

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author

Universitat Politècnica de Catalunya



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA

Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia

Programa de Doctorado

Biotecnologia Agroalimentaria i Sostenibilitat



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua



Tesis Doctoral

**“DINÁMICA DE MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN AGUAS DE RIEGO AGRÍCOLA
Y SU INCORPORACIÓN POTENCIAL EN ESPECIES VEGETALES DE INTERÉS
AGRONÓMICO”**

Presentada por

Diana Calderón Preciado

para optar al título de Doctora por la Universitat Politècnica de Catalunya

Director

Prof. Josep Maria Bayona Termens

Departamento de Química Ambiental
Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Co-director

Dr. Víctor Matamoros Mercadal

Departamento de Química Ambiental
Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Ponente

Dra. Núria Cañameras Riba

Departament d'Enginyeria Agroalimentària
i Biotecnologia
Universitat Politècnica de Catalunya

Barcelona, Abril 2012



Acta de qualificació de tesi doctoral

Curs acadèmic:

Nom i cognoms

DNI / NIE / Passaport

Programa de doctorat

Unitat estructural responsable del programa

Resolució del Tribunal

Reunit el Tribunal designat a l'efecte, el doctorand / la doctoranda exposa el tema de la seva tesi doctoral titulada

_____.

Acabada la lectura i després de donar resposta a les qüestions formulades pels membres titulars del tribunal, aquest atorga la qualificació:

APTA/E

NO APTA/E

(Nom, cognoms i signatura) President/a		(Nom, cognoms i signatura) Secretari/ària	
(Nom, cognoms i signatura) Vocal	(Nom, cognoms i signatura) Vocal	(Nom, cognoms i signatura) Vocal	

_____, _____ d'/de _____ de _____

El resultat de l'escrutini dels vots emesos pels membres titulars del tribunal, efectuat per l'Escola de Doctorat, a instància de la Comissió de Doctorat de la UPC, atorga la MENCIO CUM LAUDE:

SI

NO

(Nom, cognoms i signatura) Presidenta de la Comissió de Doctorat	(Nom, cognoms i signatura) Secretària de la Comissió de Doctorat
---	---

Barcelona, _____ d'/de _____ de _____

AGRADECIMIENTOS

Hace unos pocos días una persona me hacía la eterna pregunta ¿Qué te falta para terminar la Tesis?, yo contesté cabizbaja: los agradecimientos... Pensaba han sido ya 5 años y 7 meses, no sé si mi vena de escritora sea lo suficientemente prolífica para agradecer de manera satisfactoria, para mí y por supuesto para el lector, todo aquello y aquellos que han sido parte importante de esta etapa. Al volver la mirada más que dificultades y sinsabores veo con alegría obstáculos vencidos, momentos divertidos, y experiencias invaluable... Me considero afortunada de haber encontrado un lugarcito en el Laboratorio 312-320, donde los compañeros de trabajo se convirtieron en grandes amigos y un apoyo constante en aquellos momentos donde me faltaron las fuerzas.

En primer lugar me gustaría agradecer al Prof. Josep Maria Bayona, por la gran ayuda aportada para el desarrollo riguroso de los estudios que conforman la presente Tesis, pero más allá de ello por su humanidad y apoyo incondicional en momentos difíciles, siempre le estaré profundamente agradecida por la confianza que en mí ha depositado. Quisiera también agradecer al Dr. Víctor Matamoros por su profundo involucramiento en la realización de la presente Tesis y su invaluable aportación para hacerla suya, también he de decir que lo que más le admiro es su infatigable alegría en la investigación. Moltes gràcies a ambdós per dirigir la meva Tesi doctoral i per donar-me moltes vegades les energies y la confiança que em feien falta per finalitzar aquesta etapa.

Debo un especial reconocimiento a la Prof. Núria Cañameras (DEAB-UPC), Dr. Robert Savé y Carme Biel (IRTA-Torre Marimón) por su ayuda y la colaboración estrecha en la realización de la presente Tesis.

It's funny sometimes the way life works, it puts incredible people in our way unexpectedly, that was the case of my favorite Australian and roommate... thank you Mel "Blondie" for those talks, the teas, your sweetness and that infallible logic that I envy so much! See I'm FANTASMA no more! See you in Melbourne! Gracias Blanka por tu fantástica ironía y las historias de "Layla". A la "tite Aurelita... Ay esa minutaaa. A María "xirafinhna" por que todo saldrá bien tía... A Julio por su humor increíble, y ese farol rojo... Dago y Anna+Brunito, de todo corazón muchas gracias por preocuparse por mí, por alentarme a seguir adelante, y por seguir siendo mis amigos a pesar de mis "hoy no puedo quedar"!!! Los estimo un montón.

En mi estancia en el CSIC he tenido el placer de conocer a varias personas que me han permitido compartir su visión del mundo y de esta manera han enriquecido la mía... Claudito tan alegre, Núria siempre tan pendiente de mí y mi salud (mental :p), Quentin y esas horas en el lab diciendo "esto tiene que salir". También hay mucha gente que ha dejado una marquita en mí, aunque solo hayamos compartido un momento efímero... y esa experiencia es algo que atesoro profundamente...

Todos los predocs dirán que existe una "Red de Apoyo Intra-Laboratorio", donde las bromas de pasillo, alguna que otra fiesta y salidas en general son una buena forma de encontrar el lado amable a los altibajos de la investigación... Gracias: Lou, Oscar, María José, Ana, Naiara, Cristóbal, Bibi y a otros tantos que han pasado por estos corredores. Sin lugar a duda de toda la gente que conforma esta particular "Red" los más importantes y más queridos para mí son mis chic@s de los lab 311-320. WOW!!!!. Yo es que si fuera un poco más elocuente podría llenar y llenar páginas con los buenos momentos vividos, las palabras de aliento recibidas, las lecciones aprendidas, todos aquellos detalles que hacen ESPECTACULAR a mi familia española. Carla "Miss Fotogenia", una de las personas más nobles e inteligentes que conozco, Carmen, ya quisiera yo tener su inagotable vitalidad y sentido del humor, Carolina, una persona centrada e inteligente pero sobretodo generosa, Cristal, la definición orgánica de "lust for life", Jagos, todo un filósofo con el que se debate de cualquier tema, María, tan divina y tan pragmática... Gracias también a Susanita, Yolanda, Tami e Isabel y si me dejo a alguien no será por falta de sentimiento (como se dice en MX) si no porque a estas alturas no doy para mucho más...

Mención a parte merece (y letras de oro diría él) Luis... Ay lo que hemos pasado juntos, ahora mismo me es imposible poner por escrito de manera justa y satisfactoria para ambos lo mucho que me has ayudado y alentado en todo momento... Gracias querido mío... de aquí a París, no?

Gracias a mis amigas de siempre Glor (Mirò), Gaby (Refill), Ludmi (Ira), Chris (las divorciadas del 203)... esas chicas inteligentes (;!!), guapísimas e independientes que a pesar de la distancia y mi malísima memoria siguen ahí, como si nunca nos hubiésemos separado! All the Montreal people: Je suis fou de vous!!!! Those nights in Ceilidh, those "field trips", those walks by the road in the middle of nowhere, that crazy bus driver... the laughs, the costumes, the "wild", the fun and complicity... I miss you all.

MUCHAS GRACIAS hermanitos!! Por el amor, el apoyo, la comprensión, las bromas los viajes y los apapachos!!! A mis padres quiero y debo agradecer el gran ejemplo de vida y superación que me han dado siempre... y una cosa es cierta yo no estaría donde estoy si no fuese por ustedes y esa enorme fe que han tenido en mí y que yo tengo en ustedes. Papá my number one y mamá siempre mi mejor amiga...

CONTENIDO

i	■	ÍNDICE DE TABLAS
ii	■	ÍNDICE DE FIGURAS
v	■	ABSTRACT
vii	■	RESUMEN
ix	■	RESUM
xi	■	ACRÓNIMOS

CAPÍTULO I. Introducción General

3	I.1.	Agua regenerada
6	I.1.1.	Reutilización de aguas regeneradas
8	I.1.2.	Regulación del uso de aguas regeneradas en el riego agrícola
10	I.1.3.	Requerimientos en la calidad del agua para su uso agrícola
13	I.2.	Presencia de microcontaminantes orgánicos en el medio acuático
18	I.2.1.	Parámetros fisicoquímicos relevantes de los microcontaminantes orgánicos
19	I.2.2.	Productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) y contaminantes prioritarios
19	I.2.2.1.	PPCPs: Descripción
21	I.2.2.2.	PPCPs: Origen y destino final en el medio
25	I.2.2.3.	Contaminantes prioritarios: Descripción
26	I.2.2.4.	Tecnologías para la eliminación de PPCPs y compuestos relacionados
27	I.2.2.5.	PPCPs y contaminantes prioritarios: Algunos efectos ambientales
29	I.2.3.	Subproductos de desinfección: Trihalometanos y N-nitrosaminas
32	I.2.3.1.	Trihalometanos: Formación y descripción
35	I.2.3.2.	N-nitrosaminas: Formación y descripción
40	I.3.	Incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas
42	I.3.1.	Vías principales de incorporación
42	I.3.1.1.	Vía radicular
43	I.3.1.2.	Incorporación a partir de la fase vapor circundante
43	I.3.1.3.	Difusión a través de las partes aéreas de la planta
44	I.3.2.	Transporte
46	I.3.3.	Sistemas de detoxicación de xenobióticos en plantas

CAPÍTULO II. Objetivos y Estructura General

51	II.1.	Objetivos generales
51	II.2.	Objetivos específicos
53	II.3.	Estructura general

CAPÍTULO III. Metodologías Analíticas para la Determinación de Microcontaminantes Orgánicos en Matrices Ambientales

57	III.1.Introducción al capítulo
57	III.2.Determinación de microcontaminantes orgánicos en matrices acuosas
57	III.2.1. Antecedentes analíticos
59	III.2.2. Preparación de muestra
60	III.2.3. Separación cromatográfica y detección
62	III.2.4. Validación de la metodología analítica
63	III.3.Determinación de THMs en matrices acuosas
63	III.3.1. Antecedentes analíticos
65	III.3.2. Preparación de muestra
65	III.3.3. Separación cromatográfica y detección
66	III.3.4. Validación de la metodología analítica
67	III.4.Determinación de N-nitrosaminas en matrices acuosas
67	III.4.1. Antecedentes analíticos
68	III.4.2. Preparación de muestra
69	III.4.3. Separación cromatográfica y detección
70	III.4.4. Validación de la metodología analítica
71	III.5.Determinación de PPCPs y otros microcontaminantes específicos en matrices vegetales
71	III.5.1. Antecedentes analíticos
72	III.5.2. Preparación de muestra
74	III.5.3. Separación cromatográfica y detección
74	III.5.4. Validación de la metodología analítica
76	III.6.Consideraciones generales del diseño de experimentos
79	III.7.Contextualización y estructura del capítulo
81	III.8.Artículo científico 1. <i>Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination</i>
92	III.9.Discusión general de resultados

CAPÍTULO IV. Evaluación del Uso de Aguas Regeneradas en el Riego Agrícola

97	IV.1.Introducción al capítulo
97	IV.2.Métodos estadísticos y quimiométricos
97	IV.2.1. Pre-tratamiento de datos
97	IV.2.2. Análisis de componentes principales (PCA)
99	IV.3.Modelos de incorporación de microcontaminantes orgánicos
102	IV.4.Contextualización y estructura del capítulo
103	IV.5.Artículo científico 2. <i>Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading</i>
121	IV.6.Artículo científico 3. <i>Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network</i>
129	IV.7.Discusión general de resultados

CAPÍTULO V. Incorporación y Translocación de Microcontaminantes Orgánicos en Cultivos Irrigados con Agua Regenerada

139	V.1. Introducción al capítulo
139	V.2. Factores determinantes en la incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas
139	V.2.1. Funcionamiento de la planta y estructuras fisiológicas de relevancia
144	V.2.2. Efecto “ <i>ion trap</i> ”
146	V.3. Contextualización y estructura del capítulo
147	V.4. Artículo científico 4. <i>Uptake of Organic Emergent Contaminants in Spath and Lettuce: An in Vitro Experiment</i>
161	V.5. Artículo científico 5. <i>Foliar uptake of emerging and priority organic contaminants. An in vitro evidence.</i>
177	V.6. Discusión general de resultados

185 ■ CONTEXTUALIZACIÓN GLOBAL DE LA TESIS

189 ■ CONCLUSIONES

195 ■ REFERENCIAS

ÍNDICE DE TABLAS

- 5 ■ **Tabla I.1.** Algunos parámetros de calidad del agua.
- 7 ■ **Tabla I.2.** Terminología empleada en la reutilización de aguas.
- 9 ■ **Tabla I.3.** Criterios de calidad de aguas para su uso en irrigación agrícola.
- 14 ■ **Tabla I.4a.** Algunas propiedades fisicoquímicas relevantes y utilidad comercial de microcontaminantes orgánicos específicos de interés estudiados en la presente Tesis.
- 16 ■ **Tabla I.4b.** Estructuras químicas de los microcontaminantes específicos de interés estudiados en la presente Tesis.
- 22 ■ **Tabla I.5.** Niveles medios de PPCPs y compuestos relacionados en diferentes compartimientos acuáticos.
- 26 ■ **Tabla I.6.** Clasificación de las sustancias prioritarias según la Directiva Marco del Agua.
- 30 ■ **Tabla I.7.** Comparación de la inactivación microbiana obtenida con diferentes agentes desinfectantes.
- 31 ■ **Tabla I.8.** Tipo de subproducto de desinfección generado de acuerdo al agente desinfectante utilizado.
- 32 ■ **Tabla I.9.** Algunas propiedades fisicoquímicas relevantes de los trihalometanos.
- 34 ■ **Tabla I.10.** Concentraciones mínimas, máximas y medias de trihalometanos en diferentes compartimientos acuáticos.
- 34 ■ **Tabla I.11.** Toxicología de los trihalometanos.
- 35 ■ **Tabla I.12.** Algunas propiedades fisicoquímicas relevantes de las N-nitrosaminas.
- 38 ■ **Tabla I.13.** Niveles medios de N-nitrosaminas en diferentes compartimientos acuáticos.
- 39 ■ **Tabla I.14.** Toxicología de algunas N-nitrosaminas.
- 42 ■ **Tabla I.15.** Algunos ejemplos de incorporación de microcontaminantes orgánicos en diferentes especies vegetales.
- 59 ■ **Tabla III.1.** Algunos procedimientos analíticos utilizados para la determinación de fármacos en muestras acuosas.
- 62 ■ **Tabla III.2.** LODs en la determinación de microcontaminantes orgánicos en muestras acuosas mediante SPE-GC-MS.
- 63 ■ **Tabla III.3.** Algunos procedimientos analíticos utilizados en la determinación de trihalometanos en muestras acuosas.
- 67 ■ **Tabla III.4.** LODs obtenidos en la determinación de THMs en muestras acuosas mediante SPME-GC-ECD y comparación con las obtenidas por métodos USEPA.
- 67 ■ **Tabla III.5.** Algunos procedimientos analíticos utilizados en la determinación de N-nitrosaminas en muestras acuosas.
- 71 ■ **Tabla III.6.** Figuras de mérito obtenidas para la determinación de N-nitrosaminas en muestras acuosas mediante GC-MS y las obtenidas por el Método 521 USEPA con el mismo fin.
- 74 ■ **Tabla III.7.** Figuras de mérito obtenidas para la determinación de los analitos diana en material vegetal mediante GC-MS/MS.

ÍNDICE DE FIGURAS

- 3** ■ **Figura I.1.** Ciclo hidrológico. Adaptado de NASA, (2010).
- 6** ■ **Figura I.2.** Países que reportan los mayores volúmenes por habitante de aguas residuales tratadas para riego agrícola (Jiménez, 2006).
- 13** ■ **Figura I.3.** Procesos que afectan el destino final de los microcontaminantes orgánicos en el medio acuático (Barber et al., 1995).
- 21** ■ **Figura I.4.** Vías de contaminación ambiental por fármacos. Adaptado de Ternes, (1998).
- 30** ■ **Figura I.5.** Ilustración esquemática de las reacciones entre diferentes agentes oxidantes con la materia orgánica natural (NOM, Natural Organic Matter) y compuestos inorgánicos reducidos. Adaptado de Edzwald, (2011).
- 31** ■ **Figura I.6.** Relación entre nivel de desinfección, riesgo sanitario y producción de DBPs. Adaptado de Sadiq y Rodríguez, (2004).
- 33** ■ **Figura I.7.** Ilustración esquemática de la cloración al punto de ruptura.
- 45** ■ **Figura I.8.** Vías de incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas. (a) Incorporación radicular, (b) incorporación a partir de la fase vapor, (c) incorporación por difusión a través de las partes aéreas de la planta. Adaptado de la University of Maryland University College, (2011).
- 60** ■ **Figura III.1.** Esquema de la metodología analítica para la determinación de PPCPs, contaminantes prioritarios y otras sustancias de interés en muestras acuosas.
- 61** ■ **Figura III.2.** Registro de los iones totales (TIC) y las trazas iónicas correspondientes a los iones característicos de compuestos selectos. Los picos característicos se señalan con un asterisco. Muestra: Efluente del EDAR-Torroella de Montgrí.
- 64** ■ **Figura III.3.** Esquema de un dispositivo de microextracción en fase sólida utilizado en modo espacio de cabeza.
- 65** ■ **Figura III.4.** Esquema de la metodología seguida en el procesamiento y análisis de muestras acuosas en la determinación de THMs.
- 66** ■ **Figura III.5.** Cromatograma (GC-ECD) de: (a) patrones de THMs a una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, y (b) muestra acuosa de un efluente de la EDAR Prat de Llobregat. (IS) iodometano como estándar interno, (1) cloroformo, (2) bromodiclorometano, (3) dibromoclorometano y (4) bromoformo.
- 68** ■ **Figura III.6.** Esquema de la metodología seguida en la determinación de N-nitrosaminas en muestras acuosas.
- 70** ■ **Figura III.7.** Cromatogramas GC – (PCI) MS para (a) patrones de N-nitrosaminas a una concentración de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ y (b) muestra acuosa de un efluente terciario de la EDAR Torroella de Montgrí. (IS) Trifenilamina como estándar interno, (S) N-Nitrosodipropilamina como surrogate, (1) N-Nitrosodimetilamina, (2) N-Nitrosometilamina, (3) N-Nitrosodietilamina, (4) N-Nitrosopiperidina, (5) N-Nitrosopiperidina, (6) N-Morfolina y (7) N-Nitrosodi-n-butilamina.
- 73** ■ **Figura III.8.** Esquema de la metodología seguida en la determinación de PPCPS y otros contaminantes específicos en muestras vegetales.
- 75** ■ **Figura III.9.** Cromatograma GC-MS/MS para una muestra de alfalfa regada con agua regenerada, donde se muestran las transiciones utilizadas para la cuantificación de algunos analitos diana.

- 78** ■ **Figura III.10.** Diseño de componentes centrales aplicado, considerando como variables independientes temperatura y tiempo. El experimento central se llevó a cabo por triplicado. Los valores de los ejes se muestran en su magnitud real (línea continua) y normalizada (línea punteada).
- 98** ■ **Figura IV. 1.** Descomposición por PCA de la matriz de datos D en 3 componentes.
- 130** ■ **Figura IV. 2.** Concentraciones medias de microcontaminantes orgánicos identificados en la comunidad de regantes de Torroella de Montgrí. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75.
- 132** ■ **Figura IV. 3.** Concentraciones medias de THMs por punto de muestreo.
- 132** ■ **Figura IV. 4.** Concentraciones medias de N-nitrosaminas por punto de muestreo.
- 140** ■ **Figura V.1.** Estructura de la raíz, donde se muestran las rutas apoplástica y simplástica. Adaptado de Pearson Education, (2008).
- 142** ■ **Figura V.2.** Estructura de la hoja mostrando sus partes más representativas. Adaptado de Garden Resources, (2010).
- 143** ■ **Figura V.3.** Sistema vascular de la planta, mostrando el transporte de productos fotosintéticos a través del floema y el transporte de agua a través del xilema. Adaptado de la University of Illinois, (2004).
- 144** ■ **Figura V.4.** Esquema del efecto “*ion trap*” producto de la bomba de protones presente en la membrana celular, responsable de la introducción de ácidos débiles al interior de la célula.
- 179** ■ **Figura V.5.** Fotografías correspondientes al experimento de incorporación de contaminantes orgánicos in vitro para la evaluación de la vía de incorporación radicular. A) Espatifilo, B) lechuga y C) diferentes tratamientos utilizados en el experimento (lechuga).
- 180** ■ **Figura V.6.** Cambios de pH en la rizosfera mostrados en la raíz de *Vigna unguiculata* en condiciones de oscuridad (izquierda) y luz (derecha) después de 6 h de incubación en gel de agar con un indicador de pH (púrpura de bromocresol) y 1mM de nitrato de potasio. Reimpreso de Rao et al., 2002.

ABSTRACT

Climatic change and a swift population and industrial growth have caused a severe decrease in the available freshwater resources. In the management of water scarceness the use of sustainable alternatives that improve the preservation of this vital resource becomes essential. A great example of a sustainable alternative is the use of reclaimed water in agricultural irrigation; since agricultural activities represent the world's largest consumption of freshwater.

The work carried out and compiled in this Thesis can be divided in two main sections; the first of which is focused on the evaluation of the chemical quality of waters used in agricultural irrigation and their impact on irrigated crops. In the second section the uptake of organic micropollutants is evaluated by means of two model plants. The target compounds included in the studies encompassed in this Thesis belong to different chemical classes, namely: pharmaceuticals and personal care products, priority pollutants and disinfection by-products. Previously developed and validated analytical methodologies were employed in the determination of these compounds in water matrices; however in this Thesis a new analytical methodology for the determination of emergent micropollutants in vegetable matrices was developed and optimized.

In the first section of this Thesis the chemical quality of irrigation waters of two agricultural regions of Catalonia, Torroella de Montgrí (TM) and Parc Agrari del Baix Llobregat (PABL), was evaluated. In TM an evaluation of river (Ter River) and reclaimed (WWTP-TM) waters was carried out. Even though, the river water displayed a higher frequency of detection of organic micropollutants, the total concentration of these compounds was superior in the WWTP-TM effluent. Alfalfa and apple crops irrigated with these waters showed quantifiable concentrations of 5 organic micropollutants (i.e., ibuprofen, naproxen, methyl dihydrojasmonate, caffeine and tonalide). In PABL, the application of two mathematical models was used to estimate the theoretical plant tissue concentration according to the concentration of the organic micropollutants present in the irrigation water. The models were further validated by comparing the theoretical plant tissue concentration obtained with their application with the experimental tissue concentration of the TM crops.

The second part of this Thesis was concerned with evaluating the *in vitro* root incorporation of 6 organic micropollutants in two model plants (spath and lettuce). The uptake process of the target analytes and their posterior detoxification within the plant was characterized by calculating the kinetic constants of such processes. The physicochemical properties of the studied compounds (i.e., molecular mass and log K_{ow}) were found to be determinant. The *in vitro* foliar incorporation of 11 target analytes in lettuce heart's leaves was also undertaken. Relative humidity did not exert an statistically significant repercussion in the sorption of the studied compounds. However, the compound's solubility, volatility and polarity were found to be statistically significant in such process.

RESUMEN

En los últimos años el cambio climático y el vertiginoso crecimiento poblacional e industrial han provocado la reducción de los recursos hídricos disponibles. Es por ello que el uso de alternativas sostenibles que permitan la conservación de este recurso resulta imprescindible. Un ejemplo es la implementación del uso de agua regenerada para riego agrícola. No obstante, la presencia de microcontaminantes orgánicos en estas aguas puede resultar en un riesgo potencial para la salud humana.

El trabajo realizado y compilado en la presente Tesis se divide en dos grandes apartados; el primero se centra en la evaluación de la calidad química de las aguas de riego agrícola y su impacto sobre los cultivos irrigados; mientras que en el segundo, se evalúa la incorporación de microcontaminantes en plantas modelo. Los analitos diana considerados en este trabajo pertenecen a diversas clases de compuestos químicos: fármacos y productos de cuidado personal, contaminantes prioritarios y subproductos de desinfección. Para la determinación de estos compuestos en matrices acuosas, se emplearon metodologías desarrolladas en estudios anteriores. Sin embargo, en esta Tesis se desarrolló y optimizó una metodología analítica específica para la determinación de microcontaminantes orgánicos en material vegetal.

En la primera parte de la Tesis se evaluó la calidad química de las aguas utilizadas para el riego de dos zonas agrícolas de Cataluña: Torroella de Montgrí (TM) y el Parc Agrari del Baix Llobregat (PABL). En TM se evaluaron aguas de riego de origen fluvial (río Ter) y regeneradas (efluente de la EDAR-TM). Aunque la frecuencia de detección de microcontaminantes orgánicos fue mayor en el agua de río, la concentración total de éstos fue superior en el efluente de la EDAR-TM. Los cultivos de alfalfa y manzana irrigados con estas aguas mostraron concentraciones cuantificables de 5 microcontaminantes orgánicos (ibuprofeno, naproxeno, metil dihidrojasmonato, cafeína y tonalida). En PABL, la aplicación de dos modelos matemáticos permitió el cálculo de la concentración teórica en el tejido del cultivo en base a la concentración de los microcontaminantes presentes en el agua de riego. Los modelos se validaron mediante la comparación de la concentración teórica obtenida de la aplicación de los modelos con la concentración experimental presente en los cultivos de TM.

En la segunda parte de la Tesis se evaluó la incorporación radicular *in vitro* de 6 microcontaminantes orgánicos en dos plantas modelo (espatifilo y lechuga). Se caracterizó el proceso de incorporación de los analitos en el tejido vegetal y su posterior detoxicación mediante el cálculo de las constantes cinéticas de tales procesos; siendo las propiedades fisicoquímicas de los analitos (masa molecular y $\log K_{ow}$) determinantes. Finalmente, se evaluó la incorporación foliar *in vitro* de 11 microcontaminantes orgánicos en cogollos de lechuga. Aunque la humedad relativa no tuvo una repercusión estadísticamente significativa en la sorción de los analitos diana en la hoja, si la tuvieron la solubilidad, volatilidad y polaridad de éstos.

RESUM

En el darrers anys la pressió sobre els recursos hídrics s'ha incrementat degut al canvi climàtic i a un creixement poblacional i industrial desmesurat. És per això que l'ús d'alternatives sostenibles que permetin la conservació d'aquest recurs són imprescindibles. Un clar exemple és la implementació de l'ús d'aigua regenerada per al reg agrícola. Malgrat això, la presència de microcontaminants orgànics en aquestes aigües pot resultar en un risc potencial per a la salut humana.

L'estudi realitzat i compilat en aquesta Tesi es divideix en dos grans apartats; el primer es centra en l'avaluació de la qualitat química de les aigües de reg agrícola i el seu impacte en els respectius cultius, mentre el segon avalua la incorporació de microcontaminants en plantes model. Els analits diana considerats en aquest treball pertanyen a diverses classes de compostos químics: fàrmacs i productes d'higiene personal, contaminants prioritaris i subproductes de desinfecció. Per a la determinació d'aquests compostos en matrius aquoses es van utilitzar metodologies analítiques anteriorment desenvolupades pel grup de recerca. Malgrat això, en aquesta Tesi es va desenvolupar i validar una metodologia analítica específica per a la determinació de microcontaminants orgànics en material vegetal.

En la primera part de la Tesi s'avaluà la qualitat química de les aigües utilitzades per al reg de dos zones agrícoles de Catalunya: Torroella de Montgrí (TM) i el Parc Agrari del Baix Llobregat (PABL). A TM s'avaluaren aigües de reg d'origen fluvial (riu Ter) i regenerades (efluent EDAR-TM). Tot i que la freqüència de detecció de microcontaminants orgànics va ser major en l'aigua de riu, la concentració total d'aquests va ser superior en l'aigua regenerada. Els cultius d'alfals i poma regats amb aquesta aigua mostraren concentracions quantificables de 5 microcontaminants orgànics (ibuprofèn, naproxèn, metil dihidrojasmonat, cafeïna i tonalida). A PABL, l'aplicació de dos models matemàtics va permetre el càlcul de la concentració teòrica en el teixit del cultiu en base a la concentració dels microcontaminants presents en l'aigua de reg. Els models foren validats mitjançant la comparació de la concentració teòrica obtinguda de l'aplicació dels models amb la concentració experimental present en els cultius de TM.

En la segona part de la Tesi es va avaluar la incorporació radicular *in vitro* de 6 microcontaminants orgànics en dues plantes model (espatifil·li i enciam). Es caracteritzà el procés d'incorporació dels analits en el teixit vegetal i la seva posterior detoxificació mitjançant el càlcul de les respectives constants cinètiques, essent les propietats fisicoquímiques (massa molecular y $\log K_{ow}$) dels analits determinants. Finalment, s'avaluà la incorporació foliar *in vitro* d' 11 microcontaminants orgànics en fulles d'enciam. Tot i que la humitat relativa no va tenir una repercussió estadísticament significativa en la sorció dels analits diana en la fulla, sí la tingueren la solubilitat, la volatilitat i la polaritat d'aquests.

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ABC	ATP Binding Cassette/ Transportadores ABC
AED	Atomic Emission Detector/Detector de emisión atómica
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AOP	Advanced Oxidation Process/Proceso de oxidación avanzada
BAF	Bioaccumulation factor/Factor de bioacumulación
BCF	Bioconcentration factor/Factor de bioconcentración
CCL	Contaminant Candidate List/Lista de contaminantes candidatos
CDHS	California Department of Health Services/ Departamento de servicio de salud de California
CLND	Chemiluminescent nitrogen detection/Detección de nitrógeno mediante quimioluminiscencia
DAI	Direct Aqueous Injection/Inyección acuosa directa
DBPs	Disinfection by-products/Subproductos de desinfección
DELCD	Dry electrolytic conductivity detector/Detector de conductividad electrolítica seca
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction/Microextracción dispersiva líquido-líquido
DMA	Directiva Marco del Agua/Water framework directive
DOE	Design of Experiments/Diseño de experimentos
DON	Dissolved Organic Nitrogen/ Nitrógeno orgánico disuelto
DVB/CAR/PDMS	Divinylbenzene/Carboxene/Polydimethylsiloxane Fiber /Fibra de Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano
ECD	Electron Capture Detector/Detector de captura de electrones
ECDs	Endocrine disruptors/Disruptores endócrinos
EI	Electronic Impact/Impacto electrónico
EQS	Environmental Quality Standards/Estándares de Calidad Ambiental
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
IARC	International Agency for the Research of Cancer/ Agencia internacional para la investigación del cáncer
GHGs	Greenhouse gases/ Gases de efecto invernadero
GSTs	Glutathion S-transferases/Glutatión S-transferasas
HAAS	Haloacetic acids/Ácidos haloacéticos
HS	Headspace/Espacio de cabeza

IS	Internal Standard/Estándar interno
k_H	Constante Ley de Henry
K_{ow}	Coefficiente de partición octanol-agua
K_{oc}	Coefficiente de partición carbono orgánico del suelo-agua
K_d	Coefficiente de partición fase sólida y acuosa
LC	Liquid Chromatography/Cromatografía de líquidos
LLE	Liquid-Liquid Extraction/Extracción líquido-líquido
LPME	Liquid-phase microextraction/Microextracción en fase líquida
LOD	Limit of Detection/Límite de detección
LOQ	Limit of Quantitation/Límite de cuantificación
MCM	Methyl chloromethanoate/Metil clorometanoato
MRM	Multiple Reaction Monitoring/Monitorización de reacciones múltiples
MS	Mass Spectrometry/Espectrometría de Masas
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry/Espectrometría de masas en tándem
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion/Dispersión de matriz en fase sólida
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide/N-metil, N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-(tert-butyl dimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide/ N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida
N-DBPs	Nitrogenated disinfection by-products/Productos de desinfección nitrogenados
NOM	Natural Organic Matter/Materia orgánica natural
NPD	Nitrogen Phosphorus Detector/Detector de nitrógeno y fósforo
OEHHA	Office of Environmental Health Hazard Assessment/Oficina de evaluación de riesgos a la salud
PABL	Parc Agrari del Baix Llobregat
PCA	Principal Components Analysis/Análisis de componentes principales
PCI	Positive Chemical Ionization/Ionización química positiva
PLE	Pressurized Liquid Extraction/Extracción con líquidos presurizados
PP	Priority Pollutant/Contaminante prioritario
PPCPs	Pharmaceutical and Personal Care Products/Fármacos y productos de cuidado personal
PT	Purge and trap/Purga y trampa
PTV	Programmable Temperature Vaporizer/Vaporizador de temperatura programable
Q-TOF	Quadrupole-Time-of-Flight/ Cuadrupolo-Tiempo de vuelo
RCF	Root Concentration Factor/Factor de concentración en la raíz

RSM	Response Surface Methodology/Metodología de superficie de respuesta
RT	Retention time/Tiempo de retención
SCF	Stem Concentration Factor/Factor de concentración en el tallo
SIM	Selected Ion Monitoring/Monitorización de un ión selecto
SPE	Solid Phase Extraction/Extracción en fase sólida
SPME	Solid phase microextraction/Microextracción en fase sólida
t_{1/2}	Vida media
THMs	Trihalometanos
TM	Torroella de Montgrí
TMSH	Trimethylsulfonium hydroxide/Hidróxido de trimetilsulfonio
TSCF	Transpiration Stream Concentration Factor/Factor de concentración en el xilema
TTHMs	Trihalometanos totales
UDP-	Uridina difosfato-
UDMH	Unsymmetrical dimethyl hydrazine /Dimetilhidrazina asimétrica
UNEP/PNUMA	United Nations Environment Programme/Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography/Cromatografía líquida de ultra-alta presión
USEPA	United States Environmental Protection Agency/Agencia de protección ambiental de EE.UU.
UV	Ultraviolet/ Ultravioleta
WHO/OMS	World Health Organization/Organización Mundial de la Salud
WWTP/EDAR	Waste Water Treatment Plant/Estación Depuradora de Aguas Residuales

Nota: Siglas y acrónimos derivados de una expresión castellana no se han pluralizado. No obstante, a las siglas y acrónimos procedentes del inglés se les ha añadido una “s” cuando fue necesario para mantener su formato original.

A mis padres y hermanos



Capítulo I

Introducción General

"L'eau reste la grande dénonciatrice des secrets
de la terre et la plus belle source n'est qu'une
trahison de ses entrailles."

Jean Giraudoux

"First Ceres broke with crooked plow the glebe;
first gave to earth its fruits and wholesome food;
first gave the laws;
—all things of Ceres came; of her I sing;
and oh, that I could tell her worth in verse;
in verse her worth is due."

Ovidio

I.1. Agua regenerada

El agua constituye dos terceras partes de la superficie terrestre y el 75% del cuerpo humano, y por tanto es uno de los elementos primordiales para la vida en el planeta. El agua circula a través del territorio y del cuerpo humano transportando, disolviendo, reponiendo nutrientes y materia orgánica a la vez que traslada materiales de desecho. Constituye de este modo uno de los factores limitantes al desarrollo humano.

El volumen global de agua dulce se estima alrededor de los 35 millones de km³ y representa aproximadamente el 2,5% del volumen total de agua existente en el planeta. Sin embargo, la cantidad de agua dulce necesaria para el desarrollo y mantenimiento de ecosistemas y civilización humana se cifra en 200 000 km³, menos del 1% del volumen total (UNEP, 2003) (Figura I.1.).

Por otra parte, además de la naturalmente limitada disponibilidad de este recurso, el cambio climático ejerce una presión adicional sobre éste. En los próximos 20 años se prevé un incremento en la temperatura terrestre de 0,4 °C. Esta predicción se ha realizado para varios escenarios de emisiones de gases de efecto invernadero (GHGs, *Greenhouse gases*); tomando en consideración un escenario en el que las concentraciones de todos los GHGs y aerosoles se mantuviesen constantes a los niveles del año 2000, se produciría un calentamiento global de 0,1 °C por década. Este calentamiento provocará un aumento de las sequías, e incremento en la frecuencia e intensidad de eventos de precipitación extremos. Estos eventos a su vez contribuirán al incremento del riesgo de inundaciones (IPCC, 2007). Adicionalmente, la actividad humana puede impactar de manera grave e irreversible al medio acuático, al contaminar o sustraer de forma no sostenible este recurso. Los sectores económicos de transporte, energía, agricultura, industria y servicios urbanos constituyen la mayor contribución a la contaminación de los recursos hídricos (Fuerhacker, 2009).

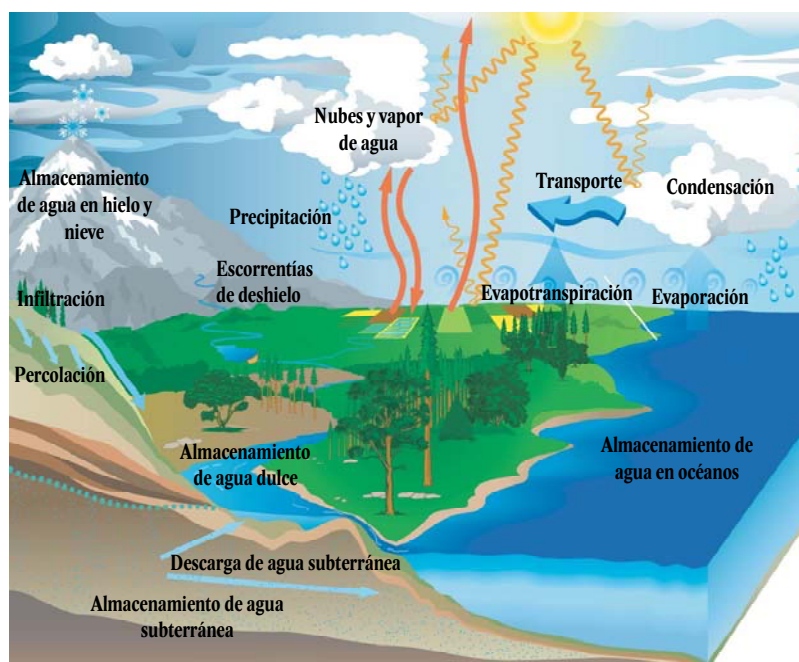


Figura I.1. Ciclo hidrológico. Adaptado de NASA, (2010).

De manera global, el 70% del agua dulce disponible es utilizada en actividades agrícolas, el 20% para propósitos industriales y el 10% para uso doméstico (Zimmerman et al., 2008). En algunos países en vías de desarrollo, el riego agrícola representa más del 80% de la extracción de agua con un volumen total de entre 20 000 – 160 000 Mm³ año⁻¹ (FAO, 2005). La carencia de agua suficiente para abastecer cualquiera de estos sectores provocaría trastornos importantes en el funcionamiento de la sociedad. Sin embargo, no satisfacer las demandas del sector agrícola tendría consecuencias graves provocando una reducción en la producción alimentaria. Un ejemplo drástico es el de la región del Cuerno de África (Yibuti, Etiopía, Kenia, Somalia y Uganda) que desde el año 2011 se enfrenta a la peor sequía en 60 años. Ello ha provocado una severa crisis en el suministro de alimentos y un incremento en la tasa de desnutrición de la población (UN, 2011).

La calidad de cualquier cuerpo de agua ya sea superficial o subterráneo se encuentra supeditada a influencias naturales y humanas. Si la calidad de las aguas únicamente dependiera de factores naturales, los factores más relevantes serían la liberación de minerales como consecuencia de la meteorización de la litosfera, procesos atmosféricos de evapotranspiración, deposición de polvo y sal, lixiviación de materia orgánica y nutrientes del suelo. Además, factores hidrológicos que ocasionan escorrentías, y procesos biológicos en el ecosistema acuático pueden alterar la composición química del agua.

Generalmente, la calidad del agua se determina mediante la comparación de las características físicas y químicas de una muestra en relación a valores guía o estándares de calidad (Tabla I.1). Estos parámetros se han establecido para asegurar el suministro de agua adecuado para el consumo humano, protegiendo de esta manera la salud de la población.

El declive en la calidad y la cantidad de agua disponible se ha convertido en un tema preocupante debido al crecimiento constante de la población, la expansión de las actividades industriales y agrícolas, y a las alteraciones del ciclo hidrológico como resultado del cambio climático. Los elementos anteriormente remarcados ilustran la creciente dificultad a la que habremos de enfrentarnos en un futuro cercano para asegurar el suministro de agua a la población.

Tabla I.1. *Algunos parámetros de calidad del agua.*

Parámetro	Fuente	Efectos en el suministro de agua
Sólidos, turbidez	Aguas residuales urbanas, escorrentías agrícolas y efluentes industriales.	Dificulta el tratamiento del agua. Reduce la efectividad del tratamiento. Protege a los microorganismos de los desinfectantes. Reduce la capacidad de la fuente de agua.
Nutrientes	Lixiviados de sistemas sépticos, descargas de aguas residuales industriales, escorrentías de carreteras, granjas animales, campos agrícolas y vertederos.	Los nitratos y nitritos pueden ser tóxicos para niños y fetos en gestación. Aceleran la eutrofización. Ocasionan coloración y turbidez. Coadyuvan en la formación de DBPs (Disinfection by-products). Ocasionan alteraciones indeseables a las propiedades organolépticas del agua.
Materia orgánica natural	Su presencia ocurre de manera natural.	Influyen en la disponibilidad de nutrientes. Movilizan compuestos orgánicos hidrofóbicos. Coadyuvan en la formación de DBPs.
Contaminantes orgánicos sintéticos	Proceden de actividades domésticas e industriales, derrames y fugas industriales, descarga de aguas residuales, escorrentías urbanas, de granjas animales y campos agrícolas.	Efectos adversos a la vida humana y acuática.
Coliformes	Proceden de aguas residuales domésticas, sistemas sépticos, escorrentías urbanas, granjas animales y campos agrícolas.	Los coliformes fecales son indicadores de contaminación fecal de mamíferos. La presencia de microorganismos patógenos como <i>Giardia</i> sp. y <i>Cryptosporidium</i> sp. amenazan la salud humana.
Metales	Procede de actividades industriales y aguas residuales, escorrentías diversas.	La presencia de metales tiene efectos adversos en la vida acuática y la salud pública.
Aceites y grasas	Escorrentías que contengan queroseno, aceites lubricantes, aguas residuales, urbanas, industriales, restos de alimentos y aceite de cocina.	Interfiere con el tratamiento biológico causando problemas de mantenimiento. Interfiere con el ecosistema acuático.
Sodio	Proviene del deshielo de caminos y almacenamiento de sal.	Ocasiona con su consumo inmoderado alta presión arterial y enfermedades cardiovasculares en humanos.
Algas	Proviene de la descarga de aguas residuales, sistemas sépticos, escorrentías de rellenos sanitarios, urbanos y agrícolas.	Impacto a las propiedades organolépticas del agua. Obstrucción de filtros. Algunas especies son tóxicas para la vida acuática.
Oxígeno disuelto	Procede de materia orgánica, descarga de aguas residuales y escorrentías varias	Problemas con el tratamiento del agua. Coadyuva al desprendimiento de hierro y manganeso. Alteración a las propiedades organolépticas del agua.

Fuente: (AWWA, 1999).

I.1.1. Reutilización de aguas regeneradas

Mientras la demanda hídrica aumenta, el rol de la regeneración y reutilización del agua (Figura I.2.) se hace indispensable en el control integral de los recursos hídricos disponibles (Jiménez y Asano, 2008). Este aspecto es especialmente significativo, considerando la importancia del mantenimiento y crecimiento del sector agrícola en el aseguramiento de la producción alimentaria (Rosegrant y Cai, 2001). En este sentido, la reutilización de aguas residuales no es una invención reciente, hay indicios de su uso para riego agrícola en la Grecia Clásica y en la civilización minoica (3000 – 1000 AC). Sin embargo, no fue sino hasta mediados del siglo pasado que las mejoras en la calidad de los efluentes produjeron un interés creciente en el uso de aguas regeneradas en la agricultura (Asano, 1998).

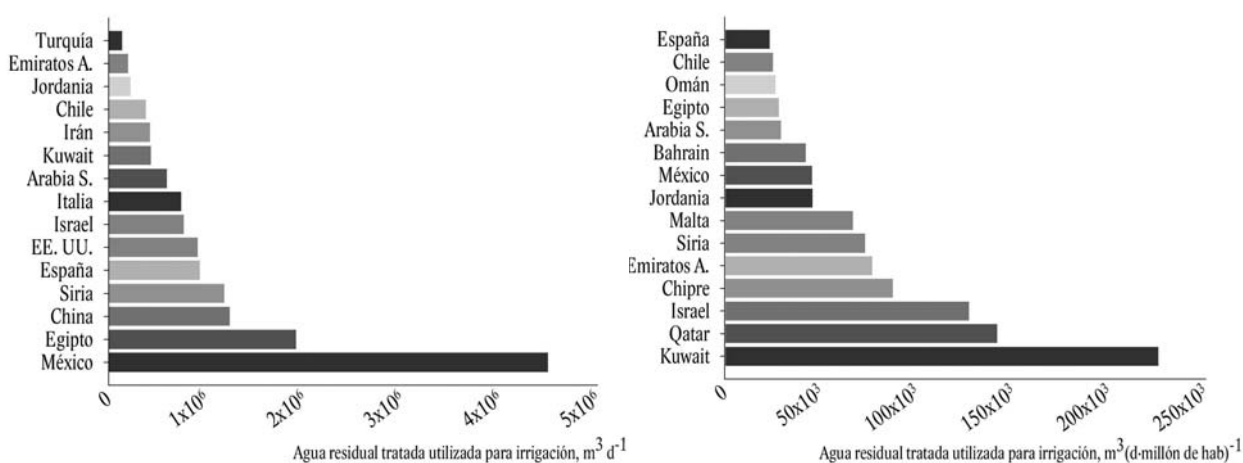


Figura I.2. Países que reportan los mayores volúmenes por habitante de aguas residuales tratadas para riego agrícola (Jiménez, 2006).

En la actualidad la utilización de agua regenerada en riego de cultivos agrícolas se aplica activamente en países como EE. UU., Israel, Australia, España y México (Jiménez y Asano, 2008). A título ilustrativo, en la Tabla I.2 se presentan las diferentes modalidades de reutilización del agua. En EE. UU., el riego agrícola es la actividad con mayor consumo de agua regenerada, especialmente el estado de California que utiliza el 46% del volumen total de agua regenerada producida para este propósito (California State Water Resources Control Board, 2002).

La reutilización del agua, en contraste con el uso de agua potable, no tiene estándares de calidad universales, debido a que la reutilización presenta diferentes aplicaciones y se ha desarrollado de manera local para tratar necesidades específicas. La reutilización del agua se practica de manera diferente en países desarrollados y en aquellos en vías de desarrollo. Para los primeros es una práctica planificada mientras que para los segundos frecuentemente no lo es (Tabla I.2). En países industrializados, la reutilización se practica mayoritariamente para preservar las fuentes de suministro de agua dulce y proteger el medio ambiente. Por otra parte, en países en vías de desarrollo de regiones áridas o semiáridas, la necesidad de un incremento del suministro de agua en agricultura, se ve resuelta por aguas residuales sin tratar. Cualquiera que sea la motivación para la reutilización del agua, está claro que ésta se incrementará globalmente en un futuro cercano

para paliar problemas de escasez y para afrontar futuros retos derivados del cambio climático y del incremento de población.

Tabla I.2. *Terminología empleada en la reutilización de aguas.*

Término	Definición
Procesamiento	Aplicación de un tratamiento tecnológico para la modificación de la calidad del agua.
Reciclaje de aguas	Recuperación de aguas residuales de un uso específico y posterior redireccionamiento a su uso original; típicamente involucra un solo uso o usuario.
Regeneración de aguas residuales	Tratamiento o procesamiento de agua residual para hacerla reutilizable.
Agua regenerada	Es el producto final de la regeneración de aguas residuales, cumple con los parámetros de calidad de materiales biodegradables, materia en suspensión y patógenos.
Agua reciclada	Agua regenerada que cumple parámetros de calidad apropiados para su utilización en una actividad específica.
Reutilización de aguas	Uso beneficioso de aguas residuales tratadas.
Reutilización directa	El uso directo de agua regenerada, cuyas aplicaciones incluyen irrigación agrícola y de paisajes, como agua de enfriamiento además de otros usos industriales, etc.
Reutilización indirecta	Mezcla, dilución y dispersión de agua residual tratada mediante su descarga en embalses, ríos, o acuíferos subterráneos antes de su reutilización.
Reutilización de agua potable	Uso de aguas regeneradas altamente tratadas para incrementar el suministro de agua de bebida.
Reutilización directa de agua potable	Incorporación de agua regenerada en el sistema de suministro de agua potable, sin renunciar al control del recurso.
Reutilización indirecta de agua potable	Incorporación de agua regenerada en el suministro de agua potable mediante la inclusión de un paso intermedio en el que se mezcla agua regenerada con agua superficial o subterránea previo a la entrada de una planta potabilizadora.
Reutilización de agua no potable	Incluye todas las aplicaciones de reutilización de aguas exceptuando el uso directo o indirecto en el suministro de agua de bebida.

Adaptado de: Levine y Asano, (2004).

Existen diferentes usos en los que se pueden utilizar aguas regeneradas. El marco jurídico sobre la reutilización de aguas regeneradas en el Estado Español reconoce los siguientes usos (Real Decreto 1620/2007):

1. Usos urbanos (riego de jardines, baldeo y descarga de aparatos sanitarios)
2. Usos agrícolas (riego)
3. Usos industriales (refrigeración, aguas de proceso y limpieza)
4. Usos recreativos (riego de campos de golf)
5. Usos ambientales (recarga de acuíferos y caudal ecológico ríos)

Este Real Decreto fija 4 criterios a cumplir para la utilización de aguas regeneradas en los usos anteriormente enumerados: 1) nematodos intestinales, 2) *Escherichia coli*, 3) sólidos en suspensión y 4) turbidez. Para cada uno de los criterios se establece un valor máximo admisible determinado por cada uso, además de la periodicidad con la que deben medirse tales parámetros en las aguas regeneradas, así como las técnicas analíticas de referencia a aplicar (Ministerio de la Presidencia, 2007). Sin embargo, en contraste con lo

que ocurre en las *Guidelines for Water Reuse* de la USEPA, el RD no incluye una diferenciación en la tecnología de tratamiento necesaria para cada uso (USEPA, 2004). Debido a que la presente Tesis se enmarca dentro del estudio de la calidad química del agua regenerada para riego agrícola, este uso será desarrollado más ampliamente en los siguientes apartados (secciones I.1.2. y I.1.3).

I.1.2. Regulación del uso de aguas regeneradas en el riego agrícola

Todos los estándares y valores guía relacionados con la reutilización de aguas están enfocados principalmente a salvaguardar la salud pública. Lo anterior es comprensible debido a que el contacto, inhalación, o ingesta de agua contaminada con organismos patógenos o sustancias tóxicas podría ocasionar efectos perjudiciales sobre la salud. En este sentido, el riesgo sanitario más común asociado a la reutilización de aguas residuales urbanas tratadas es la transmisión de enfermedades infecciosas (Lazarova y Bahri, 2005b).

El uso de agua regenerada para riego agrícola fue el primer uso de reutilización del agua reconocido y también el primero para el que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció valores guía. No obstante, aunque algunos países pioneros en la reutilización de aguas regeneradas han establecido ciertas normas nacionales para su utilización, no existe una legislación internacional que regule la calidad del agua utilizada para este fin.

Los países que aplican la reutilización de aguas en el riego agrícola se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo al tipo de estándares que aplican.

- I. Países sin valores guía ni estándares específicos para la reutilización de aguas: Afganistán, Irak, Líbano y Libia.
- II. Países que no poseen normativa específica para la reutilización de aguas, pero sí estándares exhaustivos para el manejo de aguas residuales: Argelia, Egipto y Siria.
- III. Países cuyos criterios de calidad de agua para la salud pública se basan en los estándares de la OMS (1989): Irán, Marruecos, Palestina, Túnez y Yemén.
- IV. Países que poseen regulaciones extensas similares o equivalentes a las ilustradas en el Título 22 de California sobre criterios para la reutilización de aguas o a los estándares de la USEPA: Baréin, Kuwait, Jordania, Omán, Qatar, Arabia Saudita, España y los Emiratos Árabes Unidos.

En la Tabla I.3. se ilustran estándares utilizados en la reutilización de agua en el riego agrícola para algunos países.

Tabla I.3. Criterios de calidad de aguas para su uso en riego agrícola

	California (2000)	Arizona (2000)	USEPA (2004)	OMS (1989)	OMS (2001)	Israel (1978)	Túnez (1975)	Chipre (1997)	Chile (1984)	Francia (2001)	España (2007)
Tipo de tratamiento	Ley	Ley	Valores guía	Valores guía	Valores guía propuestos	Ley	Ley	Estándares provisionales	Valores guía	Valores guía propuestos	Ley
Tratamiento mínimo requerido	Terciario + desinfección	Terciario + desinfección	Terciario + desinfección	Lagunas de estabilización	Secundario + laguna de estabilización + desinfección	Secundario	Lagunas de estabilización	Terciario	NR	NR	NR
DBO ₅ total (mg L ⁻¹)	NR	NR	10	NR	NR	15	30	10	NR	NR	NR
SS (mg L ⁻¹)	NR	NR	5	NR	NR	15	30	10	NR	35	20–35
Coliformes totales (UFC/100 mL)	2.2	NR	0	NR	NR	2.2	NR	NR	NR	NR	NR
Coliformes fecales (UFC/100 mL)	NR	No detectable	No detectable	1000	1000	NR	NR	50	1000	1000	NR
Helmintos (huevos/100 mL)	NR	NR	NR	1	0.1	NR	<1	0	NR	1	1
<i>Escherichia coli</i> (UFC/100 mL)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1000	100–1x10 ⁴

Adaptado de: Lazareva y Bahri, (2005), Jiménez y Asano, (2008) y Reemtsma y Jekel, (2006).

DBO₅: Demanda biológica a los 5 días

SS: Sólidos en suspensión

UFC: Unidades formadoras de colonias

NR: No regulado

I.1.3. Requerimientos en la calidad del agua para su uso agrícola

La reutilización sostenible de agua se encuentra íntimamente ligada a la calidad del efluente utilizado y a los riesgos ambientales asociados a su aplicación. La agricultura puede considerarse como un sistema de tratamiento del suelo en el que se reciclan los nutrientes presentes en él. El suelo posee la capacidad de atenuar contaminantes, no obstante, el agua regenerada debe cumplir los requerimientos de calidad antes de poder ser utilizada en la agricultura. Los criterios de calidad más relevantes agua regenerada son aquellos relacionados con la seguridad sanitaria y aquellos relativos a cuestiones agronómicas.

