmente como compuestos originales y no como sus metabolitos debido a la alta eliminación de estos compuestos a través de la orina. Otro motivo es que la metanfetamina tiene como metabolito la anfetamina y el éxtasis metaboliza a 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA) esto significa que si se quiere cuantificar la anfetamina o MDA se estaría dando la suma del consumo de dos drogas diferentes y se confundirían las estimaciones del consumo de MDA y MDMA (12).

Para determinar la cocaína y el cannabis se buscan sus metabolitos que son la benzoilecgonina (BE) y el THC-COOH, respectivamente (7,12). La cocaína es bastante inestable, debido a que se puede hidrolizar según las condiciones de pH en las que se almacene la muestra. Su metabolito BE, en cambio, es bastante estable en agua y no se ve tan afectado por las condiciones de almacenaje. Si se quiere estudiar el consumo simultáneo de cocaína y alcohol se debería buscar cocaetileno como biomarcador, ya que es el metabolito que se deriva del consumo de estas dos drogas de manera conjunta (12). En el caso del cannabis sus metabolitos presentan dificultades de conservación debido a su naturaleza hidrofóbica y tiene poca excreción urinaria, por lo



tanto se debe seguir investigando para mejorar la cuantificación, pero hasta el momento se está determinado con THC-COOH (13,14).

Además de las drogas comentadas, que serían las más habituales, en los últimos años se están investigando las nuevas drogas psicoactivas (NPS). NPS forman un grupo heterogéneo de compuestos que cubre muchas clases diferentes de drogas, como catinonas sintéticas, piperazinas, cannabinoides sintéticos, sustancias de tipo fenciclidina, triptaminas sintéticas (psicodélicas), fenetilaminas y benzodiacepinas sintéticas (12). Desde un punto de vista analítico, constituyen un desafío, debido a su número cada vez mayor, la falta de material de referencia para muchos de ellos, conocimiento limitado de su metabolismo y sus bajas concentraciones en aguas residuales. El interés en la detección de NPS en aguas residuales es debido a la alta toxicidad y las implicaciones adversas para la salud que resultan del uso de algunos de estos compuestos (15). Dado que son drogas recientemente conocidas, hasta el momento se están determinando con su compuesto original y no con sus metabolitos (16).

A la hora de determinar los biomarcadores de las drogas hay que tener en cuenta un factor muy importante que es la estabilidad de éstos en el agua., ya que puede conducir a subestimaciones o sobreestimaciones significativas al determinar la concentración de drogas en WBE. Por lo tanto, es importante que se tenga conocimiento sobre el comportamiento de estas sustancias en los sistemas de alcantarillado y la estabilidad en la matriz de la muestra durante la recolección y el almacenamiento de aguas residuales para evitar cometer errores en la estimación de drogas por parte de la población (17).

1.3. METODOLOGÍA UTILIZADA EN WBE

Las concentraciones de drogas de abuso y sus metabolitos en las aguas residuales generalmente están en el orden de ng/L (ppt), y por ello se requieren métodos analíticos muy sensibles para su análisis. Por ese motivo, una de las técnicas más utilizadas hasta el momento es la cromatografía de líquidos acoplada a la



espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (18-22) con un analizador de triple cuadrupolo (QqQ), debido a que ofrece buena selectividad y bajos límites de detección (23). Aunque también últimamente se está utilizando el detector de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) con analizadores de tiempo de vuelo (TOF) (24, 25) y Orbitrap (26) en combinación con la técnica cromatográfica. Estos dos ofrecen límites de detección similares al LC-MS/MS y permiten determinar masas exactas permitiendo realizar análisis de sustancias desconocidas e identificar nuevas sustancias psicoactivas que entran cada año en el mercado ilegal (27).

A pesar del fuerte potencial de la cromatografía líquida en combinación con MS/MS, una de las posibles problemáticas de esta potente técnica es la posible supresión de la señal de los analitos de interés durante el proceso de ionización en el MS debido a las interferencias de la matriz, conocido como efecto matriz. Uno de los aspectos clave de las metodologías analíticas que debe abordarse para garantizar una cuantificación precisa e identificación fiable, es la eliminación, minimización o corrección de tales efectos matriciales. Aunque la sensibilidad de los instrumentos modernos es excelente, es necesario un paso de tratamiento de muestra para concentrar los analitos de la muestra y eliminar sustancias potencialmente interferentes. Por tanto, se hace necesaria una etapa previa al análisis cromatográfico donde los analitos deben extraerse y preconcentrarse con una técnica de extracción, siendo la extracción en fase sólida (SPE) la técnica más utilizada (20, 28-30). Dependiendo de la polaridad y las propiedades ácidas o básicas de los compuestos, las drogas son comúnmente extraídas con cartuchos de fase reversa y sorbentes con grupos de intercambio o mixtos. (7, 23).

Entre 2005 y 2010, un número creciente de grupos de investigación aplicaron sus propios métodos para evaluar el uso de drogas ilícitas, a nivel local y nacional, en varios países, demostrando el potencial del enfoque WBE para cuantificar el uso de drogas ilícitas a nivel comunitario. Desafortunadamente, es difícil comparar los resultados de estos primeros estudios debido a la falta de procedimientos comunes con respecto a las estrategias utilizadas para muestrear las aguas residuales y para el cálculo retrospectivo del consumo de drogas ilícitas (31). Por lo tanto, teniendo en cuenta las diferentes metodologías que se pueden utilizar para la cuantificación de estas drogas, en 2010, se estableció una red en toda Europa (red SCORE, *Sewage*



analysis CORE group Europe) (32) con el objetivo de estandarizar los enfoques utilizados para el análisis de aguas residuales mediante el establecimiento de un protocolo de acción común referido a todas las etapas del análisis. En España dentro de esta red participan distintos grupos científicos que se detallan a continuación:

- Instituto de Análisis e Investigación de Alimentos, Departamento de Química Analítica, Universidad de Santiago de Compostela.
- Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Salamanca.
- Investigación en Seguridad Alimentaria y Medioambiental, Universidad de Valencia.
- Instituto de Investigación de pesticidas y agua, Universidad Jaume I, Castellón.
- Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Universidad Complutense de Madrid.
- Agua, Medio Ambiente y Química de Alimentos (ENFOCHEM, *Water, Environmental and Food Chemistry*), Departamento de Química Ambiental, Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC), Barcelona.

A parte de la red SCORE, en España se ha creado la “Red española de análisis de aguas residuales con fines epidemiológicos” (ESAR-Net) con el objetivo de contribuir al avance científico y al reconocimiento de esta metodología en España, impulsando el liderazgo de los grupos españoles a nivel internacional (33).

Gracias a estos grupos se han realizado varios estudios en diferentes EDARs del territorio español como en Madrid, Barcelona, Valencia, Castellón y Santiago de Compostela (8, 18, 34,35).

La primera actividad del grupo SCORE fue una investigación a nivel europeo, realizada en 2011 en 19 ciudades, que permitió realizar el primer estudio de aguas residuales comparando el uso de drogas ilícitas en diferentes ciudades de Europa. Este estudio también incluyó el primer ejercicio de intercalibración para la evaluación de la calidad de los datos analíticos y permitió una caracterización integral de las principales incertidumbres del enfoque de WBE (36). Tras el éxito de este estudio inicial, se



realizaron estudios similares durante los años siguientes, que llegaron a cubrir 68 ciudades y 23 países en Europa en 2019 (37).

A pesar de que el concepto de WBE puede parecer bastante útil y avanzado, los resultados de dicho análisis están sujetos a incertidumbres, principalmente asociadas con el muestreo, el análisis y la estabilidad de los biomarcadores, los factores que influyen en el cálculo del consumo de drogas y la estimación del tamaño de la población (38). Los esfuerzos para minimizar los posibles errores y estandarizar todos los procedimientos han logrado cierto éxito y siguen en continua investigación. La adopción de un procedimiento estandarizado, como es el protocolo de acción común de la red SCORE, posibilita la comparación de estudios entre diferentes países al tener resultados que han seguido los mismos parámetros de calidad (31).

2. OBJETIVOS

Uno de los objetivos principales de este trabajo bibliográfico es dar a conocer el concepto de WBE como herramienta que se utiliza en el estudio del consumo de drogas por parte de la población y la importancia de su investigación y desarrollo. Además de este objetivo general, se pretende abordar los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar los estudios realizados en España hasta la fecha para la evaluación del consumo de drogas bajo el concepto de WBE y explicar las diferentes metodologías y los principales resultados que se han ido obteniendo.
2. Comentar la evolución del consumo de drogas desde el año 2011 hasta el 2019 de anfetamina, metanfetamina, éxtasis y cocaína en cuatro ciudades españolas: Barcelona, Valencia, Santiago de Compostela y Castellón.
3. Evaluar las incertidumbres asociadas al enfoque de WBE relacionadas con cada una de las etapas del método y que estudios o mejoras se han propuesto para minimizarlas.
4. Señalar las posibles perspectivas de futuro del enfoque para mejorar y ampliar sus aplicaciones.

3. EVOLUCIÓN DE LA DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE DROGAS EN LA POBLACIÓN

Anteriormente a la introducción del concepto de WBE, la determinación del consumo de drogas en cada población se realizaba mediante encuestas poblacionales y otros indicadores como el historial de las cantidades de drogas que la policía interceptaba (39). El principal inconveniente de estas encuestas es que son propensas a estar condicionadas por el tabú social que supone reconocer el consumo de este tipo de sustancias. Por ello, en vista de que estos procedimientos podían llevar a la obtención de resultados subjetivos y poco fiables se desarrollaron alternativas basadas en un análisis instrumental (31).

El doctor Daughton en 2001 (4) introdujo el concepto de epidemiología basada en aguas residuales conocida por sus siglas en inglés WBE (*Wastewater-Based Epidemiology*) que implicaba tomar muestras de aguas residuales de diferentes plantas de tratamiento y determinar a partir de los resultados obtenidos la cantidad de drogas presentes en el agua y de esta manera poder estimar el consumo de estas drogas. En 2005 se puso en práctica esta estrategia por Zuccato y col. (6) que determinaron la cocaína y sus metabolitos en aguas residuales y a partir de este estudio se extendieron a las otras drogas de abuso como la anfetamina, metanfetamina, cannabis o éxtasis (5). Actualmente se han estudiado además de las drogas anteriores, más de 37 drogas de abuso, por ejemplo en 2017 en Barcelona se estudiaron 19 drogas entre las cuales estaban cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, ketamina, LSD, morfina, heroína, 6-acetilmorfina, metadona, EDDP, THC-COOH, OH-THC y varias NPS (18).

WBE es un enfoque basado en el análisis químico de contaminantes y biomarcadores en aguas que parte de la base de que las drogas de abuso consumidas por un determinado individuo se excretan al medio a través de las heces u orina y de este modo llegan a los sistemas de alcantarillado urbanos. Por lo tanto, la determinación de este tipo de compuestos en las aguas residuales puede proporcionar información sobre la cantidad y tipo de drogas consumidas en una ciudad de manera anónima. En la siguiente figura se puede observar el esquema del proceso que sigue WBE (Figura 1) (40).

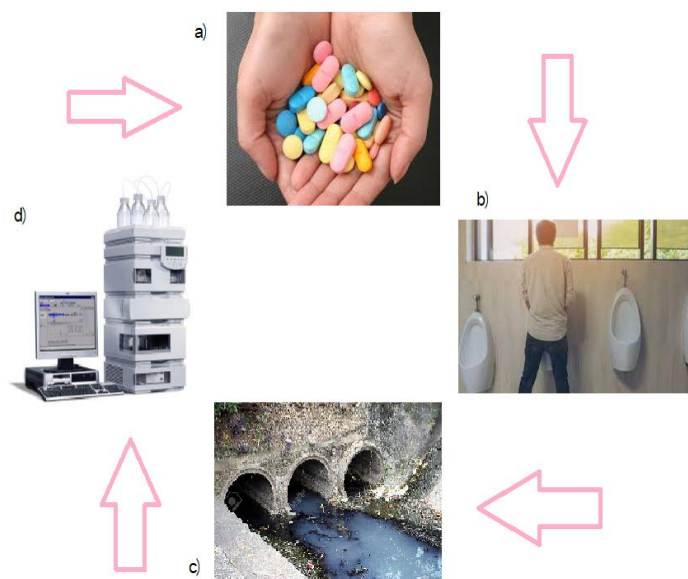


Figura 1: Esquema del proceso WBE: a) consumo de drogas b) excreción de los metabolitos o del compuesto original de las drogas en forma de orina o heces c) llegada de biomarcadores a la red de alcantarillado d) determinación de la concentración de las drogas de interés en aguas superficiales.