Parámetros de importancia sanitaria

El riesgo biológico relacionado con la reutilización del agua se ha reconocido desde el inicio de la irrigación con aguas residuales. Este riesgo tiene un resultado relativamente inmediato, es decir, el desarrollo de la enfermedad ocurre en un periodo corto de tiempo. En cambio, el riesgo químico a menudo se traduce en problemas de salud a mediano y largo plazo (p. ej., efectos crónicos como el cáncer). Los criterios a considerar en la evaluación del riesgo químico, fueron concebidos en gran medida gracias al gran desarrollo y mejora de la instrumentación y metodologías analíticas logrados durante los últimos años (Lazarova y Bahri, 2005).

Patógenos. Los tres tipos de organismos que despiertan la mayor preocupación en la irrigación agrícola y por tanto, a los que se le presta mayor atención son parásitos, bacterias y virus entéricos. Como regla, las normativas correspondientes a la reutilización de aguas establecen valores límite para la presencia de bacterias utilizando organismos indicadores como coliformes totales y fecales, además de *Escherichia coli*. Los valores guía establecidos por la OMS incluyen también huevos de helminto. El contenido de virus, no obstante, únicamente es considerado por algunos organismos reguladores (Jiménez y Asano, 2008).

Químicos. Las aguas residuales municipales que no están significativamente impactadas por efluentes industriales, generalmente, contienen concentraciones de compuestos orgánicos e inorgánicos que no representan un peligro para la salud humana cuando el agua regenerada se utiliza en la irrigación agrícola. La mayoría de los criterios de calidad del agua establecen niveles numéricos para microcontaminantes inorgánicos potencialmente tóxicos como Cu, Cr, Cd, Ni, Pb, Hg y Zn (Lazarova y Bahri, 2005a). No obstante, no existe ninguna ley que regule la presencia de microcontaminantes orgánicos específicos (p. ej., fármacos, fragancias, etc.) en aguas regeneradas, este tema se desarrolla en mayor profundidad en las secciones I.2.2.2 y I.2.2.3.

Parámetros de importancia agronómica

Las propiedades relevantes del agua se basan en la productividad y calidad de los cultivos, conservación y productividad del suelo, además de la protección del medio ambiente. La calidad del agua de riego es de especial importancia en zonas áridas donde temperaturas extremas y humedades relativas bajas resultan en altas tasas de evaporación con la consiguiente acumulación de sales en el suelo (Jiménez y Asano, 2008).

Salinidad. La salinidad es uno de los factores más importantes a tener en cuenta en la agricultura. Las sales disueltas disminuyen la presión osmótica del agua en el suelo y, como consecuencia, producen un incremento en la energía que las plantas deben aplicar para incorporar agua del suelo. Como resultado, la respiración se incrementa y el crecimiento y rendimiento de la mayoría de las plantas declina progresivamente con el aumento de presión osmótica. El agua regenerada, generalmente, presenta una salinidad entre baja y media con una conductividad eléctrica (EC_w) de entre 0,6 y 1,7 dS m⁻¹. En este sentido, el Real Decreto 1620/2007 establece valores límite de 3 dS m⁻¹.

Iones fitotóxicos. Los iones fitotóxicos que pueden estar presentes en los efluentes municipales a concentraciones lo suficientemente altas para causar toxicidad son el B, Cl y Na. Éstos pueden causar daño individualmente o en su combinación.

Elementos traza. Estos normalmente no se incluyen en ensayos rutinarios de aguas de riego, pero se debe prestar atención a este parámetro si al utilizar efluentes de origen urbano se sospecha de un impacto significativo por parte de efluentes industriales. Entre los elementos más relevantes destacan Al, Be, Co, F, Fe, Li, Mn, Mo, Se, Sn, Ti, W y V. Otro grupo de elementos traza, como As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Hg y Zn, se caracteriza por ocasionar daños a la salud si se han incorporado en los cultivos. Se han establecido niveles umbral de este último grupo de elementos debido a la posibilidad de una acumulación a largo plazo en el suelo, lo que le podría ocasionar daños irreversibles.

Nutrientes. Los nutrientes más importantes para los cultivos son N, P, K, Cu, Mn, Zn, B, y S. Usualmente, el agua regenerada contiene la cantidad suficiente de estos nutrientes como para cubrir una parte importante de las necesidades del cultivo. Se ha reportado que la aplicación de aguas regeneradas provenientes del uso urbano (100 mm ha⁻¹) aporta entre 16 – 62 kg de nitrógeno total, 4 – 24 kg de fósforo, 2 – 69 kg de potasio, 18 – 208 kg de calcio y 9 -110 kg magnesio.

pH. El rango de pH para las aguas de riego se encuentra entre 6,5 y 8,4, valores fuera de estos límites indican una anomalía en la calidad del agua. En este caso el agua de riego puede provocar un desequilibrio nutricional en la planta afectando su crecimiento y salud.

Bicarbonatos y carbonatos. Niveles elevados de bicarbonato (>180 – 240 mg L⁻¹) pueden incrementar el pH del suelo y, en combinación con carbonato, pueden afectar la permeabilidad del mismo. La presencia de carbonatos en concentraciones superiores a 500 mg L⁻¹ podría además ocasionar daños severos a la planta.

La eficiencia de irrigación es de gran relevancia sobre todo en áreas donde los recursos hídricos son escasos o con tasas altas de evapotranspiración. Idealmente las aguas regeneradas deberían aplicarse cerca de la zona de la raíz utilizando micro-aspersores o emisores de goteo. Estas técnicas de irrigación tienen la ventaja adicional de impedir el contacto foliar, permitiendo un mejor ajuste a los requerimientos hídricos del cultivo (Jiménez y Asano, 2008).

La elección adecuada del método de irrigación a emplear podría ser un factor que coadyuve a la protección de la salud. Existen diferencias significativas, en términos de riesgo sanitario, entre los distintos métodos de irrigación, estas diferencias intrínsecas al método de irrigación se enumeran a continuación (Jimenez y Asano, 2008; Lazarova y Bahri, 2005b):

- I. Nivel bajo de protección sanitaria: asociado a riego por inundación y aspersion.
- II. Nivel medio de protección sanitaria: asociado a riego por surcos.
- III. Nivel alto de protección sanitaria: asociado a riego por goteo y subterráneo.

I.2. Presencia de microcontaminantes orgánicos en el medio acuático

El agua, como componente esencial para la vida, es constantemente usada y reutilizada. Tal ciclo expone a este recurso a un gran número de contaminantes químicos tanto de origen natural como antropogénico (p. ej., pesticidas, fertilizantes, herbicidas, desechos radioactivos, fármacos y productos de cuidado personal, entre otros). Estos compuestos orgánicos de origen antropogénico, son incorporados en el ciclo hídrico mediante varias rutas que incluyen escorrentías agrícolas, explotaciones ganaderas, lixiviados de vertederos y efluentes de EDAR. Estos compuestos son denominados microcontaminantes orgánicos ya que su concentración en el medio acuático suele encontrarse en niveles traza (ng L^{-1} - $\mu\text{g L}^{-1}$). La frecuencia en la presencia y concentración de estos contaminantes difiere enormemente entre sistemas acuáticos.

Los microcontaminantes orgánicos pueden migrar entre diferentes compartimientos, y acumularse sin sufrir transformaciones significativas, al menos temporalmente. Los procesos que afectan al destino final de los microcontaminantes orgánicos en el medio acuático pueden clasificarse en bióticos y abióticos dependiendo de si existe acción o no de seres vivos. Entre los procesos bióticos destacan la bioconcentración, biomagnificación y biodegradación (Onesios et al., 2009). Entre los abióticos, se pueden enumerar la sorción en material particulado y sedimentos, sedimentación de partículas en suspensión, fotólisis e hidrólisis (Boreen et al., 2003; Quintana et al., 2005). Tanto los procesos químicos como los biológicos transforman o mineralizan estos compuestos en diferentes etapas y escalas temporales (Figura I.3.).

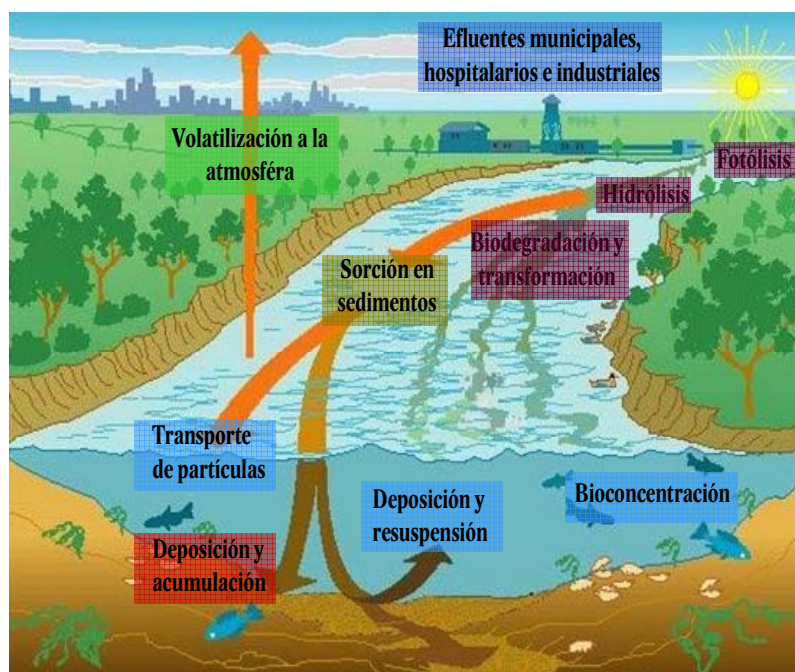


Figura I.3. *Procesos que afectan al destino final de los microcontaminantes orgánicos en el medio acuático (Barber et al., 1995).*

Existe gran cantidad de información con respecto a la eliminación de PPCPs en EDAR (Hirsch et al., 1999; Lishman et al., 2006; Miège et al., 2009). En estos estudios es aparente que la eliminación promedio de

fármacos y productos de cuidado personal (PPCPs, *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) es muy variable, desde compuestos recalcitrantes, como es el caso de la carbamazepina o el ácido clofibrico hasta compuestos con elevadas eficiencias de eliminación como la cafeína. Tales diferencias en las eficiencias de eliminación no son sorprendentes si se considera que estos compuestos son muy heterogéneos en términos estructurales, reactividad y propiedades químicas. Además la eliminación de un compuesto cualquiera depende de factores ambientales (p. ej., temperatura, pH, exposición solar), contenido de materia orgánica, así como del tipo y abundancia de la flora microbiana involucrada (Jjemba, 2008).

Para la realización de la presente Tesis se han seleccionado una gran variedad de microcontaminantes orgánicos pertenecientes a diferentes clases químicas. Se han considerado los denominados contaminantes emergentes que engloban a PPCPs y subproductos de desinfección del agua (DBPs, *Disinfection by-products*), así como algunos compuestos considerados como prioritarios bajo la Directiva Marco del Agua (DMA) (Tablas I.4a y b).

Tabla I.4a. *Algunas propiedades fisicoquímicas relevantes y utilidad comercial de los microcontaminantes orgánicos específicos de interés estudiados en la presente Tesis.*

	pKa	Log K _{ow} ^a	Constante Ley de Henry ^a	Log D _{ow} ^b	Uso
Fármacos					
Diclofenaco	4,15	4,02	1,94 x 10 ⁻¹⁰	1,17	AINE
Carbamazepina	13,9	2,25	4,42 x 10 ⁻⁹	2,25	Antiepiléptico psicotrópico
Ácido clofibrico	2,84	2,84	8,96 x 10 ⁻⁷	-1,32	Control de lípidos en sangre
Cafeína	-	0,16	1,46 x 10 ⁻⁹	0,16	Estimulante
Ibuprofeno	4,31	3,79	6,2 x 10 ⁻⁶	1,10	AINE
Flunixinina	5,82	4,90	1,09 x 10 ⁻¹¹	3,69	AINE
Ketoprofeno	5,94	3,00	8,65 x 10 ⁻¹⁰	1,90	AINE
Acetaminofeno	8,51	0,27	2,63 x 10 ⁻¹¹	0,26	Analgésico
Naproxeno	4,2	3,10	1,39 x 10 ⁻⁸	0,30	AINE
Triclosan	7,9	4,66	2,04 x 10 ⁻⁷	4,61	Agente antifúngico y antibactericida
Productos de cuidado personal					
Ambrettolida	NA	5,37	1,11 x 10 ⁻¹	NA	Fragancia
Metil dihidro jasmonato	NA	2,98	2,05 x 10 ⁻⁵	NA	Fragancia
Galaxolida	NA	6,26	5,40 x 10 ⁻³	NA	Fragancia
Tonalida	NA	5,80	1,73 x 10 ⁻³	NA	Fragancia
Cashmeran	NA	4,49	5,81 x 10 ⁻³	NA	Fragancia
Ácido hidrocínámico	4,37	2,29	2,40 x 10 ⁻⁶	-0,34	Materia prima en perfumería e industria alimentaria
Fenoles Estrogénicos					
Tert-octilfenol	-	5,28	1,84 x 10 ⁻⁴	NA	Elaboración de productos de limpieza

	pKa	Log K _{ow} ^a	Constante Ley de Henry ^a	Log D _{ow} ^b	Uso
Bisfenol A ^o	8,73	3,64	3,74 x 10 ⁻¹⁰	3,63	Materia prima en la fabricación de policarbonato y resina epoxi
Nonilfenol*	10,28	5,99	2,44 x 10 ⁻⁴	5,99	Tensioactivos industriales
Antioxidantes					
BHT	12,75	5,03	1,69 x 10 ⁻⁴	5,03	Antioxidante en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica
BHA	NR	3,50	3,50 x 10 ⁻⁶	NA	Antioxidante y preservante alimentario y en la industria farmacéutica
Agentes ignífugos					
Tributilfosfato	NA	3,82	1,31 x 10 ⁻⁴	NA	Agente plastificante
Tris cloroetil fosfato	NA	1,63	1,04 x 10 ⁻⁶	NA	Agente ignífugo en plásticos
Pesticidas					
Dimetoato	NA	0,28	8,63 x 10 ⁻¹⁰	NA	Insecticida
Clorpirifós*	NA	4,66	1,03 x 10 ⁻⁴	NA	Insecticida
Atrazina*	1,68	2,82	1,83 x 10 ⁻⁷	2,82	Herbicida
Alacloro*	0,62	3,37	8,13 x 10 ⁻⁷	3,37	Herbicida
Simazina*	1,62	2,40	1,38 x 10 ⁻⁷	2,40	Herbicida
Diclobenil	NA	2,83	1,17 x 10 ⁻³	NA	Herbicida
Linuron	NA	2,91	4,72 x 10 ⁻⁷	NA	Herbicida
Lindano*	NA	4,26	1,05 x 10 ⁻²	NA	Insecticida
Deltametrina	NA	6,18	2,48 x 10 ⁻⁶	NA	Insecticida
Clorotalonil	NA	3,66	6,20 x 10 ⁻⁶	NA	Fungicida
Cipermetrina	NA	6,38	3,23 x 10 ⁻⁵	NA	Insecticida
Diuron	NA	2,67	2,18 x 10 ⁻⁸	NA	Herbicida
MCPA	3,73	2,52	5,61 x 10 ⁻⁷	-0,75	Herbicida
Diazinon	2,60	3,86	3,57 x 10 ⁻⁶	3,86	Insecticida
Mecoprop ^o	3,11	2,94	7,45 x 10 ⁻⁷	-0,95	Herbicida

^a EPI-Suite software Versión 4.1.

^b Calculado a partir de la ecuaciones siguientes:

Ácidos: $D_{ow} = K_{ow}(1 + 10^{pH - pK_{a1}})^{-1}$ a pH=8. (Stevens-Garmon et al., 2011)

Bases: $D_{ow} = K_{ow}(1 + 10^{pK_{a} - pH})^{-1}$ a pH=8. (Stevens-Garmon et al., 2011)

* Sustancias peligrosas prioritarias.

^o Sustancias sujetas a revisión para ser incorporadas a la lista de sustancias peligrosas prioritarias.

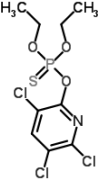
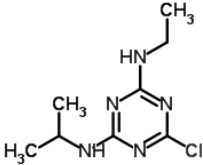
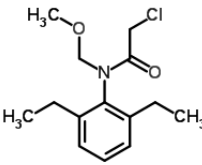
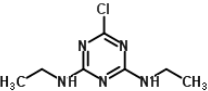
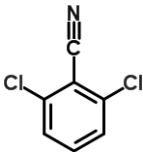
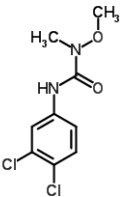
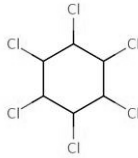
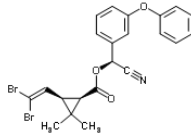
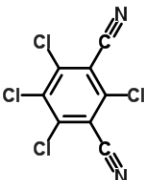
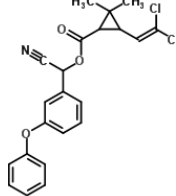
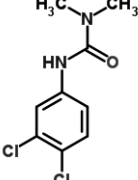
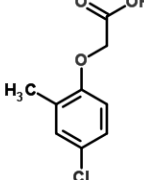
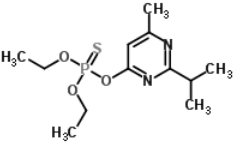
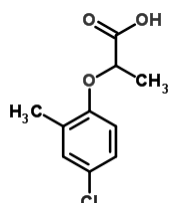
AINE: Antiinflamatorio no esteroideo.

NR: No reportado.

NA: No aplicable.

Tabla I.4b. Estructuras químicas de los microcontaminantes orgánicos específicos de interés estudiados en la presente Tesis.

1		2		3		4	
5		6		7		8	
9		10		11		12	
13		14		15		16	
17		18		19		20	
21		22		23		24	

<p>25</p> 	<p>26</p> 	<p>27</p> 	<p>28</p> 
<p>29</p> 	<p>30</p> 	<p>31</p> 	<p>32</p> 
<p>33</p> 	<p>34</p> 	<p>35</p> 	<p>36</p> 
<p>37</p> 	<p>38</p> 		

¹Diclofenaco, ²Carbamazepina, ³Ácido clofibrico, ⁴Cafeína, ⁵Ibuprofeno, ⁶Flunixina, ⁷Ketoprofeno, ⁸Acetaminofeno, ⁹Naproxeno, ¹⁰Triclosan, ¹¹Ambrettolida, ¹²Metil dihidro jasmonato, ¹³Galaxolida, ¹⁴Tonalida, ¹⁵Cashmeran, ¹⁶Ácido hidrocínámico, ¹⁷Bisfenol A, ¹⁸Tert-octilfenol, ¹⁹Nonilfenol, ²⁰BHT, ²¹BHA, ²²Tributilfosfato, ²³Tris cloroetil fosfato, ²⁴Dimetoato, ²⁵Clorpirifós, ²⁶Atrazina, ²⁷Alacloro, ²⁸Simazina, ²⁹Diclobenil, ³⁰Linuron, ³¹Lindano, ³²Deltametrina, ³³Clorotolonil, ³⁴Cipermetrina, ³⁵Diuron, ³⁶MCPA, ³⁷Diazinon, ³⁸Mecoprop.

I.2.1. Parámetros fisicoquímicos relevantes de microcontaminantes orgánicos

Las características físicas y químicas de un compuesto determinan fundamentalmente su destino ambiental (Tabla I.4^a). Para entender los procesos que dirigen el comportamiento de los microcontaminantes orgánicos en el medio se incluyen los siguientes descriptores fisicoquímicos:

Degradación, vida media ($t_{1/2}$)

La vida media de un compuesto, $t_{1/2}$, es el tiempo requerido para que la mitad de éste pierda su identidad química, ya sea por descomposición, alteración metabólica u otros factores.

Coefficiente de partición octanol-agua, K_{ow}

Este coeficiente es una medida de la hidrofobicidad e hidrofiliidad de un compuesto. Representa la razón de concentraciones de un compuesto entre dos disolventes parcialmente inmiscibles: octanol y agua, en equilibrio a una temperatura específica.

$$K_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{agua}} \quad \text{Adimensional}$$

Valores elevados de K_{ow} son indicativos de una alta hidrofobicidad del compuesto en cuestión, que aumenta al incrementarse el valor de este parámetro. Debido a la alta magnitud que puede alcanzar este parámetro en compuestos orgánicos, éste generalmente se expresa como $\log K_{ow}$. Los valores de $\log K_{ow}$ son generalmente inversamente proporcionales a la solubilidad en agua y directamente proporcionales a la masa molecular de la sustancia.

Constante de Henry, k_H

Esta constante define la distribución de un compuesto entre una solución acuosa y la fase vapor en equilibrio. La partición de un compuesto entre la disolución del suelo y los espacios intersticiales de aire en el suelo se suele estimar mediante la Ley de Henry y el grado de esta partición mediante la constante de Henry (k_H). Dicha constante se expresa generalmente de dos formas:

$$k_H' = \frac{\text{Concentración en la fase gaseosa}}{\text{Concentración en la fase líquida}} \quad \text{Adimensional}$$

$$k_H = \frac{\text{Presión de vapor en el líquido}}{\text{Solubilidad del compuesto}} \quad \text{Pa m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ o atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$$

De igual manera esta constante puede estimarse, indicando la posibilidad de volatilización de un compuesto en función de su presión de vapor, masa molecular y solubilidad.

$$k_H' = \frac{16,04 \text{ (Presión de Vapor) (Masa Molecular)}}{\text{(Temperatura) (Solubilidad)}} \quad \text{Adimensional}$$

Cuanto mayor sea el valor para esta constante, mayor será su potencial de volatilización. La volatilidad de un contaminante, expresada por K_H , es una medida de la tendencia de partición relativa entre agua y aire.

Coefficiente de partición suelo-agua, K_d

El K_d es la constante de distribución de una sustancia orgánica entre el suelo y el agua en equilibrio a una temperatura determinada.

$$K_d = \frac{\text{Concentración adsorbida en el suelo}}{\text{Concentración disuelta en el agua}} \quad \text{L kg}^{-1}$$

Coefficiente de partición carbono orgánico del suelo-agua, K_{oc}

El K_{oc} es una medida de la tendencia de un compuesto o material a adsorberse a las partículas del suelo corregida por la fracción de materia orgánica presente en el suelo

$$K_{oc} = \frac{K_d \times 100}{\% \text{ carbono orgánico en el suelo}} \quad \text{L kg}^{-1}$$

I.2.2. Productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) y contaminantes prioritarios

I.2.2.1. PPCP: Descripción

En los últimos años la comunidad científica ha mostrado un gran interés por los denominados microcontaminantes emergentes. Este grupo de compuestos generalmente se define como contaminantes orgánicos traza no regulados, recientemente introducidos al medio y/o recientemente detectados gracias al avance de la instrumentación analítica (Richardson, 2007). Los PPCPs, dentro de los microcontaminantes emergentes, son un grupo de contaminantes muy diverso, en el caso de los productos de higiene personal se aplican mayoritariamente de forma externa, mientras que los fármacos se aplican por las vías tópica, oral y/o parenteral. Muchos fármacos se excretan principalmente metabolizados o incluso en su forma parental a través de las heces u orina (Daughton y Ternes, 1999). Por tanto, estos compuestos forman parte de las aguas residuales domésticas. Los PPCPs más frecuentemente detectados en aguas superficiales incluyen una gran variedad de analgésicos, anticonvulsivos, antimicrobianos, reguladores lipídicos, almizcles policíclicos, anti-inflamatorios no esteroideos, hormonas sintéticas, entre otros (Kolpin et al., 2002b). Los PPCPs se producen en cantidades muy cercanas a la de los agroquímicos. Se ha reportado una producción de entre 1000 y 5000 toneladas anuales para la tonalida y galaxolida, respectivamente, por lo que se les considera como los almizcles sintéticos más importantes (Heberer, 2003). La Tabla I.4 recopila algunas propiedades fisicoquímicas de interés y uso comercial de los analitos diana estudiados en esta Tesis.

Los PPCPs se consideran contaminantes “nuevos” o “emergentes”, sin embargo es bien sabido que su uso ha sido amplio durante varias décadas. Ahora bien, es justo decir que la atención que se le ha dado a la presencia de estos compuestos en el medio ambiente es reciente. El interés en este grupo de contaminantes

radica directa o indirectamente en las grandes cantidades en las que estos se producen, su uso extendido y diversidad química.

Durante la última década, se ha documentado ampliamente la presencia de fármacos en el medio ambiente, presencia que ha captado la atención tanto de la comunidad científica como de la población en general. Se ha reportado la presencia de fármacos en todos los compartimientos del ecosistema acuático (Daughton y Ternes, 1999; Heberer, 2002). Aunque estos microcontaminantes orgánicos aparecen a niveles traza (bajos ng L^{-1}), existe una preocupación creciente debido a que estos compuestos han sido diseñados para ser biológicamente activos, pudiendo dañar o influenciar a los organismos acuáticos (sección 1.2.2.5.).

Hasta la fecha, se ha reportado la presencia de más de 100 fármacos en aguas de drenaje, aguas superficiales y potables, residuos ganaderos, sedimentos, biosólidos y suelos en concentraciones que van desde bajos ng L^{-1} hasta $\mu\text{g L}^{-1}$ (Deblonde et al., 2011; Halling-Sorensen et al., 1998). En diferentes estudios realizados en Alemania se han reportado al menos 34 compuestos en aguas subterráneas o efluentes de EDARs (Daughton y Ternes, 1999; Heberer, 2002) y al menos 16 fármacos en su forma parental o de metabolitos en agua potable a niveles de ng L^{-1} (Heberer y Adam, 2005).

I.2.2.2. PPCPs: Origen y destino final en el medio

La fuente más significativa de residuos farmacéuticos en el medio ambiente es la medicación de humanos y ganado (Boxall et al., 2004; Kwon, 2011). Los fármacos no se metabolizan completamente en el organismo y, a menudo, son excretados en su forma parental o con transformaciones menores y frecuentemente conjugados con moléculas polares como el ácido glucurónico. Los conjugados excretados pueden descomponerse fácilmente mediante la acción de bacterias presentes en las heces fecales o en las EDAR, de esta manera la forma parental del fármaco es liberada al medio ambiente. La Figura I.4. ilustra las posibles fuentes y rutas que explican la presencia de fármacos en el medio ambiente.

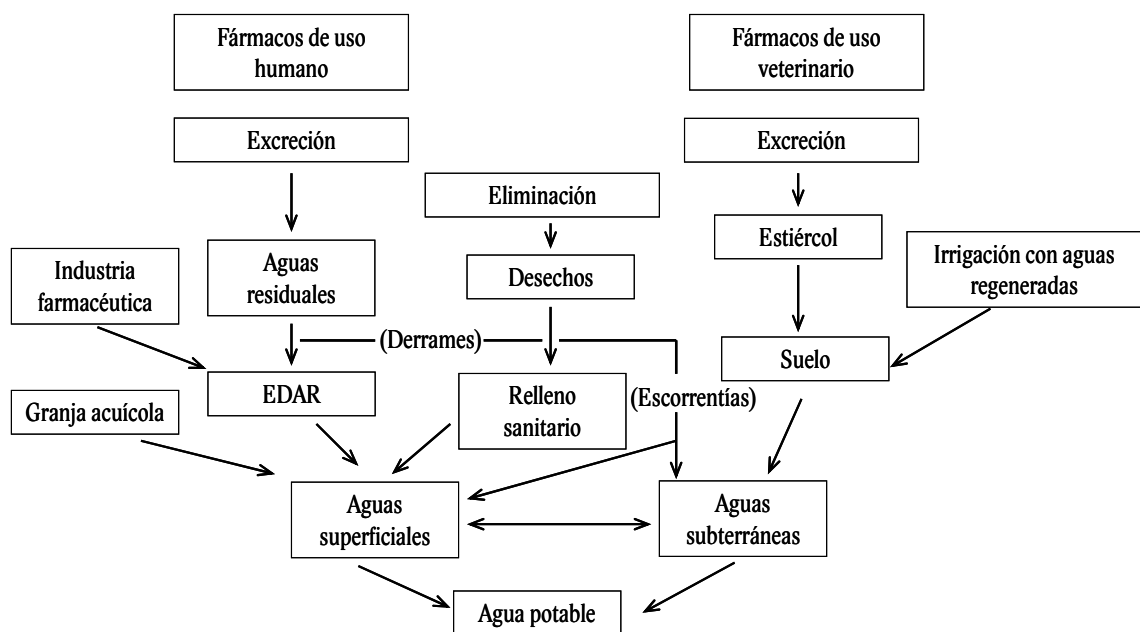


Figura I.4. Vías de contaminación ambiental por fármacos. Adaptado de Ternes, (1998).

Aguas regeneradas

Para mejorar la calidad de los efluentes que se descargan al medio, se han desarrollado diferentes tecnologías de tratamiento de las aguas residuales. Configuraciones que van desde sistemas descentralizados como el tratamiento de aguas residuales domésticas producidas en pequeños núcleos de población (p. ej., humedales construidos y biofiltros) hasta tratamiento de efluentes de grandes núcleos poblacionales que implican el uso de tecnologías más energéticamente dependientes (p. ej., lodos activados). En ambos casos el objetivo final es alcanzar los valores de calidad descritos para los parámetros legislados, éstos se enumeran en la Tabla I.3.

La mayoría de las EDAR todavía son alimentadas mediante colectores mixtos, sin separación entre aguas residuales urbanas y pluviales. De esta manera durante la época de lluvias, los caudales de agua que

deben tratarse pueden exceder la capacidad de la planta, lo que ocasionaría una descarga de efluentes sin tratar al medio acuático.

A principios de los años 60 se había barajado ya la posible presencia de fármacos y particularmente de hormonas estrogénicas en aguas residuales (Stumm-Zollinger y Fair, 1965). Sin embargo, en esa época no se contaba con herramientas analíticas que posibilitaran la detección de estos compuestos. En la actualidad se han reportado una gran variedad de PPCP en aguas regeneradas. En la Tabla I.5. se presentan los grupos y concentraciones promedio de los contaminantes que se han considerado en la presente Tesis.

Tabla I.5. *Niveles medios de PPCPs y compuestos relacionados en diferentes compartimientos acuáticos.*

Clase de contaminante	Agua potable, ng L ⁻¹ , (min-max)media	Aguas superficiales, ng L ⁻¹ , (min-max)media	Aguas regeneradas, ng L ⁻¹ , (min-max)media	Referencias
Fármacos	(5 – 258)130	(0.001-2.28)0.43	(0.01-11.73)1.9	[1-6]
Productos de cuidado personal	NR	(20-420)120	(160-1400)320	[2,6,7,8]
Fenoles estrogénicos	(1- 8)4	81	(50-120)70	[4, 6, 11]
Agente ignífugo	NR	(37-368) 90	(70-390)250	[6, 9]
Antioxidantes	NR	(306-620)460	(270-610)440	[2, 6]
Pesticidas	NR	(8-1877) 942	(90-190)140	[4, 5, 6, 10]

¹(Bartelt-Hunt et al., 2009); ²(Bendz et al., 2005); ³(Kasprzyk-Hordern et al., 2009); ⁴(Loos et al., 2010); ⁵(Nikolaou et al., 2007); ⁶(Calderón-Preciado et al., 2011); ⁷(Matamoros et al., 2009); ⁸(Muñoz et al., 2009); ⁹(Martínez-Carballo et al., 2007); ¹⁰(Kuster et al., 2008); ¹¹(Collier, 2007).
NR: No reportado.

Algunos PPCPs pueden considerarse como ubicuos, debido a su elevada frecuencia de detección en el medio acuático. Éste es el caso de las fragancias galaxolida y tonalida, que se han detectado en concentraciones de hasta 4200 y 1900 ng L⁻¹, respectivamente en aguas regeneradas de Alemania (Gatermann et al., 1999).

En un estudio realizado por Glassmeyer et al., (2005) en EE.UU. se consideraron 10 EDAR ubicadas en regiones geográficas distantes entre sí. En éste se describe un escenario típico en el que se documenta un incremento notable de la presencia, variedad y concentración de contaminantes antropogénicos (PPCPs y pesticidas) en el río al verterse en su cauce el efluente de una EDAR. Asimismo, el número total y la concentración de estos compuestos, así como indicadores de actividad antropogénica relacionados (p. ej., cafeína, colesterol), disminuyen al alejarse del punto de introducción del efluente, posiblemente debido a un efecto de dilución, degradación y/o sorción.

Aguas superficiales

Las aguas superficiales de ríos, arroyos y lagos abastecen de agua potable a muchos núcleos poblacionales. La mayoría de estas aguas se originan directamente de la lluvia, sin embargo, también contribuyen significativamente a éstas las escorrentías, aguas residuales y/o regeneradas. Las aguas superficiales son muy proclives a una contaminación derivada de actividades naturales y humanas en su

cuenca, como puede ser el caso de la introducción de aguas residuales crudas en el cauce de un río, ó la descarga de efluentes producidos en granjas acuícolas o en actividades agrícolas. Así, la calidad de estas aguas dependerá en gran medida de las actividades que realicen los usuarios aguas arriba y del uso que se les dé en su cuenca hidrográfica. Diferentes autores han observado la presencia de fragancias galaxolida y tonalida entre 5 y 200 ng L⁻¹ en ríos de Suiza y Rumania, o hasta 10 000 ng L⁻¹ en aguas superficiales cercanas a Berlín (Bhandari et al., 2009).

Un estudio exhaustivo realizado por Kolpin et al. (2004), en diversos ríos de EE.UU., mostró un incremento en la presencia y concentración de fármacos en condiciones de caudal bajo. Esta observación sugiere una correlación entre la calidad del agua y las variaciones estacionales, ya que el caudal de los ríos a menudo varía dependiendo de la estación.

Sedimentos

Existe poca información acerca de la presencia de fármacos en el compartimiento agua/sedimento. Sin embargo, Löffler y colaboradores (2005) evaluaron la dinámica de 10 fármacos y metabolitos específicos (carbamazepina, 10-11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina, ácido clofibrico, ¹⁴C-diazepam, oxazepam, ¹⁴C-ibuprofeno, 2-hidroxi-ibuprofeno, ¹⁴C-iopromida, ivermectina y ¹⁴C-paracetamol) en una cámara bentónica a escala laboratorio. Los procesos bióticos de degradación tuvieron un impacto significativo solamente para el paracetamol, ibuprofeno y su respectivo metabolito. Asimismo, los procesos de sorción en el sedimento resultaron significativos para aquellos contaminantes moderadamente lipofílicos (valores de log D_{ow} elevados) como la carbamazepina y su respectivo metabolito, el diazepam y en menor grado el oxazepam; para el resto de los analitos (más hidrofílicos) la sorción en sedimento mostró una relevancia limitada (Löffler et al., 2005).

En los últimos años la industria acuícola se ha mostrado como una fuente muy importante de contaminación al sedimento acuático. El 70% de los agentes terapéuticos utilizados en acuicultura se liberan al medio acuático. De estos, una fracción se adsorbe a las partículas en suspensión acumulándose en los sedimentos, donde permanecen estables (Zezhi, 2001). Los PPCPs más hidrofóbicos pueden adsorberse a los sedimentos o removilizarse si existe una perturbación física. Frecuentemente, los compuestos con tal característica tienden a concentrarse en el sedimento, reduciendo de esta manera su concentración en la columna de agua, y con ello el riesgo derivado de la exposición en organismos pelágicos. No obstante, este riesgo se incrementa para los organismos bentónicos que habitan o tienen mayor contacto con el sedimento (Kümmerer, 2004).

Aguas subterráneas

Las aguas subterráneas son una fuente de recursos hídricos de vital importancia. En el caso de Dinamarca esta fuente satisface el 98% de sus necesidades de agua potable (McKay, 1998) y cubre casi la mitad de las necesidades hídricas de EE.UU. (AWWA, 1995). Por esta razón, la presencia y transporte de cualquier contaminante en este compartimiento puede suponer un riesgo a la salud pública. Sobre todo porque en muchos casos, las aguas subterráneas no están sujetas a ningún tratamiento antes de su distribución como agua potable. La calidad de las aguas subterráneas se ve afectada principalmente por la recarga de acuíferos

con aguas de calidad inferior, fugas de sistemas de drenaje y lixiviados de vertederos en los que además de otros contaminantes, comúnmente se encuentran una gran variedad de PPCPs. Otras fuentes de contaminación por PPCPs en el agua subterránea pueden proceder de escorrentías de granjas ganaderas y/o agrícolas, y fugas en fosas sépticas.

Un ejemplo de lo anterior es el un estudio realizado por Bartelt-Hunt (2011) en donde se investigó la presencia de 17 fármacos de uso veterinario y 13 hormonas esteroideas y sus metabolitos en lagunas y agua subterránea cercanas a explotaciones ganaderas. Se detectaron 9 antibióticos en el agua subterránea: sulfamerazina, sulfametazina, sulfametazol, sulfatiazol, eritromicina, lincomicina, monesina, ractopamina y tiamulina en concentraciones de entre 25 hasta 2380 ng L⁻¹. Se detectaron también dos hormonas: testosterona y estrona en concentraciones de entre 30 y 40 - 390 ng L⁻¹, respectivamente.

Agua potable

La presencia de PPCPs y contaminantes relacionados en el agua potable ha despertado, como es natural, un gran interés (Collier, 2007; Loraine y Pettigrove, 2005). En la tabla I.5 podemos observar que, comparados con otros compartimientos acuáticos, la presencia y los niveles de PPCPs hallados en aguas potables son sustancialmente inferiores. Los microcontaminantes orgánicos detectados en este tipo de aguas comúnmente se encuentran en concentraciones inferiores a 100 ng L⁻¹ (Jjemba, 2008). Los PPCPs detectados en el agua potable tienden exhibir una alta estabilidad química, baja biodegradabilidad y bajos coeficientes de sorción. Estas propiedades coadyuvan en gran medida a que la presencia de estos compuestos despierte preocupación acerca del efecto adverso que puede desencadenar el uso de dicha agua (Snyder et al., 2003; WHO, 2011).

Cabe mencionar que actualmente no existe una normativa que legisle la presencia de PPCPs en aguas potables. En el caso de la Unión Europea, la Directiva relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (98/83/EC) requiere de la monitorización de 48 parámetros, ninguno de los cuales se refiere a PPCPs. Por su parte la USEPA ha establecido una lista de contaminantes candidatos en agua potable (CCL, *Candidate Contaminant List*) que incluye sustancias que están bajo consideración para su incorporación en valores guía aplicados a agua potable. Esta lista se basa en dos criterios primordiales:

- (1) el contaminante afecta negativamente a la salud pública y
- (2) su presencia es frecuente en sistemas públicos de distribución de agua.

Aunque recientemente la USEPA actualizó los valores guía aplicados al agua potable, ninguno de los parámetros incluidos recoge la evaluación de PPCPs (USEPA, 2009). Por su parte el estado de California, ha considerado recientemente la incorporación de PPCPs y otros compuestos que producen disrupción endocrina en la legislación aplicada al agua potable (Jjemba, 2008). Sin embargo, tal modificación a la legislación se ha abandonado por la falta de métodos analíticos estandarizados para cuantificar satisfactoriamente las bajas concentraciones en las que estos contaminantes se encuentran presentes.

Suelo

Los PPCPs pueden incorporarse en los suelos a través de varias rutas que incluyen escorrentías, material particulado, además de fertilizantes orgánicos y biosólidos. De hecho, se estima que la aplicación de abono y biosólidos a cultivos agrícolas es la fuente principal de PPCPs en este compartimiento (Kinney et al., 2006; Wu et al., 2010).

En este contexto, se ha reportado la presencia de antibióticos en suelos y fincas agrícolas enmendadas con fertilizante de origen animal (Aga, 2008; Kay et al., 2005). De igual forma se ha documentado la presencia de carbamazepina en suelos; donde este compuesto parece ser relativamente móvil y no fácilmente atenuable (Heberer et al., 2002; Kuehn y Mueller, 2000).

I.2.2.3. Contaminantes prioritarios: Descripción

La Directiva Marco del Agua (DMA) es probablemente la normativa Europea más ambiciosa introducida en la legislación del agua durante décadas (Directiva 2000/60/CE). Ésta impone exigencias específicas para el control de la contaminación y establece estándares de calidad ambiental (EQS, *Environmental Quality Standards*) para 33 sustancias prioritarias (PPs, *Priority Pollutants*) (Directiva 2008/105/CE) seleccionadas según criterios de persistencia y toxicidad (Tabla I.6.). Los PPs incluyen compuestos orgánicos sintéticos (p. ej., lindano y simazina) e inorgánicos (p. ej., mercurio). Se caracterizan por una alta toxicidad, elevada persistencia en el medio ambiente y/o por ser potencialmente bioacumulables. Algunos de ellos causan disrupción endocrina en organismos marinos y, consecuentemente, podrían representar un riesgo para el ecosistema y la salud humana (Frye et al., 2012).

La DMA pretende alcanzar un “estatus químico y ecológico apropiado” para lo que deben cumplirse los EQS para PPs en todos los cuerpos acuáticos antes del 2015. De acuerdo con la DMA, los países miembros deben implementar medidas con el objetivo de disminuir la contaminación de PPs progresivamente y suspender o disminuir sus emisiones y descargas. La implementación de la DMA requiere de la monitorización y control de las concentraciones de PPs para el aseguramiento de la protección de los ecosistemas costeros. Una vez que las concentraciones de PPs en las aguas superficiales se hayan determinado, se deben establecer también las causas de la contaminación. En este respecto, la DMA requiere que los países miembros conozcan qué tipo de PPs entran en las aguas superficiales con el objetivo de determinar las mejores alternativas en el control de la contaminación.

Tabla I.6. Clasificación de las sustancias prioritarias según la Directiva Marco del Agua.

Sustancias prioritarias identificadas como peligrosas		Sustancias prioritarias no identificadas como peligrosas		Sustancias sometidas a revisión para su posible catalogación como sustancias peligrosas prioritarias	
Antraceno, difeniléteres bromados, cadmio y sus compuestos, cloroalcanos, endosulfán, hexaclorobenceno, hexaclorobutadieno, lindano ,	mercurio y sus compuestos, nonilfenol , hidrocarburos aromáticos policíclicos ⁽¹⁾ , compuestos de tributilestano	Alaoloro , atrazina , benceno, pentabromodifenileter ⁽²⁾ , clorfenvinfós, clorpirifós , 1,2-dicloroetano, diclorometano, triclorobencenos, cloroformo , trifluralina, di(2-etilhexil)ftalatos,	diurón, fluoranteno, isoproturón, plomo y sus derivados, naftaleno, níquel y sus derivados, octilfenol, (4-81,1',3,3' tetrametilbutilfenol)), simazina .	AMPA, bentazon, bisfenol A , dicofol, EDTA, cianuro libre, glifosato, mecoprop , almizcle xileno, PCB,	ácido de perfluoro-octan-sulfonato, quinoxifeno (5,7-dicloro-4-(p-fluorofenoxi) quinolina), dioxinas.

En negritas se muestran los compuestos estudiados en la presente Tesis

⁽¹⁾ Benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(k)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno

⁽²⁾ Congéneres no. 28, 47, 99, 100 y 154

EDTA: Etilendiaminotetraacético

PCB: Bifenilos policlorados

AMPA: Ácido aminometilfosfónico

En la Tabla I.6. se han marcado en **negro** las seis sustancias peligrosas prioritarias y las dos sustancias bajo revisión evaluadas en los estudios realizados en la presente Tesis.

I.2.2.4. Tecnologías para la eliminación de PPCP y compuestos relacionados

Desde una perspectiva histórica, podemos decir que las tecnologías de tratamiento de aguas residuales fueron diseñadas con el objetivo principal de eliminar patógenos, materia orgánica y nutrientes, pero no PPCPs y otros contaminantes específicos (Jjemba, 2008).

Los procesos convencionales utilizados en las EDAR involucran habitualmente tratamientos primario y secundario. Durante el primero, una pequeña porción de PPCPs se degrada por la acción de los microorganismos presentes, mientras una porción mayor es eliminada al retirar el lodo de los tanques de sedimentación. Esto es debido a que el material particulado del fango adsorbe una fracción importante de estos compuestos (hidrofóbicos). Finalmente, otra pequeña porción de PPCPs integrados en las grasas y aceites se elimina mediante flotación (Jjemba, 2008).

El tratamiento secundario está esencialmente diseñado para eliminar la materia orgánica disuelta presente en las aguas residuales. La mayoría de los sistemas son aeróbicos, aunque también los hay diseñados para alternar entre condiciones aerobias y anaerobias (*Sequencing batch reactors*). Durante el tratamiento secundario, se degradan un mayor número de contaminantes orgánicos, incluyendo en este grupo a los PPCPs, por acción microbiana o adsorción a los flocúlos. Los sistemas de tratamiento más extendidos aplicados en esta etapa son: lodos activados, lagunas de oxidación y películas biológicas (Jjemba, 2008; Lazarova y Bahri, 2005a).

Los tratamientos avanzados o terciarios se aplican para mejorar la calidad fisicoquímica de los efluentes provenientes del tratamiento secundario. Entre las operaciones que se aplican en este tratamiento se encuentran la coagulación, floculación, nitrificación y desnitrificación, adsorción en carbón activo, intercambio

iónico, reacciones de oxidación avanzada (p. ej., ozono y Fenton), procesos de desinfección clásica (radiación con luz UV y cloración), procesos de separación con membranas (p. ej., ósmosis inversa y ultrafiltración) y electrólisis. Durante este tratamiento, se eliminan también PPCPs, pero el grado de eliminación dependerá de la eficiencia del método utilizado sobre un compuesto específico.

Entre los tratamientos avanzados cabe mencionar a los procesos de oxidación, generalmente catalíticos. La eficiencia del proceso está supeditada a la concentración del oxidante, tiempo de contacto, temperatura y pH. Los agentes oxidantes más comúnmente utilizados son el dióxido de cloro, agua oxigenada, compuestos de hierro y ozono. Se ha reportado que algunos agentes oxidantes son capaces de degradar algunos contaminantes orgánicos específicos como los PPCPs (Abdelmelek et al., 2011). Ahora bien, se ha demostrado también que la combinación de agentes oxidantes, en los denominados procesos de oxidación avanzada (AOP, *Advanced Oxidation Process*); consigue mejores eficiencias de eliminación en la mayoría de los casos, aunque encarece el proceso de tratamiento (Huber et al., 2005; Zwiener y Frimmel, 2004). La combinación de agentes altamente oxidantes, como H₂O₂/ozono o UV/ozono, genera radicales hidroxilo no selectivos que reaccionan con un gran número de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Asimismo, aunque la aplicación de tratamientos terciarios es prometedora, la eficacia de estos tratamientos debe probarse bajo las condiciones de operación a escala real (Jjemba, 2008).

Es evidente que mejorar las eficiencias de eliminación de los PPCPs en aguas residuales implica la aplicación de más de un proceso incrementando con ello el coste del tratamiento. Adicionalmente, debe también considerarse que se ha reportado la generación de productos intermedios de degradación de PPCPs, como resultado de la aplicación de AOP, que poseen una mayor toxicidad que el compuesto del que se originaron. Un ejemplo de lo anterior es el caso del 2-[(2-clorofenil)amino], producto de la fototransformación del diclofenaco; como resultado de un aumento en lipofilidad este compuesto produce una toxicidad aguda en algas (*Scenedesmus vacuolatus*) superior a la del compuesto parental (Schulze et al., 2010).

1.2.2.5. PPCPs y contaminantes prioritarios: Algunos efectos ambientales

Los PPCPs y otros contaminantes de origen xenobiótico presentes en el medio ambiente pueden desencadenar reacciones toxicológicas en ciertos organismos. Aunque estos efectos no ocasionen la muerte inmediata de un organismo pueden alterar su fecundidad (Witte, 1998). Debido a que los contaminantes químicos en el medio ambiente se encuentran casi siempre en forma de mezclas, resulta difícil evaluar el efecto individual de un compuesto específico (Escher et al., 2005). Los efectos de estas combinaciones químicas en los organismos expuestos pueden ser multigeneracionales, presentarse en momentos puntuales o incluso durante todo el ciclo de vida (Jjemba, 2008).

La concentración en la que se encuentran presentes estos compuestos, no es el factor más importante en la evaluación de su impacto ambiental, lo son su actividad biológica (potencia y toxicidad) y persistencia. En este sentido, la fracción biodisponible del compuesto es la que determina su toxicidad. En el estudio del efecto ambiental de los fármacos, no se puede obviar que estos son compuestos biológicamente activos, diseñados

para tener una alta resistencia a la biodegradación, ya que de su estabilidad metabólica depende en gran medida el éxito de su acción farmacológica (Escher et al., 2005). De esta manera la contaminación del medio con PPCPs, además de tener un efecto potencial sobre la salud humana, puede impactar sobre otros organismos presentes en el ecosistema (Jjemba, 2008).

Resistencia antibiótica

Los agentes antimicrobianos han jugado un papel importante en el control de enfermedades infecciosas desde 1940 (Jeśman et al., 2011). Desde entonces, se han desarrollado un gran número de agentes antimicrobianos sintéticos o semi-sintéticos con este fin. Sin embargo, el incremento de bacterias resistentes a ciertos antibióticos ha posicionado a la comunidad científica y la población en general en contra del uso indiscriminado de antibióticos en el campo de la medicina humana y veterinaria (Wright, 2005).

Existen dos tipos de resistencia antibiótica: la resistencia activa resultado de una presión evolutiva para desarrollar un mecanismo de acción contra el ataque de un antibiótico o una clase de antibióticos y la pasiva donde la resistencia es producto de procesos adaptativos generales que no se relacionan con la presencia de antibióticos (Wright, 2005). El primer mecanismo de resistencia antibiótica reportado en la literatura fue la producción de penicilinasas por *Escherichia coli* (Abraham y Chain, 1940).

Es importante remarcar que la administración de antibióticos al ganado en concentraciones sub-terapéuticas puede incluso acelerar el desarrollo de la resistencia contra agentes antimicrobianos ya que las bacterias son capaces de sobrevivir a la exposición prolongada y/o repetida a estos compuestos (McAllister et al., 2001). Durante la exposición prolongada a dosis sub-terapéuticas existe una mayor posibilidad de creación de bacterias resistentes, debido a que tales concentraciones son lo suficientemente bajas para mejorar el crecimiento de las bacterias resistentes y lo suficientemente altas como para ejercer una presión selectiva que favorezca la predominancia de las cepas resistentes. La resistencia que se crea en este tipo de exposición es altamente estable (Schrug et al., 1997). En este sentido, se ha reportado un incremento a la resistencia a antibióticos asociada a la alimentación de peces con piensos medicados (Samuelsen et al., 1992), mientras que en otro estudio se documentó un incremento en la supervivencia de bacterias presentes en cultivos agrícolas tratados con abono animal (Chen et al., 2008).

Disrupción endócrina

Desde 1930 científicos expertos en biología y medicina han reconocido el fenómeno de la disrupción endócrina (Jjemba, 2008). A principios de la década de 1950 se relacionó al DDT, pesticida organoclorado, con este efecto, sin embargo, no fue hasta 1980 cuando se reportaron cambios en la tasa de género y deformidades en órganos sexuales de gaviotas que vivían en áreas contaminadas con este compuesto (Fry y Toone, 1981). Adicionalmente, desde hace algunas décadas se han documentado anomalías en el desarrollo y reproducción de algunos organismos acuáticos atribuidas a este fenómeno (Colborn et al., 1994).

Los disruptores endocrinos (ECDs, *Endocrine Disruptors*) son compuestos exógenos que alteran las funciones del sistema endocrino, afectando de esta manera la salud de un organismo, su prole o una

subpoblación. Estos compuestos simulan y/o antagonizan a las hormonas endógenas (Schug et al., 2011). Los ECDs tienen una elevada relevancia en la ecotoxicología ya que pueden influenciar negativamente la reproducción de organismos, afectando la supervivencia y existencia de poblaciones completas. Un gran número de PPCPs incluyendo el 17 β -estradiol (hormona sexual natural) y el 17 α -etinilestradiol (píldora anticonceptiva), pueden inducir cambios en la reproducción de peces a niveles de partes por trillón (Snyder et al., 2003). Se ha reportado también que debido a la exposición de truchas al paracetamol, se produjo en dichos individuos una reducción en la producción de vitelogenina, precursora de las proteínas de la yema, encargadas de nutrir a los embriones en desarrollo (Miller et al., 1999). En el mismo sentido, se ha reportado que la presencia de fluoxetina a concentraciones subletales ocasiona cambios en apetito, reproducción e inmunidad en peces (Brooks et al., 2003; Fong, 1998; Fong et al., 1998). El incremento de las concentraciones de fluoxetina ocasionó anomalías en el pez medaka japonés (*Oryzias latipes*) contándose entre dichas anomalías edemas y desarrollo de aletas pectorales (Brooks et al., 2003).

Otros efectos ecotoxicológicos

Se ha documentado la significatividad de la exposición indirecta a PPCPs a través de la cadena alimentaria. En este tipo de exposición, especies que habitualmente no tendrían un contacto directo con estos compuestos, lo tienen a través de la ingesta de una presa contaminada. Un ejemplo de la vía indirecta es la reportada para los buitres de espalda blanca (*Gyps bengalensis*) endémicos de la India, cuyo declive poblacional cifrado en un 95%, se atribuye a la ingesta de ganado muerto medicado con diclofenaco (Oaks et al., 2004).

En humanos, se sospecha que la exposición a contaminantes ambientales durante la gestación en el útero materno podría tener como consecuencia el desarrollo de cánceres como la leucemia linfoblástica aguda en niños y adultos jóvenes (Alexander et al., 2001; Meinert et al., 2000).

I.2.3. Subproductos de desinfección: Trihalometanos y N-nitrosaminas

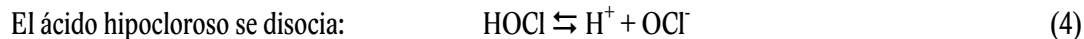
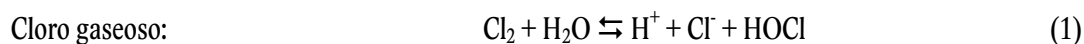
La desinfección del agua mediante la cloración ha permitido una mejora notable en la salud pública desde que se aplicó por primera vez a finales del siglo XIX. En 1881, Koch demostró que las bacterias tienen un papel importante en las enfermedades originadas por la ingesta y/o contacto con agua, y que además pequeñas cantidades de cloro podían eliminar o inactivar efectivamente dichos patógenos (Koch, 1881). En la actualidad, garantizar una buena calidad microbiológica del agua sigue siendo primordial debido a la relación directa que existe entre el agua y las enfermedades entéricas. Así, la cloración es la medida de desinfección más aplicada en la potabilización del agua (WHO, 2008). Además del cloro, existen otros agentes desinfectantes alternativos de uso menos extendido como cloraminas, dióxido de cloro, ozono y radiación ultravioleta (Tibbetts, 1995). En la Tabla I.7 se presenta la eficacia de algunos agentes desinfectantes contra diferentes clases de patógenos.

Tabla I.7. Comparación de la inactivación microbiana obtenida con diferentes agentes desinfectantes.

Desinfectantes	Microorganismo patógeno			Efectividad General
	Bacteria	Virus	Protozoarios	
Cloro libre	Excelente	Excelente	Suficiente/Limitado	Bueno
Cloraminas	Suficiente	Limitado	Muy limitado	Limitado
Dióxido de cloro	Bueno/Excelente	Bueno/Excelente	Suficiente	Bueno
Ozono	Excelente	Excelente	Bueno/Excelente	Bueno/Excelente
Irradiación ultravioleta	Bueno/Excelente	Suficiente	Bueno	Bueno

Fuente: Edzwald, (2011).

Durante el proceso de desinfección de las aguas, el cloro se aplica generalmente como gas comprimido, o en disoluciones de hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio. Esencialmente el uso de cualquiera de las tres formas de cloro es equivalente debido al equilibrio que existe entre el gas molecular disuelto y la disociación de las sales (eq. 1 – 4).



El cloro y otros agentes desinfectantes reaccionan con compuestos orgánicos naturales presentes en el agua, como es el caso de ácidos húmicos y fúlvicos, para formar compuestos orgánicos halogenados, denominados subproductos de desinfección (DBPs, *Disinfection by-products*) (Figura I.5., Tabla I.8.). Entre estos compuestos se encuentran trihalometanos (THMs, *Trihalomethanes*) y N-nitrosaminas, que son objeto de estudio de la presente Tesis doctoral.

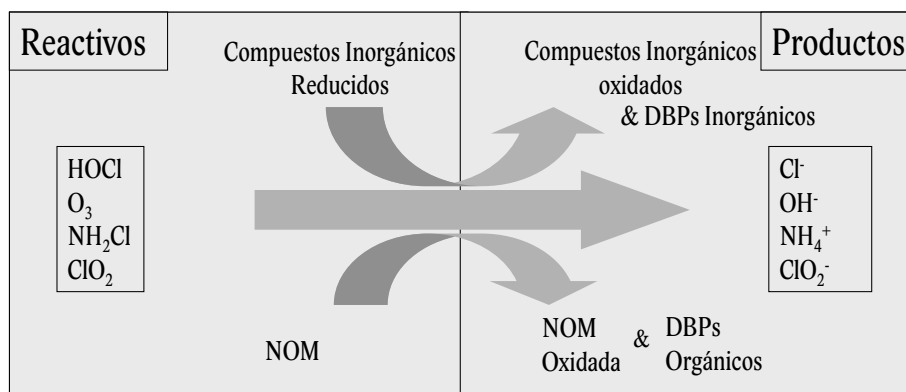


Figura I.5. Ilustración esquemática de las reacciones entre diferentes agentes oxidantes con la materia orgánica natural (NOM, Natural Organic Matter) y compuestos inorgánicos reducidos. Adaptado de Edzwald, (2011).

Tabla I.8. Tipo de subproducto de desinfección generado de acuerdo al agente desinfectante utilizado. "X" representa el elemento halogenado.

Tipo de DBP	Agente desinfectante			
	Cloro	Cloraminas	Dióxido de cloro	Ozono
Compuestos con enlaces O-X				
Oxcloruros			✓	
Oxibromuros				✓
Compuestos con enlaces C-X				
Trihalometanos	✓	✓		✓
Otros haloalcanos	✓			
Ácidos haloacéticos	✓	✓		
Halocetonas	✓			
Haloaldehídos	✓			
Halonitrilos	✓			
Haluros de cianógeno	✓	✓		
MX y compuestos relacionados	✓			
Halonitrometanos	✓			
Compuestos no halogenados				
Ácidos alifáticos	✓		✓	✓
Aldehídos				✓
Cetonas				✓
N-nitrosaminas	✓	✓		

Fuente: Jacangelo y Trussell, (2002).

La presencia de DBPs como resultado de la cloración (p. ej., cloroformo) fue reportada por primera vez por Rook (1974). Su formación y niveles dependen de muchos factores, entre los cuales cabe destacar la dosis de cloro, pH, temperatura, tiempo de residencia y niveles de bromo (Nieuwenhuijsen et al., 2000). En la última revisión realizada por la Prof. Richardson se ha evidenciado la existencia de al menos 600 DBPs diferentes (Richardson, 2012). El cloroformo es usualmente el DBP predominante, aunque los THMs bromados pueden formarse en altas concentraciones cuando las aguas a clorar contienen cantidades relevantes de bromo (Krasner et al., 2009). De esta manera, se hace indispensable el conocimiento sobre la formación y presencia de estas moléculas para encontrar una solución de compromiso entre una desinfección eficiente y un control adecuado de los productos de desinfección (Figura I.6.).

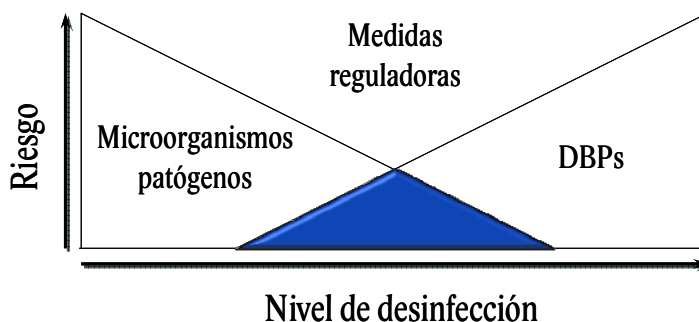






Figura I.6. Relación entre nivel de desinfección, riesgo sanitario y producción de DBPs. Adaptado de Sadiq y Rodríguez, (2004).

I.2.3.1. Trihalometanos: Formación y descripción

Los THMs son moléculas formadas por un átomo de carbono y tres sustituyentes halogenados. Tienen como fórmula general CHX_3 , donde X puede referirse a cloro, bromo, yodo o a sus combinaciones. Los THMs resultan principalmente de la reacción entre cloro o bromo y compuestos orgánicos presentes en el agua de manera natural (Brown et al., 2011).

Los cuatro THMs más abundantes y que componen un grupo de contaminantes regulados conocido como trihalometanos totales (TTHMs, *Total Trihalomethanes*) son cloroformo (CHCl_3), bromodiclorometano (CHBrCl_2), dibromoclorometano (CHBr_2Cl) y bromoformo (CHBr_3). Los cuatro compuestos aquí considerados son líquidos a 25 °C y presentan presiones de vapor que van desde 0,80 kPa (bromoformo) a 23,33 kPa (cloroformo). Los THMs son ligeramente solubles en agua, con solubilidades de hasta 1 mg mL^{-1} en condiciones estándar. La Tabla I.9. muestra algunas de las propiedades más relevantes de este grupo de compuestos.

Tabla I.9. *Algunas propiedades fisicoquímicas relevantes de los trihalometanos.*

Trihalometanos	Estructura química	Número CAS	Temperatura de ebullición, °C	Log K_{ow}	Constante Ley de Henry, k_H
Cloroformo		67-66-3	61,2	1,52	$1,32 \times 10^{-1}$
Bromodiclorometano		75-27-4	120,0	1,61	$4,31 \times 10^{-2}$
Dibromoclorometano		124-48-1	90,0	1,70	$1,41 \times 10^{-2}$
Bromoformo		75-25-2	148,1	1,79	$4,61 \times 10^{-3}$

EPI-Suite software Versión 4.1.

La presencia de cloro libre es un prerequisite para la formación de THMs. La Figura I.7. muestra el punto de ruptura de la cloración a partir del cual se inicia la rápida formación de THMs. No obstante, de manera general la reacción entre el cloro y el agua para dar lugar a la formación de THMs se divide en tres fases. En la primera fase el cloro satura la demanda impuesta por la matriz inorgánica del agua y la formación de THMs es mínima. Durante la segunda etapa el cloro reacciona con la matriz orgánica más reactiva, es en esta

etapa donde se forma la mayor cantidad de THMs. En la última fase, el cloro reacciona con la matriz orgánica restante y menos reactiva produciendo THMs a una velocidad inferior a la de la segunda fase (Edzwald, 2011).

Se ha reportado ampliamente que la formación de THMs se incrementa al aumentar la dosis de cloro. Sin embargo, una cantidad de cloro residual muy por encima de la demanda de cloro tiene poco impacto en el incremento de la velocidad de formación de THMs (Koukouraki y Diamadopoulos, 2003). De igual manera, se ha relacionado un incremento en la matriz orgánica presente en el agua con el aumento de la velocidad y la proporción de formación de estos compuestos (Nikolaou y Lekkas, 2001). Por otro lado, existen también evidencias que vinculan un aumento de la velocidad de reacción a altas temperaturas. Una temperatura más alta se traduce en una velocidad de hidrólisis superior, lo que ocasiona una rotura más rápida de los enlaces aromáticos presentes en el agua, permitiendo de esta manera una mayor halogenación y formación de estas moléculas (Koukouraki y Diamadopoulos, 2003)

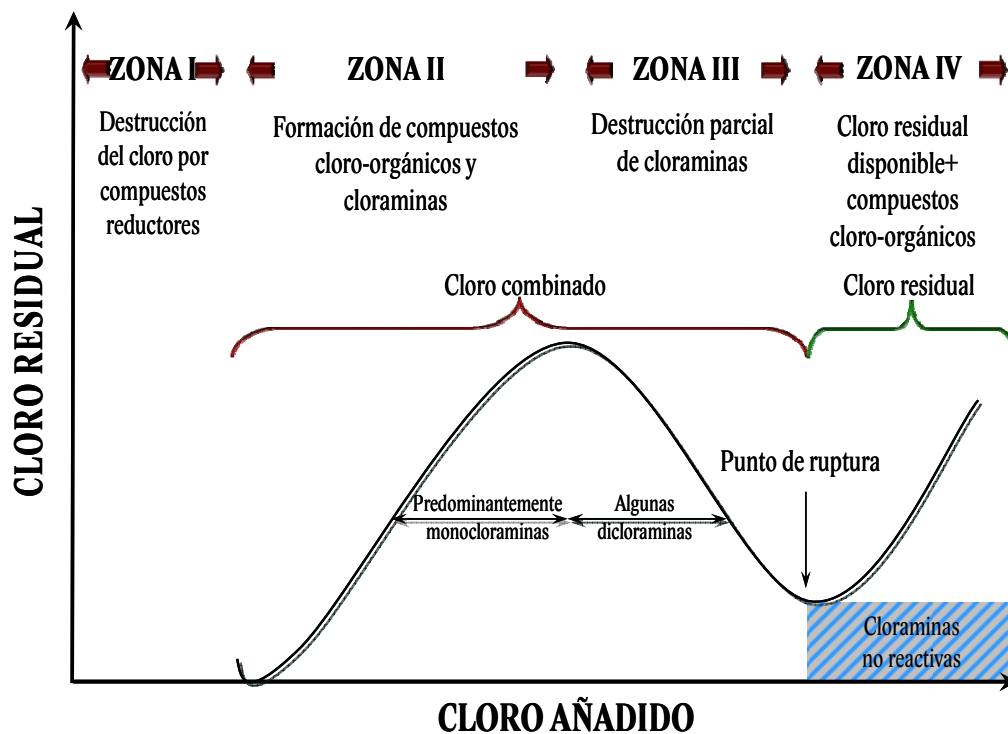


Figura I.7. Ilustración esquemática de la cloración al punto de ruptura.

En la Tabla I.10 se presentan algunos de los niveles de THMs detectados en diferentes compartimientos acuáticos. En ella se puede observar la gran diferencia en concentración de estos contaminantes en los efluentes de EDAR al compararlos con su presencia en aguas potables o superficiales.

Tabla I.10. *Concentraciones mínimas, máximas y medias de trihalometanos en diferentes compartimientos acuáticos.*

Trihalometanos	Agua potable, $\mu\text{g L}^{-1}$	Aguas superficiales, $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluentes de EDAR, $\mu\text{g L}^{-1}$	Referencias
Trihalometanos totales	(13 – 78) 46	(0,10 – 0,60) 0,35	(2 – 363) 182	[1-3]
Cloroformo	(13 – 23) 18	0,11	(5 – 195) 100	[1,2]
Bromodichlorometano	6	NR	(1 – 109) 55	[1,2]
Dibromoclorometano	3	NR	(0,5 – 44) 23	[1,2]
Bromoformo	1	NR	(0,1 – 15) 8	[1,2]

¹(Matamoros et al., 2007); ²(Musikavong et al., 2005); ³(Yoon et al., 2003).
NR: No reportado.

Los THMs fueron los primeros DBPs en ser identificados en agua potable (Bellar et al., 1974; Rook, 1974), los primeros sujetos a un método analítico validado y los primeros en ser incluidos en un estudio de monitorización de redes de abastecimiento de agua potable (Symons et al., 1975). Entre los THMs, el cloroformo es el compuesto que se ha evaluado más intensamente en materia de carcinogenicidad en animales. La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) lo ha clasificado como un posible carcinógeno para humanos (Grupo 2B; IARC, 1999) al igual que al bromodichlorometano (Grupo 2B; IARC, 1999). Por otra parte, la evidencia existente sobre la carcinogenicidad del dibromoclorometano y bromoformo es limitada, por lo que no se les clasificó como carcinógeno en humanos. (Grupo 3; IARC, 1999). En la Tabla I.11 se detallan los efectos y rutas de exposición utilizados por la IARC para la evaluación de este grupo de compuestos.

Tabla I.11. *Toxicología de los trihalometanos.*

Trihalometanos	Ruta de Exposición Experimental	Efecto (animales de experimentación)	Evaluación IARC
Cloroformo	Inhalación y administración en agua de bebida	Incremento en la frecuencia de adenomas y carcinomas en células renales, hiperplasia atípica del túbulo renal, incremento en basofilia citoplásmica	Grupo 2B
Bromodichlorometano	Administración en agua de bebida	Nódulos neoplásicos y adenofibrosis	Grupo 2B
Dibromoclorometano	Administración en agua de bebida	Produce un incremento significativo en la incidencia de neoplasmas hepatocelulares	Grupo 3
Bromoformo	Sonda nasogástrica	Produce pólipos adenomatosos y adenocarcinomas en el intestino grueso	Grupo 3

Fuente: Chloroform 1. Exposure Data - IARC Monographs, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 52 Chlorinated Drinking-water; Chlorination By-products; Some Other Halogenated Compounds; Cobalt and Cobalt Compounds.

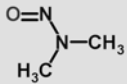
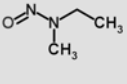
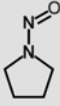

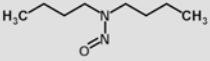
La exposición en humanos a subproductos de la cloración, como es el caso de THMs, no ocurre únicamente a través de la ingesta de agua y alimentos, sino también a través de la inhalación y absorción cutánea durante la ducha, natación, etc. Cada una de las rutas de exposición tiene una diferente metabolización y, posiblemente, una alta variación dependiendo de la persona expuesta (Whitaker et al., 2003).

Con el motivo de regular la presencia de estos DBPs en agua potable, la OMS ha fijado los siguientes valores guía: 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el cloroformo, 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el bromodiclorometano y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para dibromoclorometano y bromoformo. La Unión Europea por su parte ha establecido límites más restrictivos y ha enmendado la concentración de TTHMs permitida en agua potable, disminuyéndola de 150 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Directiva 80/778/EC).

I.2.3.2. N-nitrosaminas: Formación y descripción

Las N-nitrosaminas son compuestos orgánicos nitrogenados de estructura general $\text{R}_2\text{N}-\text{N}=\text{O}$. Estos compuestos comparten el grupo funcional $\text{N}-\text{NO}$, y forman una familia con un amplio espectro de masas moleculares y estructuras químicas (Tabla I.12). Son compuestos polares, no bioacumulables, usualmente solubles en agua y bastante estables (Kolpin et al., 2002a). Es esta última propiedad, combinada con su hidrofiliidad, la que contribuye a que estos compuestos representen un riesgo importante para las reservas acuáticas subterráneas (Nawrocki y Andrzejewski, 2011).

Tabla I.12. Algunas propiedades fisicoquímicas relevantes de las N-nitrosaminas.

N-Nitrosaminas	Estructura química	Número CAS	Masa molecular (g mol^{-1})	Log K_{ow}	Constante Ley de Henry, k_H
N-Nitrosodimetilamina, NDMA		62-75-9	74,08	-0,64	$8,41 \times 10^{-5}$
N-Nitrosometiletilamina, NMEA		10595-95-6	88,10	-0,15	$1,12 \times 10^{-4}$
N-Nitrosopirrolidina, NPYR		930-55-2	100,1	0,23	$6,54 \times 10^{-5}$
N-Nitrosopiperidina, NPIP		100-75-4	114,15	0,72	$8,68 \times 10^{-5}$
N-Nitrosodi-n-butilamina, NDPA		924-16-3	158,24	2,31	$4,60 \times 10^{-4}$

Algunos de los compuestos comprendidos en la familia de las N-nitrosaminas son N-Nitrosodimetilamina, N-Nitrosodi-n-butilamina, N-Nitrosometiletilamina, N-Nitrosomorfolina, N-Nitrosopiperidina y N-Nitrosopirrolidina. Sus estructuras químicas y algunas propiedades fisicoquímicas relevantes se recogen en la Tabla I.12.

El uso de agentes desinfectantes alternativos, particularmente cloraminas, para la desinfección de efluentes de EDAR es una tendencia creciente que tiene por objeto reducir la formación de THM y ácidos haloacéticos (HAAS, *Haloacetic Acids*) (Seidel et al., 2005). Tal estrategia, si bien reduciría la formación de DBPs halogenados, promovería la formación de DBPs nitrogenados (N-DBPs, *Nitrogenated disinfection by-products*) bastante más tóxicos. En la formación de N-DBPs, el nitrógeno puede provenir tanto de precursores orgánicos, como el nitrógeno orgánico disuelto (DON, *Dissolved Organic Nitrogen*), o en el caso de la cloraminación, del propio desinfectante (Mitch et al., 2008). De esta forma se resalta la importancia de la elección del tipo de agente de desinfección a utilizar en función del agua a desinfectar.

Se ha reportado ampliamente la formación de N-nitrosaminas durante el tratamiento del agua y su distribución a partir de compuestos con nitrógeno orgánico. Entre los posibles precursores se encuentran: dimetilamina (Lee et al., 2007), DON (Chen y Valentine, 2006; Gerecke y Sedlak, 2003; Yoon et al., 2003), aminas terciarias y cuaternarias (Lee et al., 2007), agentes floculantes catiónicos y resinas de intercambio aniónico utilizadas en el tratamiento de aguas (Najm y Trussell, 2001). Entre las especies DON se pueden enumerar aminoácidos, proteínas, amino azúcares, amidas, nitrilos, pirroles, purinas y pirimidinas que se encuentran ampliamente distribuidas en aguas superficiales (Westerhoff y Mash, 2002). Estas especies generalmente comprenden una pequeña porción de la NOM (0,5 -10%, en peso) (Westerhoff y Mash, 2002). Los niveles de DON se ven incrementados en aguas impactadas con aguas residuales y actividad algal (Krasner et al., 2008).

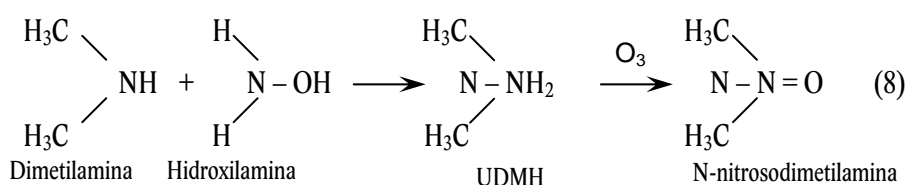
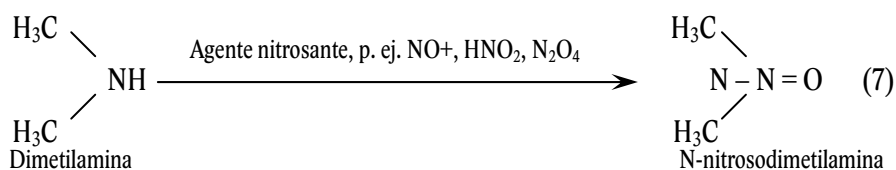
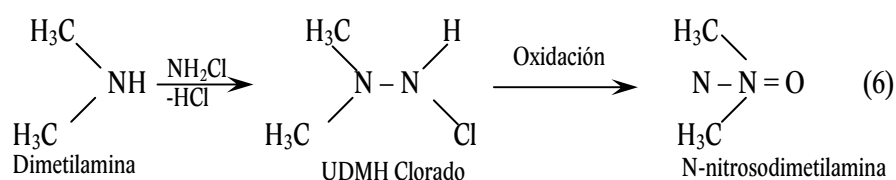
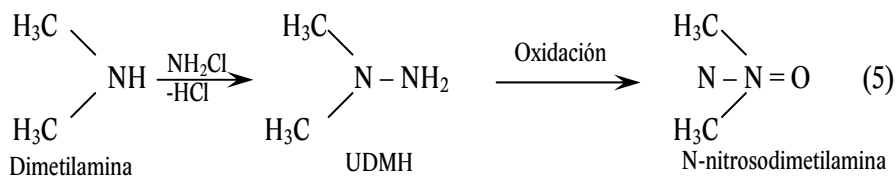
La mayoría de estudios que intentan explicar los mecanismos de formación de NDMA durante el tratamiento del agua se basan en la presencia de dimetilamina como molécula precursora (Choi y Valentine, 2002; Mitch y Sedlak, 2002; Schreiber y Mitch, 2005). No obstante, a pesar de la relevancia de la dimetilamina en la formación de NDMA, no existen datos sistemáticos que detallen su presencia y niveles en los diferentes compartimientos acuáticos. Se espera que dichos niveles se encuentren en los $\mu\text{g L}^{-1}$, por lo que, aunque el rendimiento de dicha reacción sea inferior al 3%, la cantidad de NDMA que puede formarse sería importante (Nawrocki y Andrzejewski, 2011).

La formación de NDMA durante la cloraminación (ecuación 5) se ha descrito como una sustitución nucleofílica entre una monocloramina y dimetilamina para formar dimetilhidrazina asimétrica (UDMH, *Unsymmetrical dimethyl hydrazine*). Esta última se oxida rápidamente para formar NDMA (Choi y Valentine, 2002).

La reacción (6) muestra un mecanismo hipotético de la formación de NDMA, demostrando que la formación de NDMA depende de la concentración de dicloroaminas y no de monocloraminas. De acuerdo a esta hipótesis la dicloroamina reacciona con la dimetilamina resultando un derivado clorado de la UDMH que posteriormente se oxida para dar lugar a la NDMA. De esta manera, la producción de NDMA se correlacionó

positivamente con la concentración de oxígeno presente. La reacción (7) muestra la formación de NDMA a partir de una reacción de nitrosación de la dimetilamina (Keefer y Roller, 1973).

Generalmente, se observan concentraciones superiores de dicloraminas en la adición de cloro a aguas que contienen amonio.



La formación de NDMA como resultado de la ozonización de dimetilamina ha sido reportada en múltiples ocasiones y el mecanismo de formación propuesto se ilustra en la ecuación (8). La formación de NDMA se basa en la generación de hidroxilamina a partir de la oxidación del dimetilamina, que da lugar al UDMH para posteriormente oxidarse dando lugar a la formación de N-nitrosaminas (Yang et al., 2009).

Otra posible ruta de formación de NDMA es la inducida por radiación ultravioleta cuando el agua contiene dimetilamina y nitritos, la velocidad de la reacción aumenta al incrementar las concentraciones de los sustratos y a pH alcalino (Lee y Yoon, 2007).

Sin embargo, aunque la dimetilamina sea considerada como el precursor natural y más probable de la NDMA, algunos estudios indican que la cantidad en la que se encuentra presente en aguas superficiales o

efluentes secundarios es insuficiente para justificar la cantidad de NDMA formada (Le Roux et al., 2011). Por lo anterior, se espera que otros precursores contribuyan a la presencia de estos compuestos en dichas aguas. En este sentido se ha demostrado que las aminas terciarias presentes en fármacos y productos de cuidado personal pueden ser precursoras de N-nitrosaminas durante la cloraminación. Este es el caso de la ranitidina para la que se reportan rendimientos de conversión de entre el 63 y 90% (Shen y Andrews, 2011).

En la Tabla I.13 se recogen algunos de los niveles en los que se encuentra este grupo de DBPs en diferentes compartimientos del medio acuático.

Tabla I.13. *Niveles medios de N-nitrosaminas en diferentes compartimientos acuáticos*

N-nitrosaminas	Agua potable, ng L ⁻¹	Aguas superficiales, ng L ⁻¹	Efluentes de EDAR, ng L ⁻¹	Referencias
N-Nitrosodimetilamina, NDMA	10 – 180	53,5	<5 – 400	[1,2,3,4,5]
N-Nitrosometiletildilamina, NMEA	2 – 71	NR	4	[1,4]
N-Nitrosopirrolidina, NPYR	1	NR	12	[1,4]
N-Nitrosopiperidina, NPIP	118	NR	<2	[1,2]
N-Nitrosodi-n-butilamina, NDBA	2	NR	<5 – 24	[1,2]

¹(Richardson, 2007); ²(Krauss et al., 2009); ³(Sedlak et al., 2005); ⁴(Schreiber y Mitch, 2006); ⁵(Zhao et al., 2008).
NR: No reportado

Las N-nitrosaminas son una familia de compuestos de extremada potencia carcinogénica, muy superior a la exhibida por los THMs (Mitch et al., 2003). La hepatotoxicidad es el efecto sistémico más importante de la exposición a NDMA. El mecanismo que induce el daño hepático puede estar relacionado con la alquilación de proteínas celulares (Martino et al., 1988). La IARC ha clasificado a la NDMA como un probable carcinógeno para humanos (Grupo 2A; IARC, 1998), mientras que la NMEA, NPYR, NPIP y NDBA fueron clasificadas como posibles carcinógenos para humanos (Grupo 2B; IARC, 1998). La Tabla I.14. recoge algunos de los efectos más importantes ocasionados por diferentes rutas de exposición de las N-nitrosaminas estudiadas en la presente Tesis doctoral según la IARC.

La NDMA fue inicialmente descubierta en aguas potables desinfectadas mediante cloración en Ontario, Canadá (Jobb et al., 1994). Normalmente se presenta en niveles de bajos ng L⁻¹ en aguas cloradas/cloraminadas, pero puede formarse en niveles muy superiores en aguas residuales desinfectadas mediante cloración.

Tabla I.14. *Toxicología de algunas N-nitrosaminas.*

N-nitrosaminas	Ruta de Exposición Experimental	Efecto (animales de experimentación)	Evaluación IARC
N-Nitrosodimetilamina, NDMA	Ingestión e inhalación	Produce tumores en hígado, riñones y tracto respiratorio	Grupo 2A
N-Nitrosometilamina, NMEA	Ingestión	Produce carcinomas hepatocelulares	Grupo 2B
N-Nitrosopirrolidina, NPYR	Ingestión	Produce carcinomas hepatocelulares, además de incrementar la incidencia de adenomas pulmonares	Grupo 2B
N-Nitrosopiperidina, NPIP	Ingestión e inhalación	Produce tumores benignos y malignos de hígado, pulmón, esófago, tracto digestivo y sistema respiratorio, además de carcinomas hepatocelulares	Grupo 2B
N-Nitrosodi-n-butilamina, NDBA	Administración oral, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa	Produce tumores benignos y malignos en vejiga urinaria, esófago, hígado, tracto respiratorio, estómago, además de leucemia.	Grupo 2B

Fuente: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 17. Some N-Nitroso Compounds.

La NDMA está regulada por la USEPA bajo el *Resource Conservation and Recovery Act* (RCRA) como un contaminante altamente peligroso (USEPA, 2006) y bajo el *Clean Water Act* (CWA) con respecto a la liberación accidental de compuestos (USEPA, 2005). La NDMA está catalogada como un contaminante aéreo peligroso que es regulado bajo el Programa de Tóxicos Aéreos en el *Clean Air Act* (USEPA, 1992).

En 1998 el *California Department of Health Service* (CDHS), EE.UU. estableció un nivel de acción para la NDMA de 2 ng L⁻¹ en agua potable, valor basado en un riesgo de 1 x 10⁻⁶ de desarrollar cáncer. Posteriormente en 1999, el nivel de acción se ajustó a 20 ng L⁻¹ para que se adecuara a los hallazgos en materia de producción de NDMA durante el tratamiento de aguas. En 2002, una vez completados los estudios de formación de NDMA en el tratamiento de aguas, el nivel de acción se estableció en 10 ng L⁻¹. Actualmente en EE.UU. la NDMA no está regulada en el agua potable, pero se encuentra incluida en el *Second Unregulated Contaminants Monitoring Rule* (UCMR-2) de 2005. Bajo la UCMR-2 se están recolectando datos de presencia a nivel nacional para NDMA y otras nitrosaminas. Por su parte la *Office of Environmental Health Hazard Assessment* (OEHHA) estableció en 2006 un valor guía de salud pública (PHG, *Public Health Guideline*) para el NDMA de 3 ng L⁻¹ en agua potable (OEHHA, 2006).

La necesidad de asegurar un suministro de agua fiable en términos de salud pública es crucial. En este sentido, diferentes estudios toxicológicos han sugerido riesgos de salud a largo plazo asociados a la exposición crónica a compuestos orgánicos traza como es el caso de los DBPs (Kolpin et al., 2002a).

I.3. Incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas

Como se ha puntualizado ya en secciones previas de esta Introducción, los recursos hídricos disponibles en el mundo son limitados, por lo que se buscan nuevas alternativas para su uso y manejo adecuados. La agricultura es el sector económico con mayor impacto sobre este recurso, por tanto el uso de aguas regeneradas se contempla como una opción excelente y sostenible para asegurar la producción alimentaria en zonas afectadas por la escasez de agua y poder preservar así los recursos hídricos disponibles. No obstante, se ha precisado también que los efluentes de EDAR son la entrada principal de microcontaminantes orgánicos al medio acuático, debido a la incapacidad de las EDAR para eliminar completamente estos contaminantes durante el tratamiento aplicado. Como consecuencia de su presencia en las aguas de riego, estos compuestos pueden ser incorporados por las plantas e introducirse en el ciclo alimentario.

Ahora bien, la asimilación por parte de las plantas de los microcontaminantes orgánicos depende, entre otros factores, de su concentración en el medio, por lo que la persistencia del compuesto puede alterar su destino final y su impacto. La evaluación de la vida media de un compuesto específico puede ayudar a conocer el potencial de incorporación de un compuesto dado en una planta. Mientras mayor sea ésta, mayor es el tiempo que el compuesto permanece en el suelo y por tanto mayor es su potencial de ser incorporado por las plantas presentes. Los procesos de degradación son químicos y/o biológicos, y éstos dependen de factores ambientales y características inherentes al suelo, p. ej., temperatura, contenido de agua, pH del suelo, carbono orgánico, población microbiana. Como consecuencia la vida media de un compuesto puede variar de suelo a suelo (Ryan et al., 1988).

Existe una clasificación de compuestos que se basa en la diferenciación de los compuestos a partir de su vida media en suelo: menos de 10 días (clase A), entre 15 y 50 días (clase B) y mayor de 50 días (Clase C). Según (Gillett, 1983) un compuesto cuya $t_{1/2}$ sea mayor de 14 días posee la suficiente estabilidad como para poder ser asimilado por las plantas.

Existen tres vías principales mediante las cuales los microcontaminantes orgánicos pueden introducirse en la planta:

- i. incorporación radicular**
- ii. incorporación a partir de la fase vapor circundante**
- iii. incorporación por difusión a través de las partes aéreas de la planta.**

Una vez que el microcontaminante ha entrado a la planta, le sigue una posible translocación impulsada por el proceso de evapotranspiración. El grado de distribución que el compuesto alcance en la planta estará íntimamente ligado a sus propiedades fisicoquímicas (Simonich y Hites, 1995).

Uno de los descriptores fisicoquímicos más utilizados en la evaluación del potencial de incorporación de un contaminante orgánico es el K_{ow} (sección I.4.1.). Un valor de $\log K_{ow}$ alto representa alta hidrofobicidad.

Compuestos extremadamente hidrofóbicos como PCBs, PAHs y otros hidrocarburos ($\log K_{ow} > 3$) se enlazan fuertemente a la materia orgánica presente en el suelo y no se disuelven en el agua presente. Su baja biodisponibilidad limita su potencial de incorporación (Ryan et al., 1988).

Es ampliamente aceptado que los compuestos cuyo $\log K_{ow}$ se encuentra entre 1 y 4 presentan un mayor potencial a ser incorporados por las plantas (McCutcheon y Schnoor, 2003). En este sentido, Briggs y colaboradores (1983) predijeron la concentración de compuestos no-iónicos en el floema en función de su concentración en la solución del suelo y el $\log K_{ow}$. El valor máximo del factor de concentración en el floema se obtuvo para las sustancias con un $\log K_{ow}$ entre 1,8 y 3,1 (Briggs et al., 1983). Se cree que las sustancias con un $\log K_{ow}$ en el rango óptimo son lo suficientemente hidrofóbicas para movilizarse a través de la bicapa lipídica de las membranas celulares, pero lo suficientemente solubles en agua para ser transportadas por los fluidos celulares (Pilon-Smits, 2005). Si el compuesto es demasiado hidrofílico, será incapaz de atravesar las membranas lipídicas, mientras que una alta lipofilia disminuirá su eficiencia para cruzar la endodermis, p. ej., posible adsorción en material lipídico de la membrana (Trapp y McFarlane, 1994). Adicionalmente, si el compuesto en cuestión se disocia a pH fisiológico, tal disociación tendrá también un impacto importante en su velocidad de incorporación (Trapp, 2000).

Una propiedad que impacta significativamente la biodisponibilidad de un compuesto químico y por ende su potencial de translocación es el K_{oc} . Un valor elevado de K_{oc} indica la tendencia del compuesto a adsorberse al suelo en lugar de permanecer disuelto en la disolución suelo-agua intersticial. Por lo tanto, este compuesto tiene un menor potencial de ser asimilado por las plantas.

Otra propiedad fisicoquímica de interés en la incorporación de microcontaminantes orgánicos a la planta es la k_H . Las sustancias con $k_H > 10^{-4}$ tienden a moverse en los espacios intersticiales del suelo, mientras que los contaminantes con $k_H < 10^{-6}$ se mueven predominantemente en agua. Ahora bien, si el k_H del compuesto se encuentra entre 10^{-4} y 10^{-6} , éste será móvil en aire y agua incrementando de esta manera su potencial de incorporación en plantas (Linde, 1994).

En la Tabla I.15., se recogen algunos estudios en los que se ha evaluado la incorporación de microcontaminantes orgánicos en distintas especies vegetales

Tabla I.15. *Algunos ejemplos de incorporación de microcontaminantes orgánicos en diferentes especies vegetales.*

Especie vegetal	Contaminante	Vía de Incorporación	Referencias
Pepino, <i>Cucumis sativus</i>	Carbamazepina	Radicular	[1,2]
Soja, <i>Glycine max</i>	Carbamazepina, difenilhidramina, fluoxetina, triclosan y triclocarban	Radicular	[3]
Frijol, <i>Phaseolus vulgaris</i>	17 α -etinilestradiol y triclosan	Radicular	[4]
Alfalfa, <i>Medicago sativa</i>	Oxitetraciclina	Radicular	[5]
Repollo, <i>Brassica oleraceavar. viridis</i>	Tetrabromobisfenol A y hexabromociclododecano	Radicular	[6]
Rábano, <i>Raphanus sativus</i>	Tetrabromobisfenol A y hexabromociclododecano	Radicular	[6]
Mostaza morena, <i>Brassica juncea</i>	Paracetamol	Radicular	[7]
Maíz, <i>Zea mays</i>	Acenafteno, fluoreno y fenantreno	Radicular y a través de las partes aéreas de la planta	[8]
Maíz, <i>Zea mays</i>	Fenantreno	A través de las partes aéreas de la planta	[9]
Espinaca, <i>Spinacia oleracea</i>	Fenantreno	A través de las partes aéreas de la planta	[9]
Zacate italiano, <i>Lolium multiflorum</i>	Fenantreno y pireno	Radicular	[10]

¹(Llop et al., 2010); ²(Shenker et al., 2011); ³(Wu et al., 2010); ⁴(Karnjanapiboonwong et al., 2011); ⁵(Kong et al., 2007); ⁶(Li et al., 2011); ⁷(Bartha et al., 2010); ⁸(Lin et al., 2007); ⁹(Wild et al., 2005); ¹⁰(Kang et al., 2010).

I.3.1. Vías principales de incorporación

I.3.1.1. Vía radicular

Los compuestos químicos entran en la raíz con el flujo del agua y pueden seguir tres rutas posibles: vía apoplástica a través de las paredes celulares, vía simplástica en el protoplasma mediante los plasmodesmos, o la vía transcelular de vacuola en vacuola (Figura I.8.a.) (Raven et al., 2004).

El compuesto se puede movilizar en el apoplasto y de esta manera evitar entrar a las células hasta llegar a la endodermis. Una vez allí, todas las moléculas tienen que atravesar las membranas plasmáticas y el protoplasto de las células endodérmicas, entrar al simplasto y finalmente llegar al xilema a partir de donde pueden ser translocadas (Trapp y McFarlane, 1995).

La eficiencia de la incorporación vía radicular puede describirse mediante el ratio entre la concentración del xenobiótico en la raíz y la concentración del compuesto en la disolución circundante. A este ratio se le denomina factor de concentración en la raíz (RCF, *Root Concentration Factor*). Briggs y colaboradores (1982), demostraron que la incorporación de compuestos no-ionizados consiste de dos etapas principales: (i) una fase

de equilibrio de concentraciones entre la fracción acuosa en el interior de la raíz con la fracción acuosa de la disolución circundante y (ii) la sorción del compuesto en las porciones hidrofóbicas de la raíz. Briggs estableció la siguiente relación para fenilureas.

$$\text{Log (RCF-0,82)} = 0,77 \log K_{ow} - 1,52$$

Aunque muchos estudios llevados a cabo han llegado a la conclusión de que no hay translocación de sustancias hidrofóbicas en esta vía de incorporación, sí se ha descrito una acumulación sobre todo en tubérculos (Fries y Marrow, 1981; Sawhney y Hankin, 1984; Webber et al., 1994). Adicionalmente, se ha reportado otra excepción, Hülster y colaboradores (1994) describieron el transporte activo de dioxinas en dos variedades distintas de calabaza (*Cucurbita pepo* 'Giromontiina' y *Cucurbita pepo* 'Gelber Zentner'). Por su relevancia en los experimentos realizados en la presente tesis este tema se profundizará en la sección V.2.

I.3.1.2. Incorporación a partir de la fase vapor circundante

La difusión a la fase de vapor y la incorporación a la raíz o tallo puede ser una ruta importante para compuestos volátiles (Figura I.8.b.). Los dos procesos responsables de la incorporación de un xenobiótico presente en el suelo mediante esta vía son:

- (1) volatilización del compuesto del suelo,**
- (2) deposición del vapor en la superficie de la planta.**

La velocidad de volatilización depende de la presión de vapor del compuesto. Ésta varía con la temperatura ambiental, solubilidad del compuesto, capacidad de sorción y propiedades físicas del suelo. Ésta es una vía de incorporación importante para compuestos con una constante de Henry superior a 10^{-4} (Pilon-Smits, 2005).

I.3.1.3. Difusión a través de las partes aéreas de la planta

Ciertos compuestos orgánicos pueden alcanzar las partes aéreas de la planta (tallo y hojas) en forma de moléculas gaseosas libres, disueltos en gotas de agua o sorbidos en partículas de polvo (Figura I.8.c.). La deposición de la fase gaseosa o de partículas de polvo se denomina deposición seca, mientras que a la deposición de contaminantes disueltos en agua se le llama deposición húmeda. Los compuestos depositados sobre las superficies de la planta pueden incorporarse en los lípidos cuticulares, difundirse a través de la membrana lipídica y eventualmente ser translocados a través del floema. Otra opción puede ser la entrada del xenobiótico en forma gaseosa a través de los estomas (Riederer et al., 2002). Se ha sugerido que además de lípidos y ceras, la cutícula presenta poros acuosos formados por hebras de carbohidratos sumergidos en las interfaces lipídicas (Eichert y Goldbach, 2008; Schonherr, 2006), los cuales podían afectar directamente la entrada de microcontaminantes orgánicos en la planta.

La incorporación de microcontaminantes está influenciada por la temperatura, humedad relativa, concentración en el aire del compuesto, las características intrínsecas de la planta (p. ej., especie, composición de la cutícula), tiempo de exposición, el modo de transporte del compuesto (fase gaseosa, sorbido en una partícula o disuelto), y por último sus propiedades fisicoquímicas (p. ej., hidrofobicidad, volumen molar, volatilidad) (Reichenauer y Germida, 2008).

La hidrofobicidad del microcontaminante en esta ruta de incorporación, como en el resto, es de gran importancia. Trapp y McFarlane (1995), reportaron una mayor incorporación y translocación a través de los tallos para aquellos compuestos con un $\log K_{ow}$ entre 1 y 3. A diferencia de la raíz, en los tallos las moléculas no deben atravesar una endodermis, lo que permite una mayor movilidad a compuestos polares. La translocación de compuestos hidrofóbicos se encuentra limitada por la sorción que sufren en la propia cutícula. Adicionalmente, estos compuestos no se translocan con facilidad mediante el floema debido a su baja solubilidad.

Se ha descrito también la influencia del volumen molar en la incorporación de compuestos orgánicos a través de las hojas. En un estudio de incorporación de 28 compuestos orgánicos en membranas cuticulares, se correlacionó la constante cinética de desorción en membrana con el volumen molar (Baur et al., 1996). De esta forma mediante el volumen molar y pendiente de la regresión se puede predecir la constante de desorción de un compuesto dado.

I.3.2. Transporte

Con la excepción de microcontaminantes con estructuras análogas a las fitohormonas, no existe evidencia que apunte a la incorporación y transporte activos para este tipo de compuestos (Trapp y Mc Farlane, 1995). El transporte pasivo se encuentra determinado por difusión y solubilidad en agua y membrana cuticular.

La propiedad más importante para el transporte de sustancias químicas no-ionizadas es la hidrofobicidad. Briggs y colaboradores (1983) definieron el factor de concentración en el tallo (SCF, *Stem Concentration Factor*) como el ratio entre la concentración de compuesto en el tallo y su concentración en la solución externa. Adicionalmente describieron el movimiento de los contaminantes de la raíz hacia el tallo en lo que denominaron el factor de concentración en el xilema (TSCF, *Transpiration Stream Concentration Factor*). El concepto anterior fue definido como el ratio entre la concentración del analito diana en la savia del xilema y su concentración en la solución externa.

Briggs y colaboradores (1982) midieron el TSCF para fenilureas en cebada. Estos compuestos cubrían un amplio rango de K_{ow} , el óptimo en translocación se obtuvo para un $\log K_{ow}$ de 1,8. Al realizar este experimento en soja, Sicbaldi y colaboradores (2000), encontraron que el valor máximo de TSCF correspondía a un valor $\log K_{ow}$ de 3. Para que un compuesto sea capaz de llegar al sistema vascular, éste debe atravesar la barrera entre el sistema apoplástico y simplástico. De esta manera, el TSCF se puede definir como una medida de la facilidad del compuesto en atravesar dicha barrera.

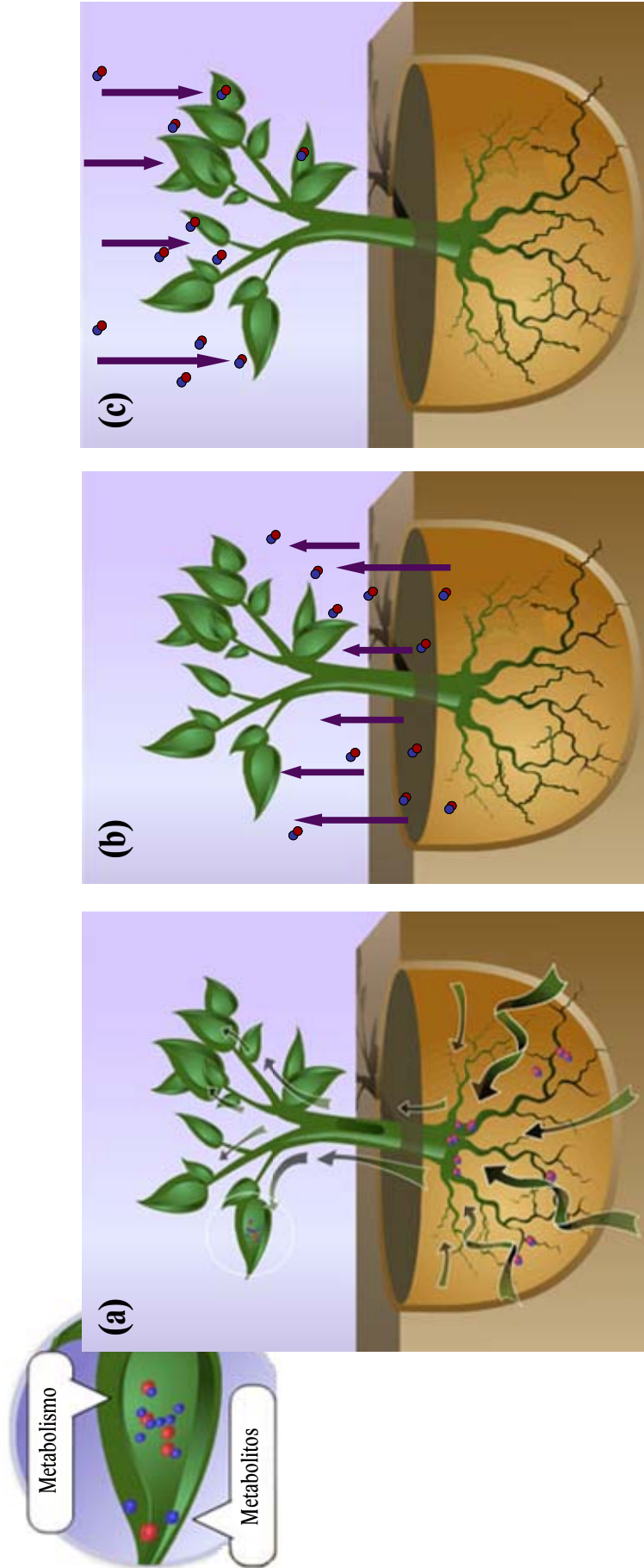


Figura 1.8. Vías de incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas. (a) Incorporación radicular, (b) incorporación a partir de la fase vapor, (c) incorporación por difusión a través de las partes aéreas de la planta. Adaptado de University of Maryland University College, (2011).

La incorporación de ácidos débiles depende del pH y de la polaridad del compuesto ionizado, que es superior a su contraparte no-ionizada. De esta manera el movimiento de los ácidos débiles a través de las membranas puede variar con el pH. Por ejemplo, los ácidos carboxílicos con valores de pK_a entre 3 y 6 producen aniones típicamente 3 o 4 unidades de $\log K_{ow}$ más bajas (más polares) que su contraparte no disociada. Por lo que además del pH de la savia del xilema y de compartimientos adyacentes, la translocación de estos compuestos depende también de su pK_a (Castro et al., 2004; Trapp, 2000).

En resumen se puede decir que los compuestos no-ionizados se mueven más fácilmente en el flujo acuoso del xilema y por tanto, pueden desplazarse más libremente entre los tejidos tanto del xilema como del floema.

I.3.3. Sistemas de detoxicación de xenobióticos en plantas

Las plantas, como el resto de los organismos del medio ambiente, están continuamente expuestas a compuestos químicos potencialmente tóxicos. Tales compuestos orgánicos son incorporados por la planta, a pesar de no tener ninguna utilidad para ésta (Coleman et al., 1997). De este modo, las plantas han desarrollado mecanismos múltiples para responder a las alteraciones sufridas por el medio que las rodea. Entre estos mecanismos se cuentan los sistemas de detoxicación para la eliminación de estos microcontaminantes, debido a que la catabolización directa de estos compuestos no es posible.

Sandermann (1992) denominó como “Green liver” al sistema de detoxicación de las plantas por la similitud existente entre el metabolismo vegetal de microcontaminantes orgánicos y las funciones del hígado animal. Las enzimas responsables del metabolismo “Green liver” tienen la capacidad de transformar y controlar compuestos producidos por la planta, adicionalmente, el extenso número de sustratos posibles para este sistema enzimático permite a las plantas la transformación de muchos microcontaminantes orgánicos. El sistema de detoxicación de las plantas que involucra tanto microcontaminantes orgánicos naturales como antropogénicos (p. ej., pesticidas) consiste en tres procesos secuenciales:

- (I) transformación
- (II) conjugación
- (III) compartimentalización

De manera general, las transformaciones químicas sufridas por los microcontaminantes orgánicos involucran al menos una reacción enzimática que resulta en la conversión del compuesto en productos químicamente distintos al compuesto parental; así, los productos de la primera fase son usualmente menos tóxicos y más hidrofílicos que el compuesto del que proceden. El incremento en la solubilidad del producto disminuye la habilidad del contaminante de interaccionar con las membranas celulares, restringiendo su presencia y distribución en células y tejidos.

Fase I: Transformación

El objetivo de la primera etapa del sistema de detoxificación es la funcionalización de las moléculas. Los productos de esta fase son usualmente más hidrofílicos, lo que facilita su transporte. Y al poseer grupos reactivos (p. ej., -OH, -COOH), tienen una actividad bioquímica superior a la del compuesto parental, es decir, son especies más reactivas y generalmente más tóxicas que el compuesto original.

En esta fase, el microcontaminante orgánico es asimilado por un tejido de la planta capaz de realizar transformaciones enzimáticas de oxidación, hidroxilación, deshalogenación, reducción, esterificación e hidrólisis. La transformación más común y mejor descrita es la oxidación catalizada por oxigenasas de la familia citocromo P450. Estas enzimas actúan sobre una amplia variedad de sustratos y pueden encontrarse en una gran variedad de organismos. En plantas superiores, las monooxigenasas convierten moléculas hidrofóbicas en especies más reactivas y polares. Otro grupo de enzimas importante en esta etapa es el de las carboxilesterasas que hidrolizan los ésteres carboxílicos, compuestos hidrofóbicos. Los ácidos carboxílicos que resultan de esta reacción son más reactivos que la sustancia parental, y pueden ser conjugados con otras moléculas durante la fase II.

Fase II: Conjugación

En esta fase, la conjugación de los microcontaminantes orgánicos activados durante la fase I o aquellos ya funcionalizados naturalmente se conjugan con moléculas endógenas, p. ej., azúcares, péptidos. Los compuestos conjugados poseen las características fisicoquímicas necesarias para su posterior compartimentalización, es decir son menos tóxicos para la planta (puede no ser el caso en humanos), y más solubles en agua. Ésta es una fase de protección a la planta en el proceso de detoxificación.

El tipo de reacción que sufrirán los microcontaminantes orgánicos dependerá de su estructura química. Los grupos funcionales -OH, -NH₂, -SH, y -COOH usualmente desencadenan reacciones catalizadas por las glicosil-transferasas. Por otro lado, la presencia de dobles enlaces conjugados, halógenos o grupos nitro determina la acción de glutatión S-transferasas (GSTs, Glutathion S-transferases) (Schroder y Collins, 2002).

Conjugación mediada por glicosiltransferasas. Las glicosiltransferasas son una amplia familia de enzimas que transfieren azúcares activados con nucleótidos-difosfato a sustratos de baja masa molecular. Estas enzimas cumplen un papel importante en la defensa de la planta y su tolerancia al estrés.

La glicosilación de metabolitos en la fase II del sistema de detoxificación es importante para mejorar su estabilidad, debido a que al ser conjugados con glucosa son atrapados en la vacuola y de esta manera se evita su degradación a compuestos fitotóxicos, p. ej., cianuros tóxicos, aldehídos o isocianatos.

Conjugación mediada por glutatión S-transferasas. El glutatión es un metabolito importante que actúa como agente reductor, protegiendo la célula contra el estrés oxidativo y resguardándola contra la toxicidad química mediante las reacciones de conjugación de la fase II.

Esta modificación química es de gran importancia ya que se ha relacionado la disponibilidad del glutatión y las GSTs con la resistencia de la planta contra herbicidas. A diferencia de la conjugación mediante glicosilación, la conjugación catalizada por las GSTs es una reacción de sustitución sobre los grupos funcionales -OH o -NH que conlleva la eliminación de los grupos electrófilos de la molécula diana (Sandermann, 1992; Schroder y Collins, 2002). De esta manera, aun si hubiese una descomposición de este producto, la toxicidad es usualmente menor a la del compuesto parental. No así en el caso de los derivados glicosados, que pueden romperse mediante la acción de glucosidasas, perdiendo de esta manera el resto de glucosa y produciendo un compuesto reactivo (Schroeder et al., 2007).

Fase III: Compartimentalización

Es de esperar que la acumulación de conjugados podría tener como consecuencia una cierta fitotoxicidad, y podría incluso inhibir el sistema enzimático (inhibición por sustrato). Tales procesos se evitan en la fase final del sistema de detoxicación, donde los compuestos modificados en la fase II se transportan activamente desde el citosol a la vacuola o la pared celular.

La transferencia de los compuestos conjugados con UDP-azúcar o glutatión se lleva a cabo, indistintamente, mediante los transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*). Éstos juegan un rol central en los procesos de detoxicación en muchas especies desde arqueobacterias hasta humanos. Estos transportadores parecen ser específicos para el glutatión o azúcar, pero no para el microcontaminante. La información anterior, significaría que tanto el glutatión como los azúcares funcionan como etiquetas en la molécula, identificándola para su almacenamiento.

En muchos trabajos se describe que la vacuola es el lugar de almacenamiento final de los xenobióticos. Sin embargo, muchos de los conjugados del glutatión y algunos glicosados sufren reacciones posteriores de metabolización, y terminan finalmente en el apoplasto, rizosfera o incluso en la atmósfera. Por lo que la vacuola puede ser un lugar de almacenamiento intermedio encargado de mantener altas velocidades de reacción durante la etapa de conjugación y regular la concentración de las enzimas involucradas (Schroder y Collins, 2002).