Para la determinación del consumo de drogas en la población se ha utilizado mayoritariamente el mismo proceso analítico desde 2005: una extracción por SPE seguida de un análisis por cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (6, 9-10, 14, 18). En la siguiente figura se detalla el procedimiento seguido para el cálculo del consumo de drogas por parte de la población (Figura 2):

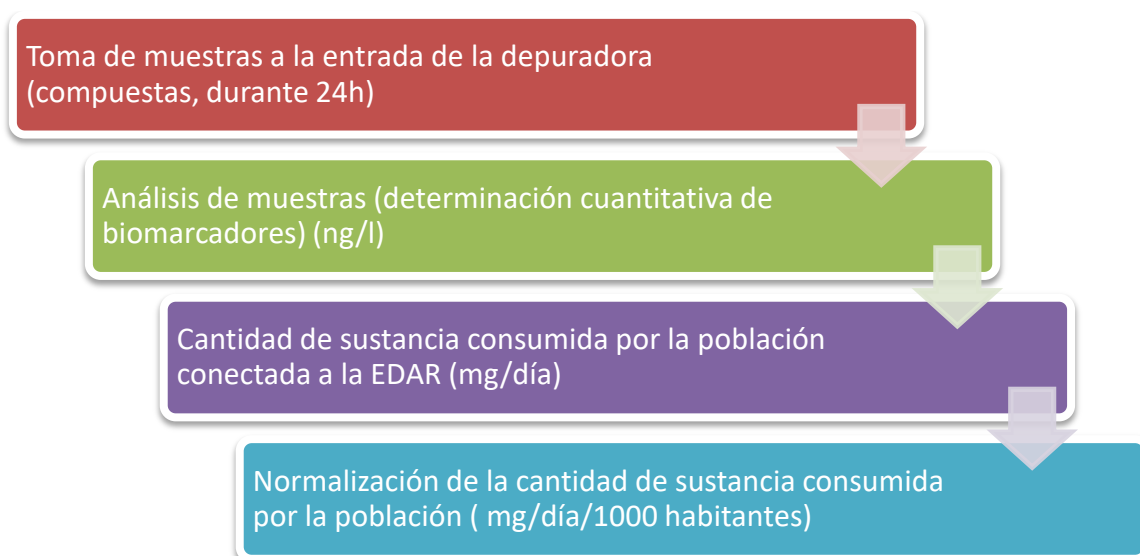


Figura 2: Procedimiento para la determinación de drogas en aguas residuales

El proceso de WBE consta de varias fases tal como se muestra en la figura 2. Inicialmente, se obtienen muestras compuestas de las aguas residuales que llegan a las plantas de tratamiento. La recogida de muestras en la EDAR se suele realizar en un intervalo de tiempo que suele ser a lo largo de 24h. Seguidamente se analizan las muestras para determinar cuantitativamente los biomarcadores de las drogas de interés. Conociendo la cantidad del biomarcador por ejemplo en mg/día y el tamaño de la población que vierte sus aguas a la EDAR se puede normalizar el consumo en mg/día/1000 habitantes mediante la siguiente ecuación (ecuación 1) (16):

$$\left(\frac{\frac{mg}{día}}{1000 \text{ habitantes}} \right) = \frac{C_i \times F \times \frac{R_i}{E_i}}{P} \text{ (Ecuación 1)}$$

En la expresión anterior, C_i es la concentración del analito (droga original o metabolito) medido en las muestras (ng/l), F es el volumen total de aguas residuales que ha llegado a la EDAR durante el período de muestreo (generalmente 24 h) (l/día), P es el número de habitantes en la población, R_i es la relación entre la masa molar del compuesto original y su metabolito y E_i es la tasa de excreción promedio del analito, que es un factor tabulado (7, 31, 41).

3.1. WBE EN ESPAÑA: ESAR-NET

Tal y como se ha comentado anteriormente, a nivel europeo encontramos la red SCORE donde participan grupos de investigación de diferentes países. A raíz de la contribución de varios grupos españoles en la red SCORE, en España se creó la Red Española de Análisis de Aguas Residuales con Fines Epidemiológicos (ESAR-Net) que es una Red formada por 6 grupos de investigación españoles y más de 20 investigadores con amplia experiencia en química analítica y epidemiología, y su objetivo es contribuir al avance científico de WBE y difundir el potencial de esta herramienta a las autoridades y entidades potencialmente interesadas y a la sociedad en general. Con la creación de ESAR-Net se pretende fomentar la colaboración y coordinación a nivel nacional, realizando estudios que monitoricen el consumo de drogas en varias ciudades de España, para tener un mayor impacto científico y social (7, 33).



ESAR-Net cuenta también con entidades asociadas, como por ejemplo el observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA, *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*), *Energy Control*, Socidrogalcohol o la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas, ya que el EMCDDA tiene como objetivo difundir los resultados a diferentes entidades o autoridades así como también a la sociedad en general (34).

Dentro de las acciones de carácter científico-colaborativo, ESAR pretende (42):

- Investigar en el territorio español el consumo de drogas ilegales, alcohol y tabaco, involucrando para ello a las entidades con competencia en prevención y salud pública.
- Validar metodologías para el análisis de alcohol y tabaco, ya que para las demás drogas mencionadas anteriormente, ya han sido validadas a nivel internacional en el marco de la red SCORE.
- Explorar otras aplicaciones de WBE como la identificación de nuevos biomarcadores para determinar el consumo de nuevas sustancias psicoactivas.
- Evaluación de la eficiencia de la eliminación de drogas en EDAR convencionales y estudio del impacto medioambiental e este tipo de contaminantes emergentes.

Actualmente, la red analiza durante una semana varios periodos del año (teniendo en cuenta factores de interés como festivales o vacaciones), las aguas residuales de 17 plantas de tratamiento de aguas residuales distribuidas en 7 comunidades autónomas del territorio español, que cubren un total de 6 millones de habitantes, lo que equivale al 13% de la población total. A través de este muestreo, en el que se cubren diferentes tipos de población, se pretenden conocer los patrones de consumo en España y detectar las tendencias de consumo de manera efectiva y más rápida (7, 33, 42).

4. ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE WBE

4.1. Primeros estudios sobre WBE y metodología de análisis

Los primeros estudios que aplicaron el enfoque WBE se basaron en la técnica utilizada para la matriz de orina pero aplicada en aguas residuales para determinar los metabolitos de las drogas (43,44). Tal y como se ha comentado anteriormente, en 2005 se aplicó por primera vez el concepto de WBE para el análisis de drogas. En el estudio realizado por Zuccato y col. (6) determinaron la cocaína y su metabolito, benzoilecgonina, en aguas residuales de diferentes EDARs situadas en Italia, que recibía aguas de las ciudades Cagliari, Latina, Cuneo y Varese, mediante LC-MS/MS con un analizador QqQ e ionización a presión atmosférica (API). También se compararon con muestras recogidas en el río Po. Para la determinación se siguió la siguiente metodología:

- Se recolectaron muestras de 500 ml del río Po y 2 L de aguas de entrada de las cuatro EDARs anteriormente mencionadas. A continuación, se almacenaron a 4°C durante 3 días.
- Las muestras se filtraron en un filtro de microfibra de vidrio y se ajustó un pH 2 con una solución de HCl al 37%.
- Se realizó una SPE con un cartucho Oasis MCX (*mixed-mode cation-exchange*) acondicionado con metanol, agua y agua a pH 2. Después de pasar la muestra, los cartuchos se secaron al vacío y se procedió a la elución de los analitos con metanol y una solución de amoníaco al 2% de metanol. Finalmente, la muestra se secó con una corriente de aire hasta sequedad.
- Los analitos extraídos se redisolviaron en 100 µl de ácido acético al 0,01%. Se analizaron mediante LC-MS/MS con una columna C8. La fase móvil fue ácido fórmico al 0,1% y acetonitrilo. La detección por MS se realizó en modo electrospray positivo (ESI+).

Con este estudio se concluyó que la concentración del metabolito de la cocaína se encontraba en una mayor proporción, entre 390-750 ng/l, que el compuesto original, que estaba entre 42-120 ng/l, debido a la ruta metabólica de la droga dentro del cuerpo, es decir, en los humanos, sólo un pequeño porcentaje de cocaína se excreta en

la orina como droga original, mientras que la gran cantidad se excreta como benzoilecgonina (45). Se determinó que las concentraciones obtenidas en las diferentes EDARs eran diez veces mayores y la relación cocaína/metabolito más estable a lo largo del tiempo (0.15 ± 0.02) que en las muestras recolectadas en el río (0.05 ± 0.02), debido a que se podría tener una menor estabilidad de cocaína y benzoilecgonina en EDAR y medios ambientales debido a las diferentes condiciones. Gracias a esta comparación, se señaló el problema de la inestabilidad química y biológica de los analitos, ya que esto hace variar las concentraciones y se ve afectado el cálculo de las estimaciones de consumo (6).

En 2006, los mismos investigadores del estudio antes citado aplicaron el método analítico por primera vez a otras drogas ilícitas, como las anfetaminas, la morfina, los cannabinoides y la metadona. Los metabolitos se determinaron en aguas residuales de dos EDARs una en Milán (Italia) y la otra en Lugano (Suiza) (21). La metodología utilizada fue la misma que en 2005 (6): una extracción SPE y análisis por LC-MS/MS. Aparte del modo de ionización ESI+ también se evaluó el comportamiento de los analitos en ESI- , donde se obtuvo un mayor respuesta de la señal en ESI+ para todos los compuestos menos para los cannabinoides., ya que estos en comparación a la obtenida en ESI+ era de mayor intensidad. (22)

En este estudio también se valoró la estabilidad de los analitos en las aguas residuales donde se observó una degradación entre un 13-40 % de los biomarcadores después de los 3 días de almacenamiento de la muestra a 4 °C. Se pudo ver que el uso de estándares internos deuterados para cada sustancia es útil para minimizar los efectos de la matriz, que se traduce en la reducción o el aumento de la señal del analito, y que puede afectar a la fuente de electrospray al analizar muestras reales, ya que al conocer la concentración inicial y final del estándar se corregirá las pérdidas del analito en todas las etapas del método. (21).

Posteriormente, este enfoque metodológico, que permite obtener datos reales y reproducibles sobre el consumo de drogas de manera objetiva y rápida, ha sido utilizado y refinado por un número cada vez mayor de investigadores para estimar el consumo de una gran variedad de drogas de abuso en muchas áreas geográficas

diferentes como sería en África (46), Italia (21,47), Finlandia (48), Bélgica (49), Turquía (50), Costa Rica (51), Estados Unidos (52), Polonia (30), España (35), etc.

4.2. COORDINACIÓN DE ESTUDIOS A NIVEL EUROPEO

En 2010, se estableció una red a nivel europeo (Grupo CORE de análisis de aguas residuales - Europa (SCORE)) (32) con el objetivo de estandarizar los enfoques utilizados para el análisis de aguas residuales y coordinar estudios internacionales mediante el establecimiento de un protocolo de acción común (53). Los aspectos más relevantes de este protocolo los podemos ver resumidos en la Tabla 2. El protocolo consta de varias pautas que abordan la recolección de muestras, su almacenamiento y los análisis que se realizan sobre estas muestras.