Capítulo II




Objetivos y Estructura General

“All the water that will ever be is, right now”
National Geographic

“Fiat Panis”
Lema latino, FAO

II.1. Objetivos generales

Los objetivos generales de la presente Tesis doctoral son los siguientes:

-  Desarrollar y validar una metodología analítica multiresiduo para la determinación de microcontaminantes orgánicos en matrices vegetales a niveles traza.
-  Monitorizar la presencia y concentración de microcontaminantes orgánicos en el agua de riego de dos zonas agrícolas catalanas sujetas a regímenes de irrigación con aguas regeneradas.
-  Evaluar el potencial de incorporación de microcontaminantes orgánicos específicos en plantas modelo vía radicular y vía deposición en la superficie de la hoja.

II.2. Objetivos específicos

En este contexto y para la consecución de los objetivos generales planteados, la presente Tesis cubre los objetivos específicos que se detallan a continuación.

1. Desarrollar y validar un método analítico para la determinación multiresiduo de 13 microcontaminantes orgánicos en muestras vegetales empleando la dispersión en matriz sólida (MSPD, *Matrix Solid Phase Dispersion*), extracción con disolventes a alta presión (PSE, *Pressurized Solvent Extraction*) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS y GC-MS/MS).
2. Aplicar la metodología analítica desarrollada a la determinación de microcontaminantes orgánicos en cultivos de interés comercial en condiciones reales (alfalfa, *Medicago sativa* y manzano, *Malus domestica*).
3. Evaluar la presencia y concentración de 47 microcontaminantes orgánicos pertenecientes a 6 familias químicas: fármacos, productos de cuidado personal, pesticidas, subproductos de desinfección, fenoles estrogénicos, retardantes de llama y antioxidantes en aguas utilizadas para el riego agrícola en dos zonas agrícolas catalanas (Torroella de Montgrí y Parc Agrari del Baix Llobregat).
4. Aplicar la metodología estadística de análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*) para la determinación de los factores que afectan los niveles y distribución de los contaminantes elegidos en la red de irrigación de Torroella de Montgrí.
5. Aplicar modelos matemáticos para la evaluación del potencial de incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas a partir de su concentración en aguas de riego, su K_{ow} y el carbono orgánico del suelo.
6. Evaluar la incorporación in vitro de contaminantes emergentes específicos utilizando como plantas modelo la lechuga (*Lactuca sativa*) y el espatifilo (*Spathiphyllum* sp.).

7. Evaluar la incorporación cuticular de microcontaminantes orgánicos específicos utilizando como planta modelo la lechuga, *Lactuca sativa*.

II.3. Estructura general

La Tesis doctoral, estructurada en cinco capítulos, se presenta en forma de compendio de artículos. En el primer capítulo se describen: usos de las aguas regeneradas y requerimientos específicos en la irrigación agrícola, origen, destino final, además de efectos de microcontaminantes orgánicos en el medio ambiente y las principales vías de incorporación de los microcontaminantes orgánicos en plantas y su destino final una vez incorporados.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis, así como su discusión se recogen en los capítulos III, IV y V.

El capítulo III describe las metodologías analíticas utilizadas en la presente Tesis; se centra en el desarrollo y optimización de una metodología para la determinación de microcontaminantes orgánicos en tejido vegetal a niveles traza (Artículo 1).

Artículo científico 1. Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Peñuela, G. and Bayona, J.M. (2009) *Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination.* Analytical and Bioanalytical Chemistry 394(5), 1319-1327.

En el capítulo IV se caracterizan las aguas regeneradas utilizadas para riego en dos zonas agrícolas de Cataluña: Torroella de Montgrí (Artículo 2) y Parc Agrari del Baix Llobregat (Artículo 3). Los resultados del estudio de la zona de Torroella de Montgrí ayudaron a establecer los factores medioambientales (variabilidad temporal y aportes de aguas de río o regeneradas y material particulado disuelto) que afectan los niveles y distribución de los analitos diana estudiados. Por otra parte, en el estudio realizado en el Parc Agrari del Baix Llobregat, además de determinar la calidad química de las aguas de riego se evalúa, a partir de modelos matemáticos, el potencial de incorporación de microcontaminantes orgánicos en cultivos vegetales.

Artículo científico 2. Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Matamoros, V. and Bayona, J.M. (2011) *Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading.* Water Research 45(1), 221-231.

Artículo científico 3. Calderón-Preciado, D., Matamoros, V. and Bayona, J.M. (2011) *Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network.* Science of the Total Environment 412-413(0), 14-19.

En el capítulo V se integran los artículos 4 y 5. Este último apartado trata los resultados conseguidos en materia de incorporación radicular y foliar de microcontaminantes orgánicos específicos en dos especies vegetales modelo (espatifilo y lechuga), ambos realizados *in vitro*.

Artículo científico 4. Calderón-Preciado, D., Renault, Q., Matamoros, V., Cañameras, N. and Bayona, J.M. (2012) *Uptake of organic emergent contaminants in spath and lettuce: an in vitro experiment.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. DOI: 10.1021/jf2046224

Artículo científico 5. Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., Biel, C., Save, R., Bayona, J.M. (2012) *Foliar uptake of emerging and priority contaminants. An in vitro evidence*. Submitted to Journal of Food Chemistry.

Además de los artículos publicados, se incluyen antecedentes específicos y una discusión adicional de resultados en cada capítulo con tal de proporcionar una mejor conexión entre los resultados presentados en cada capítulo y resaltar su relevancia.

Capítulo III

Metodologías Analíticas para la Determinación de Microcontaminantes Orgánicos en Matrices Ambientales

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale. We should not allow it to be believed that all scientific progress can be reduced to mechanisms, machine, gearings, even though such machinery has its own beauty.”

Marie Curie

III.1. Introducción al capítulo

La preparación de muestra es una de las etapas más importantes en el análisis de microcontaminantes orgánicos en matrices ambientales a niveles traza. En cualquier procedimiento de preparación de muestra, especialmente en los que contienen un gran número de componentes, se hace esencial el enriquecimiento de los analitos diana. Además, la eliminación, en la medida de lo posible, de interferencias procedentes de la matriz, resulta necesaria.

En este capítulo se describen las metodologías analíticas empleadas a lo largo de la presente Tesis para la determinación de contaminantes orgánicos en muestras acuosas y de material vegetal (artículos 1 y 2, sección III.8 y IV.5).

III.2. Determinación de microcontaminantes orgánicos en matrices acuosas

III.2.1. Antecedentes analíticos

En la presente sección se describen de manera breve las técnicas extractivas aplicadas en la determinación de PPCPs, contaminantes prioritarios y otros compuestos de interés en aguas. Se proporciona también información acerca de algunas de las técnicas de derivatización más utilizadas para la determinación de estos compuestos mediante cromatografía de gases (*GC, Gas Chromatography*) acoplada a espectrometría de masas (*MS, Mass Spectrometry*).

Extracción asistida por ultrasonidos

Los ultrasonidos son ondas electromagnéticas de frecuencias comprendidas entre 16 kHz y 1 GHz. Las vibraciones ultrasónicas son una fuente de energía que facilita la desorción de algunos analitos de la matriz en la que se encuentran asociados (Romanik et al., 2007). La cavitación y la fricción entre las capas límite e intersticial que tienen lugar durante este tipo de extracción incrementan la velocidad de difusión de los analitos entre la muestra y el solvente.

Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) se utiliza para separar compuestos en una muestra acuosa en base a su polaridad y solubilidad en disolventes específicos. La SPE generalmente se lleva a cabo percolando la muestra acuosa a través de un cartucho empacado o membrana con el sorbente apropiado que actúa como fase estacionaria. Idealmente, los analitos se sorberán en la fase estacionaria, mientras aquellos que interfieren en el análisis no deberían ser retenidos. Los analitos sorbidos se eluyen con una cantidad relativamente pequeña de disolvente orgánico (3-5 veces el volumen muerto del adsorbente) (Aga, 2008).

Con el objetivo de incrementar la selectividad del proceso de extracción, la SPE utiliza diferentes tipos de fases estacionarias en función de los analitos a estudiar. Destacan las fases reversa, normal, de intercambio

iónico, polimérica y de adsorción. La fase reversa son grupos hidrofóbicos C18 (octadecil) y C8 (octil) enlazados covalentemente a la sílice, es la más comúnmente utilizada para la extracción de analitos hidrofóbicos. La fase normal utiliza grupos cianopropilo, diol, o aminopropilo enlazados covalentemente a la sílice, siendo éstas apropiadas para contaminantes polares, p. ej., compuestos catiónicos y ácidos orgánicos. Las fases de intercambio iónico en SPE se basan en la interacción electrostática de un grupo funcional cargado positivamente o negativamente del analito con otro grupo funcional cargado de la superficie del sorbente de carga contraria. Generalmente se utilizan aminas cuaternarias, ácidos sulfónicos o ácidos carboxílicos enlazados covalentemente a la sílice. Las fases poliméricas, con características hidrofóbicas e hidrofílicas, son capaces de extraer simultáneamente compuestos polares y apolares, siendo éstas las más utilizadas en la determinación de PPCPs en muestras acuosas. La SPE de adsorción se basa en las interacciones del analito con materiales sin modificar, como alúmina, florisil, carbón grafitado y otros productos con base de resina. La SPE tiene ciertas ventajas frente a la extracción líquido-líquido convencional: a) se utilizan volúmenes reducidos de disolventes, b) no se forman emulsiones y c) es posible automatizar la técnica reduciendo el costo y tiempo de análisis (Aga, 2008; Zhang et al., 2007).

Derivatización

La GC-MS se ha utilizado ampliamente en la determinación de contaminantes emergentes como es el caso de los fármacos. Sin embargo, muchas de las aplicaciones de GC-MS para este tipo de compuestos requieren de una derivatización previa ya que en su gran mayoría son analitos polares que no pueden ser analizados de manera directa mediante GC-MS por su baja volatilidad. La efectividad de la derivatización depende del tipo de compuesto estudiado y del tipo de agente derivatizante utilizado. Los agentes más comúnmente empleados son los anhídridos de ácido, los haluros de bencilo, alquilformiatos y menos frecuentemente el diazometano. Por otra parte, algunos compuestos son termolábiles y se descomponen durante la determinación cromatográfica, por lo que resulta necesario utilizar patrones de recuperación (*surrogates*) para corregir las pérdidas que ocurren durante el proceso analítico. En la presente Tesis, se ha utilizado un agente derivatizante de pequeña masa molecular: TMSH (hidróxido de trimetilsulfonio). Este reactivo es capaz de metilar, en condiciones de elevadas temperaturas (>280 °C), grupos carboxílicos e hidroxilos ácidos de los analitos de interés.

La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ofrece una buena alternativa, ya que ésta no requiere de una derivatización previa para la determinación de PPCPs pero en contrapartida su coste es muy superior. Además del mayor coste instrumental, la LC-MS/MS requiere del uso ineludible de patrones marcados isotópicamente para corregir el problema asociado a un rendimiento de ionización muy variable por efecto de la matriz (Gosetti et al., 2010).

En la Tabla III.1. se describen algunos de los procedimientos analíticos utilizados en la determinación de estos compuestos, incluyendo el agente derivatizante empleado.

Tabla III.1. Algunos procedimientos analíticos utilizados para la determinación de fármacos en muestras acuosas.

Configuración instrumental	Compuestos	LOD, ng L^{-1}	Muestras acuosas	Referencias
SPE-DER(MSTFA)-GC-MS	AINE	2 – 6	Agua potable, agua de río	[1]
SPE-DER(MTBSTFA)-GC-MS	AINE	20 – 50	Agua residual y efluente de EDAR	[2]
SPE-DER(diazometano)-GC-MS	AINE	1 – 10	Agua superficial	[3-5]
SPE-DER(MCM)-GC-MS	AINE	1	Agua superficial	[6]
SPE-LC-MS/MS	Fármacos	20 – 20000	Agua residual, superficial y potable	[7]
Dual SPME-LC-MS/MS	Fármacos	5 – 50	Agua residual	[8]
SPE-UPLC-MS/MS	Fármacos	0, 3 – 50	Agua superficial	[9]
SPE-UPLC-[Q-TOF-MS]	Fármacos	10 – 500	Agua de río, afluente y efluente de EDAR	[10]

¹(Kosjek et al., 2005), ²(Rodríguez et al., 2003), ³(Buser et al., 1998), ⁴(Buser et al., 1999), ⁵(Tixier et al., 2003), ⁶(Weigel et al., 2002), ⁷(Ferrer et al., 2010), ⁸(Unceta et al., 2010), ⁹(Kasprzyk-Hordern et al., 2007), ¹⁰(Petrovic et al., 2006).

DER: Derivatización

MSTFA: N-metil, N-trimetilsilil-trifluoroacetamida

MTBSTFA: N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida

MCM: Methyl chloromethanoate

LC: Liquid Chromatography

MS/MS: Tandem Mass Spectrometry

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography

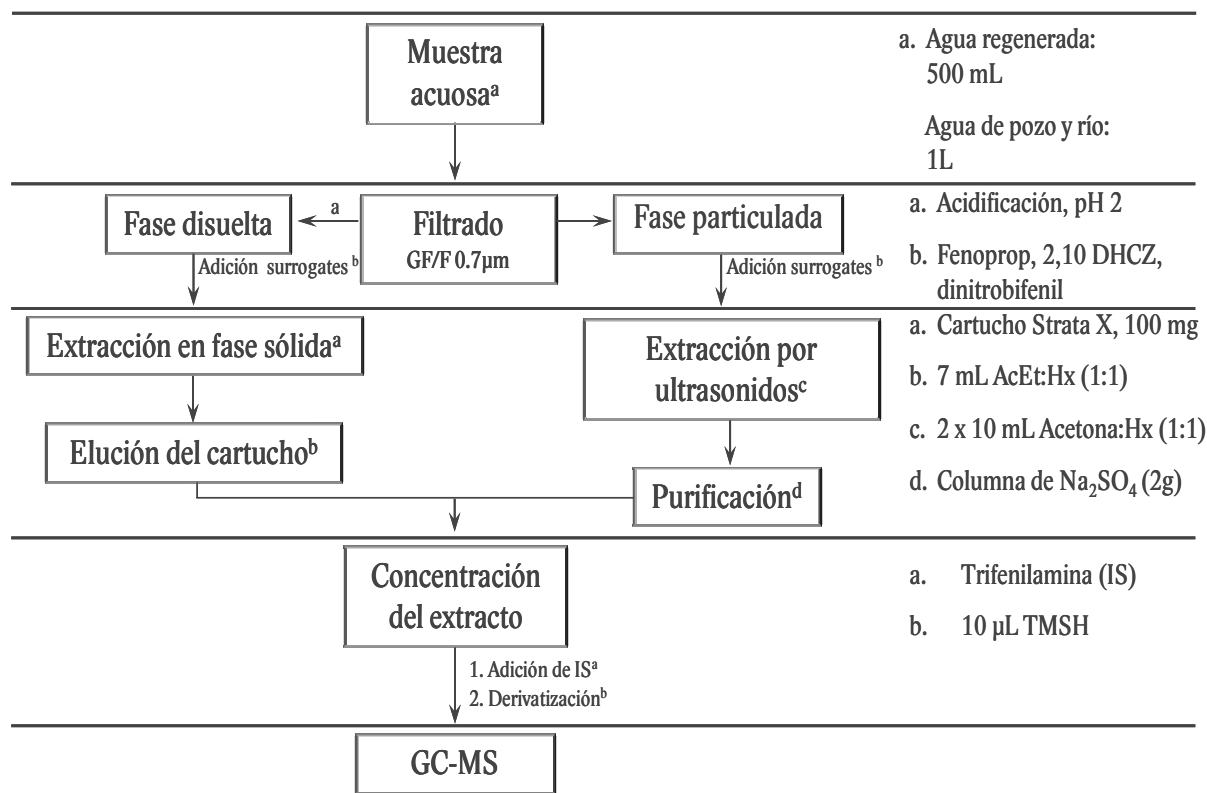
Q-TOF: Quadrupole-Time-of-Flight

III.2.2. Preparación de muestra

La Figura III.1. muestra el esquema general de la metodología analítica utilizada para la determinación de contaminantes orgánicos en las fases disuelta y particulada de matrices acuosas (agua regenerada y de río). La metodología aplicada para la fase disuelta fue desarrollada y validada previamente por Matamoros et al. (2005), mientras que el procedimiento aplicado para la extracción y análisis de la fase particulada se describe en Matamoros y Bayona (2006). Una vez las muestras fueron recogidas, se transportaron refrigeradas al laboratorio para su procesamiento. El tiempo de almacenamiento de las muestras fue siempre inferior a 72 h.

Existen diferentes métodos para la extracción de este tipo de compuestos en matrices acuosas (Tabla III.1). Sin embargo, debido a que se ha reportado ampliamente el uso satisfactorio de SPE en métodos multiresiduo, donde se ha logrado la extracción simultánea de analitos diana con estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas diferentes, se optó por su aplicación en esta Tesis.

Para ello se emplearon cartuchos de fase polimérica STRATA X con propiedades tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, conferidas por una superficie copolimérica de divinilbenzeno y estireno modificado con un área superficial comprendida entre 760 y 820 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ y un tamaño de poro de entre 81 y 91 Å. Estas propiedades hacen que dicho cartucho sea idóneo para la extracción de microcontaminantes tanto polares como no polares (Phenomenex, 2011).



AcEt: Acetato de etilo
HX: n-Hexano

Figura III.1. Esquema de la metodología analítica para la determinación de PPCPs, contaminantes prioritarios y otras sustancias de interés en muestras acuosas.

III.2.3. Separación cromatográfica y detección

Los extractos obtenidos mediante la metodología descrita en la sección anterior fueron analizados en un GC-MS (TRACE, Thermo Scientific) en modo impacto electrónico (EI) con una energía de ionización de 70 eV. La inyección de las muestras (1µL) se realizó en modo *splitless* y la separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna DB-5 (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm de grosor de fase. El horno cromatográfico se programó con la siguiente rampa de temperatura: 65 °C en isoterma por 2 min, la temperatura se elevó hasta 120 °C (15 °C min⁻¹), después a 160 °C (4 °C min⁻¹), luego a 220 °C (7 °C min⁻¹), posteriormente a 290 °C (5 °C min⁻¹) y finalmente hasta 320 °C (15 °C min⁻¹) donde permaneció durante 5 min. La cuantificación de las muestras se realizó mediante una recta de calibración externa, utilizando trifenilamina (TPA) como estándar interno (IS). Las regresiones que se obtuvieron a partir de las rectas de calibrado siempre fueron satisfactorias con un coeficiente de regresión, $r^2 > 0,99$. La identificación de los compuestos se realizó considerando la normativa europea SANCO/10232/2006, que establece que la identificación y confirmación de los analitos diana se realiza de acuerdo al siguiente criterio: (i) cambio en el tiempo de retención con respecto al estándar de menos de 2 desviaciones estándar (Sd) (ii) tres m/z característicos por compuesto (excepto del patrón de recuperación del que se piden dos m/z) y (iii) las intensidades de m/z comparados con el estándar no deben superar un 15% de variación.

En la Figura III.2. se muestra un cromatograma típico de GC-MS de una muestra del efluente de una EDAR en donde se señalan algunos de los compuestos identificados.

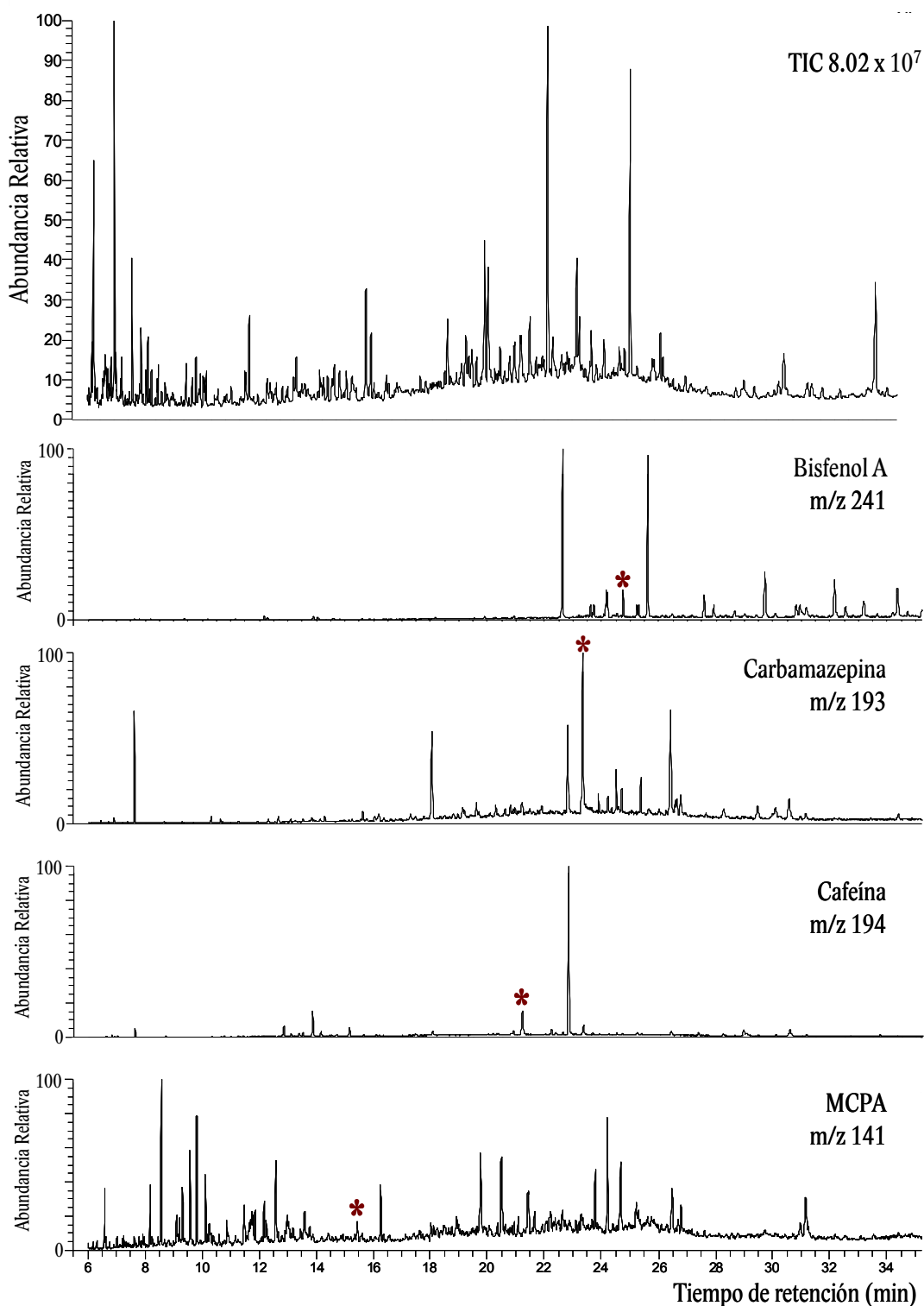


Figura III.2. Registro de los iones totales (TIC) y las trazas iónicas correspondientes a los iones característicos de compuestos selectos. Los picos característicos se señalan con un asterisco. Muestra: efluente de EDAR Torroella de Montgrí.

III.2.4. Validación de la metodología analítica

Los límites de detección (LODs) se calcularon a partir de la señal en el blanco de método correspondiente al tiempo de retención de los analitos en estudio normalizada con el área del IS (Área del blanco/Área del IS = A_{blanco}/A'). El LOD del método se definió como la media del blanco de método por triplicado, más tres veces su Sd ($A_{\text{blanco}}/A' + 3Sd_{\text{blanco}}$). En la Tabla III.2. se presentan las figuras de mérito de los compuestos individuales analizados mediante esta metodología.

Tabla III.2. LODs en la determinación de microcontaminantes orgánicos en muestras acuosas mediante SPE-GC-MS.

Compuesto	LOD ₁ ng L ⁻¹	r ²	Recuperación* (%)	CV* (%)	Compuesto	LOD ₁ ng L ⁻¹	r ²	Recuperación* (%)	CV* (%)
Fármacos					Antioxidantes				
Diclofenaco	51	0.999	89 ± 10	8	BHT	33	0.998	69 ± 6	9
Carbamazepina	21	0.997	101 ± 1	1	BHA	124	0.997	NC	NC
Ácido clofibrico	15	0.996	80 ± 2	5	Agentes ignífugos				
Cafeína	33	0.997	65 ± 3	5	Tributilfosfato	91	0.998	NC	NC
Ibuprofeno	2	0.993	85 ± 2	5	Tris cloroetil fosfato	71	0.998	105 ± 5	5
Flunixinina	92	0.995	104 ± 2	3	Pesticidas				
Ketoprofeno	71	0.997	86 ± 9	7	Dimetoato	81	0.996	NC	NC
Acetaminofeno	37	0.997			Clorpirifos	286	0.999	NC	NC
Naproxeno	34	0.999	93 ± 1	2	Atrazina	46	0.992	89 ± 5	5
Triclosan	22	0.999	93 ± 4	4	Alacloro	31	0.999	96 ± 2	3
Productos de cuidado personal					Simazina	127	0.999	88 ± 5	8
Ambrettolida	36	0.999	41 ± 3	7	Diclobenil	18	0.999	NC	NC
Metil dihidrojasmonato	37	0.993	92 ± 5	5	Linuron	128	0.995	NC	NC
Galaxolida	6	0.998	88 ± 4	4	Lindano	58	0.993	NC	NC
Tonalida	22	0.998	96 ± 4	4	Deltametrina	58	0.992	NC	NC
Cashmeran	27	0.999	80 ± 4	5	Clorotalonil	21	0.999	NC	NC
Celestolide		0.999	86 ± 5	8	Cipermetrina	155	0.998	NC	NC
Ácido hidrocínámico	26	0.997	82 ± 6	8	Diuron	2	0.996	NC	NC
Fenoles estrogénicos					MCPA	147	0.997	92 ± 4	3
Bisfenol A	30	0.999	95 ± 8	8	Diazinon	47	0.999	NC	NC
4-tert-octilfenol	97	0.992	NC	NC	Mecoprop	65	0.999	NC	NC
Nonilfenol	81	0.996	NC	NC					

* Calculado a partir de n=3, a un nivel de dopaje de 0.2 - 1 µg L⁻¹. (Matamoras et al., 2010).

NC: No calculado

CV: Coeficiente de variación

III.3. Determinación de THMs en matrices acuosas

III.3.1. Antecedentes analíticos

La determinación de THMs en muestras acuosas se lleva a cabo mayoritariamente utilizando GC con detección por captura de electrones (ECD) o acoplamiento a MS (Tabla III.3.). Como se ha explicado en el Capítulo I de la Tesis (Tabla I.10.), la presencia de THMs en aguas naturales y/o potables abarca desde las decenas de ng L^{-1} hasta el centenar de $\mu\text{g L}^{-1}$. Debido a que la instrumentación analítica disponible no es capaz de alcanzar niveles de concentración tan bajos y a que la GC no permite el uso de disolventes acuosos, se hace necesaria una etapa de concentración previa de la muestra. En la Tabla III.3. se recogen algunos de los métodos analíticos más utilizados en la determinación de THMs en aguas de diferente naturaleza.

Tabla III.3. *Algunos procedimientos analíticos utilizados en la determinación de trihalometanos en muestras acuosas.*

Configuración instrumental	LOD, ng L^{-1}	Muestras acuosas	Referencias
DAI-GC-ECD	10 - 5000	Aguas potable, superficial, de piscina, de río, de lluvia	[1,2]
DAI-GC-MS	70 - 5400	Aguas superficiales y de río	[3, 4]
LLE-GC-ECD	5 - 1000	Aguas potable y embotellada	[2, 5-7]
LLE-GC-MS	10 - 200	-	[6, 8]
LLE-GC-ICP-MS	3 - 6	Agua de grifo	[9]
HS-LPME-GC-ECD	150 - 400	Agua de grifo y pozo	[10]
DLLME-GC-ECD	5 - 40	Agua potable	[11]
HS-GC-MS	400 - 700	Aguas de río, piscina y grifo	[2, 12, 13]
HS-GC-ECD	60 - 200	Agua de grifo	[14, 15]
HS-PTV-FGC-MS	0,4 - 3	Agua de grifo, ultrapura y aguas minerales	[16]
HS-SPME-GC-ECD	5 - 10	Agua potable	[17]
HS-SPME-GC-MS	0,3 - 10	Agua potable, grifo y río	[18]
SPME-GC-MS	20 - 500	Agua potable	[19]
PT-GC-DELCD	600 - 900	Agua potable, de piscina y destilada	[20]
PT-GC-MS	20 - 500	Agua de grifo, mar, mineral y nieve	[2]
PT-GC-ECD	20 - 70	Agua de grifo, mar, y agua de mar clorada,	[21]
PT-GC-AED	50 - 180	Agua de grifo y bebidas	[22]

¹(Biziuk et al., 1996); ²(Golfinopoulos et al., 2001); ³(Aeppli et al., 2008); ⁴(Pyle y Gurka, 1994); ⁵(Leivadara et al., 2008); ⁶(Nikolaou et al., 2002); ⁷(Nikolaou et al., 2005); ⁸(Culea et al., 2006); ⁹(Gonzalez-Gago et al., 2007); ¹⁰(Zhao et al., 2004); ¹¹(Kozani et al., 2007); ¹²(Caro et al., 2007); ¹³(Serrano y Gallego, 2007); ¹⁴(Gallard y von Gunten, 2002); ¹⁵(Kuivinen y Johnsson, 1999); ¹⁶(Pérez Pavón et al., 2008); ¹⁷(Cho et al., 2003); ¹⁸(San Juan et al., 2007); ¹⁹(Guimaraes et al., 2008); ²⁰(Buszewski y Ligor, 2001); ²¹(Allonier et al., 2000); ²²(Campillo et al., 2004).

DAI: Direct Aqueous Injection

LLE: Liquid-Liquid Extraction

LPME: Liquid-phase microextraction

DLLME: Dispersive liquid-liquid microextraction

PTV: Programmable Temperature Vaporizer

DELCD: Dry electrolytic conductivity detector

PT: Purge and trap

AED: Atomic Emission Detection

Microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (HS-SPME)

Las metodologías que involucran la extracción en espacio de cabeza (HS, *Headspace*) han sido ampliamente utilizadas para la determinación de THMs y otros compuestos volátiles en muestras acuosas (Tabla III.3). Entre estas metodologías, una de las más utilizadas es la microextracción en fase sólida (SPME, *Solid phase microextraction*). El HS-SPME utiliza una fibra de sílice o metálica recubierta con un polímero. La fibra se introduce en el espacio de cabeza de un vial sellado, que contiene la muestra, agitado magnéticamente (Figura III.3.). Una vez alcanzado el equilibrio, la fibra se introduce en la cámara de vaporización del inyector de un GC. Seguidamente los analitos se transfieren a la columna cromatográfica mediante desorción térmica. Las principales ventajas de las técnicas en HS es que permiten la determinación de los compuestos volátiles de la muestra sin interferencia de la matriz no volátil evitando el uso de disolventes orgánicos generalmente tóxicos (Pawliszyn, 1997). En estos sistemas, la manipulación de la muestra es mínima, ya que el proceso extractivo ocurre en una sola etapa, por lo que el error se reduce.

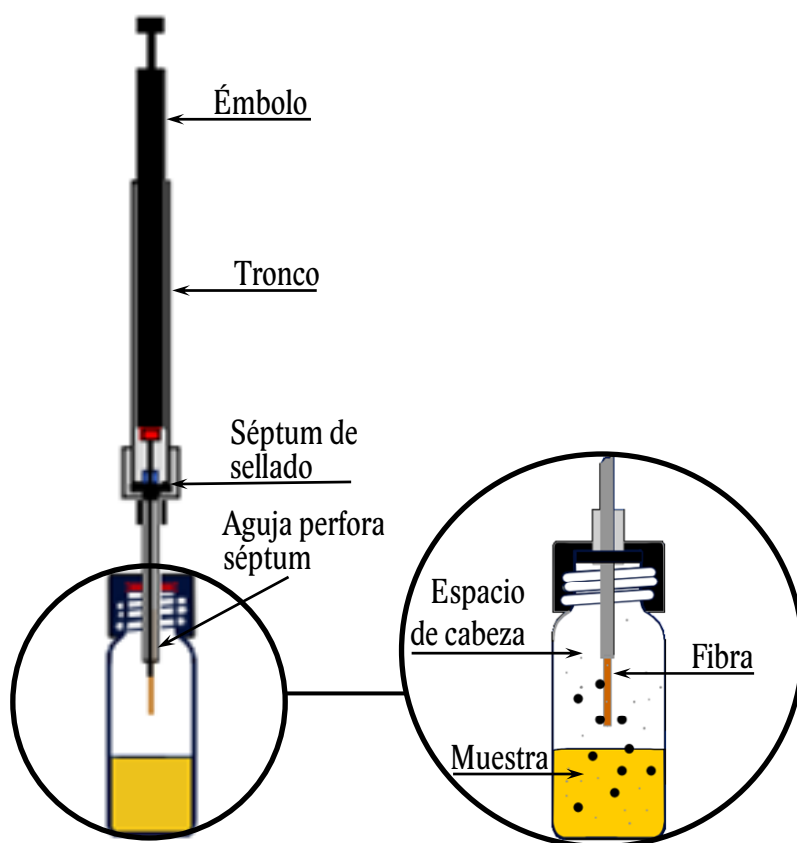


Figura III.3. Esquema de un dispositivo de microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (HS-SPME).

III.3.2. Preparación de muestras

La Figura III.4. ilustra el esquema general de la metodología analítica utilizada en la determinación de THMs en muestras acuosas. Las muestras fueron recogidas en frascos ámbar con 100 mg de ácido cítrico para evitar la formación posterior de estos compuestos a partir del cloro residual libre. Los frascos, llenados sin dejar espacio de cabeza, fueron transportados refrigerados al laboratorio para su procesamiento posterior. El tiempo de almacenamiento fue siempre inferior a 48 h.

La extracción de estos compuestos se realizó mediante HS-SPME, utilizando una fibra recubierta de carboxeno/polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (CAR/PDMS/DVB) de 2 cm de longitud y 50/30 μm de grosor de fase.

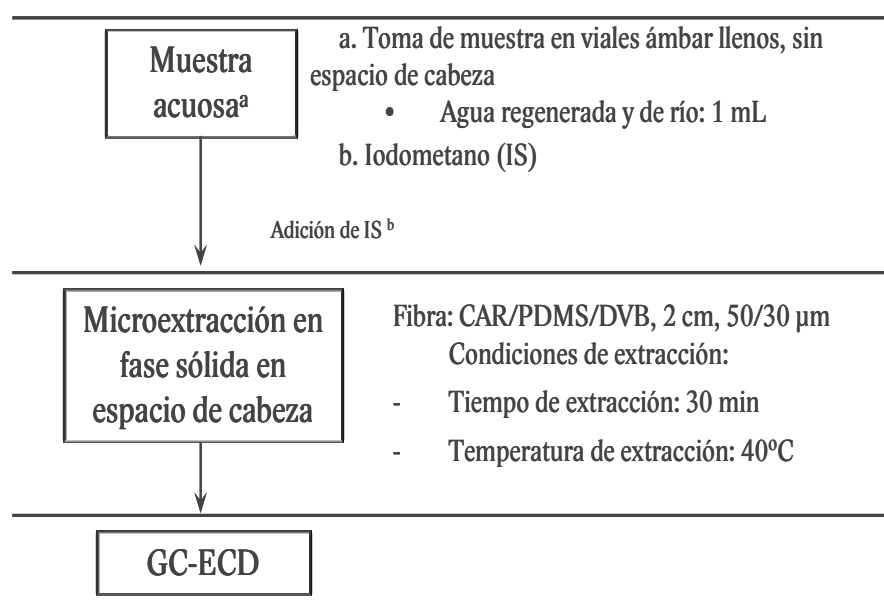


Figura III.4. Esquema de la metodología seguida en el procesamiento y análisis de muestras acuosas en la determinación de THMs.

III.3.3. Separación cromatográfica y detección

La determinación analítica de estos compuestos en las muestras acuosas se basó en la adaptación de una metodología descrita previamente (Cho et al., 2003). Una vez que las muestras fueron extraídas mediante HS-SPME, la fibra fue desorbida térmicamente en el inyector del GC-ECD. El ECD posee una elevada sensibilidad a los compuestos con elementos electronegativos en su estructura (Down y Lehr, 2005).

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna Rtx® – VGC de 60 m x 0,32 mm ID x 1,8 μm de grosor de fase. El horno cromatográfico se programó con la siguiente rampa de temperatura: 35 °C en isoterma durante 10 min, la temperatura se llevó hasta 110 °C (3 °C min⁻¹), y luego a 230 °C (10 °C min⁻¹) donde permaneció durante 10 min. La cuantificación de las muestras se realizó mediante rectas de calibrado externo normalizando la señal del compuesto individual con el estándar interno (iodometano). La

linealidad del método se mantuvo entre 0,001 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los coeficientes de regresión, r^2 , obtenidos de las rectas de calibrado fueron siempre superiores a 0,99. La identificación de los compuestos se realizó tomando como base el tiempo de retención de patrón con respecto a la muestra.

En la Figura III.5. se muestra un cromatograma típico de estos compuestos en un patrón y una muestra real analizada.

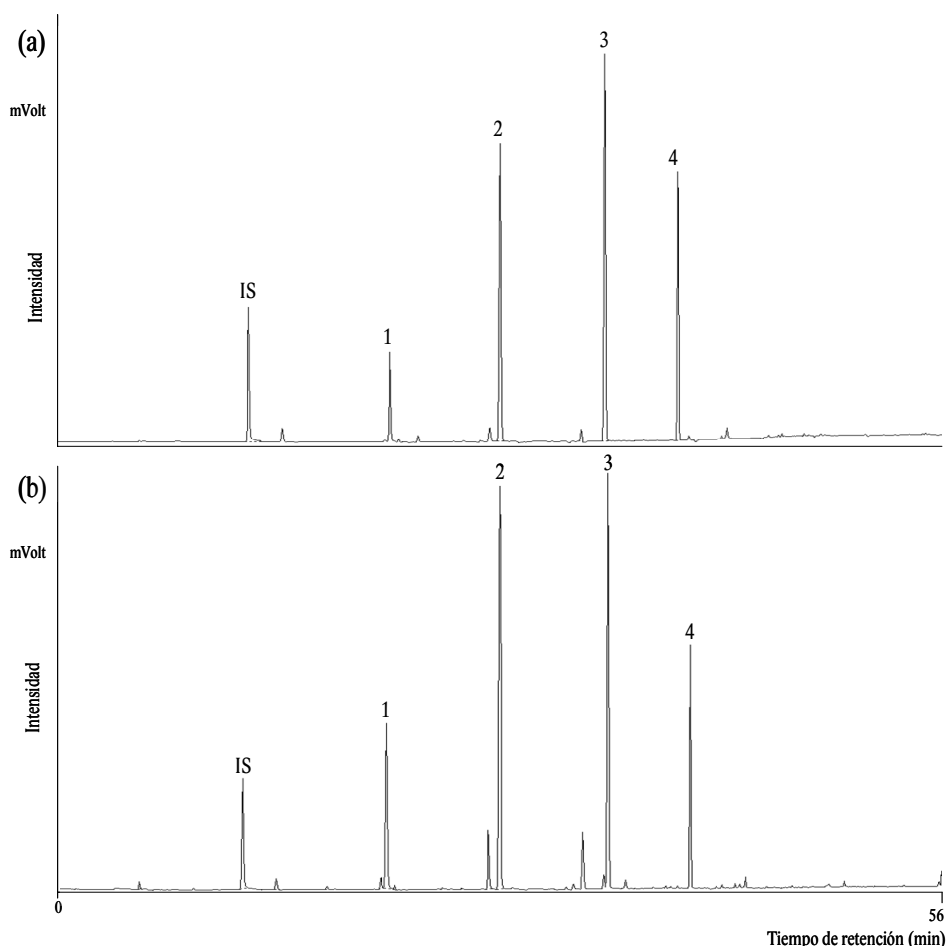


Figura III.5. Cromatograma (GC-ECD) de (a) patrones de THMs a una concentración de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, y (b) muestra acuosa de un efluente de la EDAR Prat de Llobregat. (IS) iodometano como estándar interno, (1) cloroformo, (2) bromodiclorometano, (3) dibromoclorometano y (4) bromoformo.

III.3.4. Validación de la metodología analítica

Los LODs se calcularon de la manera descrita en la sección III.2.4. En la Tabla III.4. se describen las figuras de mérito de los compuestos individuales analizados utilizando esta metodología, así como la de tres métodos EPA comúnmente aplicados. Aunque la sensibilidad de la metodología analítica utilizada en esta Tesis para la determinación de THMs en muestras acuosas (SPME-GC-ECD) fue muy similar a la reportada por los diferentes métodos de la USEPA, el cloroformo presentó una sensibilidad mucho más baja. Este aspecto se tratará más profundamente en el apartado de discusión de los resultados (sección III.9).

Tabla III.4. LODs obtenidos en la determinación de THMs en muestras acuosas mediante SPME-GC-ECD y comparación con las obtenidas por métodos USEPA.

Compuesto	Metodología aplicada en la presente Tesis ¹			EPA 502.2 ²	EPA 524.2 ³	EPA 551.1 ⁴
	LOD, ng L ⁻¹	CV* (%)	r ²	MRL, ng L ⁻¹	MRL, ng L ⁻¹	MRL, ng L ⁻¹
Cloroformo, CHCl ₃	350	3	0.997	20	20	50
Bromodichlorometano, Cl ₂ BrCH	9	2	0.996	20	30	3
Clorodibromometano, ClBr ₂ CH	1	9	0.998	300	70	1
Bromoformo, CHBr ₃	1	4	0.990	1600	200	4

MRL: Minimum Reporting Level

* CV: Coeficiente de variación

¹ Adaptado de Cho et al., 2003.² USEPA Method VOCs in water by GC/PID/ELCD.³ USEPA Method VOCs in water using GC-MS.⁴ USEPA Method Chlorinated compounds in water using GC-ECD.

III.4. Determinación de N-nitrosaminas en matrices acuosas

III.4.1. Antecedentes analíticos

Existen un gran número de metodologías utilizadas para la determinación de N-nitrosaminas en muestras acuosas. La determinación de estos compuestos se lleva a cabo generalmente mediante GC con detector de nitrógeno y fósforo (NPD), quimioluminiscencia (CLND, *Chemiluminescent Nitrogen Detection*) o acoplada a MS. En la Tabla III.5. se recogen algunos de los métodos analíticos utilizados en la determinación de N-nitrosaminas en aguas.

La USEPA ha creado el Método 521 para la determinación de NDMA y seis N-nitrosaminas adicionales en agua potable utilizando inyección de grandes volúmenes en GC acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

Tabla III.5. Algunos procedimientos analíticos utilizados en la determinación de N-nitrosaminas en muestras acuosas.

Configuración instrumental	LOD, ng L ⁻¹	Muestras acuosas	Referencias
SPME-HS-GC-MS/MS	1 – 5	Agua potable, de grifo, afluyente y efluente final de EDARs	[1]
SPE-LC-MS/MS	0,1 – 10,6	Agua potable	[2]
SPE-UPLC-MS/MS	1,2 (NDMA)	Agua potable	[3]
SPE-GC-HRMS	0,08 – 1,7	Agua potable, efluente terciario de EDAR	[4]
SPE-GC-(PCI)-MS	0,4 – 1,6	Agua potable	[5]
SPME-GC-NPD	144 – 890	Agua potable, efluente secundario	[6]
SPME-GC-(CI)-MS	253 – 506	Agua potable, efluente secundario	[6]
SPME-GC-CLND	57 – 193	Agua potable, efluente secundario	[6]

¹(Llop et al., 2010); ²(Zhao et al., 2006); ³(Wang et al., 2010); ⁴(Planas et al., 2008); ⁵(Charrois et al., 2004); ⁶(Grebel et al., 2006).

III.4.2. Preparación de muestras

La Figura III.6. muestra el esquema general de la metodología analítica utilizada. Las muestras fueron recogidas en botellas ámbar con 200 mg de ácido cítrico para evitar la oxidación de la muestra y la posterior formación de N-nitrosaminas. Las botellas fueron llenadas sin espacio de cabeza y transportadas refrigeradas al laboratorio para su procesamiento. El tiempo de almacenamiento fue siempre inferior a 48 h.

Se aplicó el procesamiento de muestra descrito en el Método 521 de la USEPA, cambiando el *surrogate* utilizado en el método por N-nitrosodipropilamina (no se encuentra presente en el medio ambiente).

La extracción de los analitos de interés se llevó cabo mediante SPE, utilizando cartuchos Supelclean *coconut charcoal*, desarrollados por Supelco para su uso en el Método 521 de la USEPA. Estos cartuchos poseen 2 g de fase, con un tamaño de partícula de 80/120 mesh.

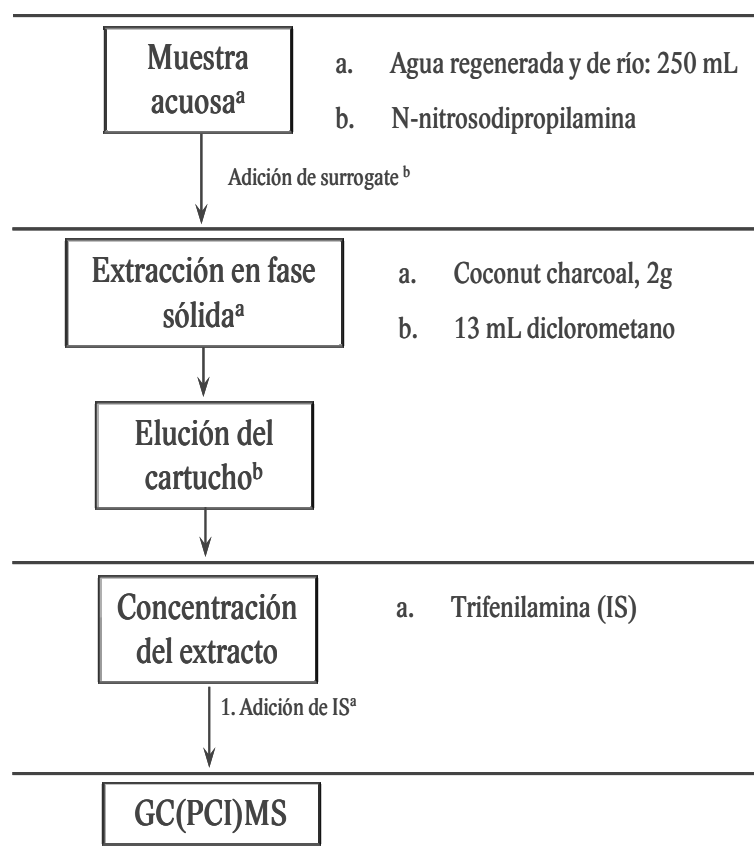


Figura III.6. Esquema de la metodología seguida en la determinación de N-nitrosaminas en muestras acuosas.

III.4.3. Separación cromatográfica y detección

La determinación analítica de estos compuestos en los extractos eluidos de los cartuchos anteriormente mencionados se basó en la metodología descrita por Charrois et al., (2004). Las muestras fueron inyectadas en un GC-MS en modo de ionización química positiva (PCI, *Positive Chemical Ionization*), utilizando amonio como gas reactivo. Con PCI se logra una ionización más suave, que resulta en una menor fragmentación molecular. Al utilizar amonio como gas reactivo se favorece la formación de iones aducto para grupos amino y nitroso en la fase gas, debido a la afinidad protónica similar entre los analitos y el gas reactivo. La formación de aductos mediante amonio-(PCI) es muy característica, se obtienen los iones $[M+18]^+$ y $[M+1]^+$, lo que facilita la cuantificación sobre todo cuando se comparan los iones aducto con los fragmentos de baja masa molecular producidos por impacto electrónico (EI, *Electronic Impact*) en matrices de agua complejas ($m/z = 42$ y 43 , para NDMA) (Prest y Herrmann, 1999).

La inyección de las muestras (1 μL) se realizó en modo splitless. La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante una columna DB-17 (50% fenil - metilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μm de grosor de fase. El horno cromatográfico se programó con la siguiente rampa de temperatura: 60 $^{\circ}\text{C}$ mantenido en isoterma durante 5 min, la temperatura se elevó hasta 200 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$), y finalmente hasta 250 $^{\circ}\text{C}$ (5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$), donde permaneció durante 5 min. La cuantificación de las muestras se realizó mediante rectas de calibrado interno normalizando la señal del compuesto individual con el estándar interno (TPA). Se observó linealidad para un rango de concentraciones comprendido entre 0,006 y 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los coeficientes de regresión, r^2 , obtenidos para las rectas de calibrado externo fueron siempre superiores a 0,99.

En la Figura III.7 se muestra un cromatograma típico de estos compuestos en un patrón estándar y en una muestra real del terciario de la EDAR Torroella de Montgrí, en la cual se han identificado N-nitrosodimetilamina y N-nitrosopiperidina.

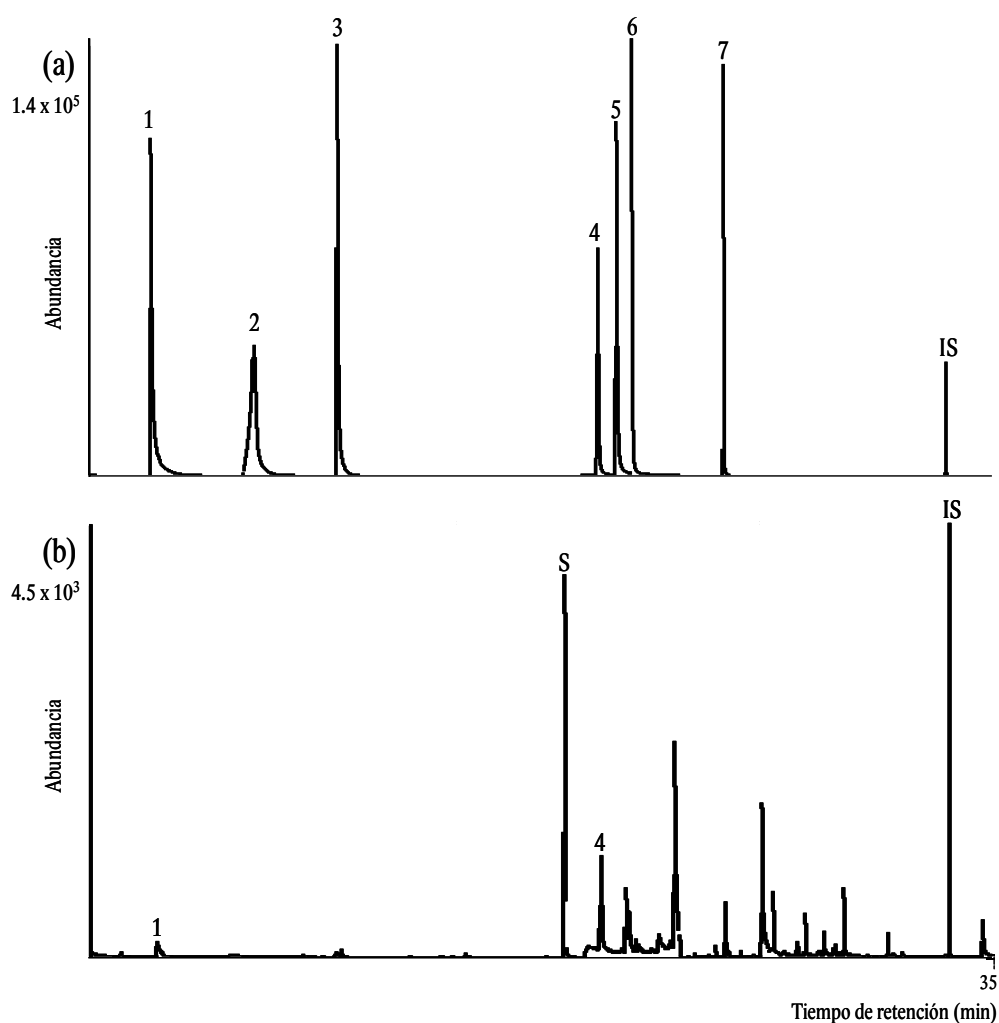


Figura III.7. Cromatogramas GC-(PCI)-MS para (a) patrones de *N*-nitrosaminas a una concentración de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ y (b) muestra acuosa de un efluente terciario de la EDAR Torroella de Montgrí. (IS) Trifenilamina como estándar interno, (S) *N*-Nitrosodipropilamina como surrogate, (1) *N*-Nitrosodimetilamina, (2) *N*-Nitrosometiletilamina, (3) *N*-Nitrosodietilamina, (4) *N*-Nitrosopiperidina, (5) *N*-Nitrosopirolidina, (6) *N*-Morfolina y (7) *N*-Nitrosodi-*n*-butilamina.

III.4.4. Validación de la metodología analítica

Los límites de detección (LODs) se calcularon de la manera descrita en la sección III.2.4. En la Tabla III.6., se describen las figuras de mérito de los compuestos individuales analizados mediante esta metodología. Debido a que se modificó el Método 521, cambiando el surrogate utilizado, se calcularon las recuperaciones individuales de los compuestos y del nuevo *surrogate*. Para este propósito se doparon los analitos de interés a concentraciones similares a las observadas en otros estudios (Tabla I.13). Las recuperaciones obtenidas se recogen en la Tabla III.6.

Tabla III.6. Figuras de mérito obtenidas para la determinación de N-nitrosaminas en muestras acuosas mediante GC-(PCI)MS y las obtenidas por el Método 521 USEPA con el mismo fin.

Compuesto	Metodología aplicada en la presente Tesis ¹			USEPA 521 ²
	LOD, ng L ⁻¹	Recuperación (%)*	r ²	MDL, ng L ⁻¹
N-Nitrosodimetilamina, NDMA	8	95	0.999	0,28
N-Nitrosometiletilamina, NMEA	17	78	0.997	0,28
N-Nitrosopirrolidina, NPYR	8	70	0.999	0,35
N-Nitrosopiperidina, NPIP	6	75	0.998	0,66
N-Nitrosodi-n-butilamina, NDBA	10	61	0.998	0,36

¹ Adaptado de (Charrois et al., 2004) y (Munch y Basset, 2004).

² Method 521. Determination of nitrosamines in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography with large volume injection and chemical ionization tandem mass spectrometry (MS/MS).

* Nivel de dopaje 10 µg L⁻¹

III.5. Determinación de PPCPs y otros microcontaminantes específicos en matrices vegetales

III.5.1. Antecedentes analíticos

Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)

La MSPD ha encontrado una aplicación especial en procesos analíticos involucrados en la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras biológicas sólidas, semi-sólidas y/o altamente viscosas (Kristenson et al., 2006). En este sentido, esta técnica ha demostrado ser eficiente en la determinación de un amplio rango de fármacos, plaguicidas y componentes naturales en muestras complejas provenientes de animales y plantas.