Tabla 2: Protocolo de acción común definido por la red SCORE

Fase del método	Procedimiento
Muestreo y manipulación de muestras	Lugar de muestreo: planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR) Tipo de muestra: compuesta de 24 horas Contenedor de muestreo: PET o recipiente de vidrio. Volumen de muestra: >0.5 L Cuestionario de muestreo: desarrollado para recopilar información sobre sistemas de alcantarillado, modo de muestreo y parámetros adicionales como DBO, DQO, N, P, datos de flujo, tipo de agua residual (doméstica o industrial), temperatura, pH
Filtración	La muestra se debe filtrar previamente con un filtro tipo GFC (0.45 μm) después de añadir el estándar interno.



Almacenamiento de la muestra	Almacenamiento: $<4^{\circ}\text{C}$ Después del muestreo, dos opciones posibles: 1. Procesar la muestra para su análisis dentro de las 12 horas. 2. Congelar las muestras inmediatamente después de la recolección.
Análisis químico - control de calidad	Sustancias investigadas: cocaína, benzoilecgonina, anfetamina, metanfetamina, MDMA y THC-COOH (los investigadores pueden añadir otros biomarcadores del consumo de otras drogas). Control de calidad interno: uso de estándares analíticos para cada compuesto. Control de calidad externo (ejercicio inter-laboratorio): análisis de un estándar en metanol que contiene los compuestos enumerados arriba a diferentes concentraciones junto con dos muestras de agua residual (una de ellas dopada).
Informe de datos	Se deben indicar los siguientes parámetros: - LOQ (límite de cuantificación): relación señal/ruido (s/n) = 1/10. - LOD (límite de detección): relación señal/ruido (s/n) (s/n) = 1/3. - Concentración media de tres réplicas por muestra.



A partir de 2010, se aplicó el protocolo de acción común según las directrices de la tabla anterior para la determinación de drogas en los estudios posteriores. La metodología seleccionada dependía de cada laboratorio, es decir, se aplica para el análisis el método validado que tenga el laboratorio pero cumpliendo con los criterios establecidos en el protocolo de acción común (31).

En 2011, se utilizó por primera vez el protocolo de acción común en un estudio donde intervinieron 19 ciudades europeas que comprendían 11 países, la Figura 3 muestra estas ciudades, para analizar muestras de aguas residuales para detectar biomarcadores de cocaína, anfetamina, metanfetamina, MDMA y cannabis. Cada laboratorio utilizó métodos analíticos internos optimizados y validados por cada uno de ellos. En la tabla 3 se pueden ver algunos de estos métodos. El método utilizado, en general, constaba de una etapa de pretratamiento de filtración y una de extracción. Las muestras de aguas residuales se filtraron previamente con un filtro tipo GFC 0.45 μm . Todos los participantes usaron SPE, *offline* u *online*, para la preconcentración y generalmente con cartuchos poliméricos como Oasis HLB. Respecto a la técnica LC-MS/MS la mayoría de los laboratorios participantes utilizaron analizadores de triple cuadrupolo o híbrido triple cuadrupolo - trampa de iones, con la excepción del Water Research Institute (KWR) (Países Bajos) y la Universidad de Santiago de Compostela (España) que utilizaron espectrometría de masas de alta resolución (HRM-Orbitrap y tiempo de vuelo MS, respectivamente). En la cuantificación, se usaron patrones internos para compensar la posible supresión o aumento de la señal debido a los efectos de la matriz. Gracias a este estudio se demostró que la epidemiología basada en las aguas residuales puede aplicarse con éxito a la evaluación y comparación del uso de drogas ilícitas a nivel local e internacional, y a la detección de cambios en el uso de una sustancia (36).

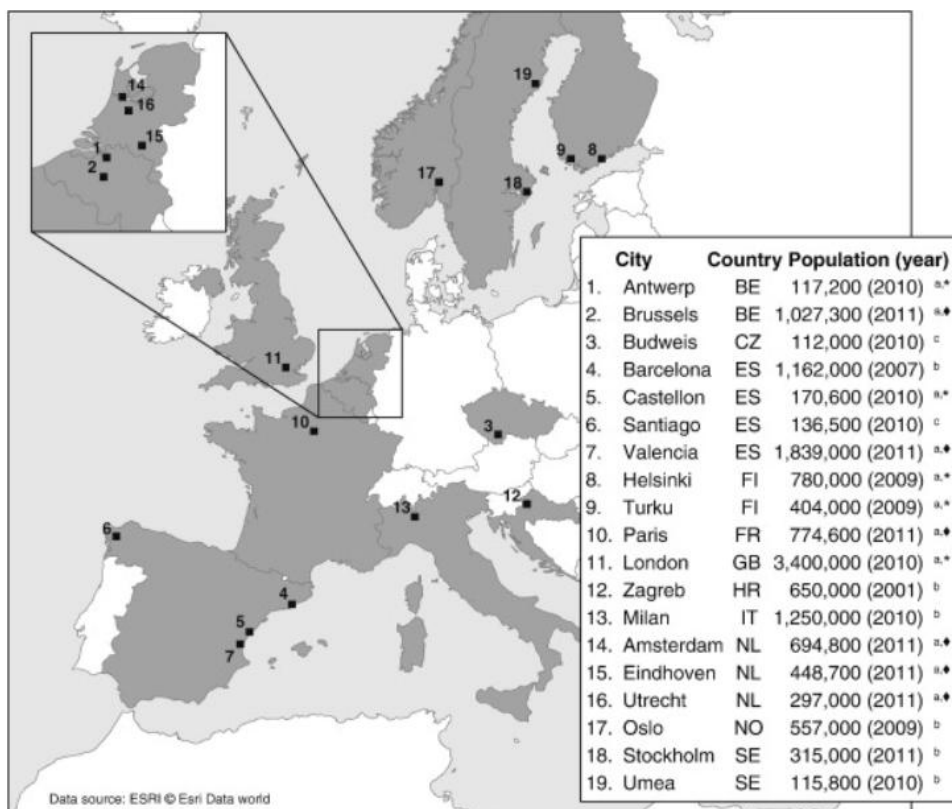


Figura 3: Ciudades europeas que participaron en el estudio de 2011 de la red SCORE.

Tabla 3: Métodos utilizados en algunas de las ciudades que participaron en los estudios de la red SCORE.

Ciudad	Columna cromatográfica Tipo (dimensión (mm) x diámetro de partícula (µm))	SPE columna		
		Tipo	Dimensión	Sorbente (mg)
Antwerp, Brussels	Luna HILIC (150 mm x 3 mm x 5 µm)	Oasis MCX	3 ml	60
Amsterdam,	Xbridge (150 mm x 2.1 mm x 3.5 µm)	Oasis HLB	6 ml	150
Barcelona	Purospher RP-18 (125 mm x 2 mm x 5 µm)	PLRP-S	10 * 2 mm	
Castellón	Aquity (BEH) (50 mm x 2.1 mm x 1.7 µm)	Oasis HLB	6 ml	200
Helsinki & Turku	Xbridge (50 mm x 2.1 mm x 3.5 µm)	Oasis MCX	3 ml	60
London	Aquity (BEH) (150 mm x 1 mm x 1.7 µm)	Oasis MCX	3 ml	60
Milan	X-terra C18 (100 mm x 2.1 mm x 3.5 µm)	Oasis MCX	3 ml	60
Milan-THC-COOH	X-terra C18 (100 mm x 2.1 mm x 3.5 µm)	Oasis MCX	3 ml	60
Oslo		Oasis MCX	6 ml	
Paris	Xbridge- Phenyl (150 mm x 3 mm x 3.5 µm)	Oasis HLB	6 ml	200
Santiago de Compostela	Nucleosil 100-3 C18HD (125 mm x 2 mm x 3 µm)	Oasis MCX	6 ml	150
Stockholm & Umeå	Hydrosphere (150 mm x 1 mm x 5 µm)	Oasis HLB	6 ml	200
Valencia	X-terra C18 (100 mm x 2.1 mm x 3.5 µm)	Oasis HLB	6 ml	200
Zagreb (PI mode)	Synergy polar-RP-80 (150 mm x 3 mm x 4 µm)	Oasis MCX	6 ml	150
Zagreb (NI mode)	Kinetex XB-C18 (100 mm x 2.1 mm x 2.6 µm)	Oasis MCX	6 ml	150

A partir de este estudio, el número de laboratorios, ciudades y países participantes en esta iniciativa internacional organizada anualmente por la red SCORE con el apoyo de la EMCDDA ha ido aumentando año a año hasta involucrar en el 2016 de 37 laboratorios de 25 países diferentes de todo el mundo (2011-2016) (37).

4.3. COMPARATIVA DE ESTUDIOS REALIZADOS EN ESPAÑA

En este apartado se comparan los métodos utilizados en algunos estudios realizados en España, a partir de los métodos desarrollados en 2005 (6) y 2006 (9) por Zuccato y col. Las metodologías publicadas desde enero 2006 hasta la fecha para determinar las drogas ilícitas y sus metabolitos en las aguas residuales se resumen en la tabla 4:

4.3.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se han realizado varios estudios sobre drogas ilícitas y sus metabolitos en aguas residuales en diferentes ciudades de España, como se puede ver en la tabla 4. Para el muestreo de aguas en general en los distintos estudios publicados, se recogieron muestras compuestas durante un período de 24 h, para ser representativas de un día completo (54-61). Después de la recolección, las muestras se almacenan a diferentes condiciones según cada estudio. Así por ejemplo, a 4 °C y se analizaron en 3 días (54-56), o se almacenaron a -20 ° C (22, 57-61) hasta una semana. La temperatura es un factor importante a la hora de almacenar la muestra, ya que normalmente cuanto más baja es la temperatura mayor es la estabilidad de los analitos debido que se inhiben los procesos de degradación y se evita el crecimiento de microorganismos que puedan dañar la muestra.

Todos los estudios publicados dentro del período revisado describen la extracción en fase sólida como etapa de preconcentración, y los volúmenes de muestra requeridos son entre 100-200 ml si se realiza mediante SPE *offline* (54-55, 57,59-60). En 2008 con el diseño de un método automatizado con SPE *online* se redujo el volumen de la muestra a 5 ml disminuyendo así el tiempo de extracción y facilitando la conservación y almacenamiento de la muestra durante meses (22).

Tabla 4: Condiciones de los métodos desarrollados en España desde 2007 hasta la fecha.

Análitos	Método	Volumen de muestra	Extracción Cartucho/Elución	Columna	Fase móvil / Gas portador	Modo de ionización	Recuperación (%) y LOQ (ng/l)	Comentarios	Año y referencia
Normorfina, morfina, norcodeína, codeína, 6-acetilmorfina, heroína, EDDP, metadona, THC-COOH	SPE-UPLC-QqQ	200 ml	Oasis HLB (Acondicionado: 5 ml MeOH, 5 ml H ₂ O) Elución: 8 ml MeOH	Acquity BEH C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm)	A: MeOH B: H ₂ O: 50Mm HCOONH ₄ (PH= 3.5 con HCOOH)	ESI(+)	60-100% 0.3-25ng/l	Catalunya -Muestra compuesta (24 h) -Almacenamiento a 4°C, hasta 3 días	(54)
Nicotina, cotinina, cafeína, paraxantina, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, cocaína, benzoilecgonina, LSD, ketamina, PCP, fentanilo	SPE-UPLC-QqQ	100 ml	Oasis HLB (Acondicionado: 8 ml MeOH 5%) Elución: 6 ml MeOH	Acquity BEH C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm)	A: AcN 0.1% HCOOH B: H ₂ O: 30Mm HCOONH ₄ (PH= 3.5)	ESI(+)	70-85% 5-850 ng/l	Catalunya -Muestra compuesta (24 h) -Almacenamiento a 4°C, hasta 3 días	(55)
Efedrina, anfetamina, metanfetamina, MDMA, cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, heroína, morfina, 6-actilmorfina, THC, 11-OH-THC, THC-COOH, LSD, nor-LSD, OH-LSD	SPE-HPLC-QLIT	5 ml	Oasis HLB para cannabinoides; PRLP-s para los demás (Acondicionado: 1 ml AcN, 1 ml H ₂ O) Elución: fase móvil SPE online	Purospher Star RP-18 end-capped (125 mm × 2.0 mm, 5 µm)	A: AcN B: H ₂ O	ESI(-) para cannabinoides; ESI (+) para los demás	8-121% 0.69-5.97 ng/l	EDAR: Barcelona, Valencia, Benicassim, Gandia -Muestra compuesta -Almacenamiento a -20°C	(22)
Anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA	SPE-HPLC-QqQ	50 ml	SupelMIP-Anfetamina 25 mg (Acondicionado: 1 ml MeOH, 1 ml H ₂ O a pH 8) Elución: 1 ml MeOH al 1% HCOOH	Halo C18 (100 mm × 2.1, 2.7 µm)	A: MeOH: 5 Mm CH ₃ COONH ₄ B: H ₂ O: 5 Mm CH ₃ COONH ₄	ESI (+)	92-113%	Noroeste España -Muestra simple - Almacenamiento a 4°C, máx. 1 semana	(56)
Anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, morfina, codeína, heroína, metadona, THC, THCCOOH	SPE-GC-QqQ	100 ml	Oasis HLB (Acondicionado: 5 ml acetato de etilo, 5 ml acetona, 5 ml H ₂ O) Elución: 2 ml acetato etilo, 8 ml acetona	Columna capilar HP-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Fase gas: He Inyección 2 µL Modo: splitless, Split ratio de 50	EI	67-134% 2-60 ng/l	Galicia -Muestra compuesta (24h) - Almacenamiento a -20°C	(57)
Nicotina, cocaína, benzoilecgonina, morfina, 6-acetilmorfina, codeína, EDDP, metadona	SPE-HPLC	10 ml	Oasis WCX (Acondicionado: 5 ml MeOH y 5 ml H ₂ O a pH 7) Elución: fase móvil SPE online	Fused-Core™ Ascentis Express C18 (50 mm × 4.6 mm, 2.7 µm)	A: 0.1 % HCOOH en H ₂ O B: 0.1 % HCOOH en MeOH	ESI(+)	51-114% 2-5- ng/l	Catalunya -Muestra compuesta (24 h) - Almacenamiento a -20°C	(58)
Anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, norbenzoilecgonina, norcocaína, THC-COOH	SPE-UHPLC-QqQ	50 ml	Oasis MCX (Acondicionado: 6 ml MeOH, 3 ml H ₂ O, 3 ml H ₂ O pH=2) Elución: 8 ml solución de amoniaco al 2% en MeOH	Phenomenex Kinetex C18 (1.7 µm, 100 Å, 50 × 2.10 mm)	A: 0.5 % HCOOH en H ₂ O B: AcN	ESI(+)	70-120% 0.5-11.6 ng/l	Castellón, Benicasim, Burriana -Muestra compuesta (24h) - Almacenamiento a -20°C	(59)
Morfina, codeína, dihidrocodeína, cocaína, metadona, mefedrona, MDPV, benzoilecgonina, EDDP, 4-metilefedrina	SPE-HRMS-Orbitrap	100 ml	Oasis MCX (Acondicionado: 5 ml MeOH y 5 ml H ₂ O a pH 3) Elución: 15 ml solución de amoniaco al 5% en MeOH	Fused-Core™ Ascentis Express C18 (100 mm × 4.6 mm, 2.7 µm)	A: 0.1 % HCOOH en H ₂ O B: AcN	ESI(+)	64-101% 100-700 ng/l	Tarragona, Reus -Muestra compuesta (24h) - Almacenamiento a -20°C	(60)
Cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, anfetamina, metanfetamina, MDMA, ketamina, LSD, morfina, heroína, 6-acetilmorfina, metadona, EDDP, THC-COOH, OH-THC, NPS	SPE-HPLC-QLIT	5 ml	PLRP-s (Acondicionado 3 ml ACN, 2 ml de H ₂ O) Elución: fase móvil SPE online	Purospher Star RP-18 end-capped (125 mm × 2.0 mm, 5 µm)	A: 5 Mm HCOOH/HCOONH ₄ B: AcN	ESI(+)	24-118% 0.6-218 ng/l	Barcelona -Muestra compuesta (24h) - Almacenamiento a -20°C	(61)

2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), 11-nor-9-carboxi-9-tetrahidrocannabinol (THC-COOH), 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxi-tetanfetamina (MDEA), dietilamida de ácido lisérgico (LSD), fenciclidina (PCP), 11-hidroxil-9-tetrahidrocannabinol (OH-THC), 11-nor-9-carboxi-THC (nor-THC), 2-oxo-3hidroxil-LSD (OH-LSD), tetrahidrocannabinol (THC), metilendioxi-pirovalerona (MDPV), drogas psicoactivas (NPS)

Los sorbentes utilizados en los estudios hechos en España han sido sorbentes hidrofílicos de fase reversa como Oasis HLB, modo mixto como Oasis MCX, Oasis WCX, polímero de impresión molecular (MIPs) y PLRP-s. Inicialmente, como se puede observar en la Tabla 2, el sorbente utilizado era Oasis HLB pero los sorbentes de modo mixto pasaron a ser los más utilizados, ya que combinan interacciones iónicas con interacciones de fase inversa que permiten introducir una etapa de lavado que se realiza con un solvente orgánico en el proceso SPE *online* dando lugar a mejores recuperaciones y una mejor retención de los analitos gracias a las propiedades básicas. Estas características mejoran la selectividad y la eliminación de las interferencias causadas por el efecto matriz.

Los cartuchos MIPs sólo se utilizaron para el estudio de anfetaminas (56), ya que se obtenían las recuperaciones más bajas en comparación con los otros analitos utilizando sorbentes hidrofílicos de fase reversa y con estos cartuchos selectivos se obtuvieron un mejor rendimiento en términos de selectividad, sensibilidad y precisión en comparación con los cartuchos Oasis HLB, ya que la recuperación en estos era inferior al 60% (54-55). A pesar de la gran mejora en la recuperación, tienen el inconveniente de que tienen una menor capacidad de carga (25 mg de sorbente frente a 60 mg en Oasis HLB), requieren más tiempo en la preparación de la muestra, debido que no es posible aplicar vacío, y son selectivos de un analito.

Por tanto, viendo que en los estudios en los que se ha determinado anfetaminas con sorbentes de modo mixto se obtienen buenas recuperaciones y que con los MIPs no sería posible realizar un método multianalítico para las drogas, el mejor sorbente sería el de modo mixto.

La elución se realiza con metanol y/o solución alcalina metanólica (54-56,58-60) o con otros solventes como acetona o acetato de etilo (22, 57,61). Tanto la elución con un disolvente como con otro presentan buenas recuperaciones, si se compara con el mismo cartucho, volumen de muestra pero diferente acondicionamiento y elución como es el caso de las referencias (54) y (57) donde se puede ver que las recuperaciones son mayores al 70% en ambos métodos.

En el método *online* (22) sólo se necesitaron 5 ml de aguas residuales y la muestra se cargó automáticamente en los cartuchos SPE (Oasis HLB para cannabinoides y de fase polimérica (PLPR-s), para el resto). La elución se realizó directamente con la fase móvil. Además de la ventaja del volumen de muestra se gana sensibilidad, ya que toda la muestra llega al sistema cromatográfico y el método presenta mayor repetibilidad al disminuir la manipulación de las muestras. Las recuperaciones obtenidas fueron mayores al 50%, menos para el THC que obtuvo un valor de 8 % debido a que era el compuesto más apolar. Se puede observar que en el resto de estudios donde utilizaban el método de SPE *online*, no analizan el metabolito THC debido a la baja recuperación y usan los cartuchos de modo mixto como se ha comentado anteriormente, obteniendo así unas buenas recuperaciones que superan el 70% (58).

En general, puede decirse que todas las metodologías son satisfactorias tal y como indica el paso de la mismas de los ejercicios inter-laboratorio que anualmente se han organizado a nivel internacional dentro de la red SCORE (37).

4.3.2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Hasta el momento en España, los metabolitos en aguas residuales se han determinado mediante cromatografía de líquidos (LC-MS/MS) (22, 54-60), con la excepción de la metodología que se basó en GC-MS (57) como se puede ver en la Tabla 4.

En las metodologías de LC y LC de ultra alta presión (UPLC), la separación cromatográfica se llevó a cabo en columnas de fase reversa, usando una fase móvil moderadamente polar que consiste en una mezcla de agua y un disolvente orgánico. Tanto la HPLC como la UHPLC pueden utilizarse para la determinación de drogas. La menor longitud de columna en UHPLC supone una resolución superior que la HPLC, aunque también se necesita una bomba preparada para soportar las altas presiones. Las fases móviles acuosas consistieron en agua, formiato o acetato de amonio (1–50 mM) (54-56, 58), y acidificación en muchos casos con ácido fórmico o acético (0,05–0,1%) (54-56, 58-61) para mejorar la ionización de los compuestos monitoreados en el modo de ionización positivo. También algunos métodos utilizaron metanol y acetonitrilo (22,59-61) que son las más utilizadas con fase inversa. La fase móvil se aplicó en gradiente para mejorar la resolución de la señal de todos los analitos.

La ionización de drogas ilícitas y sus metabolitos siempre se ha realizado por medio de ESI, ya que son sustancias polares. En general, estos compuestos se ionizan mejor en el modo positivo, aunque la clase de cannabinoides ha mostrado una buena respuesta tanto en los modos de ionización positiva como negativa, como se ha comentado antes (22). El principal inconveniente de la interfaz ESI es su susceptibilidad a los efectos de matriz que resultan en la supresión o mejora de la señal de ionización del analito. Para resolver este problema, la mayoría de los métodos actuales incluyen estándares internos para compensar los efectos de la matriz en las matrices de aguas residuales, como se mencionó en el estudio comentado anteriormente de 2006 (21).

Como analizadores los más utilizados han sido el de QqQ (54-58) y el de cuadrupolo-trampa de iones lineal (QLIT) (22, 61). Tanto uno como el otro han operado en el modo *selected reaction monitoring* (SRM). Este modo de adquisición proporciona buena sensibilidad y selectividad y garantiza la fiabilidad de los resultados si se monitorean al menos dos transiciones SRM específicas para cada analito diana, la más intensa para cuantificar y la otra para confirmar.

5. COMPARACIÓN DE ESTUDIOS DE ESTIMACIÓN DEL CONSUMO DE DROGAS BASADOS EN EL ANÁLISIS DE AGUAS RESIDUALES A NIVEL EUROPEO

5.1. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE LA RED SCORE Y CONSUMO DE DROGAS EN ESPAÑA

En el primer estudio de la red SCORE (año 2011), entre las 19 ciudades que participaron se encontraban como representación de España: Barcelona, Castellón, Santiago de Compostela y Valencia (ésta última participó con 3 EDARs y se calculó la media). Este estudio se centró en la determinación de biomarcadores de cocaína, anfetaminas, metanfetaminas, éxtasis y cannabis (36).

Tras concluir en este primer estudio, que los datos obtenidos coincidían con los datos notificados oficialmente en el monitoreo de drogas, se repitió todos los años para expandir la cobertura espacial y obtener datos consistentes a largo plazo. El número de

ciudades ha aumentado de 19 en 2011 a 87 en 2019. España añadió Madrid a las cuatro ciudades del primer estudio (62).

En las muestras obtenidas se analizaron los mismos biomarcadores que en el estudio de 2011 (36). A pesar de que se analizó cannabis no se informan resultados porque el consumo de cannabis se calcula midiendo su metabolito principal (THC-COOH) y éste se ve bastante influido en la estabilidad y el pH de la muestra. Durante los 7 primeros años de estudios no se obtuvieron cifras comparables para el THC-COOH en los estudios inter-laboratorio, por lo tanto, se debe de tener en cuenta que los resultados de cannabis emitidos en 2011 pueden ser erróneos debido a esta problemática (13, 14).