Tiene como fundamento básico la mezcla de la muestra con un dispersante sólido (p. ej., C18) que sirve como material de soporte. El dispersante actúa como agente abrasivo, provocando la disgregación de la estructura de la matriz mediante fuerzas de corte y compresión, y como un “disolvente” que coadyuva a la disgregación y dispersión de la muestra, liberando a los analitos diana (Barker, 2007).

Extracción con disolventes presurizados

Esta técnica hace uso de los mismos disolventes utilizados en otras técnicas extractivas, pero lo hace a altas presiones (100 – 140 bar) y temperaturas (50 – 200 °C). Estas condiciones permiten el incremento de la temperatura de extracción por encima del punto de ebullición del disolvente disminuyendo su viscosidad e incrementándose los coeficientes de difusión y de solvatación. Las condiciones anteriores favorecen la desorción de los analitos de la matriz (Romanik et al., 2007).

Espectrometría de masas vs. Espectrometría de masas en tándem

A menudo, la cuantificación e identificación de analitos diana presentes en cantidades traza se complica al aumentar la complejidad de la matriz, resultando en iones de identificación ocultos en el ruido de fondo. Con un cuadrupolo simple usualmente se emplea el modo de selección de ión (SIM, *Selected Ion Monitoring*) para mejorar la sensibilidad (LODs o LOQs) y la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) del método analítico. En el modo SIM, solamente se monitorizan algunos iones del analito diana en el tiempo de retención (RT) en el que éste eluye de la columna cromatográfica. Aun y las mejoras en sensibilidad que se obtienen, el modo SIM puede no ser satisfactorio al analizar niveles traza en matrices complejas, ya que las interferencias en SIM son las mismas que las que se tienen en el modo *full scan* (Agilent Technologies, 2009; Hoffmann y Stroobant, 2007; Hübschmann, 2001).

La espectrometría de masas en tándem permite una reducción drástica e incluso la eliminación de interferencias de la matriz que limitan la exactitud y LODs de los métodos SIM. Este proceso, denominado monitorización de reacciones múltiples (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*), tiene dos ventajas fundamentales sobre el SIM. Primero, la detección se basa en un “ion producto” generado por la disociación colisional de un “ion precursor” del analito diana. El ion precursor tiene la misma selectividad que un método SIM. Sin embargo, existe una elevada probabilidad de que al menos uno de los iones producto resultantes serán único o característico de este precursor y no de algún compuesto interferente. Su segunda ventaja consiste en que durante el proceso de filtrado de masas en el Q1 (primer cuadrupolo), todos los iones de bajo m/z de la muestra son eliminados. Los iones producto característicos de la disociación colisional se miden en una región de “cero” ruido del espectro. En resumen, la combinación de iones producto característicos (mayor selectividad) y la eliminación del ruido de fondo resulta en límites de detección bajos aun en el caso de matrices complejas (Agilent Technologies, 2009; Hoffmann y Stroobant, 2007).

III.5.2. Preparación de muestra

La Figura III.8. muestra el esquema general de la metodología analítica utilizada. Adicionalmente ésta se describe en detalle en la sección Experimental del artículo 1.

Es de interés remarcar que para asegurar la correcta homogeneización de la muestra, el material vegetal se disgregó con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido (-192 °C) antes de ser sometido a MSPD.

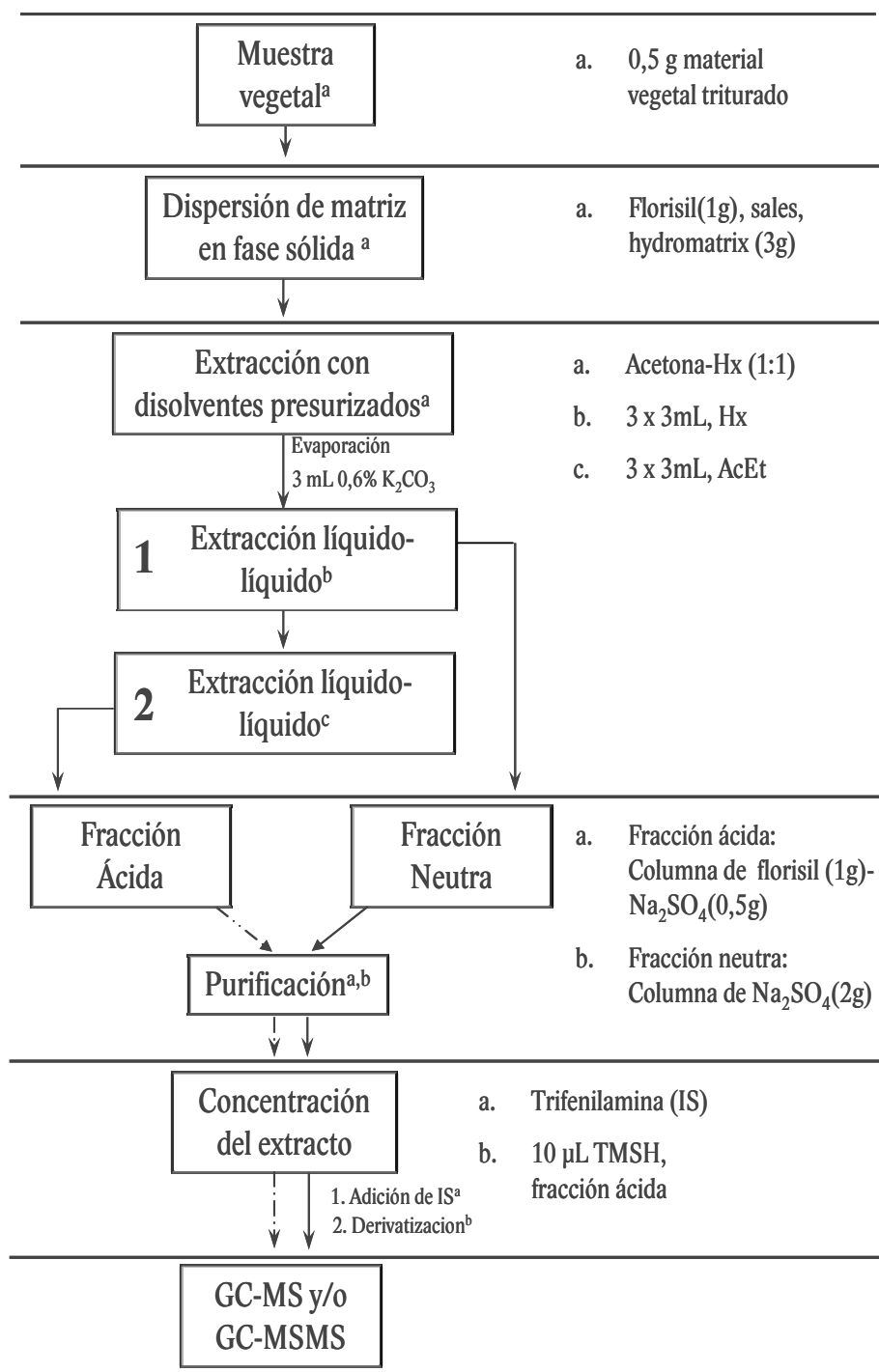


Figura III.8. Esquema de la metodología seguida en la determinación de PPCPs y otros contaminantes específicos en muestras vegetales.

III.5.3. Separación cromatográfica y detección

Los extractos obtenidos mediante las metodologías descritas en la sección anterior fueron analizados en un TRACE GC-MS (Thermo Scientific) en modo impacto electrónico (EI). Las condiciones cromatográficas, columna utilizada, volumen y modo de inyección de la muestra son las descritas anteriormente en la sección III.2.3.

La cuantificación de las muestras se realizó mediante rectas de calibrado externo normalizando la señal del compuesto individual con el estándar interno (TPA). Se observó linealidad para un rango de concentraciones entre 6 y 2400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Las regresiones lineales que se obtuvieron en las rectas de calibrado siempre fueron satisfactorias con un coeficiente de regresión, r^2 , $>0,99$. La identificación de los compuestos se realizó tomando en consideración la normativa europea SANCO/10232/2006 (ver sección III.2.3).

A pesar de los buenos resultados de sensibilidad obtenidos aplicando GC-MS durante el desarrollo metodológico, la complejidad de la matriz vegetal y las concentraciones traza en las que se encuentran los microcontaminantes en condiciones reales, hizo necesaria la utilización de un detector más selectivo. En este sentido, se desarrolló un método de análisis mediante GC acoplado a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En la Tabla III.7. se detallan las condiciones cromatográficas utilizadas en la determinación de estos compuestos mediante GC-MS/MS.

III.5.4. Validación de la metodología analítica

Los LODs y LOQs se calcularon de la manera descrita en la sección III.2.4. Los LODs y LOQs calculados para GC-MS se incluyen en el artículo I, mientras que las figuras de mérito de los compuestos individuales analizados mediante esta metodología aplicando GC-MS/MS se describen en la Tabla III.7.

Tabla III.7. Figuras de mérito obtenidas para la determinación de los analitos diana en material vegetal mediante GC-MS/MS.

Compuesto	LOD ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$	r^2	Compuesto	LOD ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$	r^2
Ácido clofibrico	0,001	0.998	BHT	8	0.999
Ibuprofeno	1	0.992	BHA	5	0.998
MCPA	4	0.997	TBP	3	0.999
MDHJ	76	0.997	Simazina	16	0.990
Furosemida	96	0.990	Atrazina	4	0.999
Carbamazepina	22	0.996	Diazinon	12	0.998
Flunixin	32	0.996	Tonalida	4	0.993
Naproxeno	0,001	0.993	Galaxolida	10	0.995
Diclofenaco	3	0.999	Alacloro	1	0.998
Triclosan	0,04	0.999	Ambrettolida	0,3	0.995
Diclobenil	3	0.997	Clorfenvinfos	11	0.999

La Figura III.9. muestra un cromatograma típico de GC-MS/MS de una muestra de alfalfa regada con agua del río Ter.

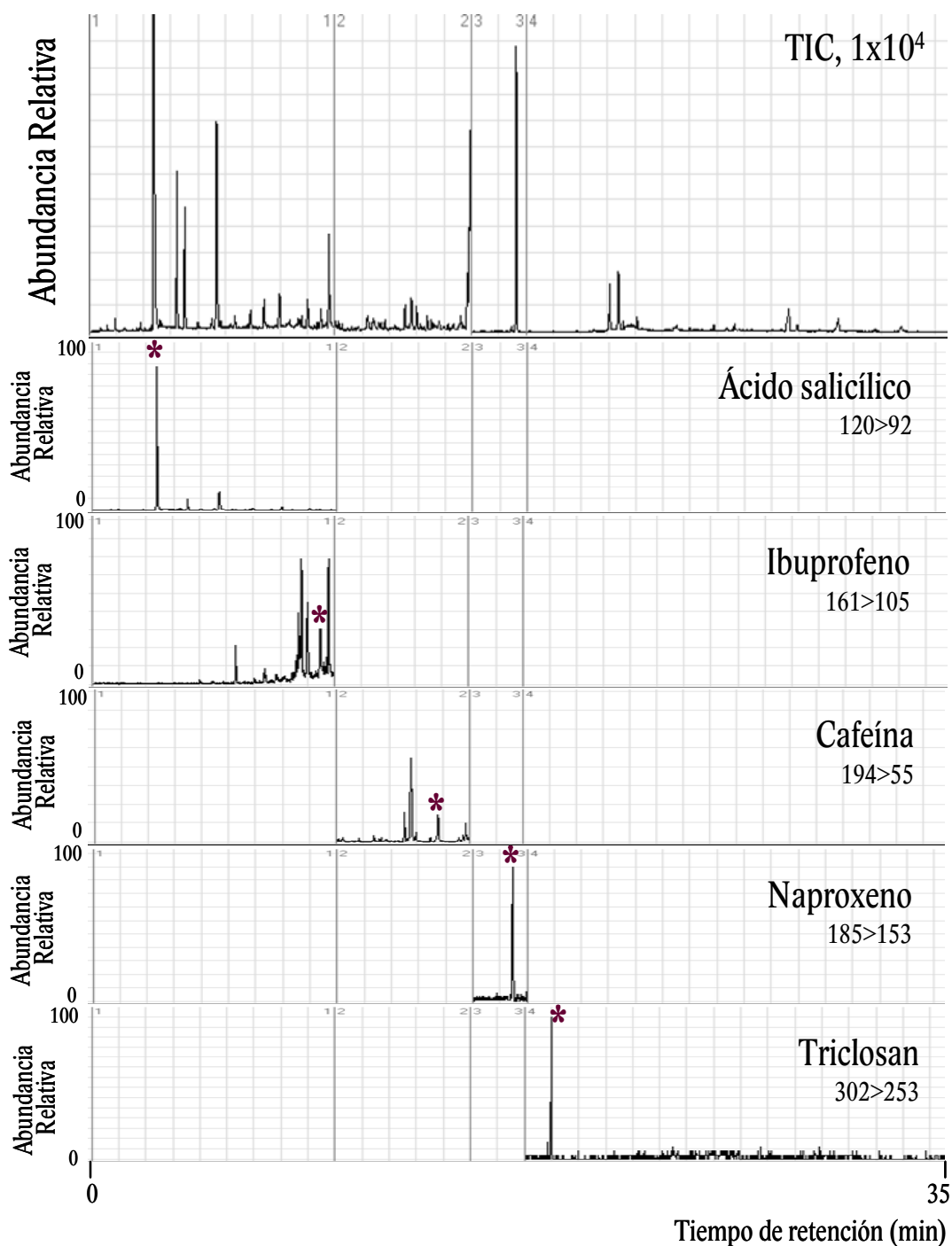


Figura III.9. Cromatograma GC-MS/MS para una muestra de alfalfa regada con agua regenerada, donde se muestran las transiciones utilizadas para la cuantificación de algunos analitos diana.

III.6. Consideraciones generales del diseño de experimentos

En la década de 1920, R.A. Fisher dio los primeros pasos hacia lo que se convertiría en el concepto de diseño de experimentos (DOE, *Design of Experiments*) y sentó las bases de los principios básicos de esta técnica. Se define un experimento como una prueba o serie de pruebas en las que se hacen cambios específicos en las variables del proceso o sistema para ser capaces de identificar los factores responsables de las variaciones observadas en la variable de respuesta (Leardi, 2009; Montgomery, 2001).

El diseño de experimentos es el proceso de plantear un experimento con el objetivo fundamental de obtener datos válidos, que serán analizados mediante métodos estadísticos apropiados para producir conclusiones válidas y objetivas (Montgomery, 2001). La aplicación de métodos estadísticos es el único enfoque objetivo que puede utilizarse en la determinación de un problema que involucre datos sujetos al error experimental. De esta manera hay dos elementos principales en la solución de un problema experimental: (1) el diseño de experimentos, y (2) el análisis estadístico de los datos obtenidos.

Ahora bien, los principios básicos del DOE son la replicación, bloqueo, aleatorización y ortogonalidad. La replicación permite distinguir efectos sistemáticos en cambios de las condiciones de experimentación, y de error en mediciones. Mediante el bloqueo se puede asignar la variabilidad a factores específicos, siempre y cuando tales factores sean conocidos y accesibles al experimentador. La aleatorización, por otra parte, minimiza el impacto de las fuentes desconocidas que no se toman en cuenta pero que afectan al funcionamiento del sistema. Finalmente, la ortogonalidad permite la evaluación independiente de los efectos de cada variable en el resultado obtenido (Montgomery, 2001).

El DOE es un método estructurado y organizado para determinar la relación entre las variables que afectan el proceso y una variable de respuesta. Se diseñan una serie de experimentos en los que se realizan simultáneamente cambios planeados y específicos a múltiples variables. Del análisis de los datos experimentales se puede obtener la siguiente información:

- (1) condiciones óptimas
- (2) las variables que más influyen sobre un proceso dado
- (3) las variables cuyo efecto sobre el proceso es despreciable
- (4) la presencia de interacciones y sinergismos

La habilidad para evaluar la significancia de las interacciones y sinergismos hace a este método especialmente potente debido a que el método convencional de “una variable a la vez”, es incapaz de obtener esta información (Almeida Bezerra et al., 2008; Montgomery, 2001).

Cribado o fase de exploración experimental

Permite identificar los factores que pueden afectar la respuesta dentro de un conjunto mayor de factores “candidatos”, de tal modo que la inclusión de estos dentro del modelo sea significativa y eliminando

aquellos factores con un efecto despreciable. En esta fase suelen emplearse los diseños factoriales completos a dos niveles (2^k donde k es el número de factores que se incluirán en el estudio) a partir de los cuales un gran conjunto inicial de candidatos quedará reducido, y será con este conjunto con el que se continuará experimentando posteriormente (Montgomery, 2001).

Diseños factoriales completos. Estos diseños se utilizan en experimentos donde es necesario estudiar el efecto conjunto de múltiples factores sobre una respuesta. Un diseño factorial completo contiene todas las posibles combinaciones de factores y niveles necesarios para evitar *aliasing* en cualquier orden. Si se asume que la respuesta es aproximadamente lineal en el rango de los niveles elegidos, un estudio de niveles definirá la respuesta mediante un diseño 2^k (donde k es el número de factores que se incluirán en el estudio). Sin embargo, si la respuesta no es lineal, es decir, si hay cuadratura en la respuesta, se debe implementar un diseño 3^k . Estos métodos proporcionan el número de experimentos más pequeño donde los k factores pueden estudiarse sin *confounding* o factores de confusión debida a su interacción. Los resultados obtenidos de un diseño 2^k pueden expresarse en términos de una regresión lineal, mientras que los resultados de un diseño 3^k se expresan como un modelo de segundo orden (Leardi, 2009).

Es muy deseable tener replicas para estimar el error en cada nivel y poder determinar así la significancia estadística de las diferencias. Un método común para la réplica de ensayos con la mínima adquisición de datos es la adición de observaciones en puntos centrales, lo que permite más observaciones sin cambiar el balance y la ortogonalidad del experimento (Costa Ferreira et al., 2007; Leardi, 2009).

Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (RSM, *Response Surface Methodology*) fue desarrollada por Box y colaboradores en los años 50. El término se originó de la perspectiva gráfica generada después del ajuste del modelo matemático. La RSM consiste en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas basadas en el ajuste de modelos a los datos experimentales obtenidos del DOE. Con este objetivo final, se emplean funciones polinomiales lineales o cuadráticas para describir el sistema en estudio y consecuentemente explorar las condiciones experimentales hasta su optimización (Khuri, 2006; Montgomery, 2001).

Existen varios diseños experimentales que pueden utilizarse en RSM; el más simple está basado en una función lineal (p. ej., 2^k), en donde la respuesta no presenta curvatura. Ahora bien, si se desea evaluar una respuesta con cierta curvatura, existen una serie de metodologías como: el diseño factorial completo 3^k , diseños Box-Behnken, diseño central compuesto, diseño de Doehler, entre otros (Almeida Bezerra et al., 2008; Costa Ferreira et al., 2007).

En la presente Tesis se aplicó el diseño central compuesto para la optimización de un método analítico capaz de determinar contaminantes emergentes en tejido vegetal (Figura III.10).

Este diseño está formado por los siguientes elementos:

- un diseño factorial completo o fraccionado,
- un diseño estrella en el que los puntos experimentales se encuentran a una distancia α de su centro, y
- un punto central.

El diseño central compuesto permite estimar la constante, términos lineales, interacciones entre factores y términos cuadráticos mediante la siguiente ecuación:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + B_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$$

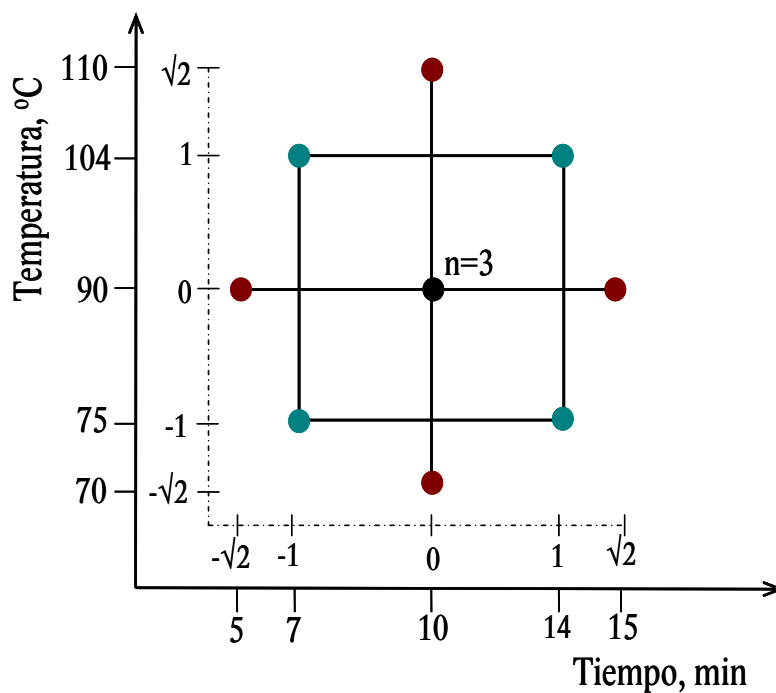


Figura III.10. Diseño de componentes centrales aplicado, considerando como variables independientes temperatura y tiempo. El experimento central se llevó a cabo por triplicado. Los valores de los ejes se muestran en su magnitud real (línea continua) y normalizada (línea punteada).

III.7. Contextualización y estructura del capítulo

En este capítulo se presenta el correspondiente desarrollo y optimización de una metodología analítica para la determinación de PPCPs y otros contaminantes específicos en material vegetal a través del artículo científico: *Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination* (sección III.8). Por otra parte, los resultados correspondientes a las metodologías aplicadas en la determinación de PPCPs, trihalometanos y N-nitrosaminas se incluyen en el artículo científico de carácter ambiental: *Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading* (sección IV.5.). Tales resultados fueron obtenidos a partir de una serie de experimentos y muestreos ambientales enmarcados en el proyecto de investigación “*Prevenió del risc sanitari derivat de l’aprofitament d’aigües regenerades com a aigües de reg agrícola*” de la *Agència Catalana de Seguretat Alimentària*.

Los resultados que se describen y discuten son los siguientes:

- La sensibilidad y pertinencia de las metodologías empleadas en el análisis de N-nitrosaminas, trihalometanos y PPCPs en matrices acuosas (Artículo 2).
- La sensibilidad de la metodología desarrollada y optimizada para el análisis de PPCPs y otros contaminantes selectos en matrices vegetales (Artículo 1).
- La utilidad de la correcta aplicación del diseño de experimentos en la optimización de una metodología analítica (Artículo1).

Además de los resultados recogidos en dos artículos científicos, se detallan los criterios seguidos para la elección de los analitos diana evaluados en el estudio descrito en el artículo 1, así como una descripción del diseño experimental utilizado y finalmente la interpretación de sus resultados (sección III.9.).

III.8. Artículo científico 1

Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination.

Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Peñuela, G. y Bayona, J.M. (2009). Analytical and Bioanalytical Chemistry 394(5), 1319-1327.

Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC–MS determination

Diana Calderón-Preciado ·
Claudio Jiménez-Cartagena · Gustavo Peñuela ·
Josep Maria Bayona

Received: 31 October 2008 / Revised: 29 January 2009 / Accepted: 2 February 2009 / Published online: 19 February 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract A new multiresidue method for the determination of 13 emerging and priority pollutants in lettuce, including pesticides, pharmaceuticals, personal care products, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and phenolic estrogens, has been developed using matrix solid-phase dispersion combined to pressurized fluid extraction (PFE) followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry determination. A sequential optimization strategy based on solvent optimization first, followed by experimental design, was performed in order to maximize target analyte extraction with the aid of response surface methodology. Firstly, a full factorial design was applied to choose the significant variables in PFE; extraction time and temperature were found to have the biggest overall effect on response for most of analytes. They were later optimized performing a central composite design and the variable response of these factors was modeled for all analytes. It was found that marked differences in physicochemical nature exerted a strong influence on extraction conditions and yield. Therefore, the effect of parameters on the response was rather different for some compounds. To overcome this conflicting behavior, a multiple response simultaneous optimization was applied using the desirability function to achieve global optimal

operating conditions. The optimal conditions were attained at 13.5 min (two extraction cycles) and 104 °C in the PFE by using hexane acetone mixture (1:1). Limit of detection and limit of quantitation values were found to be between 6.6 and 58 and 7.6 and 61.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively.

Keywords Matrix solid-phase dispersion · Pressurized solvent extraction · Multiresidue analysis · Multivariate optimization · Emerging pollutants · Vegetable

Introduction

Four out of ten people in the world are affected by water scarcity, and, in many of the countries suffering from it, irrigated agriculture represents the bulk of water demand. Accordingly, it is usually the first sector impinged by water shortage. Therefore, in order to sustain food production, an efficient use of all water resources is needed [1]. In this regard, reclaimed wastewater is a good crop irrigation alternative already in use in some countries such as EEUU, Israel, Australia, and Spain among others [2]. Nevertheless, there is a potential risk related to the contaminants not removed or partially removed in wastewater reclamation to be taken up by the irrigated crops and thus entering into the human food chain.

The classes of contaminants occurring in wastewater effluents include human and veterinary pharmaceuticals, personal care products (PCPs), pesticides, and phenolic estrogens [3]. While the potential health and environmental hazards derived from continued exposure to these chemicals are not well understood, estrogenic responses on aquatic organisms exerted by endocrine disruptors [4],

D. Calderón-Preciado · C. Jiménez-Cartagena · J. M. Bayona (✉)
Department of Environmental Chemistry, IDÆA-CSIC,
Jordi Girona 18-26,
08034 Barcelona, Spain
e-mail: jbtqam@cid.csic.es

C. Jiménez-Cartagena · G. Peñuela
Diagnosis and Pollution Control Group, Faculty of Engineering,
Antioquia University,
Medellín, Colombia

to a porcelain mortar. One gram of florisil was vigorously blended with the sample for 8 min using a pestle, then 0.2 g Na_2SO_4 , 0.05 g Na_3 -citrate dihydrate, 0.05 g NaCl, 0.02 g Na_2H -citrate sesquihydrate, and 3 g of Hydromatrix were added and blended to obtain a thoroughly homogenous mixture [38, 39]. Samples were spiked after nitrogen comminution with 25 μl of a mixed standard solution at 120 mg L^{-1} , prepared in methanol. The sample was left to stand for 30 min before extraction.

PFE procedure

The obtained mixture was transferred to a 11-mL stainless steel cell. The remaining space left in the cell was completely filled with Hydromatrix. The PFE instrument used as an extraction solvent a mixture of acetone–hexane 1:1 and ethyl acetate–hexane 2:1 and 1:1. These solvent mixtures were transferred to the cell, which then was heated and pressurized to the selected conditions. The recovered extract was collected in amber glass vials, and the cell was flushed and purged with gaseous nitrogen.

Extract partitioning

The obtained extract was evaporated to 5 mL approximately under a gentle nitrogen stream. Afterwards, 3 mL of a 0.6% K_2CO_3 aqueous solution were added to the vial; the hexanic phase was recovered and the remaining aqueous phase was extracted in 3×3 mL hexane. Then, the hexane phase was percolated through a florisil– MgSO_4 column. This procedure rendered the neutral fraction, where neutral and basic analytes were recovered, namely tonalide, non-ylphenol, dibenz[a,h]anthracene, pyrene, chlorothalonil, lindane, and atrazine. Subsequently, 3 mL of ethyl acetate and 75 μl of 5% HCl were added to the aqueous phase. Then, the organic phase was recovered and the aqueous phase was further extracted 2×3 mL ethyl acetate. The organic phase was percolated through a Na_2SO_4 column. This procedure rendered the acid fraction, where acid analytes were recovered, namely triclosan, ibuprofen, diclofenac, clofibrac acid, and bisphenol A. Though carbamazepine is not of acid nature, it was recovered in the acid fraction due to its low affinity for hexane, which was the solvent used to recover neutral and basic compounds. Both neutral and acid fractions were gently evaporated to approximately 300 μl ; this step was followed by the addition of 246 ng of triphenylamine as internal standard. The neutral fraction was directly analyzed by GC–MS, while the acid fraction was derivatized by adding 10 μl of TMSH to a 50- μl sample aliquot. The derivatization reaction took place in the chromatograph injector port at 250 °C. The determination was performed by GC–MS.

Validation

Linearity of the GC–MS method was proven because the coefficient of determination R^2 values were always >0.99 for the linear regression equations of all analytes, for six concentration levels; quantitation was performed on the basis of the internal standard procedure (Table 1).

Results and discussion

Optimization

Screening phase

Prior to the screening design, the effect of solvent on the extraction yield was evaluated in the PFE at medium operating conditions. The acetone–hexane 1:1 mixture was found to be the most suitable (Table 2) taking into account the widely different physicochemical properties of the target analytes and the complex nature of the matrix. Then, low and high values for extraction time and temperature were selected according to previous knowledge on the process. Since extraction yield depends on several factors, in order to find those which exert the largest influence, a 2^3 full factorial design was applied (Table 3). The analyzed factors were temperature, extraction time, and cycle number. A one-way analysis of variance was performed to the experimental data obtained, which showed that interaction between extraction time and temperature followed by single factors had the largest effect (positive or negative) on the response of most of analytes (not shown) but in most of the cases this is not statistically significant ($p>0.05$). From low to high temperatures, viscosity and solvent surface

Table 1 Selected parameters for GC–MS determination

Parameter	Description
Injection method	Splitless mode (0.5 min)
Injection volume	2 μl
Injector temperature	270 °C
Capillary column	TRB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm) from Teknokroma (Spain)
Carrier gas	Helium
Flow rate	1.4 mL/min (constant flow)
Temperature program	Initial 50 °C (2 min) ramped at 15 °C/min to 120 °C, at 4 °C/min to 160 °C, at 7 °C/min to 220 (5 min), at 5 °C/min to 290 °C (5 min), and at 15 °C/min to 320 °C (5 min).
Ionization	EI mode at 70 eV
Analysis mode	Full scan, two scans per second Mass range, 50–500 m/z

inhibition of multixenobiotic resistance in mussels caused by polycyclic musks [5], PCPs, the carcinogenicity and/or mutagenicity elicited by PAHs in humans, and the potential for development of antibiotic resistance as a result of low-concentration exposure to pharmaceuticals [6] are well documented. In addition, the uptake of veterinary medicines [7–9], PAHs [10], and pesticides [11] from soil into plants has also been documented, making a risk assessment of further importance.

The determination of these compounds, however, represents an analytical challenge due to the broad physicochemical properties and the complex nature of environmental matrixes. Consequently, most of the determinations of these contaminants are focused on water or sewage sludge matrixes through methods that group compounds with similar properties [12, 13] or activities [14]. However, due to the complexity of vegetation as a matrix, the analytical methods available are limited to pesticide residues and hydrophobic contaminants (i.e., polychlorinated biphenyls, dichloro-diphenyl-trichloroethanes, PAHs) but very few are related to pharmaceuticals and health products [15, 16].

To address the need for pollutant screening, a general analytical trend is the application of liquid chromatography/tandem mass spectrometry (MS/MS) and gas chromatography (GC)–MS/MS techniques due to high selectivity and sensitivity [3]. These techniques have already found application in the determination of pharmaceuticals, PCPs, endocrine disruptors, and pesticides [17–21]. Most of these techniques involve very little sample treatment but due to its high cost it is not very suitable for monitoring studies dealing with large number of samples.

On the other hand, GC–MS has been the technique of choice for the determination of semivolatile and volatile organic compounds due to its favorable combination of high selectivity and resolution, good accuracy and precision, and wide dynamic concentration range and high sensitivity [18]. When appropriate sample treatment is applied, one is able to effectively analyze these types of molecules even in complex matrixes. Sample treatment remains an essential factor in order to obtain accurate and precise results. In addition to the classical extraction approach in vegetable matrixes such solvent extraction [22] and liquid–liquid extraction [23], there are other recent alternatives such QuEChERS [24], matrix solid-phase dispersion (MSPD) [25], solid-phase extraction [26], solid-phase microextraction [27, 28], stir-bar-sorptive extraction [29, 30], supercritical fluid extraction [31, 32], microwave-assisted extraction [33, 34], and pressurized fluid extraction (PFE) [35, 36] that have been successfully applied to this kind of matrixes, mostly, however, only in pesticide determination.

The aim of this study was to develop a sensitive and inexpensive multiresidue method for the determination of

13 pesticides, pharmaceuticals, personal care products, PAHs, and phenolic estrogens in vegetable matrixes. Analyte extraction has been carried out by MSPD in combination with PFE followed by GC–MS determination. In comparison to the single methodologies, coupling of MSPD and PFE showed an evident improvement in selectivity and extraction efficiency. This improvement can be attributed to the combination of temperature and pressure and the MSPD cleanup; also an important feature of this methodology is the minimization of solvent usage [37, 38]. Accordingly, extraction variables affecting analyte recovery have been optimized by a two-step experimental design approach in order to minimize the number of experiments and to take into account the possible variable interactions.

Experimental

Materials, reagents, and apparatus

All standards were of analytical grade with between 97% and 99% purity. Pharmaceuticals, fragrances, and phenolic estrogens (ibuprofen, carbamazepine, diclofenac, clofibrac acid, triclosan, tonalide, bisphenol A, nonylphenol) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium); polycyclic aromatic hydrocarbons and trimethyl sulfonium hydroxide (TMSH) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and pesticides (lindane, atrazine, chlorothalonil) were bought from Riedel de Haën (Seelze, Germany).

Stock solutions of each individual compound were prepared in methanol or ethyl acetate at a concentration of 5,000 mg L⁻¹. All prepared standards were stored in the darkness at -20 °C and used to prepare the single and mixed working standards solutions. Gas-chromatography-grade acetone, methanol, acetonitrile, and ethyl acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Florisil was ordered from Merck. Magnesium sulfate anhydrous and sodium chloride were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Disodium hydrogen citrate sesquihydrate was bought from Aldrich (Milwaukee, USA). Trisodium citrate dihydrate was from Sigma (St. Louis, USA). The MgSO₄ and NaCl were baked for 5 h at 450 °C in a muffle furnace. Reagent water was deionized in the laboratory using the ultrapure water system Arium 611 from Sartorius (Aubagne, France).

A PFE, PSE One (Allentown, USA), was used for the extraction of target analytes from the vegetable matrix.

MSPD procedure

The lettuce samples analyzed were obtained at a local market. About 500 g of lettuce were comminuted with the aid of liquid nitrogen. Then, a 0.5-g portion was transferred

Table 2 Recoveries according with solvent mixture

Solvent mixture	Analyte group	Average recovery ^b , %
Ethyl acetate–hexane (2:1)	Acids	82 (46–91)
	Neutrals	17 (5–58)
Ethyl acetate–hexane (1:1)	Acids ^a	80 (35–128)
	Neutrals	62 (11–126)
Acetone–hexane (1:1)	Acids	70 (46–91)
	Neutrals	75 (54–94)

^a Carbamazepine was not recovered

^b Values between parentheses correspond to highest and lowest recovery

tension decrease, while its solvent strength and rate of diffusion into the sample increase, making this factor and its interaction with other factors evidently important to this process for neutral and inert molecules (i.e., lindane, pyrene, etc.). Nevertheless, functionalized molecules (i.e., carbamazepine, clofibrac acid, etc.) are more labile and prone to by-product formation at higher temperatures leading to a negative effect usually interacted with other factors. Cycle number was found to exert the lowest effect on the extraction yield; therefore, it was fixed and kept constant at two in the following optimization experiments and only the rest of the factors were considered.

Response surface design

In order to obtain further information on the effect of factors in the extraction yields of the analytes, a response surface design methodology was applied. A central composite design was performed, it consisted of 11 runs, which were a combination of the chosen factors within the following ranges: extraction temperature (76–104 °C) and extraction time (6–14 min), while keeping the cycle number was fixed at two (Table 4). Maximum extraction yield was highly satisfactory for most of the analytes; mean maximum yield for acid compounds was 92% (54–116%) with a relative standard deviation (RSD) ranging from 5% to 19%. For neutral compounds, mean maximum yield was 83% (65–95%) with an RSD ranging from 2% to 4%. Only two out of the 13 compounds showed yields under 70% that was the case of clofibrac acid and chlorothalonil.

Response variable namely extraction yield of all analytes was fitted to polynomial models. The model coefficient was calculated by a multiple regression. In Table 5, the R^2

regression coefficient for all analytes and their corresponding model are shown; broad differences in compound nature were reflected in model order. In this regard, acid analytes and atrazine fitted better to a second-order model, while the behavior of the remaining compounds was best described by a cubic model; still, all but three of the resulting models explained more than 70% of the target analyte variance.

Figure 1a shows the response plot for atrazine as time and temperature were varied. Temperature does not exert a remarkable influence on the extraction yield but, as extraction time increases, it increases the extraction yield, which is in good agreement with the model for this analyte in which the most significant term is the quadratic time ($p < 0.05$). Moreover, Fig. 1b shows the response plot for diclofenac; a minimum is observed at mean time and temperature; the highest extraction yield is reached in the zone of maximum time and temperature; the behavior of this analyte is clearly influenced by both time and temperature, reflected in the significance ($p < 0.05$) of both quadratic factors in the model for this compound. The same behavior is exhibited by ibuprofen (not shown), for which the quadratic terms for time and temperature are, as in the case of diclofenac, significant in the model ($p < 0.05$). The resemblance in these compound behavior could be explained by similarities in their properties such log Kow (ibuprofen 3.79, diclofenac 3.18), which could mean that compound affinity for the extractive solvent behaves similarly in the different extraction conditions evaluated.

Clofibrac acid behavior, as extracting factors were varied, was described by two maxima in yield, one in the zone of maximum time and temperature and the other at minimum time and temperature. In the zone of medium

Table 3 Factors and levels of the 2^3 full factorial design

Factors	Levels		Run										
	1	2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(X1) Extraction temperature, °C	80	120	100	120	80	120	80	100	80	120	80	120	100
(X2) Extraction time, min	5	15	2	1	4	4	1	2	1	1	4	4	2
(X3) Cycle number	1	4	10	15	15	15	5	10	15	5	5	15	10

Table 4 Factors and levels of the central composite design

Factors	Levels			Star point ($\alpha=1.41421$)		Run										
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)	$-\alpha$	$+\alpha$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(X1) Extraction temperature, °C	76	90	104	70	110	70	76	104	90	76	90	110	90	90	104	90
(X2) Extraction time, min	6	10	14	5	15	10	6	14	10	14	10	10	15	10	6	5

extractive conditions, a clear minimum in yield is observed. Figure 1c shows the response plot for triclosan; the highest response was achieved at high temperatures and medium time; this trend was shared by bisphenol A (figure not shown). Temperature seemed to exert the largest influence on both triclosan and bisphenol A response, in spite of lack of significant terms in their models ($p < 0.05$). Chlorothalonil (Fig. 1d), tonalide, nonylphenol, dibenz[a,h]anthracene, and pyrene exhibited a similar behavior. For this set of compounds, the minimum in extraction yield was found at minimum time and temperature; inversely maximum yield was attained at maximum time and temperature. In the polynomial models fitted to these compounds, no significant terms are present at $p < 0.05$. However, time appears to be the most influencing factor in the behavior of this set, especially at high temperatures where the increase in extraction yield becomes more evident as time increases. It is interesting to note that four out of the five compounds have high log Kow, dibenz[a,h]anthracene 6.7, tonalide 6.35, nonylphenol 5.99, pyrene 5.08, and chlorothalonil 3.66. When analyzing carbamazepine behavior, it can be seen that a maximum in response is reached at maximum time and low temperature (figure not shown). An increase

of yield with time is observed at high temperatures, even though temperature appears to have a negative effect on response at long extraction times. The response for lindane was characterized by a maximum yield obtained at maximum time and minimum temperature; time appears to have the largest effect in response because at both low and high temperatures best yield is obtained with larger extraction time (figure not shown).

The individual response plots revealed conflicting optimum parameter levels for the extraction yield. Intrinsic differences in physicochemical nature of the analytes played a visible role outside the experimental design domain; their importance was visible because parameters exerted different magnitude and even direction on the response variable depending on the analyte.

Optimization for multiple responses

To overcome differing responses of individual analyte response, a multiple response optimization approach was performed. Desirability is an objective function that ranges from zero outside of the set limits to one at the goal [40]. The numerical optimization finds a point that maximizes a function; then, the desirability function D was used to simultaneously optimize responses of all target analytes. In multiple response, a desired weight is given to each response; in the present study, when building this function, higher desirable values were given to those analytes with lower recoveries. Figure 2a, b shows the overall desirability plot when extraction time and temperature were varied. The overall desirability values were lowest in the region of low to medium extraction time and low to medium extraction temperature, while it reached its maximum at 0.68 in the region of higher temperature and time. It is important to note that the goal of optimization is to find the best set of conditions in which all responses are maximized not to get a desirability value of 1. This value is completely dependent on how closely the lower and upper limits are set relative to the actual optimum. According to the results obtained, the optimal condition for the D function is obtained with time set at 13.5 min and temperature at 104 °C. Theoretical recoveries reached by the desirability function are shown in Table 6.

Table 5 Model characteristics of target analytes

Analyte	Model order	Coefficient of determination, R^2	Significant terms in the model ($p < 0.05$)
Tonalide	3	0.71	None
Nonylphenol	3	0.79	None
DBA	3	0.73	None
Pyrene	3	0.95	None
Lindane	3	0.55	None
Atrazine	2	0.63	X_2^2
Chlorothalonil	3	0.62	None
Ibuprofen	2	0.96	X_2^2, X_1^2
Carbamazepine	3	0.97	$X_1, X_1^2, X_2^2 X_1$
Diclofenac	2	0.90	X_2^2, X_1^2
Clofibrac acid	2	0.89	$X_1 X_2, X_1^2$
Triclosan	3	0.88	None
Bisphenol A	3	0.81	None

X_1 temperature, X_2 time

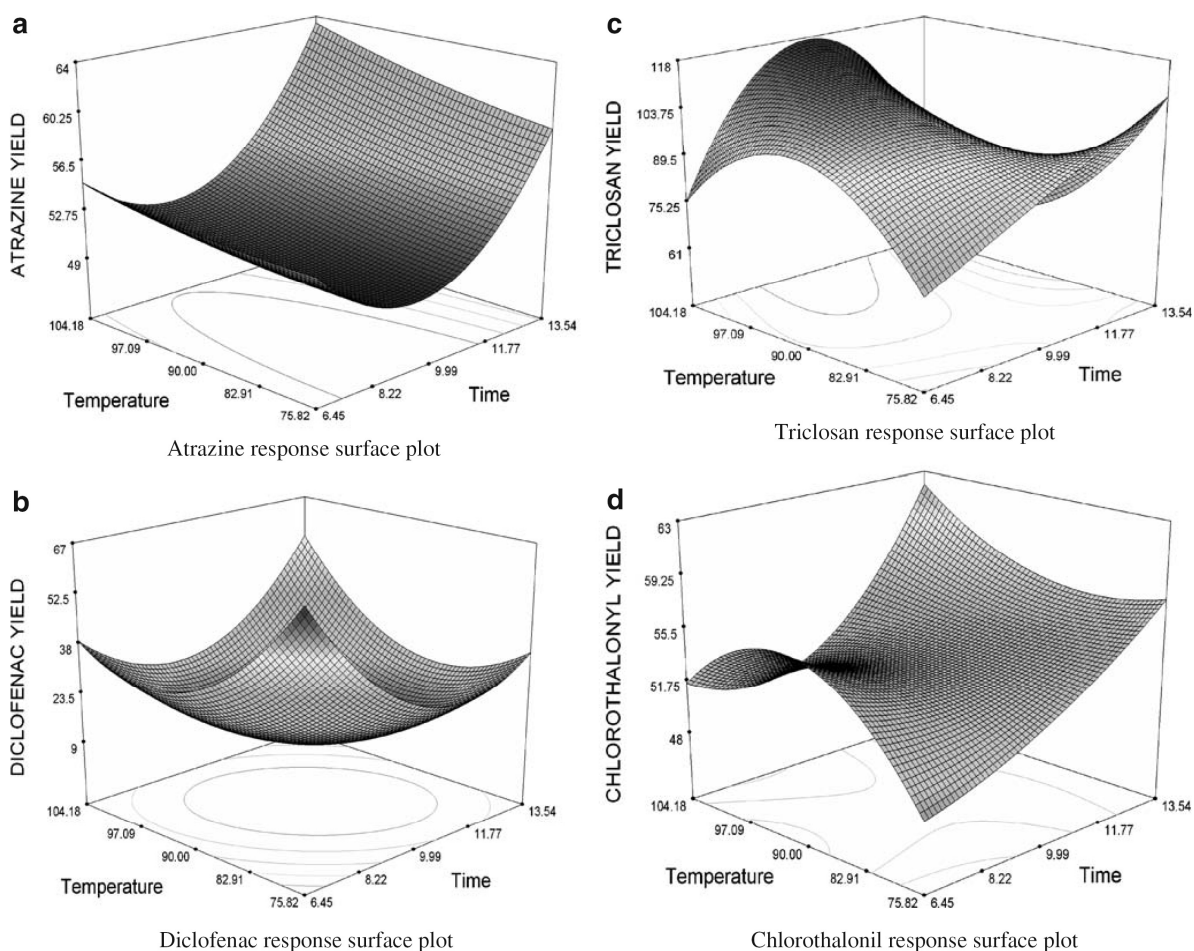


Fig. 1 a Atrazine response surface plot. b Diclofenac response surface plot. c Triclosan response surface plot. d Chlorothalonil response surface plot

Method validation

Validation of global optimal operating conditions was carried out by running those conditions and evaluating analyte recovery at two spiking levels for neutral compounds (0.1 and 0.5 mg kg⁻¹) and at one spiking level for acid compounds (0.3 mg kg⁻¹; Table 6). Recoveries and relative standard deviations were calculated from a triplicate carried out on the same day at all concentrations. The obtained recoveries were overall acceptable; average recoveries for neutral and acid analytes were 70.5% and 71.8%, respectively. In case of the acid analytes, the mean deviation of the actual and theoretical recoveries was 29.9%. Indeed, the compound whose actual recovery had the highest deviation from the predicted recovery was clofibric acid with 71% being not immediately apparent due to its good model fitting. For neutral compounds, the mean

deviation of the actual recovery and theoretical one was 27.5% for the low spiking level and 28.2% for the high one. Compounds which exhibited the worst recovery deviation were lindane with 72.6% and chlorothalonil with 50.2%. Nevertheless, both of these compounds had a poor model fitting ($R^2_{\text{lindane}}=0.55$ and $R^2_{\text{chlorothalonil}}=0.62$), which could explain this deviation in their recoveries.

Method performance

Linearity and figures of merit

Linearity for neutral analytes ranged from 0.006 to 2.40 mg kg⁻¹, while for acid analytes it was found to be between 0.005 and 2.41 mg kg⁻¹. The limits of detection (LOD) of the method were defined as the mean background noise in a blank triplicate, namely matrix sample, plus three times the

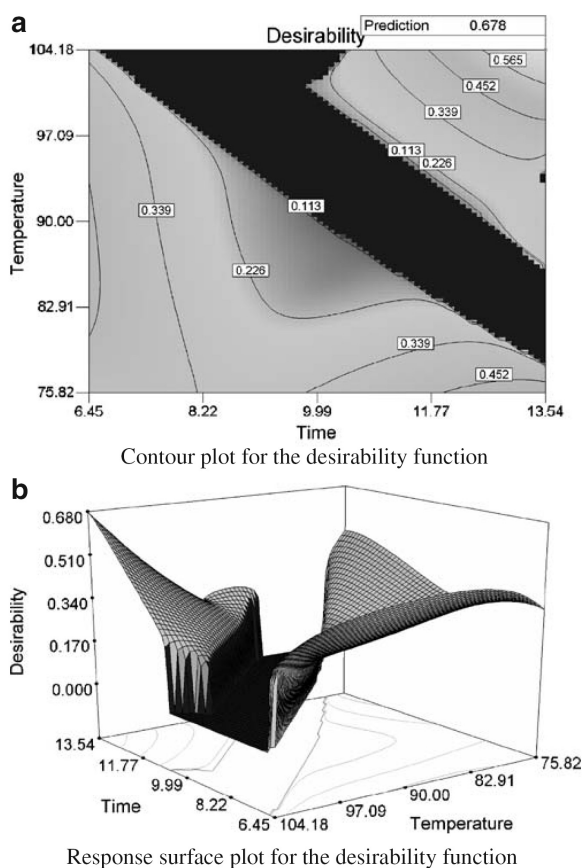


Fig. 2 **a** Contour plot for the desirability function. **b** Response surface plot for the desirability function

Table 7 Figures of merit

Analyte	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Tonalide	18.2	27.4
Nonylphenol	58.1	61.7
DBA	35.9	40.3
Pyrene	10.7	13.1
Lindane	18.4	21.3
Atrazine	33.0	39.6
Chlorothalonil	53.7	54.2
Ibuprofen	16.1	16.9
Carbamazepine	18.5	24.5
Diclofenac	23.2	25.4
Clofibric	30	30.6
Triclosan	6.6	7.6
Bisphenol A	13.6	15.3

standard deviation of the background; the limits of quantitation (LOQ) were defined as the mean background noise in a blank triplicate, namely matrix sample, plus ten times the standard deviation of the background. In Table 7, the figures of merit for all the analytes are shown. The LOD for target analytes ranged from 6.6 to 58 $\mu\text{g kg}^{-1}$, while LOQ values were between 7.6 and 61.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Repetitivity

Method accuracy and repetitivity were evaluated by performing recovery studies using a lettuce spiked at two concentrations, 0.1 and 0.5 mg kg^{-1} in the case of neutral compounds and 0.3 mg kg^{-1} for acid compounds. Samples were spiked with 25 μl of the appropriate mixed standard solution in methanol. All experiments were performed in triplicate on the same day at both concentrations. The

Table 6 Recovery data obtained from lettuce matrix spiking

Neutral analytes	Theoretical recovery	0.1 mg kg^{-1}		0.5 mg kg^{-1}		Acid analytes	Theoretical recovery	0.3 mg kg^{-1}	
		R%	RSD% ^a	R%	RSD% ^a			R%	RSD% ^a
Tonalide	92	106	13.4	87.0	8.4	Ibuprofen	92	83.2	0.88
Dibenzo[a,h] anthracene	84	57.3	9.3	50.8	12.4	Diclofenac	55	69.5	2.8
Pyrene	94	93.6	21.5	59.7	6.5	Clofibric acid	29	50.2	1.1
Lindane	68	117	10.1	73.7	6.9	Triclosan	74	91.9	0.5
Atrazine	63	59.3	9.6	79.5	3.0	Bisphenol A	76	61.1	0.2
Nonylphenol	95	79.3	11.1	54.6	9.9				
Chlorothalonil	62	30.9	14.3	37.8	8.8				
Carbamazepine ^b	59	75.0	14.6	na	na				

na not available

^a Mean recovery and variance (expressed as relative standard deviation) from analysis of spiked samples ($n=3$)

^b Spiking level was 0.3 mg kg^{-1}

relative standard deviations are shown in Table 6. Larger variability was obtained for neutral analytes. Their relative standard deviation values ranged from 3% to 21.5%, whereas for acid compounds they were much smaller ranging from 0.2% to 14.8%.

Analysis of a real sample

The efficiency of the method developed was evaluated by analyzing a nonspiked lettuce sample bought at a local market. The sample was processed in triplicate as described in the “Experimental” section. Ibuprofen was identified and quantitated on the basis of the internal standard procedure, and it was found to be at a concentration of 28.5 ng g^{-1} ; the relative standard deviation was 10.54%.

Conclusions

A multiresidue methodology for the determination of 13 emerging and priority pollutants in lettuce based on MSPD combined with PFE and GC–MS determination was successfully developed. RSM was used to optimize the parameters of PFE for each analyte. The use of the desirability function allowed for the simultaneous optimization of all analytes in spite of their conflicting responses to yield global optimal extraction conditions. Theoretical results obtained with this function were validated by running these conditions at different spiking levels, the recoveries obtained were overall acceptable. The deviation of the actual recoveries from the theoretical values could be explained by the poor fit to the model exhibited by some analytes. The use of experimental design and RSM along with the application of the desirability function yields reliable data obtained with the minimum of experimentation. Good results with respect to accuracy and repetitivity were attained in the range of concentrations studied for most of the analytes of interest. Finally, an incurred pharmaceutical could be identified in a lettuce sample obtained from local sources.

Acknowledgements DC kindly acknowledges a predoctoral fellowship from the CONACYT. CC would like to acknowledge the TECSPAR ALFA network from the EU. Funding was obtained from the Generalitat de Catalunya through the Catalan Agency for Food Safety (ACSA).