En los siguientes gráficos se puede ver la evolución de distintas drogas, en concentraciones medias de las réplicas, concretamente, de cocaína, anfetamina, metanfetamina y éxtasis en las cuatro principales ciudades españolas incluidas en estos estudios, que son Barcelona, Castellón, Santiago de Compostela y Valencia desde el año 2011 al 2019 (Figuras 4, 5, 6 7) (62):

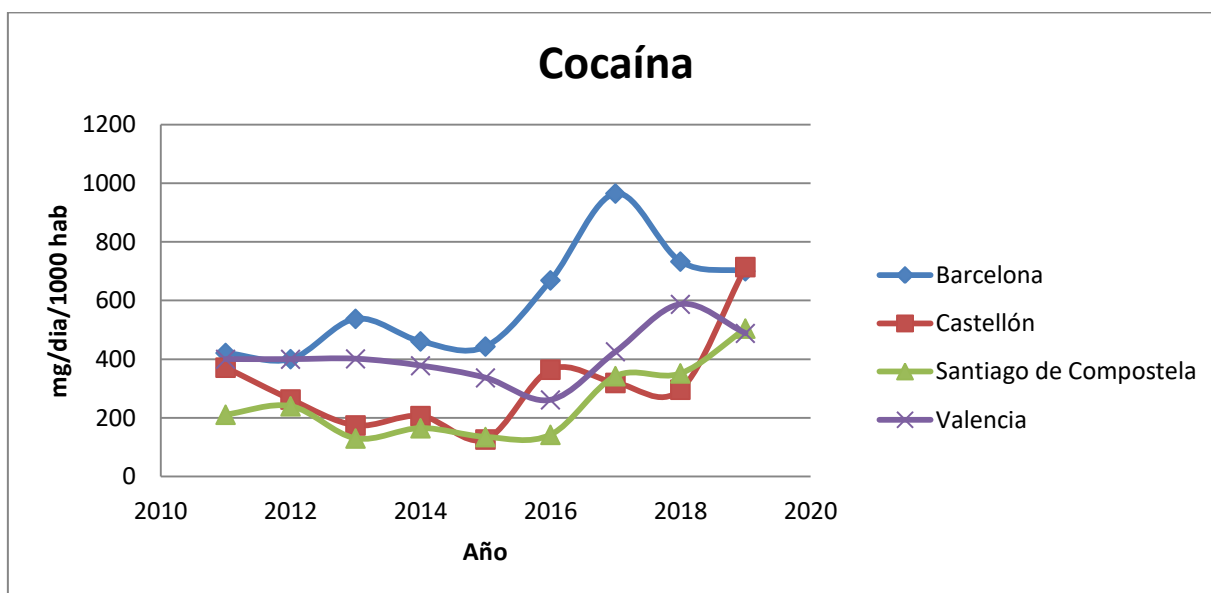


Figura 4: Gráfico de la evolución del consumo de cocaína en Barcelona, Castellón, Santiago de Compostela y Valencia.

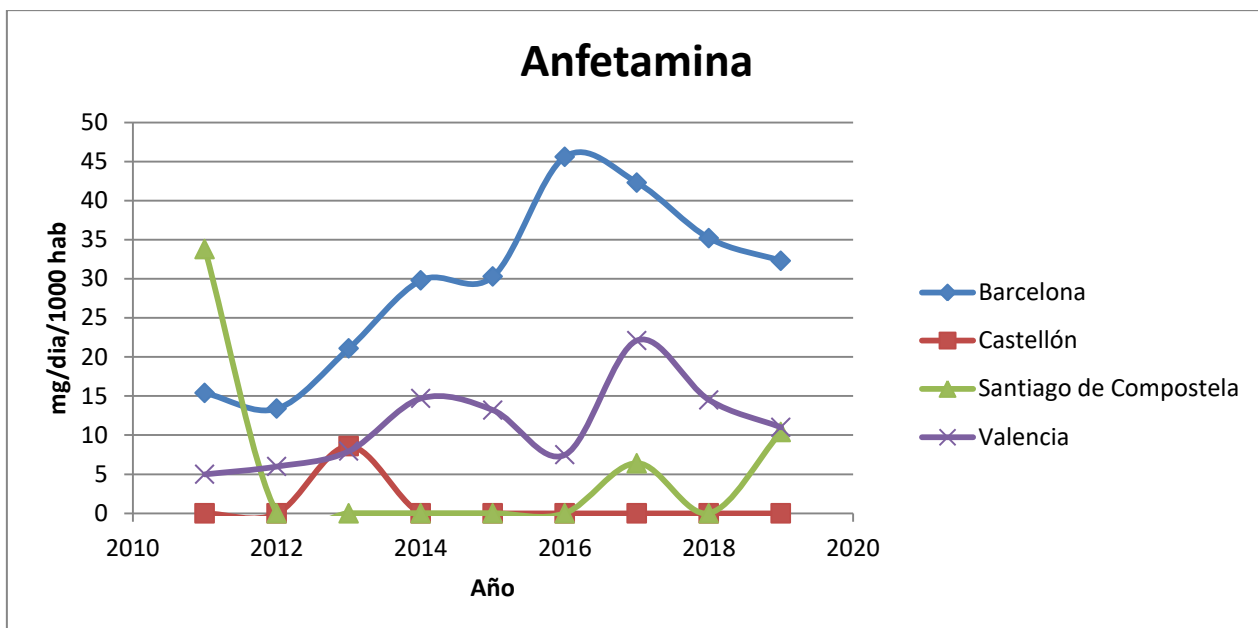


Figura 5: Gráfico de la evolución del consumo de anfetaminas en Barcelona, Castellón, Santiago de Compostela y Valencia.

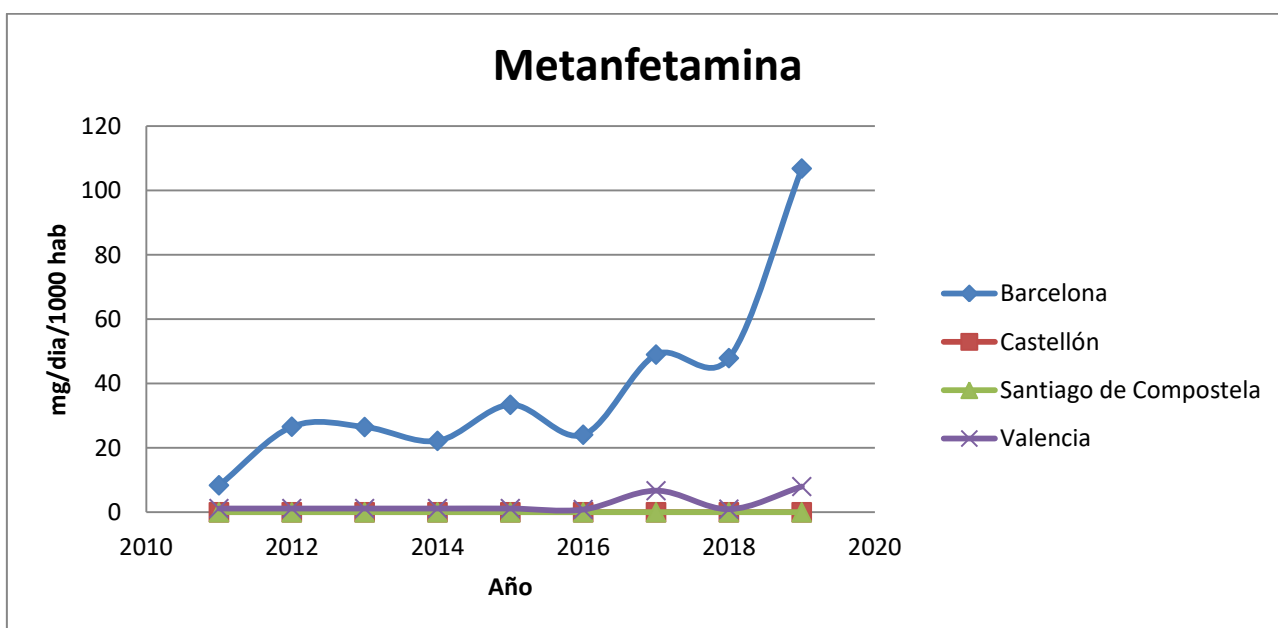


Figura 6: Gráfico de la evolución del consumo de metanfetaminas en Barcelona, Castellón, Santiago de Compostela y Valencia.

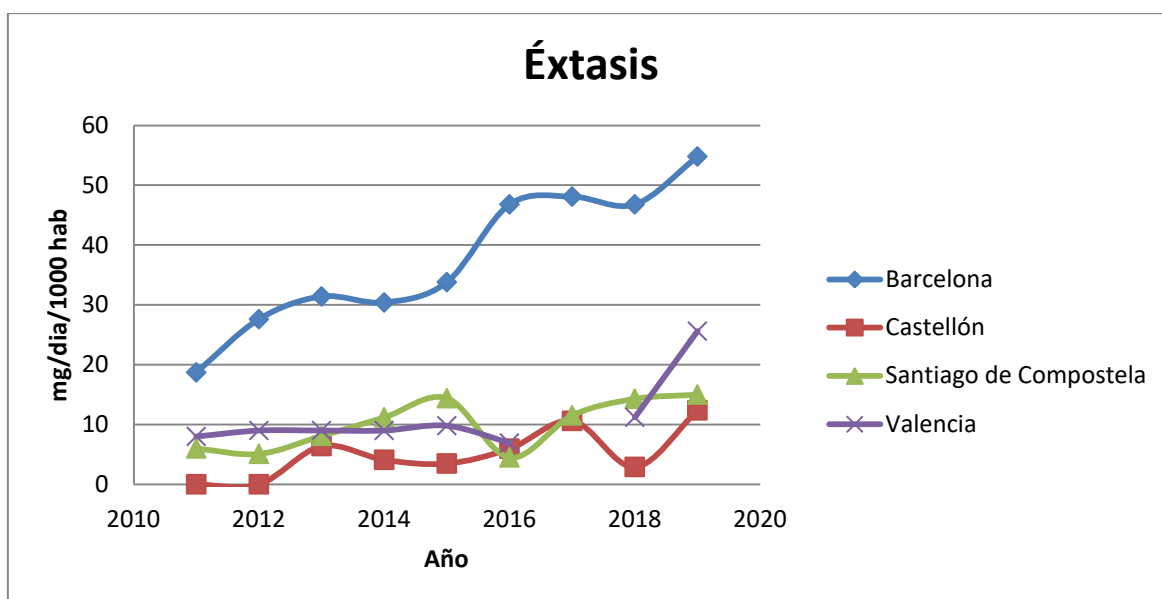


Figura 7: Gráfico de la evolución del consumo de éxtasis en Barcelona, Castellón, Santiago de Compostela y Valencia.

A través de los gráficos se puede observar que de las ciudades de España incluidas en estos estudios la de mayor consumo de drogas es claramente Barcelona con unos valores medios en 2019 de 700 mg/día/1000 hab. para la cocaína, 32 mg/día/1000 hab. de anfetamina, 107 mg/día/1000 hab. de metanfetamina y 55 mg/día/1000 hab. para el éxtasis. El consumo de cocaína en 2019 en estas cuatro ciudades se encuentran entre 488-714 mg/día/1000 hab, el doble que en el año 2011 cuando se comenzó con el estudio que era entre 211-421 mg/día/1000 hab. Para la anfetamina se puede ver que en los dos últimos años en Barcelona y Valencia ha disminuido su consumo, aunque en Barcelona la tendencia es un claro incremento, ya que los valores encontrados son el doble que en el 2011. En cuanto a la metanfetamina, Barcelona es la ciudad que tiene un consumo mayor (107 mg/día/1000 hab.) en comparación a las otras ciudades que presentan un consumo inferior a los 20 mg/día/1000 hab. El consumo de éxtasis se ha mantenido bastante estable desde el 2014, aunque en Barcelona ha ido subiendo ligeramente hasta valores de 50 mg/día/1000 hab, en Valencia ha subido de 11 mg/día/1000 hab a 25 mg/día/1000 hab.

6. INCERTIDUMBRES

Las aguas residuales son de gran utilidad para proporcionar información sobre el consumo y la tendencia de drogas en la población. La estrategia WBE tiene la capacidad de mostrar las tendencias en el consumo de drogas gracias a la excreción de biomarcadores en el alcantarillado. Es importante destacar que las capacidades de la WBE se están expandiendo mucho más allá del monitoreo del uso de drogas ilícitas y farmacéuticas, como es en la actualidad la detección de COVID-19 en aguas residuales y la exposición a contaminantes y, al ser una tendencia innovadora está en constante evolución debido a sus grandes aplicaciones (63).

Cabe señalar, no obstante, que este enfoque también tiene asociadas bastantes incertidumbres, las cuales se identificaron en 2008 (5), poco después de sus primeras aplicaciones. Estas incertidumbres están asociadas con distintos aspectos como el muestreo, la estabilidad de los biomarcadores, la medida analítica, y el cálculo posterior de los datos de consumo, que se ve afectado por factores como la excreción de la droga en el agua, el caudal de agua tratada en la EDAR y el tamaño de la población.

Aunque las fuentes de error o incertidumbres del modelo están identificadas, sólo se han investigado algunas de ellas y se han identificado y aplicado pocas técnicas para reducirlas (64, 65). A continuación, se plantean las incertidumbres y qué estudios se han realizado para evaluarlas.

6.1. MUESTREO

La toma de muestra debe ser representativa y estable durante el periodo de muestreo. Este aspecto es de gran importancia en este método, ya que son muestras compuestas, es decir, son una combinación de muestras puntuales tomadas en el mismo sitio a diferentes tiempos. El periodo de muestreo normalmente es de 24 h (31), y durante este tiempo puede haber variaciones en el flujo de las aguas residuales que llegan a las EDARs debido a factores como la lluvia, y la descarga de inodoros u otros electrodomésticos. Por ello, en base a las recomendaciones de las normas de



monitoreo de la calidad del agua aceptadas internacionalmente: "Los tiempos y las frecuencias de muestreo en cualquier estudio pueden decidirse adecuadamente sólo después de un trabajo preliminar detallado, en el que es necesaria una alta frecuencia de muestreo [...]" (66-67). Esta falta de representatividad puede tener lugar en el caso de que la toma de muestra no se realice proporcionalmente en base al tiempo o flujo de entrada de agua a la EDAR y con una elevada frecuencia, ya que las aguas residuales son corrientes muy variables y los volúmenes diarios son grandes (31).

En 2010, Ort y col. (68) evaluaron la incertidumbre relacionada con el muestreo de aguas residuales y vieron que la incertidumbre asociada a esta parte del proceso variaba entre el 1% y el 100%. Esta evaluación se llevó a cabo realizando un análisis químico de aguas residuales de una EDAR y teniendo en cuenta que puede haber alguna variación adicional como es la incertidumbre debida al análisis químico (incluido el transporte, la conservación, el almacenamiento, y la preparación de la muestra, y el error instrumental). Dado que el análisis químico es el último paso en el proceso de generación de datos, la incertidumbre asociada se puede determinar directamente. Para este estudio se consideró un toma de muestra proporcional al flujo, donde las muestras se cogían cada cierto tiempo de diferentes entradas de la EDAR (una a una variación mayor en el flujo a la otra), y simultáneamente para comparar los diferentes modos de muestreo. Se concluyó que se puede minimizar la incertidumbre pero no eliminarla, ya que depende de varios factores como los que se han comentado antes, y la frecuencia de muestreo, si se desconoce la frecuencia de variación de flujo, debe ser inferior a 15 min. ya que cuanto más tiempo se tarde en realizar el muestreo más posibilidades hay de que se produzca un cambio en el contenido de las aguas. En cuanto a las diferentes zonas de la EDAR, se confirma que el muestreo se debe realizar a intervalos de tiempo más cortos, debido a que si hay mucha variación la muestra es menos representativa, obteniendo así más incertidumbre en la entrada de la EDAR que tenía una variación de flujo mayor.

En un estudio de 2013, Castiglioni y col. (69) llegaron a la misma conclusión, que el muestreo se debe realizar en una zona de la EDAR en la cual haya un flujo más continuo, ya que es mejor para capturar la muestra más representativa y evitar la

variación en los resultados, y con en el menor intervalo de tiempo posible entre la toma de una alícuota y la siguiente.

Actualmente esta incertidumbre está definida con un valor por debajo del 10% en base a los artículos publicados (59), y los estudios realizan el muestreo según las condiciones que dicta el protocolo de buenas prácticas que desarrolló la red SCORE para que los estudios fueran comparables entre ellos (32).

6.2. ESTABILIDAD DE LOS BIOMARCADORES

La estabilidad química de los biomarcadores es una incertidumbre importante a tener en cuenta en la WBE, ya que no se limita sólo a la estabilidad de las drogas objeto de estudio en las muestras recogidas, sino también a la posible pérdida de analitos en el sistema de alcantarillado hasta la EDAR. En el caso de algunas sustancias, la estabilidad mejora cambiando las condiciones de la muestra, es decir, la manera en la cual se almacena teniendo en cuenta parámetros como la temperatura o el pH (31). La transformación de residuos de drogas en aguas residuales desde el lugar de excreción hasta el lugar de recogida de muestras en la EDAR se ha evaluado en varios estudios, como podemos ver en la tabla 5. En la tabla se observa el porcentaje de aumento o pérdida de los biomarcadores en las diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo de almacenamiento y cómo éstas afectan a algunas de las drogas de abuso estudiadas en los diferentes artículos (17, 21, 57, 70-76).

Tabla 5: Porcentaje de cambio de las principales drogas según diferentes condiciones de pH y temperatura

Tiempo (h)	Temperatura (°C)	pH	COC (%)	BE(%)	AM(%)	MA(%)	MDMA(%)	THC-COOH(%)	6-AM(%)	Ref
72	4	7.5	-36	14	5	0	1	-8	14	(21)
24	4	7.5	-7	7	0	-	-	2	-	(57)
24	4	7.5	-25	20	-	-	-	-	-	(72)
24	20	7.0	-9	-	-	-5	1	-	-53	(75)
24	20	7.5	-35	15	-5	-10	-10	0	-15	(76)
12	19	7.4	-8	7	47	8	1	-	-42	(71)
12	20	7.5	-40	6	3	2	3	-	-2	(17)
12	20	7.5	-20	14	-	0	0	-	-25	(74)
12	23	7.4	-50	10	-15	0	0	-	-15	(70)
7	21	7.4	-60	18		-	-	-	-	(73)



Podemos ver que en todos los estudios la metanfetamina y el MDMA se mantuvieron constantes en aguas residuales después de 12 horas a temperatura ambiente, ya que tuvieron una variación en la concentración entre 0-3% (17, 21, 70, 74).

En la estabilidad de la cocaína y su principal metabolito (benzoilecgonina) en las aguas residuales se puede ver que la benzoilecgonina es el residuo de cocaína más estable con aproximadamente 15 % de biotransformación después de 24h, a pH 7.5 y temperatura ambiente (76). El aumento observado de las concentraciones de benzoilecgonina a lo largo del tiempo se debe a la hidrólisis de la cocaína a benzoilecgonina, ya que ésta tiende a metabolizarse rápidamente. La cocaína fue significativamente menos estable en aguas residuales que la benzoilecgonina, con pérdidas de hasta el 50 % después de 12h, a pH 7.5 y temperatura ambiente.

El THC-COOH es estable en condiciones de 24 horas, pH 7.5 y 20 °C (76). Por el contrario, se observaron pérdidas significativas del 15% a pH 7.5 (76) y de más del 50% a pH 7 (75) para el producto de transformación del consumo de heroína (6-MAM).

Teniendo en cuenta que los períodos de residencia en las alcantarillas son inferiores a 10 horas, significa que la degradación de estos biomarcadores suele ser inferior al 10 % para la anfetamina, metanfetamina, MDMA, benzoilecgonina y THC-COOH. Por lo tanto, la degradación en el alcantarillado tendrá una influencia insignificante en los resultados del análisis de las aguas residuales si estos compuestos se utilizan en cálculos retrospectivos. Sin embargo, si se utiliza 6-monoacetilmorfina para el cálculo retrospectivo del consumo de heroína, es probable que el consumo real de heroína se subestime debido a las considerables pérdidas de residuos por transformación de los mismos en el agua (31).

Con esta comparativa de condiciones y observando cómo se comporta cada metabolito según estos parámetros, se puede ver que no hay una condición concreta que no modifique la estabilidad de todos. Por ello, para realizar la comparación entre diferentes estudios se aplica el protocolo de la red SCORE igual que en el caso de la incertidumbre de muestreo, donde las muestras se almacenan con máximo de 4 °C y se procesan en 12h o bien se congelan hasta su análisis.

6.3. MÉTODO ANALÍTICO

La estimación del consumo de drogas mediante el análisis de las aguas residuales requiere una cuantificación precisa y sensible de los biomacadores de las drogas. Las principales dificultades asociadas con el análisis cuantitativo de las drogas ilícitas se ven relacionadas con concentraciones muy bajas de los analitos y la compleja matriz de la muestra (5, 31, 69).

Dado que la mayoría de los análisis se realizan mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas u otros métodos validados en el laboratorio que requieren una fuente de ionización para producir iones que se ve fácilmente afectada por la matriz del compuesto, se utilizan patrones internos para disminuir la influencia de la matriz. Utilizando esta metodología la incertidumbre analítica se mantiene entre el 6 y el 26% (69). Los estudios para disminuir esta incertidumbre se realizan conjuntamente con el desarrollo y validación del método, mirando parámetros como sensibilidad, resolución o límite de detección y cuantificación del método (54-61).

6.4. CÁLCULO DEL CONSUMO DE DROGAS EN LA POBLACIÓN

Como se ha visto en un apartado anterior, el cálculo del consumo de drogas se realiza mediante una ecuación (ecuación 1) en la cual intervienen varios factores y algunos de éstos pueden verse afectados debido a la falta de precisión de algunos como es el tamaño de la población que abarca la EDAR. El factor C_i , es la concentración del analito, se ve influenciado por las tres incertidumbres comentadas anteriormente (muestreo, estabilidad y método analítico). F , es el volumen total de aguas que entra a la planta durante el tiempo de muestreo y tiene una incertidumbre asociada de menos del 20%, ya que el flujo del agua no es siempre proporcional (68, 69). En el factor R_i no encontramos incertidumbre, debido a que es la relación de masa molar entre el compuesto original y el metabolito. E_i es la tasa de excreción de la droga y este valor varía según la ruta de administración de la droga, debido a que, dependiendo de la manera en la que se ingiera la droga, tendrá una tasa de excreción diferente. Por último, encontramos el factor P , es el número de habitantes en la población, que presenta una incertidumbre bastante alta entre 7-55% (69). Este rango se obtiene de



hacer la diferencia entre los valores obtenidos del censo de población y el registro de parámetros hidroquímicos como la demanda de oxígeno (DBO, DQO), el nitrógeno o el fósforo ya que si se conoce las cargas medias de estos parámetros por persona y día nos indicaran la cantidad de personas a las que da servicio la EDAR. Este valor alto se debe a que se podría ver fácilmente afectado por festivales, factores estacionales o eventos en el área de la EDAR, ya que la población fluctúa durante el año y más en épocas de verano o festividades, por tanto, es difícil conocer el número exacto de personas más allá del que proporciona el censo de población (77).

Para determinar de otra manera este número de habitantes, en 2011 (se estudió la posibilidad de determinar el promedio de concentración de nitrógeno, fósforo y demanda química y biológica de oxígeno para estimar el número específico de habitantes. Sin embargo, las concentraciones de estos parámetros convencionales de calidad del agua pueden verse influenciadas de manera significativa y sistemática por otras fuentes, como las descargas industriales (78). Actualmente, ésta última es la estrategia más implementada y que aparece en el protocolo de la red SCORE.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Debido a todos estos factores de incertidumbre que influyen en la cuantificación final del consumo de drogas y al tipo de información que proporciona, el método de epidemiología de aguas residuales no se puede utilizar como método único, sino como método complementario de apoyo en los estudios demográficos de consumo de drogas (31, 77).