References

1. FAO (2006) Coping with water scarcity: A strategic issue and priority for system-wide action. Italy. <ftp://ftp.fao.org/agl/aglw/docs/waterscarcity.pdf>. Accessed 15 august 2008
2. Jiménez B, Asano T (2008) Water Reuse. An International Survey of current practice, issues and needs. Scientific Technical Report no. 20
3. Richardson S (2008) *Anal Chem* 80:4373–4402
4. Kolpin DW, Furlong E, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) *Environ Sci Technol* 36:1202–1211
5. Jobling S, Nolan M, Tyler C, Brighty G, Sumpter JP (1998) *Environ Sci Technol* 32:2498–2506
6. Luckenbach T, Epel D (2005) *Environ Health Perspect* 13:17–24
7. Boxall A, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E, Levy LS (2006) *J Agric Food Chem* 54:2288–2297
8. Kong WD, Zhu YG, Liang YC, Zhang J, Smith FA, Yang M (2007) *Environ Pollut* 147:187–193
9. Migliore L, Civitareale C, Cozzolino S, Casoria P, Bramilla G, Gaudio L (1998) *Chemosphere* 37:2957–2961
10. Fimes J, Perrin-Garnier C, Empereur-Bissonnet P, Morel JL (2002) *J Environ Qual* 31:1649–1656
11. González M, Miglioranza K, Aizpún JE, Moreno VJ (2003) *J Agric Food Chem* 51:1353–1359
12. Bendz D, Paxéus NA, Ginn TR, Loge FJ (2005) *J Hazard Mater* 122:195–204
13. Sacher F, Thomas Lange FT, Brauch HJ, Blankenhorn I (2001) *J Chromatogr A* 938:199–210
14. Gatidou G, Thomaidis NS, Stasinakis AS, Lekkas TD (2007) *J Chromatogr A* 1138:32–41
15. Schuhmacher M, Nadal M, Domingo JL (2004) *Environ Sci Technol* 38:1960–1969
16. Scheider RJ (2008) In: Aga DS (ed) Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems. CRC, New York
17. Baugros JB, Giroud B, Dessalces G, Grenier-Loustalot MF, cren-Olivé C (2008) *Anal Chim Acta* 607:191–203
18. Pitarch E, Medina C, Portolés T, López FJ, Hernández F (2007) *Anal Chim Acta* 583:246–258
19. Loos R, Hanke G, Umlauf G, Eisenreich SJ (2007) *Chemosphere* 66:690–699
20. Hernández F, Sancho JV, Pozo O, Lara A, Pitarch E (2001) *J Chromatogr A* 939:1–11
21. Baronti C, Curini R, D’Ascenzo G, Dicorcia A, Gentili A, Samperi R (2000) *Environ Sci Technol* 34:5059–5066
22. Botitsi H, Economou A, Tsiipi D (2007) *Anal Bioanal Chem* 389:1685–1696
23. Fenoll J, Hellín P, López J, González A, Flores P (2007) *Anal Bioanal Chem* 389:643–652
24. Payá P, Anastassiades M, Mack D, Sigalova I, Tasdelen B, Oliva J, Barba A (2007) *Anal Bioanal Chem* 389:1663–1683
25. Wang S, Xu Y, Pan C, Jiang S, Liu F (2006) *Anal Bioanal Chem* 387:673–686
26. González-Rodríguez RM, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J (2008) *Food Chem* 107:1342–1347
27. Beltrán J, Peruga A, Pitarch E, López J (2003) *Anal Bioanal Chem* 376:502–511
28. Ravelo-Pérez LM, Hernández-Borges J, Borges-Miquel TM, Rodríguez-Delgado MA (2008) *J Chromatogr A* 1185:151–154
29. Liu W, Hu Y, Hao J, Xu Y, Guan Y (2005) *J Chromatogr A* 1095:1–7
30. Ochiai N, Sasamoto K, Kanda H, Yamagami T, David F, Tienpont B, Sandra P (2005) *J Sep Sci* 28:1083–1092
31. Anastassiades M, Schwack W (1998) *J Chromatogr A* 825:45–54
32. Motohashi N, Nagashima H, Párkányi C (2000) *J Biochem Biophys Methods* 43:313–328
33. Hernández Borges J, Ravelo-Pérez LM, Hernández-Suárez EM, Carnero A, Rodríguez-Delgado M (2007) *Chromatographia* 67:69–75
34. Singh SB, Foster GD, Khan SU (2007) *J Chromatogr A* 1148:152–157

35. Preud'homme H, Potin-Gautier M (2003) *Anal Chem* 75:6109–6118
36. Pang G, Liu Y, Fan CL, Zhang JJ, Cao YZ, Li XM, Li ZY, Wu YP, Guo TT (2006) *Anal Bioanal Chem* 384:1366–1408
37. Lambropoulou DA, Albanis TA (2007) *Anal Bioanal Chem* 389:1663–1683
38. Kristenson M, Ramos L, Brinkman UA (2006) *Trends Analyt Chem* 25:96–110
39. Lehotay SJ, Mastovská K, Lightfield AR (2005) *J AOAC Int* 88:615–629
40. Aggarwal A, Singh H, Kumar P, Singh M (2008) *J Mater Process Technol* 205:42–50

III.9. Discusión general de resultados

Las metodologías analíticas utilizadas en el transcurso de la presente Tesis fueron diversas, debido a las diferencias fisicoquímicas intrínsecas en el amplio espectro de analitos diana y a su determinación en dos matrices ambientales relevantes: agua y material vegetal.

La elevada sensibilidad alcanzada en la determinación de THMs mediante HS-SPME-GC-ECD (LODs, 1 – 350 ng L⁻¹) sugiere que su aplicación en matrices acuosas es idónea (Tabla I.13; Tabla 1 sección IV.5.; Tabla 2 sección IV.6.). Ahora bien, cuando se contrasta este método con los tres métodos USEPA aplicados en la determinación de THMs, el método aquí aplicado es un orden de magnitud más sensible que los métodos 502.2 y 524.2 y comparable con el 551.1 para diclorobromometano, clorodibromometano y bromoformo. No así para el cloroformo, cuyo LOD es bastante superior a los otros tres métodos; este comportamiento podría atribuirse a una menor afinidad de este compuesto por la fase utilizada en la fibra de SPME.

La fusión y adaptación del Método 521 USEPA y el propuesto por Charrois et al. (2004), fue satisfactoria para la determinación de N-nitrosaminas en aguas. La elevada sensibilidad (LODs: 6 – 16,8 ng L⁻¹) alcanzada en la metodología desarrollada pone de manifiesto la idoneidad de la misma para la determinación de estos compuestos en aguas regeneradas. No obstante, el Método 521 USEPA (Tabla III.6) presenta una mejor sensibilidad que el propuesto en esta Tesis, lo que posiblemente se debe al uso de la espectrometría de masas en tándem y a la inyección de grandes volúmenes de muestra.

La metodología aplicada en la presente Tesis para la determinación de N-nitrosaminas, y en el caso concreto de la NDMA, es lo suficientemente sensible para satisfacer los límites impuestos por Health Canada de 0,04 µg L⁻¹ (Health Canada, 2011) y el nivel de acción de 0,01 µg L⁻¹ por el CDHS de EE.UU en aguas potables.

El desarrollo de un método multirresiduo para la determinación de microcontaminantes orgánicos, prioritarios y relacionados en tejido vegetal (hoja) fue un elemento primordial de la presente Tesis y se describe en el artículo 1 (sección III.8). Esta metodología analítica se basa fundamentalmente en la extracción de los analitos diana mediante MSPD acoplada a PLE, incorporando algunos elementos de la metodología QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). El desarrollo de esta metodología se realizó en dos pasos, el primero consistió en seleccionar los elementos analíticos apropiados tanto para la matriz como para el tipo de analitos que se deseaban determinar en base a una revisión exhaustiva de la literatura científica disponible y en un segundo paso se aplicó un diseño experimental para obtener las condiciones óptimas de extracción del método.

De este modo, en la presente discusión se busca describir más detalladamente los elementos que componen esta metodología.

Como etapa inicial, se aplicó la MSPD utilizando como agente dispersante florisil (silicato de magnesio) que además de disgregar la muestra coadyuvaría a la eliminación de la clorofila presente

(Manirakiza et al., 1999). La buena homogeneización del material vegetal es un paso fundamental en esta técnica de extracción, ya que además de un tamaño y distribución uniformes se aumenta el área superficial de la muestra, lo que más tarde facilita la extracción de los analitos diana de la matriz. Un factor importante a considerar en el desarrollo de la metodología fue la selección de clorotalonil como analito diana. Este pesticida organoclorado, es inestable a pH básico y ha sido reportado ampliamente como un pesticida difícil de determinar en métodos multiresiduo (Mastovska y Lehotay, 2004). Para mejorar la extracción de este tipo de analitos, la metodología QuEChERS hace hincapié en la adición de sales, ácidos y tampones a la muestra disgregada (Anastassiades et al., 2003). Los dos tampones más utilizados son el de acetato y citrato, habiéndose reportado que ambos favorecen la extracción de compuestos cuya estabilidad es muy dependiente del pH. Aunque existen estudios que comparan la eficacia de ambos tampones en cuanto a recuperación de compuestos pH-lábiles, de manera general las diferencias no son significativas, y dependen en gran medida tanto de la matriz a analizar como del compuesto individual (Lehotay et al., 2010; Ohkawa et al., 2007; Shia, 2009). En la presente metodología, no obstante, se adoptó el uso del tampón citrato (pH 5 - 5,5) debido a que se reporta una menor co-extracción de matriz frente al tampón de acetato, 0,1% vs. 0,25% respectivamente (Ohkawa et al., 2007). Además, Shia (2009) observó que el uso del tampón citrato incrementaba la extracción de atrazina y clorotalonil de la avena. Durante el MSPD se adicionaron también Na_2SO_4 y NaCl con el objeto de favorecer la partición de los analitos entre la muestra y el disolvente orgánico debido al incremento en la fuerza iónica de la mezcla resultante (Lehotay et al., 2010).

La extracción de los analitos diana se realizó mediante PLE debido a que las altas presiones y temperaturas utilizadas en combinación con MSPD producen una extracción rápida y exhaustiva de los analitos de interés (Curren y King, 2002). Es importante mencionar que la PLE se emplea en muestras anhidras, ya que la ausencia de humedad favorece la interacción entre la matriz y el disolvente orgánico. Por esta razón, se ha utilizado HydromatrixTM (tierra de diatomeas) para desecar las muestras. Ahora bien, debido a que la extracción con PLE tiene una selectividad limitada, en el caso de la lechuga, se obtienen extractos con altas cantidades de clorofila que requieren de un clean-up adicional (columna de florisil). La eliminación de clorofila y otros pigmentos presentes en el extracto, permite una identificación y cuantificación más precisa de los analitos diana sobre todo si éstos se encuentran en niveles traza, minimizando simultáneamente el deterioro del sistema cromatográfico (Fidalgo-Used et al., 2007). Adicionalmente, se realizó una partición ácido-base con el objeto de maximizar la recuperación de los analitos de interés, obteniendo de esta manera dos fracciones, una en donde se recuperan compuestos neutros y básicos y otra con los analitos ácidos.

Ahora bien, una vez que se eligió la técnica extractiva idónea, se debían optimizar los parámetros de operación con el objetivo de maximizar la extracción de los analitos diana. La optimización de una metodología analítica, demasiado a menudo, se realiza utilizando el enfoque de “una variable a la vez”. Llevándose a cabo mediante la monitorización de la influencia de un solo factor en la variable de respuesta. Es decir, mientras se hace variar un factor, el resto se mantienen constantes. Esta secuencia de experimentación no arroja ninguna información acerca de la interacción entre las variables, lo que se considera como su principal desventaja. Para evitar este error, se aplicó un diseño experimental que permitió determinar la relación entre las variables que afectan al proceso de extracción mediante el seguimiento de la recuperación de los analitos diana.

En primer lugar, se hizo un cribado de las variables que podrían afectar la extracción aplicando para este fin un diseño 2^k , dando como elemento determinante en la extracción la interacción del tiempo y la temperatura de extracción. Esta conclusión se refuerza con lo reportado en la literatura, en donde se ilustra que los parámetros más importantes a considerar son temperatura y tiempo de extracción. En el cribado de las variables en PLE, se dejó de lado la presión, lo que a priori podría parecer un error. Sin embargo, se tomó tal decisión debido a que el papel de la presión es relativamente poco importante ya que su rol determinante es el de mantener el disolvente en estado líquido (Fidalgo-Used et al., 2007).

En el siguiente paso, se optimizaron las condiciones de extracción mediante la RSM. Los resultados proporcionados por esta metodología evidenciaron comportamientos diferentes de los analitos bajo estudio en función de sus propiedades fisicoquímicas. Es evidente que esta metodología es capaz de brindar información acerca de las condiciones específicas en las que se obtiene el rendimiento óptimo, para cada compuesto. Sin embargo, en un método multiresiduo el objetivo es encontrar las condiciones óptimas que maximicen la extracción de todos los analitos simultáneamente. Atendiendo a esta necesidad, se aplicó la función de deseabilidad, uno de los métodos más comúnmente utilizados para la optimización de respuestas múltiples. Es importante resaltar, que al construir esta función se les dio mayor peso a aquellos compuestos con recuperaciones inferiores, intentando de esta manera mejorar su recuperación final. Las condiciones óptimas globales de operación se alcanzaron a un tiempo de 13,5 min y temperatura de 104 °C. Las recuperaciones obtenidas fueron aceptables (57 – 106%) para todos los compuestos exceptuando al clorotalonil para el que se obtuvo una recuperación del 31%.

Con el objetivo de mejorar la selectividad del método y con ello los LODs, se realizó el análisis de los analitos diana mediante GC-MS/MS. Para la mayoría de los analitos se logró una mejora sustancial en los LODs, entre 2,5 y 30 veces menores que los calculados utilizando GC-MS (Tabla III.7). Ello hizo que en futuros trabajos (artículos 2, 4 y 5) se escogiera esta instrumentación analítica para la determinación de microcontaminantes orgánicos en tejidos vegetales.

Capítulo IV

Evaluación de Aguas Regeneradas Utilizadas en el Riego Agrícola

“The objective of statistical analysis is to discover what conclusions can be drawn from data and to present these conclusions in as simple and lucid a form as is consistent with accuracy.”

D.R. Cox y E.J. Snell

“.. all models are approximations.
Essentially, all models are wrong, but some are useful.
However, the approximate nature of the model
must always be borne in mind..”

George E.P. Box

IV.1. Introducción al capítulo

La distribución irregular de las precipitaciones (periodos de largas sequías seguidos de lluvias torrenciales) en la Cuenca Mediterránea ha propiciado el incremento de la reutilización de aguas regeneradas en esta zona. Aunque el primer testimonio de la reutilización de aguas residuales en Cataluña se localiza en la ciudad de Reus en el año 1932, el primer proyecto de reutilización planificada no se inició hasta el año 1989 en Castell-Platja d'Aro.

El Consorci de la Costa Brava (CCB) ha liderado la aplicación y gestión de la reutilización y regeneración de aguas residuales en Cataluña durante los últimos 20 años. Como resultado de esta ardua labor, el CCB es el organismo explotador de 13 proyectos de regeneración, con una producción anual de 5 hm³. Adicionalmente, el uso de agua regenerada en la Costa Brava presenta un amplio espectro de aplicaciones que incluyen irrigación de zonas agrícolas y campos de golf, limpieza de la vía pública o restauración de humedales.

IV.2. Métodos estadísticos y quimiométricos

De manera general podemos decir que la obtención de datos ambientales libres de ruido de fondo o de interferencias químicas y/o físicas procedentes de la muestra o del procedimiento analítico resulta difícil. La complejidad de los datos ambientales y el tamaño de las bases de datos impiden que las técnicas de análisis estadístico univariante sean suficientes en el tratamiento de éstos. Además el tipo de procesos estudiados en las Ciencias Ambientales acostumbran ser del tipo multivariante, puesto que pueden existir diversos patrones de contaminación, procedentes de fuentes diversas. Por lo tanto, aplicando técnicas de análisis multivariante permiten obtener una gran cantidad de información a partir de datos ambientales, ayudando a elucidar las variables determinantes en los procesos o fenómenos ambientales bajo estudio.

IV.2.1. Pre-tratamiento de datos

Generalmente, para extraer información a partir de datos ambientales, se requiere de la aplicación de técnicas de pre-tratamiento de datos. Este proceso es necesario cuando las variables en estudio son diversas y presentan entre ellas diferente orden de magnitud, lo que las hace incomparables entre sí. El pre-tratamiento de datos se aplica para obtener una comparación entre dichas variables, evitando que una o varias dominen al resto. Existen varios métodos que se aplican con este fin, entre los más usuales destacan la transformación logarítmica, centrado, escalado y autoescalado.

IV.2.2. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*) es un método de estadística multivariante exploratoria. El PCA parte de la hipótesis de que en un grupo de datos existe un conjunto de factores reducidos o componentes dominantes (fuentes de variación) que influyen de manera determinante en la varianza observada en los datos. Estos factores no se miden directamente, ya que no son observables de una manera experimental. Muchas veces una parte importante de la información contenida en

las variables medidas es redundante o carece de importancia. El PCA permite transformar este conjunto de variables en un nuevo conjunto cuyas variables no están correlacionadas entre sí, haciendo este sistema más sencillo de interpretar y haciendo más evidente la información oculta (Jolliffe, 2002).

La finalidad del PCA es encontrar un nuevo conjunto de ejes ortogonales en coordenadas sobre las que se puedan proyectar los datos originales y brindar una mejor y más sencilla interpretación de los fenómenos causantes de la varianza observada en las variables medidas (Helena et al., 2000; Jolliffe, 2002). Matemáticamente la matriz original de datos D se descompone siguiendo un modelo bilineal dando como resultado dos matrices ortogonales, X y Y^T (Figura IV.1.).

$$D = XY^T + E = D^* + E \quad (\text{eq. 1})$$

donde D es la matriz de datos experimentales, X es la matriz de *scores*, Y^T la matriz de *loadings* y E la matriz del error. X describe la composición de las muestras según las nuevas variables, mientras que Y^T describe la contribución de las variables originales a cada nueva variable o componente principal (PC, *Principal Component*).

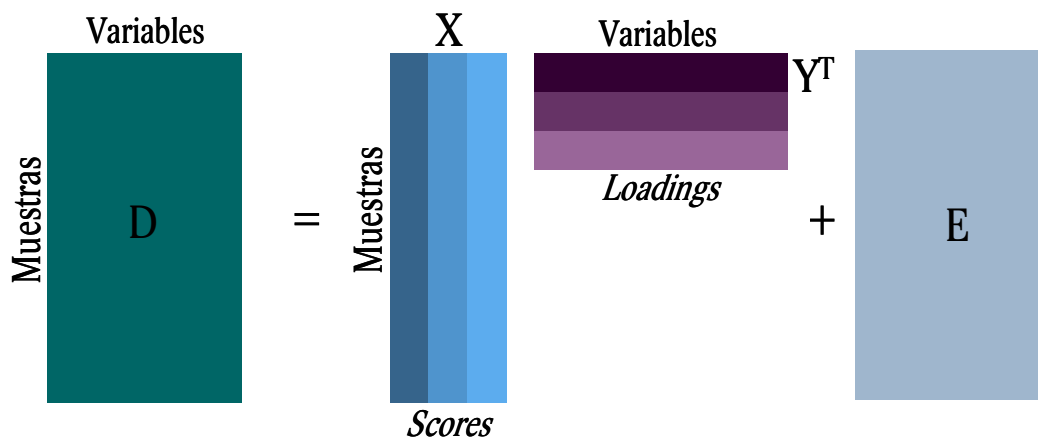


Figura IV. 1. Descomposición por PCA de la matriz de datos D en 3 componentes.

Ahora bien, una vez descompuesta la matriz D , se debe escoger el número de PCs óptimo para el análisis llegando a un compromiso entre la varianza total explicada y la complejidad del sistema. Como primer paso para determinar qué componentes deben retenerse, se evalúa su *eigenvalue*, éste indica la cantidad de varianza explicada por cada PC. Generalmente se intenta retener las PCs que posean *eigenvalues* superiores a 1. No obstante, también hay que considerar que aunque la elección de un gran número de PCs permitirá incluir una varianza total más alta, la interpretación del sistema puede ser mucho más compleja (Helena et al., 2000).

El análisis de las muestras se realiza representando gráficamente los nuevos factores o PCs. Estos gráficos denominados *scores* permiten agrupar las muestras de acuerdo a sus similitudes, además de identificar aquellas con valores extremos.

IV.3. Modelos de incorporación de microcontaminantes orgánicos

La evaluación de los riesgos potenciales que las sustancias químicas pueden ocasionar en humanos y medio ambiente se lleva a cabo internacionalmente a través de agencias reguladoras. Dichos organismos utilizan para este fin criterios como persistencia, bioacumulación y toxicidad (Government of Canada 1999; UNEP 2001; European Parliament 2006). Los criterios seguidos en la evaluación de la bioacumulación incluyen el factor de bioacumulación (BAF, *Bioaccumulation factor*), el factor de bioconcentración (BCF, *Bioconcentration factor*) y el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}).

De entre todos los modelos existentes, los más usuales son los conceptuales, estadísticos y de balance de masas. Éstos se utilizan en una gran variedad de aplicaciones relacionadas con el medio ambiente y la salud humana (Arnot et al., 2009). Según el *National Research Council* de EE.UU. un modelo se define como “*una simplificación de la realidad que se construye para obtener información de atributos selectos de un sistema físico, biológico, económico o social particular*” (NRC, 2007). Los modelos se basan en suposiciones simplificadas de las que no se espera una réplica exacta de la complejidad intrínseca de los sistemas reales. Reconocer este inconveniente no minimiza la importancia de los modelos para una variedad de propósitos en un gran número de disciplinas científicas, donde éstos se utilizan para predecir futuros resultados a partir de datos y procesos conocidos (McKone et al., 2007).

Los modelos de balance de masas multi-compartimiento (aire, agua, suelo, sedimentos, peces) fueron introducidos por D. Mackay y utilizados para cuantificar transporte, transformación y destino final de compuestos orgánicos en el medio ambiente (McKone y MacLeod, 2003). Estos modelos utilizan expresiones matemáticas para combinar procesos físicos de transporte (basados en la fugacidad) y de transformación con principios termodinámicos con el objetivo de cuantificar el destino químico, transporte y comportamiento.

Los modelos antes mencionados varían en complejidad (p. ej., niveles I – IV), propósito (p. ej., evaluativo) y escala (p. ej., local, regional, continental y global) (Mackay, 2001; MacLeod y McKone, 2004).

Los modelos Nivel I simulan una situación simple en la que un compuesto químico alcanza el equilibrio entre diferentes fases de volumen y composición definida; asumiendo un estado estacionario. En este nivel se descarta la degradación y procesos de advección, tanto de entrada como de salida en el sistema definido. Este tipo de modelos predicen la probabilidad que tiene un compuesto dado de compartimentarse basándose en sus propiedades fisicoquímicas y las características ambientales definidas.

Los modelos pertenecientes al Nivel II simulan una situación en la que un compuesto químico se libera en un ambiente a una velocidad constante; asumiendo que lo hace bajo condiciones de estado estacionario y equilibrio entre compartimientos. Los modelos de este nivel introducen velocidades de reacción (degradación) en compartimientos ambientales definidos, así como procesos de advección. Estos modelos predicen qué procesos ambientales se espera sean relevantes en la pérdida de un compuesto químico de un compartimiento determinado.

Los modelos del Nivel III suponen la liberación de un compuesto a velocidad constante y en la que la entrada y salida del compuesto en el sistema bajo estudio es igual. En los procesos de pérdida incorporados en este nivel se incluyen reacciones de degradación y advección. A diferencia de los anteriores, los modelos del Nivel III introducen velocidades de transferencia entre compartimientos, por lo que no se asumen condiciones de estado estable. Al igual que los modelos de Nivel II, los del Nivel III proporcionan información acerca de la persistencia, tiempo de residencia y potencial de transporte a largas distancias en aire o agua de un compuesto químico determinado.

Los modelos Nivel IV introducen la capacidad de modelar cambios en el comportamiento de un compuesto químico en función del tiempo. En este nivel no se asume estado estacionario, esto involucra la solución de ecuaciones diferenciales en el balance de masas, para describir el comportamiento dinámico de los compuestos químicos liberados al ambiente.

Todos los modelos de balance de masas requieren datos de propiedades fisicoquímicas (p. ej., K_{ow} , presión de vapor, solubilidad) y de reactividad (p. ej., vida media) en diferentes medios (p. ej., atmósfera, plantas). Los requerimientos de estas propiedades generalmente aumentan con la complejidad del modelo. La disponibilidad de esta información es a menudo un obstáculo a vencer en la aplicación de los modelos, debido a que estos datos están limitados a compuestos químicos muy estudiados (Arnot et al., 2009).

Es únicamente después de reconocer la amplia presencia de microcontaminantes orgánicos en el medio ambiente cuando se ha iniciado el estudio de la incorporación de estos compuestos en plantas. Como es natural, existen muchas preguntas sin resolver, y la predicción mediante modelos de incorporación, acumulación y metabolización solo es satisfactoria para un número muy reducido de compuestos. Este vacío de información se atribuye a la complejidad de los procesos involucrados, la alta variabilidad de la morfología y fisiología vegetal y al amplio espectro de contaminantes químicos con diferentes propiedades fisicoquímicas presentes en el medio ambiente. Los modelos de incorporación de microcontaminantes en plantas más relevantes se clasifican en dos grandes grupos: los basados en un enfoque teórico complejo o aquellos con enfoque empírico.

Los modelos teóricos contruidos para la descripción de procesos de incorporación y translocación en plantas difieren en gran medida en función de si son aplicables a compuestos neutros o ionizables (Trapp, 2004). Esto es debido a que los compuestos neutros sufren solo algunos procesos dentro de las plantas, como interacciones lipofílicas y reacciones metabólicas, mientras que sus contrapartes iónicas además de estas reacciones sufren procesos de disociación, efecto “*ion trap*” y atracción y/o repulsión eléctrica. Para los compuestos ionizables el pK_a del propio compuesto y las variaciones de pH del medio son más importantes que la lipofilicidad (Trapp, 2000; 2004).

La incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas descrita en el artículo 3 (sección IV.6) se ha realizado mediante el uso de los dos modelos empíricos que se citan a continuación.

Modelo I. Compuestos Neutros (Travis y Arms, 1988). Este modelo se basa en mediciones de bioconcentración en plantas para 29 compuestos organoclorados reportados en la literatura. El modelo de regresión empírica

utiliza el $\log K_{ow}$ para evaluar la incorporación de microcontaminantes orgánicos en el sistema suelo-planta (en base al peso seco).

$$\text{Log BCF} = -0,58 \log K_{ow} + 1,58$$

donde BCF es el ratio de bioconcentración planta-suelo, utilizado para relacionar la concentración química medida en el tejido vegetal con las concentraciones del suelo en el que crece dicha vegetación.

Modelo II. Compuestos Iónicos (Veith et al., 1979). Este modelo predice el valor de BCF mediante su relación lineal con K_{ow} , únicamente es aplicable para modelos de masa molecular inferior a 700. El *Technical Guidance Document on Risk Assessment* en el que se apoya la Directiva Europea (93/67/EEC) sugiere el uso de este modelo para compuestos ionizables mediante la corrección de las propiedades fisicoquímicas ($\log K_{ow}$) con la fracción neutra del compuesto, F_n .

$$\text{Log BCF} = 0,85 \times \log(F_n \times K_{ow}) - 0,70$$

IV.4. Contextualización y estructura del capítulo

Los resultados presentados en este capítulo han sido publicados en dos artículos científicos: *Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading* y *Occurrence and potencial crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network*, enmarcados en el proyecto de investigación “**Prevenció del risc sanitari derivat de l’aprofitament d’aigües regenerades com a aigües de reg agrícola**” de la Agència Catalana de Seguretat Alimentària.

Los resultados que se describen y discuten son los siguientes:

- Los niveles de microcontaminantes orgánicos presentes en las aguas de irrigación agrícola de las zonas de Torroella de Montgrí y el Parc Agrari del Baix Llobregat (Artículos 2 y 3).
- La distribución temporal y espacial de los analitos diana en las zonas de estudio (Artículos 2 y 3).
- El potencial de incorporación de microcontaminantes orgánicos en cultivos irrigados con aguas regeneradas (Artículos 2 y 3).
- La aplicación de técnicas estadísticas univariantes y multivariantes en la determinación de asociaciones naturales entre muestras y/o variables (Artículo 2).
- La aplicación de modelos matemáticos para la predicción de la concentración de microcontaminantes orgánicos en plantas (Artículo 3).

Además de los resultados recogidos en los dos artículos científicos incluidos en el presente capítulo, se detallan los criterios seguidos para la elección de los analitos diana evaluados en estos dos estudios, así como una descripción de las condiciones climatológicas sufridas por la región durante el estudio (sección IV.7.).

IV.5. Artículo científico 2

Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading.

Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Matamoros, V. and Bayona, J.M. (2011). *Water Research* 45(1), 221-231.

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading

D. Calderón-Preciado^a, C. Jiménez-Cartagena^{a,b}, V. Matamoros^c, J.M. Bayona^{a,*}

^a Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, E-08034 Barcelona, Spain

^b Diagnosis and Pollution Control Group, Faculty of Engineering, Antioquia University, Medellín, Colombia

^c Department of Chemistry, University of Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2009

Received in revised form

6 July 2010

Accepted 16 July 2010

Available online 27 July 2010

Keywords:

Reclaimed water

River water

Pharmaceuticals and personal care products

Disinfection by-products

Pesticides

Micropollutant soil loadings

ABSTRACT

Reclaimed water usage for crop irrigation is viewed both as an excellent sustainable water source and as a potential entrance for emerging organics into the food chain. This concern is backed by the already documented pollutant crop uptake potential. In the present study, irrigation waters used in agricultural fields (Torroella de Montgri, NE Spain) were screened for 47 analytes in a two year study (2007–2008). A total of 26 contaminants belonging to different chemical classes namely, pesticides, pharmaceuticals, personal care products, phenolic estrogens, antioxidants and disinfection by-products, were detected. Marked differences in concentration trends for the different chemical classes were evidenced from 2007 to 2008, and attributed to a persistent drought endured by the region in 2008. Also, loading mass rates of chemical classes were estimated based on crop irrigation regimes and they ranged from 0.8 to 121.3 g ha⁻¹ per crop cycle. These values were contrasted with those obtained for other water sources from countries where crop irrigation is commonly practiced. Finally, crops grown under these irrigation regimes, namely alfalfa and apple, were analyzed and 5 anthropogenic compounds were identified and quantitated, whose concentrations ranged from 13.9 to 532 ng g⁻¹ (fresh weight).

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is becoming widely accepted that available freshwater resources are very limited and constitute a small fraction of the total freshwater budget (Oki and Kanae, 2006). Moreover, an increase in world population has raised the pressure on natural resources, exemplified by an escalating demand for domestic, industrial and agricultural water (Zimmerman et al., 2008). Furthermore, on a global basis, 70% of freshwater is currently destined to crop irrigation, 20% for industrial purposes and the remaining 10% to domestic use (Zimmerman et al., 2008). Nowadays, 28 countries with a total population exceeding 300 million habitants are faced with water scarcity (Rosegrant and

Cai, 2001). As world demands for water grow, water reclamation and reuse become increasingly important as an indispensable component of the integral water resource management, and are widely regarded as sustainable approaches in agricultural irrigation (Jimenez and Asano, 2008). This aspect is of special significance considering the importance of adequately sustaining agricultural activities in order to ensure food production (Rosegrant and Cai, 2001). In this regard, reclaimed wastewater usage is a sustainable crop irrigation alternative already in use in some countries such as USA, Israel, Australia, and Spain (Jimenez and Asano, 2008). Nevertheless, it is well known that one of the main micro-pollutant inputs to the hydrological cycle are the WWTP

* Corresponding author. Tel.: +34 934006119; fax: +34 932045904.

E-mail addresses: dcpqam@cid.csic.es (D. Calderón-Preciado), cjimenez@farmacia.udea.edu.co (C. Jiménez-Cartagena), vmmqam@cid.csic.es (V. Matamoros), jbtqam@cid.csic.es (J.M. Bayona).
0043-1354/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.watres.2010.07.050

effluents. Indeed, these micropollutants do not need to be persistent to have an effect on ecosystems, since their medium to high removal rates are overshadowed by their continuous introduction into the environment (Petrovic et al., 2003).

Many microcontaminant classes have been documented to occur in WWTP effluents including human and veterinary pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), pesticides, phenolic estrogens, surfactants, dispersants, biocides and disinfection by-products (Kolpin et al., 2002). Though the potential health and environmental hazards derived from continued exposure to these chemicals are not well understood, the ecotoxicological effects that they could induce remain of great concern. Still estrogenic responses on aquatic organisms exerted by endocrine disruptors (Jobling et al., 1998; Fent et al., 2006), inhibition of multixenobiotic resistance in mussels caused by polycyclic musks (Luckenbach and Epel, 2005), the carcinogenicity and/or mutagenicity elicited by PAHs in humans, and the potential development of antibiotic resistance as a result of low concentration exposure to pharmaceuticals (Boxall et al., 2006) are well documented. These evidences illustrate that the occurrence of some microcontaminants, even at low concentrations, can lead to chronic health effects especially at highly contaminated sites, particularly when a possible synergistic effect of pharmaceutical mixtures could take place (Fent et al., 2006; Jjemba, 2008). In addition, the uptake of veterinary medicines (Migliore et al., 1998; Luckenbach and Epel, 2005; Kong et al., 2007), PAHs (Fimes et al., 2002; Samsoe-Petersen et al., 2002) and pesticides (Gonzalez et al., 2003; Gent et al., 2007) from soil into plants has also been documented but remains largely unknown for a variety of micropollutants (e.g. PPCPs).

Therefore, the aim of this study was to survey the occurrence of 16 PPCPs, 15 pesticides, and 9 disinfection by-products, 3 phenolic estrogens, 2 flame retardants and 2 antioxidants, in reclaimed wastewater, river water and their mixture used for crop irrigation in an agricultural community (i.e. Torroella de Montgrí, Girona, northeastern Spain). Moreover, Principal Component Analysis (PCA) was used to reduce the dimensionality of data set by explaining the correlation among the large number of variables analyzed. Then geographical and yearly trends for target analytes were obtained. Moreover, the loading mass rate of these micropollutants discharged into agricultural soil corresponding to different crops, namely maize, *Zea mays*, apple, *Malus domestica*, lettuce, *Lactuca sativa* and alfalfa, *Medicago sativa*, was estimated from the crop irrigation regimes and contaminant concentrations. Finally, alfalfa and apple crops grown in the agricultural community under the different irrigation regimes were analyzed for the target microcontaminants.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

All standards were analytical grade (97–99% purity). Reagent details are provided in Supplementary Information (S1.1).

Stock solutions of each individual compound were prepared in methanol or ethyl acetate at a concentration of 5000 mg L⁻¹. All prepared standards were stored in the darkness at -20 °C

and used to prepare single and mixed working standards solutions. THMs and nitrosamines working solutions were prepared daily from dilutions of stock solutions.

2.2. Sampling site description

This survey was carried out in agricultural fields located at the Torroella de Montgrí municipality, Girona, northeastern Spain. This community has a territorial extension of 6613 ha and due to a high tourism activity, during the summer season undergoes important fluctuations in population size. The agricultural fields subjected to our study have an approximate area of 3000 ha, with apple, corn and alfalfa crop predominance. Field irrigation is carried out through a piping network and water supply is mainly provided by the Ter River. This river (average flow rate at the mouth is 25 m³ s⁻¹) receives along its watershed, discharges from metallurgic, pulp mill, textile and tannery industries as well as raw sewage inputs from small adjacent communities. When the water supply needed for agriculture is not met by the river itself, reclaimed water from the local WWTP is injected into the network system, where it combines with riverine freshwater in an uncontrolled manner. Therefore, the reclaimed water use for agricultural irrigation is variable, mostly depending on weather conditions and usually carried out during the dry season (i.e., June–August).

The Torroella de Montgrí WWTP treats 2.3 × 10⁶ m³ of wastewater per year, mainly from urban origin. The WWTP, total surface of 2.2 ha, was designed to treat the wastewater of 68 750 equivalent inhabitants with an inflow of 16 500 m³ d⁻¹. The secondary treatment is based on activated sludge, with the corresponding nitrogen removal, followed by disinfection through high intensity-low pressure UV lamps and chlorination as tertiary treatment.

In order to evaluate irrigation water quality of the Ter River, the WWTP and their mixture, four sampling points were chosen, one in each input point in the network, namely the Ter River and WWTP, and two more sampling points within the network in order to evaluate the influence of both water origins (Fig. 1). These points were termed as Ter River Influence and WWTP Influence, respectively. Sampling campaigns were carried out in 2007 and 2008, three per year from May to September, and analyzed for the target compounds listed in Table 1.

2.3. Sample collection

Water samples for THMs and nitrosamines determination were collected in 40 mL amber glass vials and 250 mL amber glass bottles, respectively containing ascorbic acid to remove residual chlorine in water samples, 100 mg for THMs and 250 mg for nitrosamines. Both vials and bottles were fully filled (headspace free). Water samples for the other micropollutant analysis were collected in 2.5 L glass amber bottles. All samples were kept refrigerated during transport to the laboratory, where they were stored at 4 °C until they were analyzed. The total sample holding time in all cases was less than 72 h.

Crop samples of alfalfa and apple tree leaves were collected from two irrigation points: Ter Influence and WWTP Influence during the first two campaigns of 2008. Samples were carefully

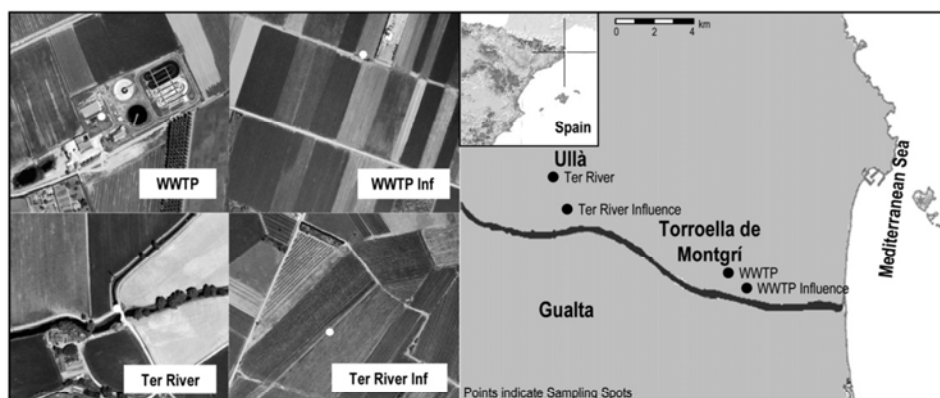


Fig. 1 – Map of North-eastern Spain representing the sampling spots studied.

wrapped in aluminum foil placed in a plastic bag and stored at -20°C until their analysis.

2.4. Analytical methodology

2.4.1. Water analysis

2.4.1.1. THMs. Trihalomethane determination was carried out by solid-phase microextraction (SPME) using an SPME TRIPLUS autosampler from Thermo Fisher, the extraction conditions were adapted from a former report (Cho et al., 2003). Fiber thermal desorption and analysis was carried out in a GC Ultra Trace (Thermo Fisher, Milan, Italy) coupled to an electron capture detector (ECD). Details of the methodology carried out are further explained in the Supplementary Information (S1.2.1.1).

The linearity range of the HS-SPME method was evaluated by performing calibration curves from the relative area of the internal standard iodomethane versus the concentration of each analyte. Standard calibration curves were plotted for twelve concentrations levels. Linearity was observed at the concentration range from 0.002 to $10\ \mu\text{g L}^{-1}$ ($R^2 > 0.99$).

The HS-SPME GC-ECD method sensitivity was evaluated in terms of LODs and LOQs, which were determined from a blank triplicate (reagent water) using the mean background noise plus 3 and 10 times the standard deviation of the background noise, respectively. LOD and LOQ range from 0.001 to 0.350 and 0.002 – $0.474\ \mu\text{g L}^{-1}$ respectively.

2.4.1.2. N-Nitrosamines. N-nitrosamines extraction was adapted from the EPA 521 method (Munch and Basset, 2004). Their determination was performed in an Ultra Trace GC coupled to a nitrogen phosphorous detector (Thermo Fisher, Milan, Italy). Detailed extraction and determination procedures of these compounds are thoroughly detailed in the Supplementary Information (S1.2.1.2). Furthermore, compound identity and quantification confirmation were performed by GC-PI MS by using ammonia as reagent gas (Agilent Technologies 5975C) as reported previously (Charrois et al., 2004).

Quantitation was performed on the basis of the internal standard procedure. Method sensitivity was calculated as

reported in the Section 2.4.1. The LODs and LOQs obtained for n-nitrosoamines ranged respectively, from 0.049 to 0.108 and 0.050 – $0.110\ \mu\text{g L}^{-1}$. Linearity of the SPE GC-NPD method for the n-nitrosamine determination ranged from 0.0057 to $7.5\ \mu\text{g L}^{-1}$ with correlation coefficients higher than 0.99 .

2.4.1.3. Pharmaceuticals and personal care products. Wastewater samples were filtered, processed and analyzed as reported previously (Matamoros and Bayona, 2006). Derivatized samples were analyzed in a TRACE GC-MS (Thermo Fisher) in the electron impact mode. Detailed extraction and determination procedures of these compounds are thoroughly detailed in the Supplementary Information (S1.2.1.3).

The LOD and LOQ of the analytical procedure were determined (using reagent water) from the mean background noise plus 3 or 10 times the standard deviation of the background noise, respectively. LOD and LOQ were from 0.002 to 0.28 and 0.003 – $0.47\ \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Recoveries ranged from 90 to 107% .

2.4.1.4. Suspended particulate matter. Filters were processed and analyzed as previously reported (Matamoros and Bayona, 2006). Further extraction and chromatographic analysis details are provided in Supplementary Information (S1.2.1.4).

2.4.2. Crop analysis

Alfalfa and apple tree leaves were extracted as previously reported (Calderon-Preciado et al., 2009). Sample analysis was carried out by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS/MS), details are provided in Supplementary Information (S1.2.3). LOQ ranged from 0.011 to $0.099\ \mu\text{g Kg}^{-1}$.

2.5. Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) (Jolliffe, 2002; Pere-Trepat et al., 2006) was performed on the data set using the SPSS 13 package (Chicago, IL). For all compounds concentration values were obtained from the sum of concentrations in the dissolved and particulate phases. Trihalomethanes were included in the analysis as total trihalomethanes rather than in the individual species. Out of the 26 compounds quantitated only 18 were

Table 1 – Frequency of detection (FOD), minimum, maximum and mean concentration of the 47 analytes in the four sampling points.

Target analyte	WWTP		WWTP Influence		Ter River Influence		Ter River	
	FOD (%)	Conc. (µg/L) (min–max) mean	FOD (%)	Conc. (µg/L) (min–max) mean	FOD (%)	Conc. (µg/L) (min–max) mean	FOD (%)	Conc. (µg/L) (min–max) mean
<i>Disinfection by-products</i>								
Chloroform	4/4(100)	(0.67–6.16) 3.36	1/5(20)	0.92	1/4(25)	1.04	2/4(50)	2.80
Dichlorobromomethane	4/4(100)	(3.25–6.09) 4.87	3/5(60)	(0.04–0.79) 0.42	1/4(25)	0.07	0/4(0)	<0.0092
Dibromochloromethane	4/4(100)	(0.15–14.24) 7.32	3/5(60)	(0.04–0.06) 0.05	3/4(75)	(0.01–0.15) 0.08	0/4(0)	<0.0001
Bromoform	4/4(100)	(1.08–23.60) 8.71	3/5(60)	(0.06–0.08) 0.07	3/4(75)	(0.02–0.18) 0.10	3/4(75)	(0.01–0.02) 0.015
Nitrosodimethylamine, NDMA	2/2(100)	(0.097–0.101) 0.099	2/2(100)	(0.12–0.14) 0.128	2/2(100)	(0.08–0.21) 0.148	2/2(100)	(0.07–0.13) 0.102
Nitrosomethylethylamine, NMEA	2/2(100)	(0.18–0.52) 0.352	1/2(50)	0.31	1/2(50)	0.51	0/2(0)	<0.049
Nitrosopyrrolidine, NPYR	2/2(100)	(0.10–0.17) 0.133	2/2(100)	(0.188–0.190) 0.190	2/2(100)	(0.11–0.18) 0.142	2/2(100)	(0.18–0.27) 0.225
Nitrosopiperidine, NPIP	1/2(50)	0.15	0/2(0)	<0.0108	1/2(50)	0.15	1/2(50)	0.16
Nitrosodibutylamine, NDDBA	0/2(0)	<0.056	0/2(0)	<0.056	0/2(0)	<0.056	0/2(0)	<0.056
<i>Pharmaceuticals</i>								
Diclofenac	3/4(75)	(0.072–0.171) 0.121	2/4(50)	(0.134–0.506) 0.320	2/5(40)	(0.053–0.714) 0.383	4/4(100)	(0.064–0.168) 0.113
Carbamazepine	3/4(75)	(0.203–0.971) 0.526	4/4(100)	(0.058–0.160) 0.121	5/5(100)	(0.076–0.193) 0.136	4/4(100)	(0.069–0.274) 0.145
Clofibric acid	2/4(50)	(0.118–0.132) 0.125	2/4(50)	(0.121–0.180) 0.150	2/5(40)	(0.103–0.135) 0.119	2/4(50)	(0.116–0.134) 0.125
Caffeine	4/4(100)	(0.113–0.492) 0.238	4/4(100)	(0.083–2.380) 0.789	5/5(100)	(0.055–0.646) 0.295	4/4(100)	(0.149–1.779) 0.791
Ibuprofen	3/4(75)	(0.017–0.259) 0.150	3/4(75)	(0.017–0.245) 0.139	4/5(80)	(0.011–0.192) 0.083	4/4(100)	(0.120–0.303) 0.228
Flunixin	0/4(0)	<0.092	0/4(0)	<0.092	0/4(0)	<0.092	0/4(0)	<0.092
Ketoprofen	0/4(0)	<0.071	0/4(0)	<0.071	0/4(0)	<0.071	0/4(0)	<0.071
Acetaminophen	0/4(0)	<0.037	0/4(0)	<0.037	0/4(0)	<0.037	0/4(0)	<0.037
Naproxen	4/4(100)	(0.035–0.139) 0.071	3/4(75)	(0.039–0.186) 0.092	4/5(80)	(0.036–0.250) 0.097	3/4(75)	(0.100–0.444) 0.224
Irgasan	0/4(0)	<0.022	0/4(0)	<0.022	0/4(0)	<0.022	0/4(0)	<0.022
<i>Personal care products^a</i>								
Ambrettolide	0/4(0)	<0.036	0/4(0)	<0.036	0/4(0)	<0.036	0/4(0)	<0.036
Methylidihydrojasmonate	3/4(75)	(0.073–0.971) 0.512	4/4(100)	(0.065–0.704) 0.374	4/5(100)	(0.065–0.704) 0.374	4/4(100)	(0.085–1.027) 0.422
Galaxolide	4/4(100)	(0.986–1.054) 1.023	4/4(100)	(0.159–0.438) 0.307	5/5(100)	(0.109–0.636) 0.309	4/4(100)	(0.107–0.190) 0.149
Tonalide	4/4(100)	(0.143–0.585) 0.357	4/4(100)	(0.035–0.329) 0.152	5/5(100)	(0.026–0.339) 0.138	3/4(75)	(0.027–0.176) 0.119
Cashmeran	2/4(50)	(0.061–0.259) 0.160	3/4(75)	(0.218–0.399) 0.291	4/5(80)	(0.176–0.416) 0.283	3/4(75)	(0.238–0.533) 0.341
Hydrocinamic acid	4/4(100)	(0.028–3.502) 1.397	0/4(0)	<0.025	0/5(0)	<0.025	2/4(50)	(0.052–0.137) 0.094
<i>Phenolic estrogens</i>								
Bisphenol A	2/4(50)	(0.072–0.171) 0.121	3/4(75)	(0.037–0.089) 0.067	2/5(40)	(0.055–0.094) 0.075	3/4(75)	(0.069–0.1) 0.081
Tert-octylphenol	0/4(0)	<0.097	0/4(0)	<0.097	0/4(0)	<0.097	0/4(0)	<0.097
Nonylphenol	0/4(0)	<0.081	0/4(0)	<0.081	0/4(0)	<0.081	0/4(0)	<0.081
<i>Antioxidants</i>								
BHT	3/4(75)	(0.086–0.621) 0.266	4/4(100)	(0.079–0.525) 0.197	4/5(80)	(0.079–0.499) 0.188	3/4(75)	(0.080–0.738) 0.306
BHA	0/4(0)	<0.124	0/4(0)	<0.124	0/4(0)	<0.124	0/4(0)	<0.124
<i>Flame retardants</i>								
Tributylphosphate	3/4(75)	(0.126–0.216) 0.160	2/4(50)	(0.145–0.229) 0.187	2/5(40)	(0.139–0.167) 0.153	2/4(50)	(0.173–0.201) 0.187
TCEP	2/4(50)	(0.361–0.376) 0.368	2/4(25)	0.284	2/5(40)	(0.241–0.298) 0.269	2/4(50)	(0.222–0.240) 0.231

It is worth mentioning, that these concentrations are well below the European limit for total trihalomethanes in drinking water ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) effective from January 2009.

NDMA and NPYR were the most frequently detected nitrosamines with an FOD of 100% in all sampling sites. Concentration ranges for *N*-nitrosamines ranged from 0.07 to $0.52 \mu\text{g L}^{-1}$. Since higher concentrations of these compounds were not found in the WWTP effluent other sources of these compounds are expected (Chen and Valentine, 2007). As it has been explained in Section 2.2, Ter River, is a highly contaminated river receiving discharges from industries which make use of chemical reactions involving alkylamines with nitrogen oxides, nitrous acid or nitrile salts are known to produce and release nitrosamines (EPA, 2008), thus adding to these compounds occurrence and high levels in this area. However WWTP effluent concentration levels are in agreement with levels reported for NDMA, $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in other WWTP effluents.

It is rather interesting that compounds which exhibit high removal efficiencies in the WWTP, namely ibuprofen, caffeine, methyl dihydrojasmonate (MDHJ), galaxolide and tonalide (i.e., 65–90%) (Petrovic et al., 2003; Chen et al., 2007; Carballa et al., 2008) are the most frequently detected along the irrigation network attributable to untreated sewage discharge into the Ter River. On the other hand, some organic pollutants may occur in WWTP effluents because they are persistent in the activated sludge process or because their biodegradation is not fast enough to be completed during wastewater treatment (Reemtsma et al., 2006). In this regard, the high detection frequency of carbamazepine, naproxen and diclofenac can be explained by their moderately low removal efficiency in a WWTP (Clara et al., 2005; Reemtsma et al., 2006).

3.2. Spatial and inter-annual variability of organic micropollutants in irrigation waters

The climatological conditions of the region of study differed greatly from 2007 to 2008. During February–July, 2008, a drought decree was enforced and almost exclusively reclaimed water from the local WWTP to irrigate crops was allowed (Generalitat de Catalunya, 2008). The increase in reclaimed water share throughout the irrigation network is clearly evidenced from the measured electrical conductivity (Table 2) in all the sampling points.

Moreover, it is also evident a marked difference between sampling years. In 2007, an almost exclusive influence of the

Ter River can be seen, added by the inactivity of the tertiary treatment of the local WWTP in the last 2007 campaign.

In Fig. 2, the interannual and spatial variability of compound concentration are shown. Abundance pattern for the studied compound groups differed from year to year, this difference was attributable to the dominating influence of reclaimed water within the irrigation network due to the 2008 drought. For fragrances, an increase in all sampling points is observed during 2008, the same occurs with flame retardants, this trend is easily explained, since both fragrances and flame retardants are most abundant in the WWTP effluent. Conversely, BHT concentration decreased in all the sampling points, this was expected since BHT is most abundant in the Ter River. Bisphenol A showed no significant interannual differences owing to its similar concentration in both Ter River and WWTP.

3.3. PCA analysis

The Bartlett's sphericity test showed a $\chi^2 = 318.9$, which is greater than the critical value $\chi^2 = 146.6$ (for 120 degrees of freedom and $p = 0.05$), thus proving that PCA can achieve a significant reduction of the original data set dimensionality.

3.4. PCA loadings

The contribution of each variable to every principal component, PC, is shown in Fig. 3a, b and c. Moreover, the explained variance by component is also included. The first five PCs, which explain the 86.2% of the variance contained in the original data set and had an eigenvalue greater than one, are displayed in Table 3. The absolute value of the loadings is an indicator of the participation of the original variables in every PC. However when a complex system such as this one is studied, it is hard to identify the underlying variables in the final PCs. Therefore, we have only retained the first three which altogether explained 67% of the total variance.

Fig. 3a shows the variable loadings to each of the three PCs retained. The first PC accounted for the 28% of the total original data variance, and it groups compounds according to sampling year (frequency of detection and abundance). The positive loadings belong to the 2008 year, while the negative ones belong to the 2007. This was clearly explained by the analyte occurrence. Clofibrac acid and tonalide dominated the positive loadings of this component, clofibrac acid was only detected in the sampling campaigns carried out in 2008 while tonalide mean concentration was two fold that of 2007. The

Table 2 – Sampling campaigns and their respective electric conductivities in the collected water samples.

Campaign Date	WWTP ^a ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	WWTPInfluence ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Ter River ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	TerRiver Influence ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
July, 2007	2820	720	709	718
September, 2007	1151	733	736	730
September, 2007	NS	720	740	742
May, 2008	2587	1666	995	2094
July, 2008	1455	419	414	487
Aug, 2008	2188	1352	688	734

NS: Not sampled.

^a The high electrical conductivity observed by WWTP is attributable to saline intrusion in coastal areas covered by Torroella de Montgri WWTP.

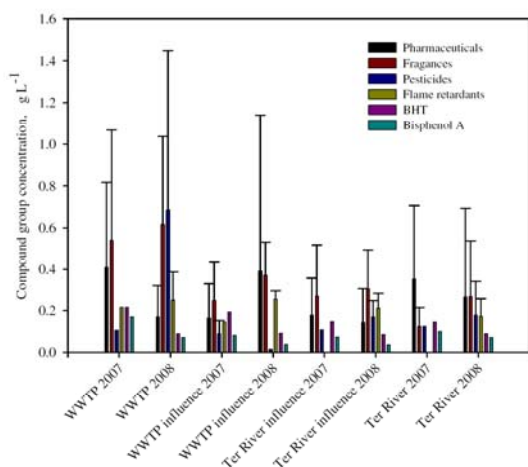


Fig. 2 – Inter-annual variability of target compound groups in the different sampling points within the irrigation network.

latter behavior was shared by diclofenac, galaxolide, TBP, ibuprofen and cashmeran. Opposite behavior was displayed by bisphenol A, naproxen and BHT, THMs and carbamazepine, whose mean concentration in 2007 in respect to 2008 was always higher. However, MDHJ and caffeine, in spite of having larger concentrations in 2007 and 2008 respectively, had an inverse loading ratio. Electrical conductivity is positively correlated to the 2008 sampling campaign, which can be easily explained by the large WWTP effluent usage in the irrigation

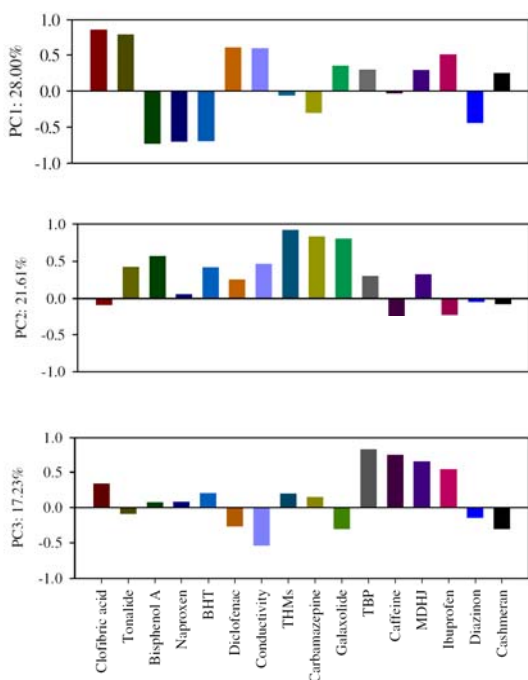


Fig. 3 – Loadings for chosen principal components by straight PCA.

Table 3 – Explained variance and eigenvalue for each principal component.

Component	Explained Variance (%)	Accumulated Variance (%)	Eigenvalue
1	28.0	28.0	4.5
2	21.6	49.6	3.5
3	17.2	66.8	66.8
4	12.2	79.1	79.1
5	7.1	86.2	89.2

net due to a severe drought endured by the region during the irrigation period of 2008. It is interesting to note that though THMs presence is highly correlated to the WWTP effluent and thus to high electrical conductivity, they appear inversely correlated in PC1. The latter can be explained by higher THMs abundance during 2007, when there was low or no influence of the WWTP effluent on the irrigation network.

The second PC accounted for 21.6% of the total variance (Fig. 3b), and it groups compounds according to pollution origin (embodied by abundance). In this case, as explained in the sampling section, the only two water inputs, and thus pollutant input to the irrigation network are the Ter River and the WWTP effluent. The positive loadings in PC2 are related to WWTP effluent while the negative ones are related to Ter River. Accordingly, THMs, carbamazepine and galaxolide, which had the highest weight on PC2, exhibited higher concentrations in the WWTP effluent than in any other sampling point. Electrical conductivity again was as expected correlated positively to the WWTP effluent. Variables with negative loadings in this case such as caffeine, ibuprofen, diazinon, clofbric acid, and cashmeran exhibited their highest concentrations in the Ter River sampling point. Interestingly, compounds that exhibit their highest concentration at the Ter River sampling point are also compounds that are easily degraded in a conventional WWTP, such is the case of caffeine, ibuprofen, cashmeran and diazinon (Buerge et al., 2003; Joss et al., 2005; Gros et al., 2007).

The third PC accounted for 17.2% of the total variance of the original data set (Fig. 3c) and it appears to group compounds according to their association to the suspended particulate matter. The variables that appear negatively correlated are the ones that exhibit a direct relation with suspended particulate matter. One of these variables is electrical conductivity, which accordingly displays a larger effect in the negative loadings. The fragrances cashmeran, tonalide and galaxolide, which exhibit large $\log K_{ow}$ (4.5–5.9) (Paasivirta et al., 2002), are also strongly related to presence of particulate matter.

3.4.1. PCA scores

Fig. 4a depicts the score plot for PC1 vs. PC2. In this Figure, two large clusters formed along PC1 are rather evident, separating data according to abundance and detection frequency of target analytes during 2007 and 2008 campaigns. On the other hand, the variables that had the highest negative weight in this component are grouped at the left side of PC1 axis, representing the 2007 sampling year. Both clusters spread alongside PC2 axis, managing a separation of pollution source. In the upper quadrants for both years, the WWTP sampling

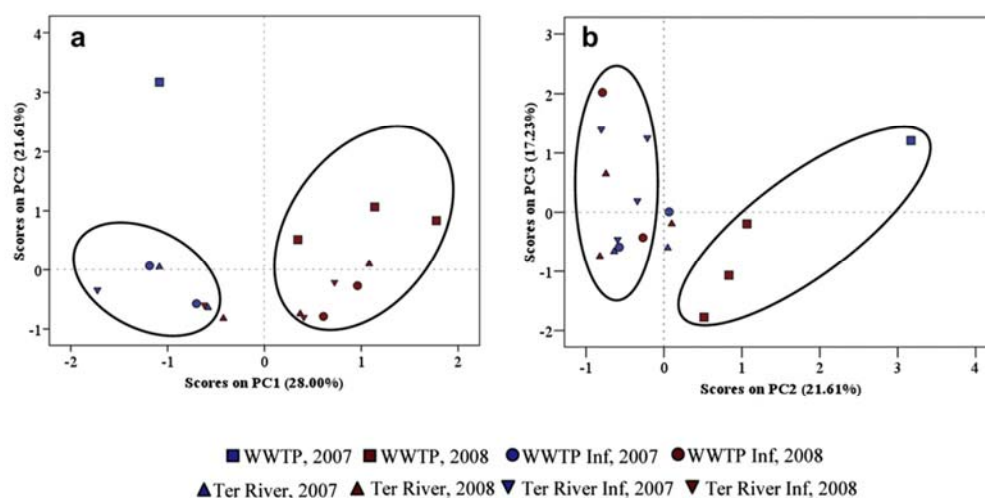


Fig. 4 – (a) Scores plot for PC1 vs. PC2 for complete data. Clusters show the temporal trend between 2007 (in red) and 2008 (in blue). (b) Scores plot for PC2 vs. PC3. Clusters depict pollution origin (water source).

data appear which is in good accordance with the PC2 loadings, characterized by the positive contribution of variables associated to the WWTP effluent. Consequently, in the lower quadrant for PC2 appear these variables associated to their high abundance in Ter River. Thus sampling data which approach to the PC2 axis origin belongs to the least polluted sampling sites, whereas those points distant from the origin are the most polluted. As expected, the large majority of the target analytes in this study were most abundant in the WWTP tertiary effluent, shown in the PC2 loadings, making this sampling point the most polluted.

Fig. 4b displays the score plot for PC2 vs. PC3. Samples are distributed along PC2 in two main clusters indicating, as previously explained, pollution origin. It is evident a significant difference of WWTP samples from the rest. The two data clusters formed spread along the PC3 axis. In the lower quadrants, sampling points which are loaded with compounds related to high particulate matter content appear, we find mostly WWTP and its influence. Consequently WWTP sampling point displays the highest concentrations for galaxolide, tonalide and diclofenac, which are the variables that have the largest influence on the PC3 loadings.

3.5. Loading mass estimation into agricultural field

Compound load to the studied agricultural fields was calculated from irrigation regimes used on corn, (*Zea mays*) apple, (*Malus domestica*) alfalfa, (*Medicago sativa*) and lettuce (*Lactuca sativa*) giving an estimate mass input ranging from 0.8 to 121.3 g ha⁻¹ per crop cycle, depending on crop irrigation regimes (Table 4). For comparative purposes the latter estimate was also carried out employing pollutant concentrations found in other countries to produce a theoretical scenario in which these waters would be used for agricultural irrigation. In Table 4, it can be seen that the WWTP effluent of our case study was the most suitable for two major compound groups,

namely, pharmaceuticals and flame retardants, this translated in lower pollutant load to agricultural fields. In the case of THMs, concentrations found were comparable to the Israeli WWTP. However in the case of PCPs, its use resulted in almost 3 fold the input to fields when compared to the German WWTP, and 35 fold in the case of nitrosamines when compared to the USA WWTP. Subsequently, when evaluating the suitability of rivers for water irrigation, we could contrast only three compound groups: pharmaceuticals, PCPs and flame retardants. The Ter River displayed the highest mass loading rate for pharmaceuticals and PCPs, among the rivers compared. Nevertheless, it displayed the lowest input for flame retardants: 2.6 fold that of Høje River.

3.6. Occurrence of personal care products and pharmaceuticals in studied crops

Non-volatile compounds which displayed higher concentrations and frequency of detection in the irrigation waters analyzed were later selected as target analytes in the screening of crops. The selected compounds were diclofenac, carbamazepine, clofibric acid, caffeine, ibuprofen, naproxen, triclosan, MDHJ, galaxolide, tonalide and hydrocinnamic acid. Table 5 shows the analyzed PPCPs in the sampled crops and their concentration levels. Out of the 11 analytes screened, 6 were detected in alfalfa and 4 in apple tree leaves. However, two of the compounds identified are naturally occurring in plants; salicylic acid found in both crops is present in plants as a signaling molecule in the activation of defence response to pathogen infection and other environmental stresses (Durner et al., 1997), and hydrocinnamic acid, found in apple tree leaves, is known to have a function as a growth inhibitor (Xuan et al., 2009). Caffeine and MDHJ were found in both crops, concentration ranges for these compounds were found to be between <0.011 and 0.016 and 0.041 and 0.532 µg Kg⁻¹, respectively, with caffeine being higher in apple leaves while

Table 4 – Estimated loading rates per chemical classes into agricultural field based on the net irrigation regime per crop cycle and water origin.

		This study, Crop (g ha ⁻¹)				Other countries, Crop (g ha ⁻¹)			
		Alfalfa ^a	Apple ^b	Corn ^c	Lettuce ^d	Alfalfa ^a	Apple ^b	Corn ^c	Lettuce ^d
THMs	River	11.0	12.0	14.1	7.05	NA	NA	NA	NA
	WWTP	91.0	103.1	121.3	60.65	90.7 ^e	102.8 ^e	121.0 ^e	60.5 ^e
Nitrosamines	River	1.8	2.3	2.7	1.4	NA	NA	NA	NA
	WWTP	2.5	3.2	3.8	1.9	0.07 ^f	0.08 ^f	0.09 ^f	0.04 ^f
Pharmaceuticals	River	5.1	6.7	7.9	3.9	1.3–2.4 ^{g,h}	1.4–2.8 ^{g,h}	1.7–3.2 ^{g,h}	0.8–1.6 ^{g,h}
	WWTP	7.6	8.7	10.2	5.1	15.5–96.4 ^{g,i}	17.6–109 ^{g,i}	20.7–128.5 ^{g,i}	10.3–64.3 ^{g,i}
PCPs	River	3.5	4.6	5.3	2.7	0.4–0.5 ^{g,h}	0.4–0.6 ^{g,h}	0.48–0.68 ^{g,h}	0.2–0.3 ^{g,h}
	WWTP	8.6	9.8	11.5	5.8	3.1–3.3 ^{g,i}	3.5–3.7 ^{g,i}	4.15–4.4 ^{g,i}	2.1–2.2 ^{g,i}
Flame retardants	River	0.8	1.0	1.2	0.6	2.1 ^h	2.4 ^h	2.8 ^h	1.4 ^h
	WWTP	1.2	1.4	1.6	0.8	NA	NA	NA	NA

NA: not available.
a 375 L m⁻² (1.5 months).
b 425 L m⁻² (8 months).
c 500 L m⁻² (5 months).
d 250 L m⁻² (3 months).
e Israel: Richardson et al. (2003).
f Switzerland: Krauss and Hollender (2008).
g Romania: Moldovan et al. (2007).
h Sweden: Bendz et al. (2005).
i Germany: Ternes et al. (2007).

MDHJ was ostensibly higher in alfalfa. In addition to MDHJ, another fragrance was detected and quantified, though only in alfalfa: galaxolide. Interestingly pharmaceuticals were only detected in alfalfa, ibuprofen and naproxen levels ranged from <0.011 to 0.061 µg Kg⁻¹. All the studied compounds, with the exception of galaxolide, exhibit log K_{ow} between 0.16 and 3.79, which are within the range reported for possible plant uptake, 1–4 (Briggs et al., 1983). The higher levels and occurrence of anthropogenic compounds in alfalfa can be explained by the amount of irrigation water used in each crop, that being 4 times higher for alfalfa than for apple (Table 4). This behavior could link plant uptake or adsorption to compound amount loaded into the soils. In addition to the latter factor

a much shorter productive cycle, only 1.5 months for alfalfa versus 8 months for apple cultivars which would mean a higher growth rate for alfalfa, would also be reflected in a larger contaminant uptake from the medium.

The occurrence of pharmaceuticals and personal care products in agricultural fields irrigated with reclaimed water has already been documented (Pedersen et al., 2005). Moreover, they display a wide range of log K_{ow} and half-lives and for many of the analytes found in this study, these properties may indicate potential crop uptake. Indeed, uptake and translocation of some pharmaceuticals, in addition to the results presented here, have already been described (Migliore et al., 1998; Luckenbach and Epel, 2005; Kong et al., 2007; Redshaw et al., 2008).

Table 5 – Occurrence of PPCPs in irrigated crops with reclaimed (WWTP) and river waters (Ter).

Target analyte	Apple tree leaves		Alfalfa	
	WWTP Inf ^a Conc. (µg Kg ⁻¹)	Ter Inf ^b Conc. (µg Kg ⁻¹)	WWTP Inf ^a Conc. (µg Kg ⁻¹)	Ter Inf ^b Conc. (µg Kg ⁻¹) (min-max) mean
Hydrocinnamic acid	0.076	35.5	<0.011	<0.011
Carbamazepine	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011
Salicylic acid ^c	0.778	0.527	0.698	(1.709–2.583) 2.146
Caffeine	0.016	15.5	<10.6	13.9
Ibuprofen	<0.012	<0.012	0.032	(0.025–0.061) 0.043
Triclosan	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011
Naproxen	<0.011	<0.011	<0.011	0.014
MethylDHJasmonate	0.041	0.041	0.156	0.532
Tonalide	<0.011	<0.011	<0.011	<0.011
Diclofenac	<0.099	<0.099	<0.099	<0.099
Galaxolide	<0.015	<0.015	16.9	<0.015

Concentrations were calculated in fresh weight.

a Reclaimed wastewater influence.

b Ter River influence.

c Quantitation performed by GC–MS.

4. Conclusions

26 out of 47 organic compounds were identified and quantitated in a two years study of reclaimed and river water (i.e. Ter) used for agricultural irrigation in the NE Spain. Although the highest overall frequency of detection of target analytes in the study area was found to be in the Ter River, the highest pollutant concentrations were exhibited by the WWTP effluent.

Furthermore, as a result of the 2008 drought endured by the region, reclaimed water usage for field irrigation increased markedly, which in turn lead to an increase of pollutant load into agricultural fields. Moreover, compounds which display high removal efficiency in conventional WWTPs (i.e., ibuprofen, caffeine, MDHJ, galaxolide and tonalide) are most abundant in river water than in WWTP effluent. In order to explain underlying factors in compound levels and distribution PCA analysis was applied, and three major factors were identified namely, temporal variability, pollutant origin and compound association with dissolved particulate matter.

Moreover, potential mass loading rate of target analytes into agricultural fields according to irrigation regimes was estimated and found to be in the range of g ha^{-1} per crop cycle. The estimated contaminant load as a result of Ter River and Torroella de Montgri WWTP effluent usage in agricultural irrigation was contrasted with other water sources obtaining comparable mass loading rates.

Finally, crops grown under these irrigation regimes were analyzed and 5 contaminants were identified and quantitated, namely ibuprofen, naproxen, MDHJ, caffeine and tonalide. A link between compound load into soil and their subsequent translocation or adsorption into crops was found to be plausible, since the studied crop with higher irrigation rate (alfalfa) also exhibited higher occurrence and concentration levels of the target analytes.

Since the potential health and environmental hazards derived from continued exposure to these chemicals are not well understood, it becomes of paramount importance the pollutant fate into agricultural fields and the experimental evaluation of their crop uptake potential.

Acknowledgments

This research was funded by the *Agència Catalana de Seguretat Alimentària* (ACSA) of Catalan Government (Generalitat de Catalunya). M. Sc. D. C. kindly acknowledges a predoctoral fellowship from the CONACYT (México). C. J. would like to acknowledge a predoctoral fellowship from COLCIENCIAS (Colombia). Dr. V. M. kindly acknowledges a postdoctoral Juan de la Cierva contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Dr. E. Jover participated actively during early stages of the project and sampling campaigns.

appendix. Supplementary information

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.watres.2010.07.050.

REFERENCES

- Bendz, D., Paxeus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* 122, 195–204.
- Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A.A., Williams, M., 1983. Relationships between lipophilicity and root uptake and distribution of non-ionised chemicals in barley shoots following uptake by roots. *Pesticide Science* 14, 492.
- Boxall, A.B.A., Johnson, P., Smith, E.J., Sinclair, C.J., Stutt, E., Levy, L.S., 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2288–2297.
- Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D., Buser, H.R., 2003. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental Science and Technology* 37, 691–700.
- Calderon-Preciado, D., Jimenez-Cartagena, C., Peñuela, G., Bayona, J.M., 2009. Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC–MS determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 1319–1327.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2008. Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. *Chemosphere* 72, 1118–1123.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H., 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* 39, 4797–4807.
- Charrois, J.W.A., Arend, M.W., Froese, K.L., Hrudef, S.E., 2004. Detecting N-nitrosamines in drinking water at nanogram per liter levels using ammonia positive chemical ionization. *Environmental Science and Technology* 38, 4835–4841.
- Chen, D.H., Zeng, X.Y., Sheng, Y.Q., Bi, X.H., Gui, H.Y., Sheng, G.Y., Fu, J.M., 2007. The concentrations and distribution of polycyclic musks in a typical cosmetic plant. *Chemosphere* 66, 252–258.
- Chen, Z., Valentine, R.L., 2007. Formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from humic substances in natural water. *Environmental Science and Technology* 41, 6059–6065.
- Cho, D.H., Kong, S.H., Oh, S.G., 2003. Analysis of trihalomethanes in drinking water using headspace-SPME technique with gas chromatography. *Water Research* 37, 402–408.
- Durner, J., Shah, J., Klessig, W.R., 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 2, 266.
- Environmental Protection Agency (2008). Emerging contaminant -N-Nitrosodimethylamine (NDMA), <http://www.epa.gov/nscep/>.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76, 122–159.
- Fismes, J., Perrin-Ganier, C., Empereur-Bissonnet, P., Morel, J.L., 2002. Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 31, 1649–1656.
- Generalitat de Catalunya, M.A.i.H., 2008. REAL DECRETO-LEY 3/ 2008, de 21 de abril, de medidas excepcionales y urgentes para garantizar el abastecimiento de poblaciones afectadas por la sequía en la provincia de Barcelona., Barcelona.
- Gent, M.P., White, J.C., Parrish, Z.D., Isleyen, M., Eitzer, B.D., Mattina, M.I., 2007. Uptake and translocation of p, p'-dichlorodiphenyldichloroethylene supplied in hydroponics solution to Cucurbita. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 2467–2475.
- Gervais, G., Brosillon, S., Laplanche, A., Helen, C., 2008. Ultra-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass

SUPPORTING INFORMATION

FOR

Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation with reclaimed and river waters

D. Calderón-Preciado^a, C. Jiménez-Cartagena^{a, b}, V. Matamoros^c & J.M. Bayona^{a*}

^a Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, E-08034 Barcelona, Spain.

^b Diagnosis and Pollution Control Group, Faculty of Engineering, Antioquia University, Medellín, Colombia.

^c Department of Chemistry, University of Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona, Catalonia, Spain.

S1. Materials and methods

S1.1. Materials and reagents

Pharmaceuticals, fragrances, endocrine disruptors and a flame retardant (i.e., ibuprofen, carbamazepine, diclofenac, clofibrac acid, acetaminophen, caffeine, flunixin, ketoprofen, tonalide, galaxolide, hydrocinnamic acid, methyl dihydrojasmonate, cashmeran, celestolide, ambrettolide, bisphenol A, nonylphenol, *tert*-octylphenol, *tris*-chloroethylphosphate) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium), trimethylsulfonium hydroxide (TMSH), tributylphosphate and triclosan were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and pesticides and a pharmaceutical (i.e., lindane, atrazine, simazine, mecoprop, chlorothalonil, cypermethrin, deltamethrin, chlorpyrifos, alochlor, MCPA, diuron, linuron, diazinon, and naproxen) were bought from Riedel de Haën (Seelze, Germany). Butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in methanol were obtained from Supelco (Bellefonte, PA). Florisil was ordered from Merck. Magnesium sulfate anhydrous and sodium chloride were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Disodium hydrogencitrate sesquihydrate was bought from Aldrich (Milwaukee, USA). Trisodium citrate dihydrate was from Sigma (St. Louis, USA). A trihalomethane (THM) calibration mix solution containing chloroform, dichlorobromomethane, dibromochloromethane, bromoform, at a concentration of 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ each in methanol was bought from Supelco (Park Bellefonte, PA). Also from Supelco were *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodipropylamine solutions in a concentration of 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in methanol and a *N*-nitrosamines calibration mix solution containing *N*-nitrosodimethylethylamine, *N*-nitrosodibutylamine, *N*-nitrosopiperidine and *N*-nitrosopiperidine each in a concentration of 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in methanol. Gas chromatography grade acetone, methanol, dichloromethane, hexane and ethyl acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hydrogen chloride was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulfate was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). The Na_2SO_4 was baked for 5 hours at 450 °C in a muffle furnace. Reagent water was deionized in the laboratory using the ultrapure water system Arium 611 from Sartorius (Aubagne, France).

S1.2. Analytical methodology

S1.2.1. Water analysis

S1.2.1.1. THMs

The SPME fiber used for extraction was a 50/30 μm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). It was conditioned at 270°C for 1 h prior to use. Fiber blanks were always carried out everyday before sample or standard analysis. Thus, 1 mL of water sample was transferred to a closed 20 mL vial through septum, immediately after 5 μL of a 0.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ methanolic solution of the internal standard, iodomethane, were also added. The extraction temperature was 40 °C and extraction time 30 min, immediately after the extraction the fiber was retracted back into the needle and transferred at once to the injector port of a gas chromatograph. Fiber thermal desorption was carried out at 250 °C for 10 min in the injector port of a GC Ultra Trace (Thermo Scientific, Milan, Italy) using a splitless time of 1 min coupled to an electron capture

detector (ECD). The instrument was fitted with a Rtx® - VGC, 60 m × 0.32 mm ID × 1.8 µm film thickness (Restek, Bellefonte, PA). Helium was used as both carrier gas and make up gas (99.9995% purity) at a flow rate of 1.5 and 60 mL min⁻¹ respectively. The oven temperature was held at 35 °C for 10 min and then temperature was programmed at 3 °C min⁻¹ to 110 °C, and then at 10 °C min⁻¹ to 230 °C holding the final temperature for 10 min.

S1.2.1.2. N-nitrosamines

Firstly, the SPE coconut charcoal cartridge bought from Supelco was conditioned by percolating 3 mL × 2 times of dichloromethane with vacuum aid until the cartridge dried, the same procedure was repeated but using methanol. Afterwards, 3 mL × 2 of methanol were percolated by gravity through the cartridge to just above the top frit, from this point forward the cartridge was not allowed to dry. Subsequently, 3 mL × 5 of reagent water were percolated by gravity through the cartridge, again never allowing it to go dry either between washes or at the end. Surrogate standard, 0.4 µg of N-nitrosodipropylamine was added to the sample, which was then thoroughly agitated and percolated through the SPE cartridges at an approximate flow rate of 10 mL min⁻¹. Cartridges were then dried for 30 min by allowing them to draw air at full vacuum. The SPE cartridge elution was carried out with 13 mL of dichloromethane, the recovered extract was then concentrated under a gentle nitrogen stream to approximately 0.5 mL, then 1.7 µg of chlorothalonil were added as internal standard.

A 50 µL sample aliquot was injected onto an Ultra Trace GC coupled to a nitrogen phosphorous detector (Thermo Scientific, Milan, Italy) fitted with a Rtx® - 5 Amine, 30 m × 0.53 mm ID × 3 µm film thickness (Restek). Helium was employed as both carrier and make up gas (99.9995% purity) at a rate of 6.2 and 15 mL min⁻¹, respectively. A split/splitless injector was used in the splitless mode at 250 °C. Oven temperature was held at 60 °C for 5 min and then the temperature programmed at 10 °C min⁻¹ to 200 °C, at 5 °C min⁻¹ to 250 °C holding the final temperature for 5 min.

S1.2.1.3. Pharmaceuticals and personal care products

Briefly, a sample volume of 500 mL was spiked with 1.5 µg of a surrogate standard mix (i.e., fenoprop for the acidic compounds, 2,2'-dinitrophenyl for musks and dihydrocarbamazepine for neutral compounds). The spiked sample was percolated through a polymeric solid-phase extraction cartridge, 100 mg Strata X from Phenomenex (Torrance, CA). Activated cartridges were eluted with 10 mL of the solvent mixture hexane/ethyl acetate (1:1). The extract was evaporated to approximately 20 µL under a gentle nitrogen stream, and 246 ng of triphenylamine (TPA) were added as internal standard. Next the vial was reconstituted to 300 µL with ethyl acetate. Methylation of the acidic carboxyl group was performed in the GC injector port at 270 °C by adding 10 µL of TMSH solution (0.25 mol L⁻¹ in methanol) to a 50 µL sample aliquot before injection.

Derivatized samples were injected onto a TRACE GC-MS (Thermo Scientific) in the electron impact mode (70 eV ionization energy) fitted with a 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 µm film thickness DB-5 (Teknokroma, Barcelona, Spain). Helium was used as carrier gas (99.9995% purity). The oven temperature was held at 65 °C for 2 min and then the temperature was programmed at 15 °C min⁻¹ to 120 °C, at 4 °C min⁻¹ to 160 °C, at 7 °C

min⁻¹ to 220 °C, at 5 °C min⁻¹ to 290 °C, and finally at 15 °C min⁻¹ to 320 °C holding the final temperature for 5 min. A volume of 2 µL of sample was injected in the splitless mode.

S1.2.1.4. Suspended particulate matter

Firstly, they were lyophilized for 24 h and then spiked with 1.5 µg surrogate standard mix of fenprop, dihydrocarbamazepine, 2,2'-dinitrobiphenyl, and kept overnight at 4 °C to allow them to equilibrate. Later, they were extracted by sonication in an ultrasonic bath with 2 x 10 mL of hexane/acetone (1:1) in a 40 mL Pyrex centrifuge tube. They were centrifuged for 5 min at 3500 rpm following every extraction and the recovered extract, percolated through a Na₂SO₄ column and evaporated under a gentle nitrogen stream to small volume. Next, 246 ng of TPA were added as internal standard to the sample, which was reconstituted to 300 µL with ethyl acetate. Further chromatographic analysis was carried out as explained in section S1.2.3.

S1.2.3. Crop analysis

Alfalfa and apple leaves were extracted as previously reported (Calderon-Preciado et al., 2009). Briefly, a matrix solid phase dispersion procedure was applied to the samples. A comminuted 0.5 g sample aliquot was transferred to a porcelain mortar. One g of florisil was vigorously blended with the sample for 8 minutes using a pestle, then 0.2 g Na₂SO₄, 0.05 g Na₃-citrate dihydrate, 0.05 g NaCl, 0.02g Na₂H-citrate sesquihydrate and 3 g of Hydromatrix were added and blended to obtain a thoroughly homogenous mixture. This mixture underwent pressurized fluid extraction in the static mode, using a mixture of solvents Acetone/Hexane (1:1), two extraction cycles of 13.5 min at a temperature of 104 °C were carried out.

The obtained extract was evaporated to 5 mL approximately under a gentle nitrogen stream. Afterwards 3 mL of a 0.6% K₂CO₃ aqueous solution were added to the vial, the hexanic phase was recovered and the remaining aqueous phase was extracted 3 x 3 mL hexane. Then, the hexane phase was percolated through a florisil-MgSO₄ column. This procedure rendered the neutral fraction. Subsequently, 3 mL of ethyl acetate and 75µL of 5% HCl were added to the aqueous phase. Then, the organic phase was recovered and the aqueous phase was further extracted 2 x 3 mL ethyl acetate. The organic phase was percolated through a Na₂SO₄ column. This procedure rendered the acid fraction.

Both neutral and acid fractions were gently evaporated to approximately 300 µl, this step was followed by the addition of 246 ng of triphenylamine as internal standard. The neutral fraction was directly analyzed by GC-MS/MS, while the acid fraction was derivatized adding 10 µL of TMSH to a 40 µL sample aliquot. The determination was performed by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)

Derivatized samples were injected onto a 7000 A GC/MS Triple Quad (Agilent Technologies) fitted with a 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 µm film thickness Sapiens (Teknokroma, Barcelona, Spain). The temperature program used was the same already detailed in S1.2.1.3. Pharmaceuticals and personal care products. A volume of 2 µL of sample was injected in the splitless mode. The temperature of the injector was set at 270 °C. Helium was used as carrier gas (99.9995% purity) at a constant flow rate of 1.0 mL/min; nitrogen was used as collision gas. The running time was of 55.24 min, divided into 4 segments. The QqQ mass spectrometer was used under the

following conditions: ionization with electron impact at 70 eV in MRM. In the optimization of the MS/MS conditions, full scan spectra were obtained to select precursor ions, followed by the acquisition of product ion spectra by collision-induced dissociation (CID) with nitrogen, Table S1.

Segment	Compound	tR (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z) (collision energy, eV)
1	Salicylic acid	7.372	120	92 (8)
1	HCA	8.555	104	78, 103(18)
1	Clofibric acid	12.354	128	65, 100 (22)
1	Ibuprofen	13.081	161	105, 118 (15)
2	MDHJ	14.769	83	55, 64 (19)
2	Caffeine	17.762	194	55, 109, 193 (18)
2	Galaxolide	18.000	243	213, 185, 198 (17)
2	Tonalide	18.174	243	159, 145, 187 (17)
3	Carbamazepine	19.900	193	165, 191, 140 (30)
3	Triclosan	21.965	302	252, 232, 159 (20)
4	Naproxen	20.478	185	153, 159, 129 (16)
4	Diclofenac	23.281	214	179, 151(25)

IV.6. Artículo científico 3

Occurrence and potencial crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network.

Calderón-Preciado, D., Matamoros, V. and Bayona, J.M. (2011). Science of the Total Environment 412-413(0), 14-19.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network

Diana Calderón-Preciado^a, Víctor Matamoros^{b,*}, Josep M. Bayona^a

^a IDAEA-CSIC, Jordi Girona, 18, E-08034 Barcelona, Spain

^b Department of Chemistry, University of Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2011

Received in revised form 21 September 2011

Accepted 21 September 2011

Available online 24 October 2011

Keywords:

Emerging contaminants

Reclaimed water

Crop uptake

Disinfection by-products

Human exposure

ABSTRACT

Emerging contaminants have received much attention in recent years due to their presence in surface waters, but little attention has been paid to their occurrence in agricultural irrigation waters. This study investigated the occurrence of these compounds in an agricultural irrigation network in northeastern Spain and, for the first time, using two plant uptake models, estimated the concentration of selected micropollutants in crops. The concentration of micropollutants in agricultural irrigation waters ranged from 10 to 5130 ng L⁻¹ and exhibited some attenuation over the course of the irrigation network. Bromoform, chloroform, diclofenac, caffeine, ibuprofen, naproxen, methyl dihydrojasmonate, galaxolide, butylated hydroxytoluene, and butylated hydroxyanisole were the most abundant contaminants (>200 ng L⁻¹, on average). The estimated concentration of micropollutants in crops ranged from <1 to 7677 ng kg⁻¹, with the neutral compounds being the most abundant. Moreover, the predicted data obtained by fate models generally agreed with experimental data. Finally, human exposure to micropollutants through fruit and vegetable consumption was estimated to be 9.8 µg per person and week (Σ 27 contaminants detected). Further studies are needed to determine the health implications that the presence of these compounds in fruit and vegetables may have for consumers.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Although Mediterranean rivers have been subjected to severe drought events for centuries, the frequency and intensity of these events has risen dramatically in recent times due to climate change and population increase (Milly et al., 2005; Iglesias et al., 2011). Agriculture has been adapted to climatic changes (e.g., irregular rainfall distribution) through the implementation of modern irrigation technologies, but the impossibility of preventing the presence of organic micropollutants in these irrigation waters has become a potentially major problem with consequences that are yet to be fully understood (Daughton, 2004).

Organic micropollutants are comprised of a broad spectrum of compounds belonging to different chemical classes and used for a large number of applications. Among these pollutants, emerging contaminants constitute a large group of compounds that includes pharmaceuticals, personal care products, plasticizers, surfactants, and herbicides and whose ecotoxicological effects are relatively unknown (Murray et al., 2010). Known examples of these effects include the reduction of macroinvertebrate diversity in rivers (Muñoz et al., 2009) and behavioral changes in mosquito fish (Henry and Black, 2008). Since conventional wastewater treatment plants (WWTPs) are not

designed to remove emerging and related contaminants, many of these compounds occur at different concentrations in surface waters (Ternes et al., 2004; Gerzabek et al., 2007; Kümmerer, 2009; Pal et al., 2010). Disinfection by-products (DBPs), although generally considered to be emerging contaminants, constitute another contaminant class of concern because some of these compounds are carcinogenic (Richardson, 2010). Trihalomethanes and N-nitrosamines are the most well known classes of DBPs and can occur at different concentrations in secondary and tertiary effluents (Matamoros et al., 2007; Yoon et al., 2011).

In addition to treated urban wastewater effluents, other emerging pollutant sources, including agriculture, farming, industrial, and landfill leachates, can reach the hydrological cycle and enter the food chain through crop irrigation (Kemper, 2008; Radke et al., 2010). Crop uptake of organic contaminants present in irrigation waters, though largely unknown, has already been documented under actual field conditions (Calderón-Preciado et al., 2011).

The effects that the occurrence of these contaminants may have on crop productivity and human health are issues of growing concern, since it has been reported that some pharmaceuticals, such as carbamazepine (Shenker et al., 2011), antimicrobials (Jones-Lepp et al., 2010), and human pharmaceuticals (Herklotz et al., 2010), can be taken up by crops from irrigation waters or soil.

The aim of this study is to assess the occurrence of emerging contaminants and related compounds in irrigation waters from the Prat

* Corresponding author. Tel.: +34 972419804.

E-mail address: victor.matamoros@udg.edu (V. Matamoros).

de Llobregat (NE Spain) agricultural network. This crop area is of special relevance from the point of view of sustainable agriculture due to its proximity to a major city (Barcelona, NE Spain), where the produce obtained from the fields can be marketed quickly after harvest. Given the large number of contaminants occurring in irrigation waters and the impossibility of assessing their occurrence in vegetation due to the lack of analytical techniques, in this study their concentrations in irrigated crops were estimated from water concentrations through the use of separate plant uptake models for neutral and ionic compounds.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Pharmaceuticals, fragrances, endocrine-disrupting chemicals and a flame retardant (i.e., ibuprofen, carbamazepine, diclofenac, clofibrac acid, acetaminophen, caffeine, flunixin, ketoprofen, naproxen tonalide, galaxolide, hydrocinnamic acid, methyl dihydrojasmonate, cashmeran, celestolide, ambrettolide, bisphenol A, nonylphenol, 4-tert-octylphenol, and tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP)) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium); trimethylsulfonium hydroxide (TMSH), tributyl phosphate, and triclosan were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); and pesticides (i.e., atrazine, simazine, mecoprop, chlorothalonil, chlorpyrifos, alachlor, and MCPA) were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA). A trihalomethane (THM) calibration mix solution (i.e., chloroform, dichlorobromomethane, dibromochloromethane, and bromoform) and an N-nitrosamine calibration mix solution (N-nitrosomethylethylamine, N-nitrosodibutylamine, N-nitrosopyrrolidine, and N-nitrosopiperidine) were purchased from Supelco (Park Bellefonte, PA). Gas chromatography grade acetone, methanol, dichloromethane, hexane, and ethyl acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and, finally, hydrogen chloride was obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Sampling site description

This survey was carried out in the agricultural irrigation network of the municipalities of Sant Vicenç dels Horts, Santa Coloma de

Cervelló, Sant Boi de Llobregat, El Prat de Llobregat, and Sant Joan Despí in the province of Barcelona in northeastern Spain (Fig. 1). Field irrigation in this region is carried out through a series of interconnected open-air concrete distribution channels in which the water is supplied by surface waters (i.e., Llobregat River, Anoia River, and Rubí Creek). Llobregat River supplies the Santa Coloma channel (P2), the Upper channel (P1) and the Cal Roc channel (P4), while Rubí Creek, which basically consists of treated wastewater, feeds the Infanta channel (P3). The agricultural area irrigated by this network spans ca. 1500 ha and is predominantly used to grow vegetables (e.g., lettuce, onions, and peppers). The Llobregat River basin, which is 156 km long and covers a catchment area of 4957 km², suffers from extreme and sudden flow fluctuations (mean annual precipitation of 3330 hm³; annual average discharge of 693 hm³) and receives the effluent discharges of more than 50 WWTPs, mostly from its two main tributaries, the Cardener and Anoia Rivers.

2.3. Sampling strategy and sample collection

Sampling campaigns were carried out in summer 2008 and summer 2009, when periods of water scarcity were predominant and, consequently, the impact of pollution was highest. Fig. 1 shows the sampling points in the irrigation network.

Water samples for THM and N-nitrosamine determination were collected in 40 mL amber glass vials and 250 mL amber glass bottles, respectively. Both the vials and the bottles contained ascorbic acid to remove residual chlorine in water samples—100 mg for the THMs and 250 mg for the N-nitrosamines—and both were filled headspace free. Water samples for the determination of other micropollutants were collected in 2.5 L glass amber bottles. All samples were kept refrigerated during transport to the laboratory, where they were stored at 4 °C until they were analyzed. The total sample holding time in all cases was less than 72 h.

2.4. Analytical methodology

Trihalomethane determination was carried out by solid-phase microextraction (SPME) using an SPME TRIPLUS autosampler from Thermo Fisher (Thermo-Finnigan, Dreieich, Germany). The extraction conditions and analytical quality details have been previously

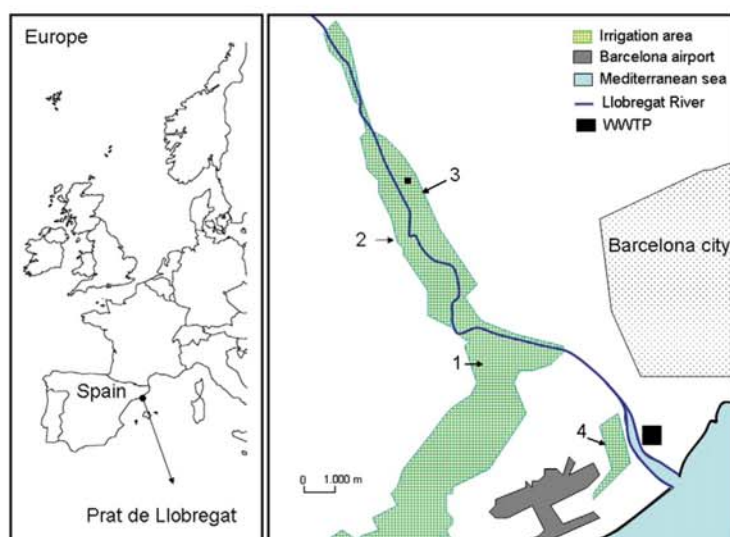


Fig. 1. Map of the sampling area. P1. Upper channel; P2. Santa Coloma channel; P3. Infanta channel; P4. Cal Roc.

described (Calderón-Preciado et al., 2011). LOD and LOQ ranged from 0.001 to 0.350 and from 0.002 to 0.474 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

N-nitrosamine extraction was adapted from the EPA 521 method. The determination was performed with an Ultra Trace GC coupled to a nitrogen phosphorus detector (Thermo Fisher, Milan, Italy). The extraction and determination procedures for these compounds are thoroughly detailed in Calderón-Preciado et al. (2011). The LODs and LOQs obtained for N-nitrosamines ranged from 0.049 to 0.108 and from 0.050 to 0.110 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

The determination of pharmaceuticals, personal care products and pesticides was performed as described by Matamoros and Bayona (2006). Briefly, 1000 mL of water samples were filtered, percolated through a 200 mg Strata X solid-phase extraction cartridge (Phenomenex, Torrance, USA). Derivatized samples were analyzed in a TRACE GC-MS (Thermo Fisher) in the electron impact mode. Detailed extraction and determination procedures of these compounds are provided in Calderón-Preciado et al. (2011). LOD and LOQ ranged from 0.002 to 0.28 and from 0.003 to 0.47 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Recoveries ranged from 90 to 107%.

3. Results and discussion

3.1. Occurrence of micropollutants in field irrigation waters

The group of micropollutants included in this study was selected on the basis of their concentration and high detection frequency in river waters and WWTP effluents (Gervais et al., 2008; Pal et al., 2010). Table 1 shows electric conductivities while Table 2 shows the frequency of detection and concentrations of selected micropollutants at the four selected sampling sites (Fig. 1). Antioxidants and THMs were found to be present at all sampling sites, whereas only 2 out of 5 N-nitrosamines (NDMA and NPIP), 5 out of 10 pharmaceuticals (diclofenac, carbamazepine, caffeine, ibuprofen, and naproxen), 4 out of 6 personal care products (methyl dihydrojasmonate, hydrocinamic acid, galaxolide, and tonalide), 1 out of 3 phenolic estrogens (bisphenol A), 1 out of 2 flame retardants (TBP), and 1 out of 8 pesticides (mecoprop) were detected above the LOD. These results generally agree with those of previous studies in agricultural irrigation waters (Calderón-Preciado et al., 2011). Overall pollutant concentration was highest in the Infanta channel (12.2 $\mu\text{g L}^{-1}$), followed by the Santa Coloma channel (6.6 $\mu\text{g L}^{-1}$), the Cal Roc channel (4.4 $\mu\text{g L}^{-1}$) and the Upper channel (4.2 $\mu\text{g L}^{-1}$). This is due to the presence of higher concentrations of DBPs in the Santa Coloma channel (8.7 $\mu\text{g L}^{-1}$), particularly bromoform and dibromochloromethane. This may be attributable to the combination of high concentrations of bromide and treated wastewater in the Llobregat River, from where the water originates. The Infanta channel had the greatest concentration of pharmaceuticals (2.9 $\mu\text{g L}^{-1}$), presumably due to both the direct discharge of Sant Feliu WWTP effluent into the channel and the high presence of treated wastewater in Rubí Creek, which feeds the Infanta channel (Fig. 1). López-Roldán et al. (2010) reported an extremely high concentration of pharmaceuticals in Rubí Creek, since the majority of its water is treated wastewater. The Upper channel (P1) and Cal Roc channel (P4), which are fed by the Santa Coloma channel (P2), had the lowest pollutant concentrations, presumably because some removal takes place as the irrigation water is distributed (i.e., due to photodegradation, sorption, and biodegradation).

Table 1
Sampling campaigns and their respective electric conductivities in the collected water samples.

Sampling date	P1 ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	P2 ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	P3 ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	P4 ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
July 2008	1951	1326	1422	1595
May 2009	2230	1676	1672	1687

The concentration of micropollutants in the water samples ranged from 0.001 to 5.13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Table 2). Chloroform and bromoform were the most abundant compounds, with concentrations ranging from 1.5 to 5.1 $\mu\text{g L}^{-1}$. It is worth mentioning that these concentrations are well below the European limit for total trihalomethanes in drinking water (93/83/EC). Apart from THMs, diclofenac, caffeine, ibuprofen, naproxen, methyl dihydrojasmonate, galaxolide, BHT, and BHA were the most abundant compounds in the Prat de Llobregat irrigation channels (>0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, on average). This partially agrees with earlier reports of diclofenac being a recalcitrant contaminant in conventional activated sewage sludge WWTPs (Miège et al., 2009) and, consequently, one of the most abundant compounds in surface waters impacted by WWTP effluents (Pal et al., 2010). Given that the high abundance of the rest of the compounds cannot be attributed to their recalcitrance, as over 80% has been reported to be eliminated at conventional WWTPs (Carballa et al., 2005; Soliman et al., 2007), the abundance of these compounds may be due to the fact that concentrations at the WWTP inlet are extremely high. Furthermore, ketoprofen was only detected in the Infanta channel, which is consistent with the high impact of treated wastewater discharge at this point. Ketoprofen concentrations were low or undetected at the other sampling sites, probably due to the compound's reported high photodegradation rate in surface waters (Boreen et al., 2003). Concentrations of NDMA and mecoprop were always below 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$, which is consistent with earlier reports on these compounds in surface waters (Kuster et al., 2008; Nawrocki and Andrzejewski, 2011).

These results partially agree with other studies carried out in the Llobregat River basin that have shown a significant presence of emerging contaminants (Céspedes et al., 2005; Kuster et al., 2008). Nevertheless, this is the first time that the occurrence of these compounds has been detected in the final field irrigation waters.

3.2. Estimation of micropollutant concentrations in irrigated crops and human exposure

Knowledge of concentration levels of micropollutants in crops is relevant to assess indirect human exposure to these pollutants. Unfortunately, there is no single model able to describe all the processes involved in plant uptake of pollutants (Trapp and Schwartz, 2000). In this study, the plant uptake of the micropollutants shown in Table 2 was assessed from concentrations in irrigation waters by modeling; neutral and ionic pollutants were studied separately. For neutrals, we used the Travis and Arms (1988), which is an empirical relationship between soil concentration and the amount of chemical found in aboveground plant parts based on a review of the data from more than twenty experimental and observational studies (Eq. (1)).

$$\log \text{BCF} = -0.578 \times \log K_{ow} + 1.588 \quad (1)$$

where BCF is the calculated soil-to-plant biotransfer factor for aboveground plant parts ($\mu\text{g g}^{-1}$ plant dry weight over $\mu\text{g g}^{-1}$ soil dry weight), and K_{ow} is the octanol-water partition coefficient for the chemical (dimensionless).

For ionic compounds, a technical guidance document (Trapp, 2009) proposed a method based on the correction of the physico-chemical properties by the compound's neutral fraction, F_n . For the BCF that means that

$$\log \text{BCF} = 0.85 \times \log(F_n \times K_{ow}) - 0.70. \quad (2)$$

In both cases, Eqs. 3 and 4 were employed to obtain the final micropollutant concentrations in crops.

$$C_{\text{soil}} = C_{\text{water}} \times f_{oc} \times K_{oc} \quad (3)$$

$$C_{\text{crop}} = C_{\text{soil}} \times \text{BCF} \quad (4)$$

Table 2
Frequency of detection (FOD), mean and standard deviation concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) of the 47 analytes in the four sampling points.

Target analyte	FOD	P1	P2	P3	P4
<i>Disinfection by products</i>					
Chloroform	7/8	1.53 ± 1.82	1.89 ± 1.12	1.87 ± 1.23	2.37 ± 1.61
Dichlorobromomethane	8/8	0.03 ± 0.03	0.44 ± 0.61	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.03
Dibromochloromethane	6/8	0.06 ± 0.08	1.16 ± 1.53	0.05 ± 0.04	0.05 ± 0.03
Bromoform	7/8	0.46 ± 0.33	5.13 ± 3.57	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.03
Nitrosodimethylamine, NDMA	8/8	0.039 ± 0.022	0.036 ± 0.028	0.029 ± 0.013	0.023 ± 0.011
Nitrosomethylethylamine, NMEA	0/8	<0.017	<0.017	<0.017	<0.017
Nitrosopyrrolidine, NPYR	0/8	<0.037	<0.037	<0.037	<0.037
Nitrosopiperidine, NPIP	3/8	0.007 ± 0.006	<0.006	0.022 ± 0.018	0.012 ± 0.012
Nitrosodibutylamine, NDBA	0/8	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Pharmaceuticals</i>					
Diclofenac	8/8	0.044 ± 0.034	0.189 ± 0.112	0.581 ± 0.794	0.063 ± 0.080
Carbamazepine	4/8	0.079 ± 0.090	0.275 ± 0.366	0.063 ± 0.066	0.069 ± 0.075
Clofibric acid	0/8	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007
Caffeine	8/8	0.229 ± 0.082	0.333 ± 0.024	0.797 ± 0.568	0.203 ± 0.107
Ibuprofen	8/8	0.071 ± 0.024	0.280 ± 0.294	0.527 ± 0.468	0.067 ± 0.053
Flunixin	0/8	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Ketoprofen	1/8	<0.001	<0.001	0.211 ± 0.293	<0.001
Acetaminophen	0/8	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040
Naproxen	8/8	0.184 ± 0.117	0.215 ± 0.106	0.715 ± 0.432	0.263 ± 0.094
Triclosan	2/8	<0.013	0.111	0.162	<0.013
<i>Personal care products</i>					
Ambrettolide	0/8	<0.018	<0.018	<0.018	<0.018
Methyldihydrojasmonate	8/8	0.529 ± 0.368	0.543 ± 0.345	0.482 ± 0.057	0.460 ± 0.286
Galaxolide	8/8	0.140 ± 0.043	0.419 ± 0.374	0.437 ± 0.459	0.170 ± 0.100
Tonalide	8/8	0.044 ± 0.038	0.074 ± 0.024	0.127 ± 0.155	0.060 ± 0.055
Cashmeran	0/8	<0.006	<0.006	<0.006	<0.006
Hydrocinnamic acid	8/8	0.012 ± 0.01	0.018 ± 0.005	0.021 ± 0.013	0.038 ± 0.023
<i>Phenolic estrogens</i>					
Bisphenol A	4/8	0.024 ± 0.023	0.025 ± 0.029	0.042 ± 0.054	0.055 ± 0.073
4-tert-octylphenol	0/8	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Nonylphenol	0/8	<0.081	<0.081	<0.081	<0.081
<i>Antioxidants</i>					
BHT	8/8	0.125 ± 0.044	0.589 ± 0.620	0.121 ± 0.025	0.182 ± 0.067
BHA	4/8	0.188 ± 0.258	0.216 ± 0.297	0.256 ± 0.353	0.134 ± 0.185
<i>Flame retardants</i>					
Tributylphosphate	4/8	0.042 ± 0.007	0.248 ± 0.298	0.064 ± 0.035	0.053 ± 0.015
TCEP	0/8	<0.055	<0.055	<0.055	<0.055
<i>Pesticides</i>					
Chlorpyrifos	0/8	<0.300	<0.300	<0.300	<0.300
Atrazine	0/8	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007
Chlorfenvinfos	0/8	<0.014	<0.014	<0.014	<0.014
Alochlor	0/8	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007
Simazine	0/8	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007
Diclobenil	0/8	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
MCPA	1/8	<0.070	0.084 ± 0.032	<0.070	<0.070
Mecoprop	4/8	0.036 ± 0.034	0.044 ± 0.046	0.093 ± 0.115	0.070 ± 0.082

FOD: number of samples above LOD/total number of samples.

where K_{oc} was obtained using the Franco et al. (2009) model. The irrigated soil of Prat de Llobregat has a pH of 8.2 and a fraction of organic carbon (f_{oc}) of 1%, on average. As can be seen from the equation, degradation and volatilization processes were not considered. Therefore, the results obtained and shown in Table 3 may overestimate the soil concentrations. Nevertheless, the former removal pathways can be counterbalanced by a continuous input of these compounds from irrigation waters, and, in fact, they have initially been considered to be pseudo-persistent.

Table 3 shows that the log BCF ranged from -2.9 (MCPA) to 2.9 (triclosan), with ionic and highly hydrophobic compounds showing the lowest soil-to-plant biotransfer factors. Nevertheless, hydrophobic compounds may have the highest micropollutant concentrations in Prat de Llobregat soils. Based on these results, the concentration of pollutants in crops after applying the above-mentioned equations ranged from <0.001 to $7.677 \mu\text{g kg}^{-1}$ (dry weight). Although

hydrophobic compounds had low BCFs, they were abundant in crops, presumably due to their high concentrations in field soils. Conversely, the results suggest that ionic compounds, which were present in high concentrations in irrigation waters, are found in low concentrations in crops because their uptake potential may be limited. This might be due to plant cells having a negative electrical potential at the cell membrane, which leads to a repulsion of the negatively charged anions. In contrast, an ion trap may lead to a high accumulation of acidic compounds in cytosol and phloem. Ion traps occur when the soil pH is lower than the cell pH and the pH of the compound pKa is near the soil pH (Trapp, 2009). However, since the pH of Prat de Llobregat field soil is about 8.2 and the pKa of the studied ionic compounds is around 4, ion trapping is probably low. The most abundant compounds in crops were bisphenol A, tonalide, galaxolide, methyl dihydrojasmonate, and BHT, which had a high BCF and K_{oc} . Finally, chloroform and bromoform were also abundant in crops but, due to

Table 3

Physico-chemical properties, BCF, crop concentration and human intake of microcontaminants shown in Table 2.

Target analyte	Log K_{ow}	pKa	Log BCF	C_{soil} ($\mu\text{g kg}^{-1}$ dw)	C_{crop} ($\mu\text{g kg}^{-1}$ dw)	Intake ^a (ng person^{-1} day ⁻¹)
<i>Disinfection by products</i>						
Chloroform	1.57	–	0.680	0.451	2.160	130
Dichlorobromomethane	1.61	–	0.657	0.036	0.162	10
Dibromochloromethane	1.70	–	0.605	0.099	0.399	24
Bromoform	1.79	–	0.553	0.503	1.799	108
Nitrosodimethylamine, NDMA	–0.57	–	1.917	<0.001	0.011	<1
Nitrosopiperidine, NPIP	0.36	–	1.380	<0.001	0.013	<1
<i>Pharmaceuticals</i>						
Diclofenac	4.02	4.06	–0.802	0.201	0.032	2
Carbamazepine	2.25	–	0.288	0.102	0.102	12
Caffeine	0.16	–	1.496	0.007	0.208	12
Ibuprofen	3.79	4.45	–0.666	0.213	0.046	3
Ketoprofen	3.00	4.25	–1.508	0.156	0.005	<1
Naproxen	3.10	4.38	–1.312	0.262	0.013	<1
Triclosan	4.76	7.9	2.941	0.001	1.245	75
<i>Personal care products</i>						
Methyl dihydrojasmonate	2.98	–	–0.134	1.644	1.206	72
Galaxolide	6.26	–	–2.030	431.8	4.027	242
Tonalide	6.35	–	2.082	307.0	2.540	152
Hydrocinnamic acid	2.29	4.37	–2.009	0.014	<0.001	<1
<i>Phenolic estrogens</i>						
Bisphenol A	3.64	9.7	2.383	0.032	7.677	461
<i>Antioxidants</i>						
BHT	5.03	–	–1.319	37.98	1.821	109
BHA	3.50	–	–0.435	1.709	0.628	38
<i>Flame retardants</i>						
Tributylphosphate	3.82	–	–0.620	1.591	0.382	23
<i>Pesticides</i>						
MCPA	2.52	3.07	–2.920	0.055	<0.001	<1
Mecoprop	2.94	3.78	–1.958	0.044	<0.001	<1

^a Recommendation of 400 g per person a day of fruit and vegetables intake (WHO); dw: dry weight; water content = 85% (human intake = $0.400 \times 0.15 \times C_{crop}$).

their high Henry's law constant, can be easily removed by plant leaves (stomata). These concentrations (<0.001 to $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight) partially agree with previously determined concentrations of some emerging contaminants found in alfalfa and apples tree leaves, collected in the municipality of Girona, Spain, (5 out of 43 anthropogenic compounds were identified and quantitated in crops, with concentrations ranging from 0.01 to $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ fresh weight) irrigated with reclaimed water at similar micropollutant concentrations to those observed in this study (Calderón-Preciado et al., 2011). Therefore, to further test the suitability of these models, they were validated with experimental data from a previously mentioned study carried out by our research team (Table 4).