Por ello, las futuras orientaciones de la investigación sobre aguas residuales deberían ir encaminadas hacia estudios destinados a avanzar en la identificación de drogas y sus metabolitos y a minimizar las incertidumbres relacionadas con los métodos de muestreo, medición y cálculo retrospectivo. Una mejor integración de esta nueva metodología con los indicadores epidemiológicos existentes permitirá una comprensión más profunda del consumo de drogas en la sociedad.



El primer punto a tratar en la siguientes investigaciones de este enfoque sería el de reducir las incertidumbres, sobre todo la referida a determinar la población que abarca una EDAR, dado que tiene un porcentaje de incertidumbre bastante elevado y hasta el momento no se ha encontrado la mejor manera para determinar este dato.

En segundo lugar, se deben realizar estudios más profundos sobre la excreción y la estabilidad de cada droga para establecer el mejor biomarcador a determinar para cada una de ellas. Sobre todo en el caso del cannabis, ya que éste al ser más apolar que las demás sustancias se encuentran dificultades analíticas para obtener una buena recuperación.

También, se debe desarrollar e investigar más el análisis de aguas residuales para la determinación de nuevas sustancias psicoactivas (NPS), ya que cada vez surgen nuevos compuestos y no se tiene conocimientos suficientes sobre en qué forma de biomarcadores se encuentran en el agua y cuáles son los más consumidos. También la gran cantidad de NPS individuales y la relativamente baja prevalencia de uso dificultan su estudio.

En último lugar, las aplicaciones del enfoque de la WBE se podrían extender para proporcionar información sobre otros indicadores dentro de una ciudad, como podría ser el consumo de alcohol en la población, tabaco o medicamentos, o para la determinación otras sustancias como pesticidas, retardantes de llama o plastificantes en las aguas residuales como un método barato y eficiente para monitorear no solo su presencia, sino también la exposición humana a estos contaminantes emergentes.

8. CONCLUSIONES

El enfoque de WBE es una tendencia innovadora para la determinación del consumo de drogas en la población. Éste tiene el potencial de monitorear las tendencias en el tiempo y las tasas de consumo de drogas en tiempo casi real y de manera anónima. A pesar de su gran utilidad, este enfoque tiene varias incertidumbres asociadas que necesitan más investigaciones para hacerles frente.



Desde su descripción en 2001 por el doctor Daughton, la metodología para determinar drogas en aguas residuales ha estado en constante evolución y estudio. Se ha podido ver que la técnica de análisis más eficaz y más utilizada es la de LC-MS/MS. En España varios laboratorios han participado en estudios del consumo de drogas en ciudades como Barcelona o Valencia, y han ido perfeccionando sus métodos a medida que pasaban los años. Gracias a estos estudios se ha podido ver que Barcelona es la ciudad española que tiene un mayor consumo de drogas en comparación a las otras ciudades estudiadas hasta el momento. Por otro lado, la creación de un protocolo de buenas prácticas por parte de la red SCORE ha iniciado y posibilitado la comparación de la tendencia de consumo a nivel internacional, ya que con este protocolo todos los laboratorios participantes siguen los mismos parámetros de calidad.

En este trabajo, también, se ha visto como se ve afectada la concentración de los biomarcadores en función del almacenamiento, dando lugar a pérdidas significativas de estos y por tanto, obteniendo resultados inexactos. Otro punto importante es la incertidumbre provocada por el tamaño de la población, que genera un error de hasta el 50 %. El estudio de otros parámetros a parte de los datos obtenidos por parte del censo y los parámetros adicionales (DBO, DQO, nitrógeno, fósforo) se deben investigar otros para obtener el número de personas que participan en la EDAR.

Por último, como aspectos futuros los estudios de identificación de los metabolitos de las NPS es esencial, dado el mayor consumo que van teniendo a medida que pasa el tiempo. A parte de enfocar los estudios a estas nuevas sustancias, también se pueden aplicar este enfoque a la detección de enfermedades como es el COVID-19 o contaminantes.

En vista de las futuras aplicaciones que podría llegar a tener el enfoque de WBE y los buenos resultados obtenidos hasta ahora en la determinación del consumo de drogas en aguas residuales, a pesar de las incertidumbres estudiadas, es un método con grandes perspectivas de futuro.

9. BIBLIOGRAFÍA

- (1) World Health Organization. [Online] https://www.who.int/substance_abuse/terminology/who_ladt/en/ (visitada 22/04/2020)
- (2) Luiza,D.; Ciobanu,A.; Vlasceanu,A.; Denisa, O. ; Negrei,C. Current Concepts on Drug Abuse and Dependence. *J. Mind. Med. Sci.* **2015**, vol.2, 18-33.
- (3) United Nations. World Drugs Report 2019. [Online] <https://wdr.unodc.org/wdr2019/> (visitada 23/04/2020)
- (4) Dughton,C. Proposed New Nonintrusive Tool to Heighten Public Awareness of Societal Use of Illicit-Abused Drugs and Their Potential for Ecological Consequences. *Pharma Pers Care Prod Environ.* **2001**, vol.791, 348-364.
- (5) Zuccato,E.; Chiabrandro,C.; Castiglioni,S.; Bagnati,R.; Fanelli,R. Fanelli. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ. Health Perspect.* **2008**, vol.116, 1027-1032.
- (6) Zuccato, E.; Chiabrano, C.; Castiglioni, S.; Calamari, D.; Bagnati, R.; Shiarea, S.; Fanelli, R. Cocaine in Surface Waters: A New Evidence-Based Tool to Monitor Community Drug Abuse. *Environ. Health.* **2005**, vol. 4, 14.
- (7) Bijlsma,L .; Celma, A.; González-Mariño, I.; Postigo,C.; Andreu, V.; Andrés-Costa, M.J.; Hernández, F.; López de Alda, M.; López-García, E.; Marcé, R.M.; Montes, R.; Pocurull, E.; Picó, Y.; Rodil, R.; Rodríguez-Gil, J.L; Valcárcel, Y.; Quintana, J.B. Wastewater-based epidemiology: applications towards the estimation of drugs of abuse consumption and public health in general. The Spanish network ESAR-Net. *Rev. Sanid. Hig. Publica.* **2018**, vol.92, 1-10
- (8) Andrés, M.; Escrivá, Ú.; Andreu,V.; Picó, Y. Estimation of alcohol consumption during “Fallas” festivity in the wastewater of Valencia city (Spain) using ethyl sulfate as a biomarker. *Sci.Total Environ.* **2016**, vol.541, 616-622.

- (9) Castiglioni, S.; Zuccato, E.; Chiabrando, C.; Fanelli, R. Bagnati, R. Mass spectrometric analysis of illicit drugs in wastewater and surface water. *Mass. Spectrom. Rev.* **2008**, vol.27,378–94
- (10) Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.M.; Guwy, A.J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, vol. 391, 1293–308.
- (11) Ryu, Y.; Barceló, D.; Barron, L.; Bijlsma, L.; Castiglioni, S.; Voogt, P.; Emke, E.; Hernández, F.; Yin, F.; Lopes, A.; López de Alda, M.; Mastroianni, N.; Munro, K.; O'Brien, J.; Ort, C.; Plósz, B.; Reid, M.; Yargeau, V.; Thomas, K. Comparative measurement and quantitative risk assessment of alcohol consumption through wastewater-based epidemiology: An international study in 20 cities. *Sci. Total Environ.* **2016**, vol.565, 977-983.
- (12) Choi, P.; Tschärke, B.; Donner, E.; O'Brien, J.; Grant, S.; Kaserzon, S.; Mackie, R.; O'Malley, E.; Crosbie, N.; Thomas, K.; Muller, J. Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, vol.105, 453-469.
- (13) Causanilles, A.; Baz, J.; Burgard, D.; Emke, E.; González, I.; Krizman, I.; Li, A.; Löve, A.; Kathrin, A.; Montes, R.; Van Nuijs, A.; Ort, C.; Quintana, J.; Senta, I.; Terzic, S.; Hernández, F.; Voogt, P.; Bijlsma, L. Improving wastewater-based epidemiology to estimate cannabis use: focus on the initial aspects of the analytical procedure. *Anal. Chim. Acta.* **2017**, vol. 988, 27-33.
- (14) González-Mariño, I.; Baz, J.; Alygizakis, N.; Andrés, M.; Bade, R.; Bannwarth, A.; Barron, L.; Been, L.; Benaglia, L.; Berset, J.; Bijlsma, L.; Bodik, I.; Brenner, A.; Brock, A.; Burgard, D.; Castrignanò, E. Spatio-temporal assessment of illicit drug use at large scale: evidence from 7 years of international wastewater monitoring. *Addiction.* **2019**, vol.115, 109-12.

- (15) Tyrkkö,E.; Andersson,M. Kronstrand. The toxicology of new psychoactive substances: synthetic cathinones and phenylethylamines. *Ther. Drug Monit.***2016**, vol.38, 190-216.
- (16) McCall,A.; Bade, R.; Kinyua,J.; Yin, F.; Thai, P.; Covaci,A.; Bajlsma,L.; Nujis,A.; Ort, C. Critical review on the stability of illicit drugs in sewers and wastewater samples. *Water Res.* **2016**,vol. 88, 933-947
- (17) Van Nujis, A.; Abdellati,K.; Bervoets,L.; Blust, R.; Jorens,P.; Neels,H.; Covaci, A. The stability of illicit drugs and metabolites in wastewater, an important issue for sewage epidemiology?. *J. Hazard. Mater.***2012**, vol.239-240, 19-23.
- (18) Mastroianni,N.; López, E.; Postigo, C.; Barceló, D.; López de Alda, M. Five-year monitoring of 19 illicit and legal substances of abuse at the inlet of a wastewater treatment plant in Barcelona (NE Spain) and estimation of drug consumption patterns and trends. *Sci.Total Environ.* **2017**, vol.609, 916-926.
- (19) Daglioglu, N.; Yavuz, E.; Kilerciolgu,S. Assessment of illicit drugs in wastewater and estimation of drugs of abuse in Adana Province, Turkey. *Forensic Sci. Int.*vol. 294, 132-139.
- (20) Baker, D.; Kasprzyk, B. Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr A.* **2011**, vol.1218, 1620-1631.
- (21) Castiglioni, S.; Zuccato, E.; Crisci, E.; Chiabrando, C.; Fanelli, R.; Bagnati, R. Identification and Measurement of Illicit Drugs and Their Metabolites in Urban Wastewater by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, vol.78, 8421–8429.
- (22) Postigo, C.; López de Alda, M.; Barcelo, D. 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.* **2008**, vol. 80, 3123-3134
- (23) Prosen, H.; Fontalans, N.; Borrull, F.; Marcé, R.M. Determination of seven drugs of abuse and their metabolites in surface and waste water using solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2017**, vol. 40, 3621-3631.
- (24) Masiá, A.; Campo, J.; Blasco, C.; Picó, Y. Ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry to identify contaminants in water: An insight on environmental forensics. *J. Chromatogr. A.* **2014**, vol. 1345, 86-97.
- (25) Andrés, M.J.; Andreu, V.; Picó, Y. Analysis of psychoactive substances in water by information dependent acquisition on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *J. Chromatogr. A.* **2016**, vol. 1461, 98-106.
- (26) Bijlsma, L.; Emke, E.; Hernández, F.; Voogt, P. Performance of the linear ion trap Orbitrap mass analyzer for qualitative and quantitative analysis of drugs of abuse and relevant metabolites in sewage water. *Anal. Chem. A.* **2013**, vol. 768, 102-110.
- (27) Boleda, M.R.; Galceran, M.T.; Ventura, F. Monitoring of opiates, cannabinoids and their metabolites in wastewater, surface water and finished water in Catalonia, Spain. *Water Res.* **2009**, vol. 43, 1126-1136.
- (28) Bijlsma, L.; Sancho, J.; Pitarch, E.; Ibáñez, M.; Hernández, F. Simultaneous ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of amphetamine and amphetamine-like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater. *J. Chromatogr. A.* **2009**, vol. 1216, 3078-3089.
- (29) Metcalfe, C.; Tindale, K.; Li, H.; Rodayan, A.; Yargeau, V. Illicit drugs in Canadian municipal wastewater and estimates of community drug use. *Environ. Pollut.* **2010**, vol. 158, 3179-3185.

- (30) Klupczynska, A.; Derezinski, P.; Krysztofiak, J.; Kokot, Z. Estimation of drug abuse in 9 Polish cities by wastewater analysis. *Forensic Sci. Int.* **2016**, vol. 260, 14-21.
- (31) EMCDDA (2016b), Assessing illicit drugs in wastewater: advances in wastewater-based drug epidemiology, Insights, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- (32) Sewage Analysis CORE group Europe (SCORE). [Online] <https://score-cost.eu/> (visitada 30/04/2020)
- (33) Red española de análisis de aguas residuales con fines epidemiológicos. [Online] <https://www.esarnet.es/> (visitada 01/05/2020)
- (34) Mastroianni, N.; López de Alda, M.; Barceló, D. Analysis of ethyl sulfate in raw wastewater for estimation of alcohol consumption and its correlation with drugs of abuse in the city of Barcelona. *J.Chromatogr. A.* **2014**, vol. 1360, 93-96.
- (35) Andrés, M.J.; Rubio, N.; Morales, M.; Picó, Y. Occurrence and removal of drugs of abuse in Wastewater Treatment Plants of Valencia (Spain). *Environ. Pollut.* **2014**, vol. 194, 152-162.
- (36) Thomas, K.; Bijlsma, L.; Castiglioni, S. Comparing illicit drugs use in 19 European cities through sewage analysis. *Sci.Total Enviro.* **2012**, vol. 432, 432-439.
- (37) Van Nuijs, A.; Lai, Y.; Been, F. Multi-year inter-laboratory exercises for the analysis of illicit drugs and metabolites in wastewater: Development of a quality control system. *TrAC Trends Anal Chem.* **2018**, vol.103, 33-43.
- (38) Castiglioni, S.; Thomas, K.; Kasprzyk-Hordern, B.; Vandam, L.; Griffiths, P. Testing wastewater to detect illicit drugs: State of the art, potential and research needs. *Sci.Total Enviro.* **2014**, vol. 487, 613-620.
- (39) Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. ENCUESTA SOBRE ALCOHOL Y DROGAS EN ESPAÑA (EDADES), 1995-2017. *Gobierno de*

- España.* [Online]
https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/EDADES_2017_Informe.pdf (visitado 01/05/2020)
- (40) Lorenzo,M; Picó,Y. Wastewater-based epidemiology: current status and future prospects. *Environ Sci.* **2019**, vol.9, 77-84.
- (41) Chicharro,A.; González, S.; Montero, J.C.; Valcárcel, Y. Evaluation of the Efficacy of the Sewage Treatment Plant of Toledo, Spain in the Elimination of Drugs of Abuse and the Estimation of Consumption. *Rev. Sanid. Hig. Publica.* **2014**,vol. 88, 1135-5727.
- (42) Institute of Environmental Assessment and Water Research. [Online]
<https://www.idaea.csic.es/project/esar-net/> (visitada 02/05/2020)
- (43) Comisión de Monitorización de Fármacos y Toxicología Clínica de la Sociedad Española de Química Clínica y Patología Molecular. IMPORTANCIA DEL LABORATORIO CLÍNICO EN EL ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO. *Con.Lab. Clin.* **2012**, vol. 16 , 109-118.
- (44) Maurer, H. Liquid chromatography–mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J. Chromatogr. B.* **1998**, vol. 713, 3-25.
- (45) Ambre, J. The Urinary Excretion of Cocaine and Metabolites in Humans: A Kinetic Analysis of Published Data. *J. Anal. Toxicol.* **1985**, vol. 9, 241-245.
- (46) Archer, E.; Castrignano,E.; Kasprzyk, B.; Wolfaardt,G. Wastewater-based epidemiology and enantiomeric profiling for drugs of abuse in South African wastewaters. *Sci.Total Enviro.* **2018**, vol. 625,792-800.
- (47) Mari, F.; Politi, L.; Biggeri, A.; Accetta,G.; Trignano, C.; Di Padua, M.; Bertol, E. Cocaine and heroin in waste water plants: A 1-year study in the city of Florence, Italy. *Forensic Sci. Int.* **2009**, vol. 189, 88-92.
- (48) Vuori, E.; Happonen, M.; Gergov, M.; Nenonen, T.; Jarvinen, A.; Ketola, R.; Vahala, R. Wastewater analysis reveals regional variability in exposure to abused drugs and opioids in Finland. *Sci.Total Enviro.* **2014**, vol. 487,688-695.

- (49) Van Nuijs, A.; Pecceu, B.; Theunis, L.; Dubois, N.; Charlier, C.; Jorens, P.; Bervoets, L.; Bluest, R.; Neels, H.; Covaci, A. Cocaine and metabolites in waste and surface water across Belgium. *Environ. Pollut.* **2009**, vol. 157, 123-129.
- (50) Daglioglu, N.; Yavuz, E.; Kilercioglu, S. Assessment of illicit drugs in wastewater and estimation of drugs of abuse in Adana Province, Turkey. *Forensic Sci. Int.* **2019**, vol. 294, 132-139.
- (51) Causanilles, A.; Ruepert, C.; Ibáñez, M.; Emke, E.; Hernández, F.; De Voogt, P. Occurrence and fate of illicit drugs and pharmaceuticals in wastewater from two wastewater treatment plants in Costa Rica. *Sci.Total Enviro.* **2017**, vol. 599-600, 98-107.
- (52) Skees, A.; Foppe, K.; Longanathan, B.; Subedi, B. Contamination profiles, mass loadings, and sewage epidemiology of neuropsychiatric and illicit drugs in wastewater and river waters from a community in the Midwestern United States. *Sci.Total Enviro.* **2018**, vol. 631-632, 1457-1464.
- (53) SCORE. Common protocol of action for monitoring illicit drugs in wastewater. [Online] **2010**.
<https://www.emcdda.europa.eu/system/files/attachments/10392/SCORE-common-protocol-of-action-for-monitoring-illicit-drugs-in-wastewater-oct-2013.pdf> (visitada 11/06/2020)
- (54) Boleda, R.; Galceran, M.T.; Ventura, F. Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. A.* **2007**, vol. 1175, 38-48.
- (55) Huerta-Fontela, M.; Galceran, M.T.; Ventura, F. Ultrapformance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of Stimulatory Drugs of Abuse in Wastewater and Surface Waters. *Anal. Chem.* **2007**, vol. 79, 3821–3829.
- (56) González-Mariño, I.; Benito, J.; Rodríguez, I.; Rodil, R.; González-Peñas, J.; Cela, R. Comparison of molecularly imprinted, mixed-mode and hydrophilic

- balance sorbents performance in the solid-phase extraction of amphetamine drugs from wastewater samples for liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination. *J.Chromatogr. A.* **2009**, vol. 1216, 8435-8441.
- (57) González-Mariño, I.; Benito, J.; Rodríguez, I.; Rodil, R.; González-Peñas, J.; Cela, R. Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography–ion trap-tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. A.* **2010**, vol. 1217, 1748-1760.
- (58) Fontanals, N.; Borrull, F.; Marcé, R. On-line weak cationic mixed-mode solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry to determine illicit drugs at low concentration levels from environmental waters. *J.Chromatogr. A.* **2013**, vol. 1286, 16-21.
- (59) Bijlsma, L.; Serrano, R.; Ferrer, C.; Isabel, T.; Hernández, F. Occurrence and behavior of illicit drugs and metabolites in sewage water from the Spanish Mediterranean coast (Valencia region). *Sci.Total Enviro.* **2014**, vol. 487, 703-709.
- (60) Prosen, H.; Fontanals, N.; Borrull, F.; Marcé, R. Determination of seven drugs of abuse and their metabolites in surface and waste water using solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2017**, vol. 40, 3621-3631.
- (61) López-García, E.; Mastroianni, N.; Postigo, C.; Barceló, D.; López de Alda, M. A fully automated approach for the analysis of 37 psychoactive substances in raw wastewater based on on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. A.* **2018**, vol. 1576, 80-89.
- (62) EMCDDA. [Online] <https://www.emcdda.europa.eu/topics/pods/waste-water-analysis> (visitada 05/06/2020)
- (63) Castiglioni, S.; Thomas, K.; Kasprzyk, B.; Vandam, L.; Griffiths, P. Testing wastewater to detect illicit drugs: State of the art, potential and research needs. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, vol.487, 613-620.

- (64) Castiglioni, L.; Bijlsma, A.; Covaci, E.; Emke, F.; Hernández, M.; Reid, C.; Ort, K.; Thomas, A.; Van Nuijs, P.; Voogt, E. Evaluation of uncertainties associated with the determination of community drug use through the measurement of sewage drug biomarkers. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, vol. 47, 1452-1460.
- (65) Yin Lai, F.; Ort, C.; Gartner, C.; Carter, S.; Prichard, J.; Kirkbride, P.; Bruno, R.; Hall, W.; Eaglesham, G.; Muller, J. Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis: Co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment. *Water Res.* **2011**, vol. 45, 4437-4448.
- (66) Clesceri, L.; Greenberg, A.; Eaton, A. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Amer. Pub. Heal. Assoc.* **1998**, vol. 20, 48-60.
- (67) ISO Water quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes; ISO 5667-1; ISO: Genève, Switzerland, **1980**.
- (68) Ort, C.; Lawrence, M.; Reungoat, J.; Mueller, J. Sampling for PPCPs in Wastewater Systems: Comparison of Different Sampling Modes and Optimization Strategies. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, vol. 44, 6289-6296
- (69) Castiglioni, S.; Bijlsma, L.; Covaci, A.; Emke, E.; Hernández, F.; Reid, M.; Ort, C.; Thomas, K.; Van Nuijs, A.; Voogt, P.; Zuccato, E. Evaluation of Uncertainties Associated with the Determination of Community Drug Use through the Measurement of Sewage Drug Biomarkers. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, vol. 47, 1452-1460.
- (70) Bisceglia, K.; Lippa, K. Stability of Cocaine and Its Metabolites in Municipal Wastewater--The Case for Using Metabolite Consolidation to Monitor Cocaine Utilization. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2014**, vol. 21, 4459-4460.
- (71) Baker, D.; Kasprzyk, B. 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. *Chromatogr. A*. **2011**, vol. 1218, 8036-8059
- (72) Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Melis, M.; Panawennage, D.; Chiarelli, P. Fanelli, R.; Zuccato, E. Identification of cocaine and its metabolites in urban wastewater and comparison with the human excretion profile in urine. *Water Res.* **2011**, vol. 45, 5141-5150.
- (73) Plosz, B.; Reid, M.; Borup, M.; Langford, K.; Thomas, K. Biotransformation kinetics and sorption of cocaine and its metabolites and the factors influencing their estimation in wastewater. *Water Res.* **2013**, vol. 47, 2129–2140.
- (74) Thai, P.; O'Brien, J.; Jiang, G.; Gernjak, W.; Yuan, Z.; Eaglesham, G. Degradability of creatinine under sewer conditions affects its potential to be used as biomarker in sewage epidemiology. *Water Res.* **2014**, vol. 55, 272–279.
- (75) Chen, C.; Kostakis, C.; Irvine, R. J.; Felgate, P.; White, J. Evaluation of pre-analysis loss of dependent drugs in wastewater: stability and binding assessments. *Drug Testing and Analysis*. **2013**, vol. 5, 716–721.
- (76) Senta, I.; Krizman, I.; Ahel, M.; Terzic, S. Assessment of stability of drug biomarkers in municipal wastewater as a factor influencing the estimation of drug consumption using sewage epidemiology. *Sci. Tot. Environ.* **2014**, vol. 487, 659–665.
- (77) Mercan, S.; Kuloglu, M.; Ascioglu, F. Monitoring of illicit drug consumption via wastewater: development, challenges, and future aspects. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*. **2019**, vol. 9, 64-72.
- (78) Van Nuijs, A.; Mougél, J.; Tarcomnicu, I.; Bervoets, L.; Blust, R.; Jorens, P.; Neels, H.; Covaci, A. Sewage epidemiology — A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environ. Intern.* **2011**, vol. 37, 612-621.