Table 4 shows that the determined compound concentration for carbamazepine, triclosan, tonalide, galaxolide and hydrocinnamic

acid (the last two analytes in the case of leaves) are below the model prediction. The latter can be explained by the large variations exhibited in irrigation water and evidently to the action of plant metabolism (Sandermann, 1994). In addition, presence of hydrocinnamic acid in tissue cannot be solely explained by uptake from irrigation waters, since this compound is naturally occurring in plants where it acts as a growth inhibitor (Xuan et al., 2009). It is also interesting to highlight the difference of galaxolide occurrence in each plant species in spite of sharing the same irrigation regime; this behavior supports previous reports claiming that, in addition to certain physicochemical compound properties, uptake also heavily depends on the plant species (Pascal-Lorber et al., 2010; Schroder and Collins, 2002). On the other hand there were other compounds, i.e., caffeine, ibuprofen, naproxen, diclofenac and galaxolide (in alfalfa) which

Table 4

Actual tissue concentration of target analytes vs. model predicted concentration (experimental data obtained from Calderón-Preciado et al., 2011).

Target analyte	Irrigation water concentration, $\mu\text{g L}^{-1}$ (min–max) mean	Concentration in tissue, $\mu\text{g kg}^{-1}$ (min–max) mean, dw		Predicted concentration in tissue, $\mu\text{g kg}^{-1}$, dw
		Apple tree leaves	Alfalfa	
Carbamazepine	(0.121–0.136) 0.13	0.043	0.024	(0.196–0.221) 0.21
Caffeine	(0.789–0.295) 0.54	(0.114–110.7) 55.4	(21.2–55.6) 38.4	(0.157–0.420) 0.29
Ibuprofen	(0.083–0.139) 0.11	0.043	(0.128–0.172) 0.15	(0.016–0.027) 0.02
Triclosan	<0.022	0.043	0.024	0.100
Naproxen	(0.092–0.097) 0.10	0.043	(0.024–0.056) 0.04	(0.003–0.004) 0.004
Diclofenac	(0.320–0.383) 0.35	0.354	0.198	(0.048–0.058) 0.05
Hydrocinnamic acid	<0.025	(0.543–253.6) 127.1	0.024	0.001
MDHJ	0.374	0.293	(0.624–2.218) 1.421	0.896
Tonalide	(0.138–0.152) 0.15	0.043	0.024	(2.000–2.203) 2.1
Galaxolide	(0.307–0.309) 0.31	0.057	(0.032–67.6) 33.8	(0.424–4.269) 2.3

were well above the predicted concentrations, this may be due to plant intrinsic transport systems which may favor entrance of these compounds. In this sense, though certain deviation from real concentrations was observed by the use of models, predicted concentrations were, in general, in the same range of magnitude. Hence these models are a valuable tool to easily and rapidly deduce from water pollutant concentration whether pollutant uptake by crops is of importance or not and thus, if necessary, take the precautionary measures in order to minimize it.

Human exposure to micropollutants through the consumption of fruit and vegetables from the Llobregat area ranged from <1 to 461 ng per person per day (Table 3). Although it occurs at low concentrations, bisphenol A, a developmental, neural, and reproductive toxicant that mimics estrogen and can interfere with healthy growth and body function (Jones et al., 2011), showed the highest diet intake. Further studies are needed to assess the concentration of these compounds in fruit and vegetables in order to determine the real human exposure to these pollutants through diet.

4. Conclusions

Forty emerging and related contaminants were identified and quantified in an agricultural irrigation network in NE Spain. Concentrations ranged from 0.001 to 5.130 $\mu\text{g L}^{-1}$. Bromoform, chloroform, diclofenac, caffeine, ibuprofen, naproxen, methyl dihydrojasmonate, galaxolide, BHT, and BHA were the most abundant ($>0.200 \mu\text{g L}^{-1}$, on average). The Infanta channel, which is fed with water from Rubí Creek, had higher concentrations of selected pollutants than the Santa Coloma channel, which is fed by the Llobregat River. This is due to the higher impact of treated wastewater in Rubí Creek. A certain attenuation was seen from the Santa Coloma channel to the Upper channel and Cal Roc channel, presumably due to photodegradation and other removal processes that take place over the course of the irrigation network. The concentration of pollutants in crops obtained after application of two different uptake models ranged from <0.001 to $7.677 \mu\text{g kg}^{-1}$ dw. Experimentally obtained tissue concentration data were used to evaluate the uptake models, and though certain deviation from predicted values was observed, they were in accordance with experimental data. Human exposure to micropollutants through the consumption of fruit and vegetables ranged from <1 to more than 461 ng per person per day. Even though concentrations are low, further studies are required to assess the real risk to humans that these pollutants pose through diet.

Acknowledgments

This study has been financed by the Catalan Food Safety Agency (ACSA). Dr. VM acknowledges a Juan de la Cierva contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We would like to thank "Consorcio del Parc Agrari del Baix Llobregat" for their help during sampling campaigns.

References

Boreen AL, Arnold WA, McNeill K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Aquatic Sci* 2003;65:320–41.

Calderón-Preciado D, Jiménez-Cartagena C, Matamoros V, Bayona JM. Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading. *Water Res* 2011;45:221–31.

Carballa M, Omil F, Lema JM. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Res* 2005;39:4790–6.

Céspedes R, Lacorte S, Raldúa D, Ginebreda A, Barceló D, Piña B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). *Chemosphere* 2005;61:1710–9.

Daughton CG. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environ Impact Assess Rev* 2004;24:711–32.

Franco A, Wenjing FU, Trapp S. Influence of soil pH on the sorption of ionizable chemicals: modeling advances. *Environ Toxicol Chem* 2009;28:458–64.

Gervais G, Brosillon S, Laplanche A, Helen C. Ultra-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. *J Chromatogr A* 2008;1202:163–72.

Gerzabek MH, Barceló D, Bellin A, Rijnaarts HHM, Slob A, Darmendrail D, Fowler HJ, Négrel P, Frank E, Grathwohl P, Kuntz D, Barth JAC. The integrated project Aqua-Terra of the EU sixth framework lays foundations for better understanding of river-sediment-soil-groundwater systems. *J Environ Manage* 2007;84:237–43.

Henry T, Black M. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish. *Arch Environ Contam Toxicol* 2008;54:325–30.

Herklotz PA, Gurung P, Vanden Heuvel B, Kinney CA. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* 2010;78:1416–21.

Iglesias A, Garrote L, Diz A, Schlickerieder J, Martín-Carrasco F. Re-thinking water policy priorities in the Mediterranean region in view of climate change. *Environ Sci Policy* 2011;7:744–57.

Jones BA, Shimell JJ, Watson NV. Pre- and postnatal bisphenol A treatment results in persistent deficits in the sexual behavior of male rats, but not female rats, in adulthood. *Horm Behav* 2011;59:246–51.

Jones-Lepp TL, Sanchez CA, Moy T, Kazemi R. Method development and application to determine potential plant uptake of antibiotics and other drugs in irrigated crop production systems. *J Agric Food Chem* 2010;58:11568–73.

Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 2008;8:1–13.

Kümmerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *J Environ Manage* 2009;90:2354–66.

Kuster M, López de Alda MJ, Hernando MD, Petrovic M, Martín-Alonso J, Barceló D. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J Hydrol* 2008;358:112–23.

López-Roldán R, de Alda ML, Gros M, Petrovic M, Martín-Alonso J, Barceló D. Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry. *Chemosphere* 2010;80:1337–44.

Matamoros V, Bayona JM. Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands. *Environ Sci Technol* 2006;40:5811–6.

Matamoros V, Mujeerigo R, Bayona JM. Trihalomethane occurrence in chlorinated reclaimed water at full-scale wastewater treatment plants in NE Spain. *Water Res* 2007;41:3337–44.

Miège C, Choubert JM, Ribeiro L, Eusèbe M, Coquery M. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – conception of a database and first results. *Environ Pollut* 2009;157:1721–6.

Milly PC, Dunne KA, Vecchia AV. Global pattern of trends in streamflow and water availability in a changing climate. *Nature* 2005;438:347–50.

Muñoz I, López-Doval JC, Ricart M, Villagrasa M, Brix R, Geiszinger A, Ginebreda A, Guasch H, de Alda MJL, Romani AM, Sabater S, Barceló D. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (northeast Spain). *Environ Toxicol Chem* 2009;28:2706–14.

Murray KE, Thomas SM, Bodour AA. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ Pollut* 2010;158:3462–71.

Nawrocki J, Andrzejewski P. Nitrosamines and water. *J Hazard Mater* 2011;189:1–18.

Pal A, Gin KY-H, Lin AY-C, Reinhard M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci Total Environ* 2010;408:6062–9.

Pascal-Lorber S, Alsayeda H, Jouanin I, Debrauwer L, Canlet C, Laurent F. Metabolic fate of [^{14}C]diuron and [^{14}C]linuron in wheat (*Triticum aestivum*) and radish (*Raphanus sativus*). *J Agric Food Chem* 2010;58:10935–44.

Radke M, Ulrich H, Wurm C, Kunkel U. Dynamics and attenuation of acidic pharmaceuticals along a river stretch. *Environ Sci Technol* 2010;44:2968–74.

Richardson SD. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 2010;82:4742–74.

Sanderemann H. Higher-plant metabolism of xenobiotics – the green liver concept. *Pharmacogenetics* 1994;4:225–41.

Schroder P, Collins C. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *Int J Phytoremediation* 2002;4:247–65.

Shenker M, Harush D, Ben-Ari J, Chefetz B. Uptake of carbamazepine by cucumber plants – a case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* 2011;82:905–10.

Soliman MA, Pedersen JA, Park H, Castaneda-Jimenez A, Stenstrom MK, Suffet IH. Human pharmaceuticals, antioxidants, and plasticizers in wastewater treatment plant and water reclamation plant effluents. *Water Environ Res* 2007;79:156–67.

Ternes TA, Joss A, Siegrist H. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 2004;38:392A–9A.

Trapp S. Bioaccumulation of polar and ionizable compounds in plants. In: Devillers J, editor. *Ecotoxicology Modeling*. US: Springer; 2009. p. 299–353.

Trapp S, Schwartz S. Proposals to overcome limitations in the EU chemical risk assessment scheme. *Chemosphere* 2000;41:965–71.

Travis CC, Arms AD. Bioconcentration of organics in beef, milk, and vegetation. *Environ Sci Technol* 1988;22:271–4.

Xuan TD, Toyama T, Fukuta M, Khanh TD, Tawat S. Chemical interaction in the invasiveness of cogongrass (*Imperata cylindrical* (L.) Beauv.). *J Agric Food Chem* 2009;57:9448–53.

Yoon S, Nakada N, Tanaka H. Occurrence and removal of NDMA and NDMA formation potential in wastewater treatment plants. *J Hazard Mater* 2011;190:897–902.

IV.7. Discusión general de resultados

El presente capítulo recoge dos artículos científicos que pretenden caracterizar la calidad química y evaluar el impacto del agua de riego empleada en dos zonas agrícolas relevantes: Torroella de Montgrí (Baix Ter) y el Parc Agrari del Baix Llobregat. El interés de focalizar el estudio en la calidad de las aguas utilizadas en la irrigación de estas dos zonas agrícolas recayó en los regímenes de irrigación que ahí se utilizan. En ambas zonas se cuenta con agua de río (Ter o Llobregat) para realizar el riego. Sin embargo, gozan también de la posibilidad de emplear para este fin aguas regeneradas provenientes de EDAR.

En la introducción a la presente Tesis, se puntualizó el gran impacto que ejercen las condiciones climáticas sobre los recursos hídricos. El régimen pluviométrico de la Península Ibérica se caracteriza por una variabilidad interanual elevada, fruto del clima mediterráneo, que hace a esa zona especialmente vulnerable de sufrir episodios de sequía. Durante los años 2007 y 2008 la Península Ibérica sufrió una grave sequía, que afectó a Cataluña con gran severidad (ACA, 2008). Por este motivo, el 3 de abril de 2007, la Generalitat de Catalunya promulgó el Decreto de Sequía 84/2007, mediante el cual se adoptan medidas excepcionales y de emergencia en relación a la utilización de recursos hídricos. Este Decreto comporta la adopción de políticas de gestión de las reservas hídricas y de contención de la demanda (reducción progresiva de las dotaciones para diferentes usos, mayor aprovechamiento de los recursos de agua subterránea, reutilización, etc.), obras de emergencia (recuperación de pozos en desuso y de este modo disponer de recursos hídricos adicionales) y por último, la reutilización de aguas, en donde se contempló el uso del agua regenerada de la EDAR del Baix Llobregat para aumentar el caudal del río y favorecer la recuperación de los acuíferos. Esta última fue una de las medidas adoptadas en aras de garantizar el mantenimiento del riego agrícola y de usos urbanos e industriales.

Por las condiciones de escasez sufridas en la región, los regímenes de irrigación empleados en los cultivos agrícolas del Baix Ter (TM, Torroella de Montgrí) y el Parc Agrari del Baix Llobregat (PABL) estuvieron fuertemente influenciados por los aportes de los efluentes de EDAR locales, especialmente en el periodo de febrero a agosto de 2008. Tal influencia se discutirá posteriormente en esta sección.

En el Capítulo III se han establecido las metodologías analíticas aplicadas a la determinación de microcontaminantes orgánicos en diferentes matrices ambientales. Sin embargo, es igualmente ineludible detallar el razonamiento detrás de la elección de estos 47 analitos diana. La selección de los contaminantes se realizó en base a 3 criterios principales:

1. Alta frecuencia de detección en efluentes de EDARs y aguas de río.
2. Presencia a elevadas concentraciones en efluentes de EDAR y aguas de río.
3. Posibilidad de ejercer efectos ecotoxicológicos.

Se eligieron 7 clases principales de contaminantes orgánicos para cubrir en lo posible, el amplio espectro de contaminantes presentes en los compartimientos acuáticos de interés (efluentes de EDAR y aguas de río). Las clases incluidas fueron: DBPs (9), fármacos (10), PCPs (6), fenoles estrogénicos (3), antioxidantes (2), agentes ignífugos (2) y plaguicidas (15).

En el segundo artículo, *Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading* (sección IV.5), se utiliza una combinación de aguas superficiales provenientes del río Ter y de la EDAR de TM (EDAR-TM) para el riego de una zona de 6592 ha a través de una red de canalizaciones. Esta combinación de fuentes depende de la variabilidad del caudal de río Ter. Cuando éste es demasiado bajo para cubrir las necesidades de riego de la zona, se inyecta el efluente terciario de la EDAR a la red de tuberías hasta satisfacer la demanda hídrica, produciéndose en la red una mezcla de ambas aguas. Por lo tanto, se puede intuir que el uso de aguas regeneradas para el riego de la zona es variable y muy dependiente de las condiciones climatológicas.

En este estudio se observó una mayor frecuencia de detección total de los contaminantes estudiados en el río Ter (75%) que en el efluente de la EDAR (66%) (sección IV.5). Estos resultados se atribuyen al vertido de aguas residuales sin tratar procedentes de pequeños núcleos poblacionales a lo largo del cauce del río Ter (Céspedes et al., 2006), incrementando de esta manera su contaminación. Ahora bien, el efluente de la EDAR exhibió la concentración total más alta entre todos los puntos de muestreo. Esto es debido a la presencia de mayores concentraciones de THMs en este punto (Figura IV.).

Cabe mencionar que de los 47 analitos diana estudiados, 7 son sustancias prioritarias reguladas en la DMA, de los cuales solamente se identificó la presencia de cloroformo. Por otro lado, dos de las sustancias candidatas a ser admitidas en la lista de sustancias peligrosas, bisfenol A y mecoprop, se encontraron en los 4 puntos de muestreo, con frecuencias de detección comprendidas entre 25 y 75%. En la figura IV.2 se muestran las concentraciones medias de los microcontaminantes orgánicos identificados.

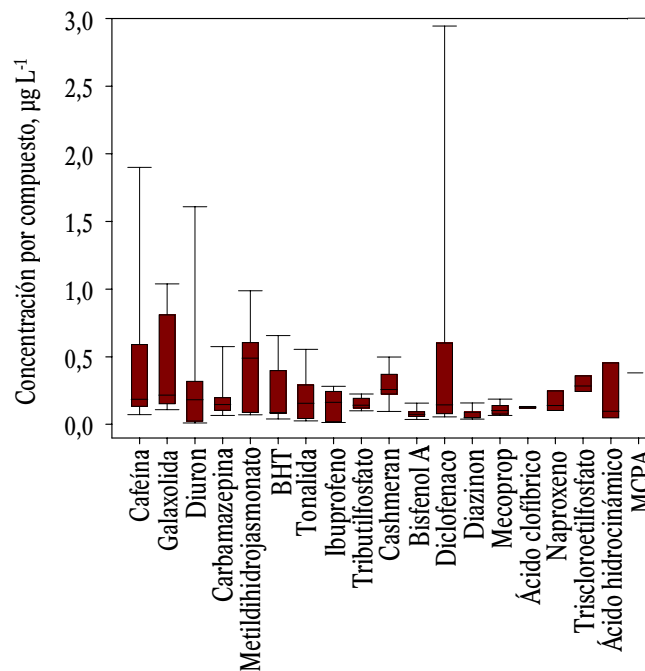


Figura IV. 2. Concentraciones medias de microcontaminantes orgánicos identificados en la comunidad de regantes de Torroella de Montgrí. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75.

En una propuesta hecha en enero de 2012 para enmendar la DMA (2000/60/EC y 2008/105/EC), se establecen por primera vez un valor guía en aguas superficiales continentales que tendría que observarse para un fármaco: diclofenaco. El valor guía propuesto en esta enmienda para ese compuesto es de 100 ng L^{-1} . Las concentraciones encontradas en TM y, como se verá posteriormente, en PABL superan este nivel, por lo que se debe dar un seguimiento cercano a este compuesto para ejercer un control adecuado.

La EDAR-TM emplea como tratamiento terciario una desinfección que consiste en la aplicación de rayos UV (lámparas de baja presión y alta intensidad) seguida de una dosificación de hipoclorito sódico por lo que era de esperar la formación de DBPs.

La presencia de THMs en el efluente de la EDAR-TM [$\overline{\text{TTHM}} = 24,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$] fue mayor que en el resto de los puntos de muestreo [$\overline{\text{TTHMs}} = 1,85$] (Figura IV. 3). Adicionalmente, estos datos apuntan a una rápida disipación de estos compuestos en la red de irrigación, probablemente por volatilización, debido a su elevada constante de Henry. Ello incide en que su presencia fue marcadamente inferior aún en WWTP Inf ($\overline{\text{TTHMs}} = 1,46$), punto con mayor influencia del agua proveniente de la EDAR-TM. En ninguna de las campañas llevadas a cabo, la presencia de TTHMs superó los $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, límite impuesto para agua potable en la Unión Europea (Directiva 98/83/CE), ni los $80 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, límite más riguroso establecido por la USEPA con el mismo motivo.

Ahora bien, la presencia de N-nitrosaminas no siguió la misma pauta, y los niveles más altos no fueron los del efluente de la EDAR-TM (Figura IV.4). Por esta razón cabría esperar otras fuentes de estos compuestos o de sus precursores que explicaran la presencia de estos compuestos en la red de irrigación. Esta presencia se podría atribuir a los vertidos industriales introducidos a lo largo del río Ter. Tales vertidos podrían proceder de la industria metalúrgica, textil o papelera (Céspedes et al., 2006; Espadaler et al., 1997).

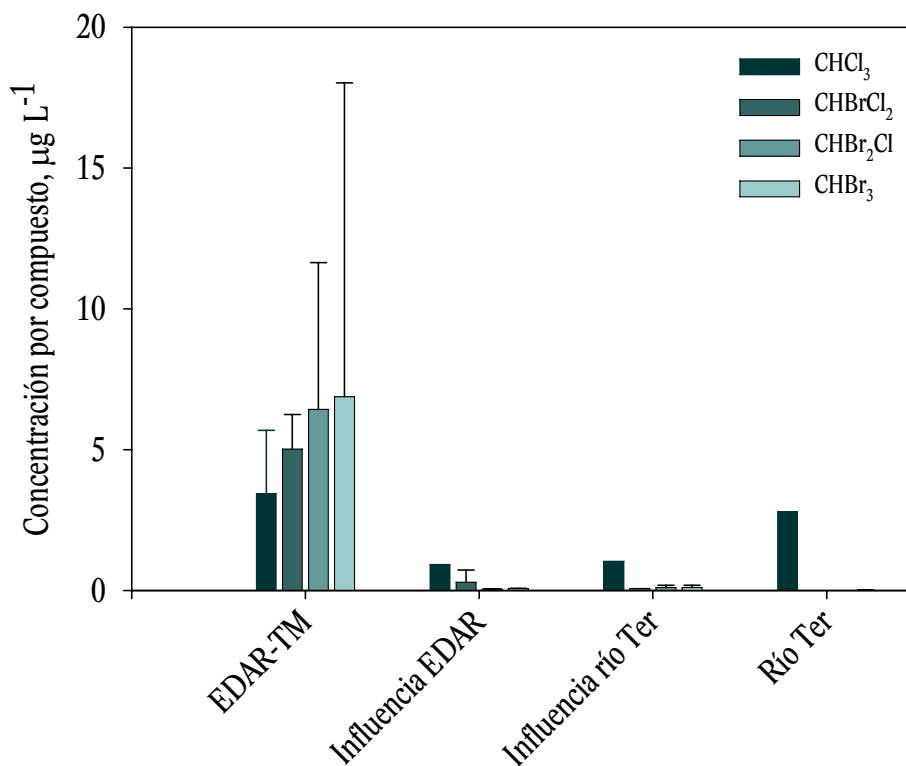


Figura IV. 3. Concentraciones medias de THMs por punto de muestreo.

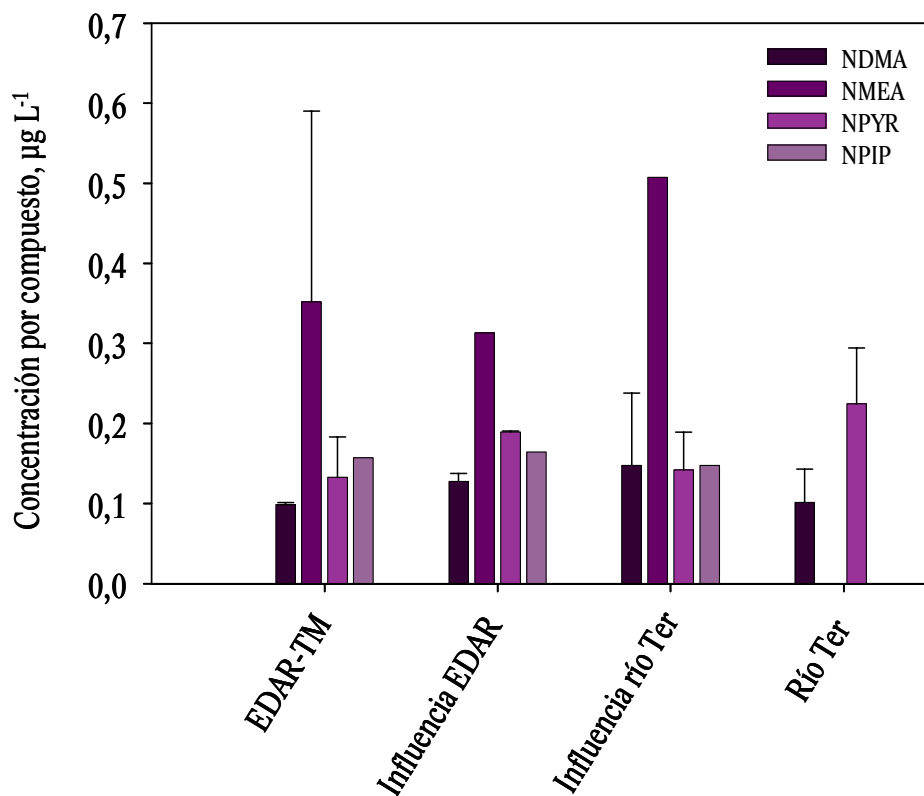


Figura IV. 4. Concentraciones medias de N-nitrosaminas por punto de muestreo.

condiciones meteorológicas de la región fueron un factor que resultó determinante en la distribución de los contaminantes diana en la red de irrigación. Como se puntualizó ya al inicio de la presente sección, la región sufrió una fuerte sequía que se agravó durante los meses de mayo a septiembre de 2008. Estas condiciones provocaron un incremento en la utilización del agua regenerada proveniente de la EDAR-TM para el riego agrícola, tal influencia es notoria especialmente en las campañas realizadas durante los meses de mayo y agosto (conductividades altas como resultado del impacto del efluente de la EDAR-TM en todos los puntos de muestreo, sección IV.5). Asimismo, los patrones de presencia de compuestos diana durante 2008 apuntaron a una influencia del efluente de la EDAR-TM. La conclusión anterior se derivó de un incremento en la presencia de contaminantes recalcitrantes al tratamiento de la EDAR, y evidentemente a una disminución de contaminantes lábiles cuya presencia se asocia a aguas urbanas sin tratar. En este respecto, se observó un incremento en la red de irrigación de agentes ignífugos, compuestos con porcentajes bajos de eliminación en EDAR convencionales (Marklund et al., 2005), y la disminución de BHT, compuesto abundante en el agua del río Ter pero con tasas de eliminación de alrededor del 76% en EDAR convencionales (Bendz et al., 2005).

Resulta interesante mencionar que en ocasiones es posible determinar la fuente de contaminación evaluando la presencia o ausencia de ciertos microcontaminantes orgánicos; como el BHT, mencionado anteriormente o la cafeína con tasas de eliminación en EDAR convencionales de entre 81 y 99% (Buerge et al., 2003). Estos compuestos podrían utilizarse como trazadores químicos de contaminación de aguas superficiales por la introducción de aguas residuales domésticas crudas. En este sentido, resulta útil la aplicación de un cociente tomando como divisor un compuesto recalcitrante al tratamiento de la EDAR (carbamazepina o ácido clofibrico) y como dividendo uno altamente degradable. Así altos índices de este cociente serían indicativos de un agua residual no tratada, mientras que valores bajos lo serían para un agua que se ha depurado satisfactoriamente.

Una vez terminado este primer análisis de datos, se aplicó la estadística multivariante, ya que ésta cuenta con métodos imparciales que pueden ayudar en la determinación de asociaciones naturales entre muestras y/o variables resaltando información no disponible a primera vista (Ashley y Lloyd, 1978). El tratamiento multivariante de datos ambientales se utiliza ampliamente para caracterizar y evaluar la calidad de aguas y es útil en la determinación de variaciones espacio-temporales causadas por factores humanos o naturales asociados con cambios estacionales (Elosegui y Pozo, 1994; Reisenhofer et al., 1998; Vega et al., 1998). En el primer artículo científico del presente capítulo (sección IV.5) se ha aplicado el PCA. Esta técnica estadística multivariante es útil en la identificación de patrones en los datos y resaltar diferencias y similitudes.

En este estudio se retuvieron las 3 primeras PCs capaces de explicar un 67% de la varianza total y se abandonaron las PC4 y 5. En la evaluación de las PC4 y 5 resultó difícil identificar las variables ambientales que representan, atribuyéndose a la complejidad del sistema ambiental en estudio. La PC1 (28% var_{tot}) separó a los analitos diana por año de muestreo, la PC2 (22% var_{tot}) los separó por origen de contaminación en relación a la influencia del río Ter o EDAR-TM, y por último la PC3 (17 % var_{tot}) agrupó los compuestos por su afinidad al material particulado en suspensión (sección IV.5, Figura 4 del artículo 2).

Con el objeto de definir el impacto de los regímenes de irrigación utilizados, se calcularon los aportes máxicos potenciales al campo agrícola tomando en cuenta 2 regímenes de irrigación (100% río Ter y 100% EDAR-TM) y las necesidades hídricas de 4 cultivos de la zona de estudio (alfalfa, manzano, maíz y lechuga). En el caso de DBPs, como cabría esperar, el mayor aporte al suelo agrícola provino de un régimen de irrigación 100% EDAR-TM. Ahora bien, los THMs, son compuestos muy volátiles, mientras que las N-nitrosaminas son particularmente susceptibles a la fotodegradación por lo que cabe esperar que tengan un tiempo de vida media corto en condiciones ambientales. Sin embargo, no puede descartarse su incorporación en los cultivos regados con esta agua; en este sentido se ha reportado ya la incorporación de NDMA en cultivos hidropónicos (Yifru y Nzengung, 2006). De igual forma, el mayor aporte máxico de PPCPs vino dado por el régimen de riego 100% EDAR-TM, mientras que en el caso de los agentes ignífugos fue un régimen 100% río Ter. Estas tres clases de compuestos presentan un amplio espectro de propiedades fisicoquímicas. Algunos de ellos, al ser polares, pueden movilizarse fácilmente y dependiendo de su estabilidad podrían incluso llegar a contaminar las aguas subterráneas; otros compuestos más lipofílicos pueden ser retenidos en la materia orgánica del suelo. Otro posible destino para estos compuestos, es su incorporación en los cultivos agrícolas y en este sentido se ha reportado ya tal proceso para algunos de estos compuestos (Tabla I. 15).

A la luz de la información recabada, y con el objetivo de redondear la caracterización de la zona de estudio, se analizó el tejido de dos especies vegetales cultivadas en esta zona durante el periodo 2007 (manzano y alfalfa). En la determinación analítica del tejido vegetal se excluyeron los DBPs por su volatilidad y fotosensibilidad, seleccionando 11 analitos diana representativos del grupo de los PPCPs. En la hoja de manzano se detectaron el ácido salicílico, ácido hidrocinámico y metil dihidrojasmonato. Los primeros dos compuestos se encuentran de manera natural en plantas y son conocidas fitohormonas, sin embargo la presencia de metil dihidrojasmonato en el tejido tiene un origen antropogénico. Por otra parte, el análisis del tejido de alfalfa reveló la presencia de 5 compuestos de origen antropogénico: cafeína, ibuprofeno, naproxeno, metil dihidrojasmonato y galaxolida. Las concentraciones obtenidas en este estudio son de la misma magnitud (unidades-decenas de $\mu\text{g kg}^{-1}$) que las reportadas para la incorporación de carbamazepina en pepino, $7,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Shenker et al., 2011) y triclosan en soja, $54 \mu\text{g kg}^{-1}$ (LeDoux, 2011).

En el tercer artículo científico, *Occurrence and potencial crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network* (sección IV.6), se estudia el potencial de incorporación de microcontaminantes en plantas a través de las aguas de riego de la zona del Parc Agrari del Baix Llobregat (PABL). El PABL es una zona con una amplia tradición horto-frutícola y es el principal abastecedor de frutas y verduras frescas de la ciudad de Barcelona. El PABL, con una superficie cultivable de 2938 ha, es el último enclave de espacio agrícola más cercano a la ciudad de Barcelona. El territorio que lo forma pertenece a 14 municipios con aproximadamente 700 000 habitantes. La irrigación de los campos agrícolas de la zona se lleva a cabo mediante una red de canales de hormigón a cielo abierto. El agua es de origen superficial proveniente de los ríos Llobregat y Anoia. No obstante, debe remarcar que tanto el río Llobregat como el Anoia están fuertemente impactados por efluentes de EDARs locales (p. ej., Igualada, Sant Feliu, DepurBaix, etc.)

De los resultados de este estudio se puede concluir que el agua utilizada para la irrigación de los cultivos del PABL está fuertemente impactada por efluentes de depuradoras locales. Este impacto es innegable

por la presencia de THMs en todos los puntos de muestreo. La diferencia en la concentración de los diferentes microcontaminantes estudiados en los diferentes puntos de muestreo (sección IV.6, Tabla 2) del sistema pone en relieve la importancia de procesos ambientales tales como la sorción, biodegradación, fotodegradación y volatilización en la disipación de microcontaminantes orgánicos. Se documentó también la presencia generalizada (frecuencia de detección del 100% en todos los puntos de muestreo) de otros microcontaminantes orgánicos como diclofenaco, cafeína, ibuprofeno, naproxeno, metil dihidrojasmonato, galaxolida, tonalida y BHT. De los analitos previamente mencionados, únicamente se considera como recalcitrante el diclofenaco (tasa de eliminación entre 5 y 70%) (Clara et al., 2005; Zwiener y Frimmel, 2003), el resto presentan tasas de eliminación entre el 65 y 90% (Carballa et al., 2008; Chen et al., 2007; Petrovic et al., 2003), por lo que la presencia de estos compuestos en las aguas de irrigación se explicaría por un funcionamiento deficiente de las EDARs o por el impacto directo de aguas residuales domésticas crudas.

Es de interés resaltar que en ninguna de las muestras tomadas a lo largo del estudio, la concentración de THMs_{tot} fue superior a $80 \mu\text{g L}^{-1}$, acatando de esta forma tanto la normativa impuesta por la Unión Europea ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) como por la USEPA ($80 \mu\text{g L}^{-1}$) para la regulación de estos contaminantes en agua potable. Además, cabe mencionar que de los 40 analitos seleccionados para este estudio, 6 de éstos pertenecen a la lista de sustancias prioritarias bajo la DMA, y solamente se encontró el cloroformo en los 4 puntos de muestreo. Los niveles en los que se encontró este compuesto son inferiores a $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, norma de calidad ambiental expresada como valor medio anual impuesto por la DMA (2008/105/CE). Adicionalmente, se reportó la presencia de bisfenol A y mecoprop, dos compuestos químicos candidatos para ser admitidos a la lista de sustancias peligrosas. Ambos compuestos se encontraron en todos los puntos de muestreo.

Las plantas cultivadas en zonas contaminadas pueden incorporar y concentrar compuestos químicos presentes en el medio ambiente. De esta forma, la bioacumulación de contaminantes a lo largo de la cadena alimentaria puede ocasionar una biomagnificación de estos compuestos en depredadores y humanos como eslabón final de la cadena trófica (Trapp, 2009). Es por esta razón que se evaluó la posible incorporación de los contaminantes diana en plantas mediante la utilización de dos modelos empíricos descritos en la introducción del presente capítulo. El modelo I propuesto por Travis y Arms (1988) es un modelo ampliamente utilizado para el cálculo de BCF, únicamente aplicable a compuestos neutros. Ahora bien, ya que un gran número de los fármacos incluidos en este estudio son ácidos débiles, su BCF se calculó de acuerdo al modelo II propuesto por Veith (1979) (Trapp, 2009). Ambos modelos pertenecen al Nivel I (sección IV.3.). Mediante la aplicación de estos modelos se obtuvieron los BCF para los analitos diana. Utilizando el K_{oc} y la concentración promedio en el agua de irrigación del analito diana se calculó la concentración individual de los compuestos en el suelo y posteriormente aplicando el BCF se calculó la concentración teórica en tejido vegetal en peso seco (ps). Las concentraciones teóricas de los analitos diana en el tejido vegetal van desde $0,005 \mu\text{g kg}^{-1}$ ps. para el ketoprofeno hasta los $7,68 \mu\text{g kg}^{-1}$ p.s. para el bisfenol A.

Para evaluar la idoneidad de los modelos utilizados en el PABL, dichos modelos se aplicaron a las concentraciones presentes en las aguas de riego de Torroella de Montgrí y a partir de éstas se estimaron las concentraciones en el material vegetal de esta zona. En tal comparación, se observó una desviación de los valores calculados mediante el modelo y aquellos obtenidos experimentalmente; tales desviaciones pueden

atribuirse a una serie de suposiciones hechas en el modelo (p. ej., concentración constante de los analitos en el suelo, homogeneidad del medio, no existe metabolización de los compuestos en la planta, se asume un régimen estacionario, entre otras). No obstante las diferencias entre las concentraciones teóricas y experimentales, ambos valores son del mismo orden de magnitud. En este caso el interés de la aplicación de modelos recae en la simplicidad en la evaluación del potencial incorporación de un contaminante basándose en tres parámetros: su concentración en el agua de riego, su coeficiente de partición octanol-agua y la cantidad de carbono orgánico presente en el suelo.

Se calculó también la exposición humana a estos compuestos en base a su ingesta teórica y se determinó un rango para ésta de entre <1 y 461 ng por persona y día. Estos niveles son más de un orden de magnitud inferior a la dosis terapéutica de cualquiera de los fármacos estudiados. Evidentemente sería de gran interés el cálculo experimental de BCFs para compuestos con un rango amplio de propiedades fisicoquímicas con el objeto de construir un modelo empírico más robusto y confiable, pero debido a la gran cantidad de compuestos químicos que entran al medio ambiente sería virtualmente imposible la determinación experimental de estos parámetros para cada compuesto.

Capítulo V

Incorporación y Translocación de Microcontaminantes Orgánicos en Cultivos Irrigados con Agua Regenerada

“There are people in the world so
hungry, that God cannot appear to them
except in the form of bread.”

Mahatma Gandhi

“Human subtlety will never devise an invention
more beautiful, more simple or more direct
than does Nature, because in her inventions,
nothing is lacking and nothing is superfluous.”

Leonardo da Vinci

V.1. Introducción al capítulo

Es ampliamente aceptado que una gran cantidad de microcontaminantes orgánicos se liberan al medio, bien formando parte del agua regenerada y/o en forma de biosólidos procedentes de fangos de EDAR (sección I.2.). Tal y como se ha mostrado en el capítulo anterior de la Tesis, los microcontaminantes orgánicos presentes en las aguas regeneradas y biosólidos pueden ser incorporados en los cultivos durante el riego o fertilización de los campos agrícolas. El comportamiento ambiental de muchos de estos compuestos incluye la sorción, fijación, movilidad y transporte en el suelo. No obstante, la información existente acerca de su toxicidad, incorporación y translocación en plantas es, en muchas ocasiones deficiente. Dicha incorporación puede o no tener un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. Sin embargo, la incorporación de microcontaminantes en plantas puede ser una ruta de exposición importante de estos compuestos en seres humanos (sección IV.7), así como la incorporación en la cadena trófica (p. ej., herbívoros).

V.2. Factores determinantes en la incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas

En la introducción de la presente Tesis (sección I.3.1.), se han detallado las diferentes vías de incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas, donde se describen las propiedades fisicoquímicas que permiten su incorporación, su posible translocación, así como los probables procesos de transformación sufridos por éstos. No obstante, es igualmente importante conocer las estructuras de la planta (raíz, cutícula y estomas) involucradas en dichas vías de incorporación, así como el sistema de transporte vascular utilizado por los microcontaminantes para su translocación a otros órganos de la planta. Es por esta razón que a continuación se proporciona una breve descripción de los órganos de la planta involucrados en este proceso.

V.2.1. Funcionamiento de la planta y estructuras fisiológicas de relevancia

Raíz

En la figura V.1. se muestra un corte transversal de la raíz. El agua circundante puede atravesar con facilidad la monocapa celular de la epidermis radicular para alcanzar el córtex. El córtex se compone de 5 a 10 capas celulares. Los protoplasmas de las células interconectadas forman lo que se denomina simplasto. En éste, las barreras de permeabilidad son las membranas plasmáticas. Dentro del córtex, en la porción de células diferenciadas adyacente al tejido conductor, se encuentra la endodermis. En la endodermis, la entrada a través de la pared celular se ve bloqueada por la banda de Caspary. Esta banda es una barrera hidrofóbica continua que bloquea la vía apoplástica por la que agua y solutos podrían cruzar la capa endodérmica. De esta manera, la endodermis regula la entrada de solutos y agua desde el córtex hasta el xilema radicular (Nobel, 2009).

El proceso de absorción de microcontaminantes orgánicos a través de la raíz difiere bastante de la penetración de éstos a través de las hojas. La selectividad de la raíz en la absorción de compuestos es muy inferior a la mostrada por las hojas, debido a que la epidermis que recubre a la raíz está desprovista de cutícula.

Los microcontaminantes orgánicos entran por la raíz disueltos en el agua, comportándose como lo harían los nutrientes. Se mueven a través del tejido transportador (xilema) mayoritariamente a través del apoplasto, mientras que una menor cantidad se desplaza a través del simplasto a través de las células y el plasmodesmo que las une (Kvesitadze et al., 2006a; Nobel, 2009).

La raíz absorbe los microcontaminantes orgánicos en dos fases: en la primera estos compuestos se difunden del medio hacia la raíz, y en la segunda fase se acumulan lentamente en el tejido (Korte et al., 2000). La intensidad del proceso de absorción depende de la masa molecular del contaminante, la concentración en la que éste se encuentra en el medio, su polaridad, pH del medio, temperatura, humedad del suelo, entre otros factores (Kristich y Schwarz, 1989; Ugrehelidze et al., 1986).

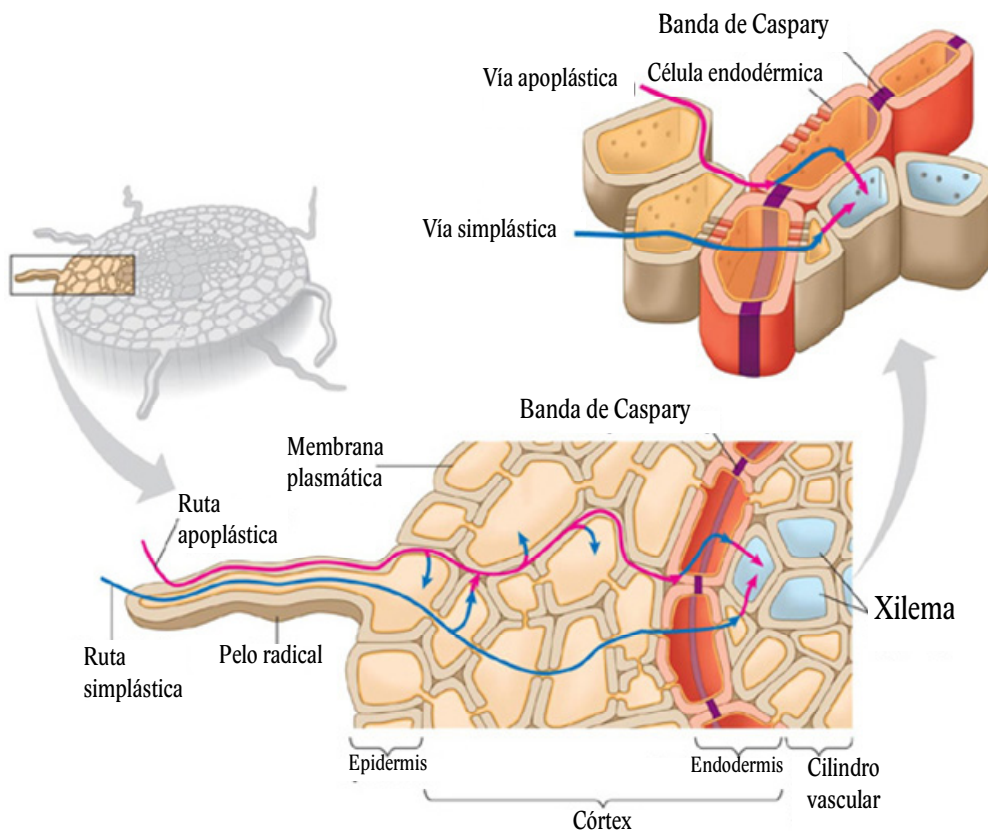


Figura V.1. Estructura de la raíz, donde se muestran las rutas apoplástica y simplástica. Adaptado de Pearson Education, (2008).

La raíz absorbe un amplio espectro de sustancias orgánicas desde compuestos hidrofílicos hasta lipofílicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Fismes et al., 2002). La influencia de la lipofilicidad en el proceso de absorción en la raíz es significativa y bien conocida. Así, las sustancias con una moderada hidrofílicidad ($\log K_{ow}$ 0,5 – 3) se absorben de una forma más efectiva (Briggs et al., 1982).

Es importante remarcar que la masa molecular de una sustancia es el principal factor limitante durante la incorporación de microcontaminantes orgánicos en la raíz (Kvesitadze et al., 2006a). No obstante, la velocidad de difusión del contaminante en la raíz es directamente proporcional a la concentración de éste en el suelo.

Cutícula y estomas

Las hojas de las plantas son órganos especializados en capturar luz y CO₂, ambos juegan un rol crítico en la supervivencia y productividad de la planta. La cutícula, con un grosor entre 1 y 15 µm, cubre todas las superficies aéreas principales protegiendo a la planta de daños por UV y ataques de herbívoros. La cutícula está esencialmente constituida por una capa cerosa en la superficie externa de las paredes celulares de la epidermis (Bargel et al., 2004 y 2006). En ella la cutina se encuentra en mayor proporción sirviendo de soporte para la deposición de ácidos grasos, alcanos y ceras (Figura V.2). La capa de ceras en la cutícula actúa de barrera a la adsorción y penetración de compuestos orgánicos en las hojas. No obstante, el estado de ionización de una sustancia es un factor determinante en la intensidad de su penetración a través de la cutícula de la hoja. Los ácidos débiles se absorben predominantemente en su estado no disociado, ya que en este estado presentan una polaridad inferior que su contraparte ionizada y atraviesan más fácilmente la barrera de ceras de la cutícula (Baur et al., 1974).

La cutícula proporciona un alto grado de resistencia a la difusión de gases, por lo que debe estar perforada para permitir la entrada de CO₂ (Figura V.2). Estas perforaciones denominadas estomas, son poros en la epidermis de entre 30 y 80 µm de diámetro formados por la apertura de dos células guarda (Hetherington y Woodward, 2003). Estos poros se encuentran en la superficie de casi todo el tejido fotosintético. El sistema de estomas funciona como un regulador importante del proceso de penetración de microcontaminantes orgánicos en hojas. Al cambiar el diámetro de apertura del estoma, la planta controla la entrada de compuestos de diferente tamaño molecular (Kvesitadze et al., 2006a).

La apertura o cierre de los estomas depende del grado de hidratación de la hoja, niveles de luz, temperatura ambiental, humedad, CO₂ atmosférico, presencia de ácido abscísico y agua disponible en el suelo (Kvesitadze et al., 2006a). Por lo que los factores anteriormente mencionados son los que controlan la difusión de CO₂ y vapor de agua entre la hoja y la atmósfera. Gases y líquidos pueden introducirse en las hojas a través de los estomas. En el caso de los gases, su permeabilidad depende del grado de apertura de los estomas, mientras que la permeabilidad de los líquidos depende de la humidificación de la superficie de la hoja, la tensión superficial del líquido y morfología de los estomas (Schonher y Bukovac, 1972). Los estomas además permiten la introducción de compuestos orgánicos volátiles asociados a la fase vapor así como nanopartículas (Eichert et al., 2008; Wild et al., 2006).

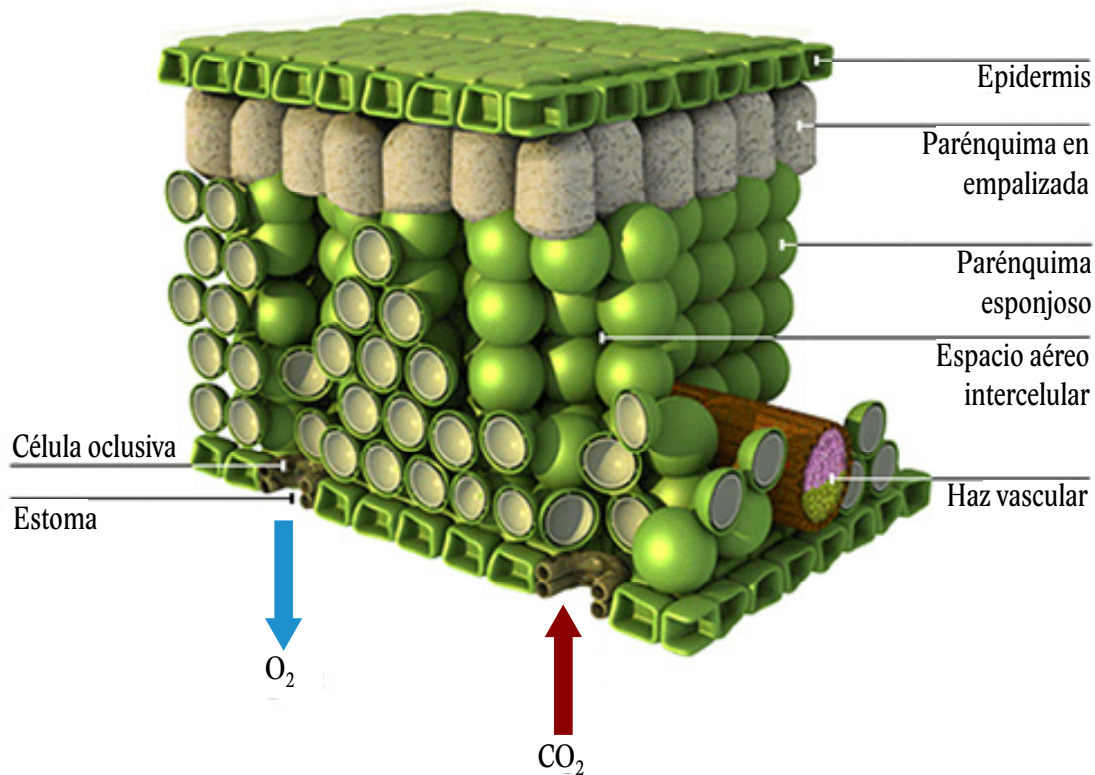


Figura V.2. Estructura de la hoja mostrando sus partes más representativas. Adaptado de Garden Resources, (2010).

Sistema vascular

El sistema vascular de transporte de la planta se encuentra regido por la teoría de cohesión-tensión. Esta teoría tiene en cuenta el movimiento ascendente (contra la fuerza de la gravedad) del agua a través del sistema vascular de las plantas. De manera muy sucinta y de acuerdo a esta teoría, la evapotranspiración en las hojas crea una presión negativa en las células del mesófilo que produce el ascenso del agua desde la raíz hasta las hojas. Esta tensión es debida a la cohesión de las moléculas de agua resultado de la formación de puentes de hidrógeno y a la interacción de estas moléculas con las paredes celulares hidrofílicas del xilema (Dixon y Joly, 1895). A pesar del gran escrutinio sufrido, esta teoría se mantiene aún como la más aceptada en cuanto a la explicación del movimiento del agua en plantas terrestres (Angeles et al., 2004).

El xilema se encuentra formado por elementos conductores denominados traqueidas, células parénquima no conductoras y fibras, mientras que el floema se encuentra formado por elementos cribosos conectados a células acompañantes, además de células parénquima y fibras. Xilema y floema se diferencian del precambio para formar el haz vascular que conecta a todos los elementos de la planta (Nobel, 2009), constituyendo el sistema vascular de la planta. Xilema y floema se encuentran uno al lado del otro en raíz, tallos y hojas (Figura V.3.) (Pittermann, 2010).

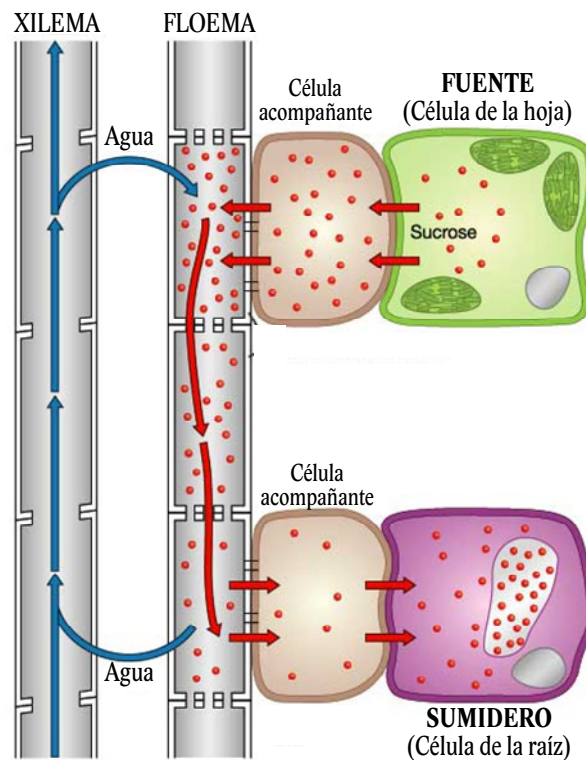


Figura V.3. Sistema vascular de la planta, mostrando el transporte de productos fotosintéticos a través del floema y el transporte de agua a través del xilema. Adaptado de la University of Illinois, (2004).

Una vez el compuesto ha penetrado en hojas o raíz, éste puede translocarse a diferentes órganos de la planta mediante los mismos procesos fisiológicos utilizados para el transporte de nutrientes. Estos procesos son la transpiración, realizada mediante el transporte de agua y sustancias disueltas incorporadas desde la raíz hacia las partes superiores de la planta a través de los tejidos del xilema, y el transporte de asimilados y sustancias disueltas desde las hojas hacia las partes inferiores de la planta utilizando el floema (Kvesitadze et al., 2006a).

A partir de la información anterior y de manera general, se puede deducir que aquellos microcontaminantes orgánicos que penetren en la planta mediante la vía foliar serán transportados mediante el tejido del floema, mientras que aquellos microcontaminantes que ingresen a la planta por la vía radicular se translocarían mediante el tejido del xilema (Kvesitadze et al., 2006). Tal deducción, aunque correcta, debe matizarse, debido a que dependiendo de la permeabilidad del compuesto en cuestión este podría pasar de un tejido conductor a otro (Bromilow et al., 1990).

V.2.2. Efecto “ion trap”

Tal y como se ha descrito en la sección anterior la principal estructura de transporte en la planta es el xilema. Éste se encarga de la movilización de agua y minerales a través del tallo. Los compuestos que entran en la planta vía radicular y posteriormente son transportados por el xilema, deben atravesar una o más membranas celulares. Las membranas celulares contienen proteínas (H^+ -ATPasas) conocidas como “bomba de protones” que regulan el flujo de iones desde el interior al exterior de la célula y viceversa, creando un gradiente electroquímico. La fuerza impulsora del movimiento de iones a través de la membrana cargada, es el potencial químico y eléctrico. Las H^+ -ATPasas ayudan a mantener un pH bajo en la región de la pared celular bombeando H^+ hacia el exterior de la célula a expensas del gasto de ATP de acuerdo con la siguiente reacción:



El ambiente químico dentro de la célula varía de la solución externa que la rodea (apoplasto), por lo que el grado de disociación de un compuesto puede incrementarse o disminuir de acuerdo al compartimiento celular en el que se encuentre. El pH típico para el citoplasma celular y el floema se encuentra alrededor de 7,5 y 8-8,5, respectivamente, mientras que para la vacuola y espacio extracelular el pH tiene un valor de 5,5 (Trapp y McFarlane, 1995). La forma neutra de la molécula penetra la membrana celular (X-COOH), no así su forma aniónica. Una vez que la molécula penetra al citoplasma, compartimiento “alcalino” de la célula, la molécula se disocia a su base conjugada (X – COO⁻). La base conjugada es aniónica y muy polar, por lo que queda atrapada dentro de la célula al no poder atravesar la membrana de nuevo (Figura. V.4). A este fenómeno se le denomina efecto *ion trap*.

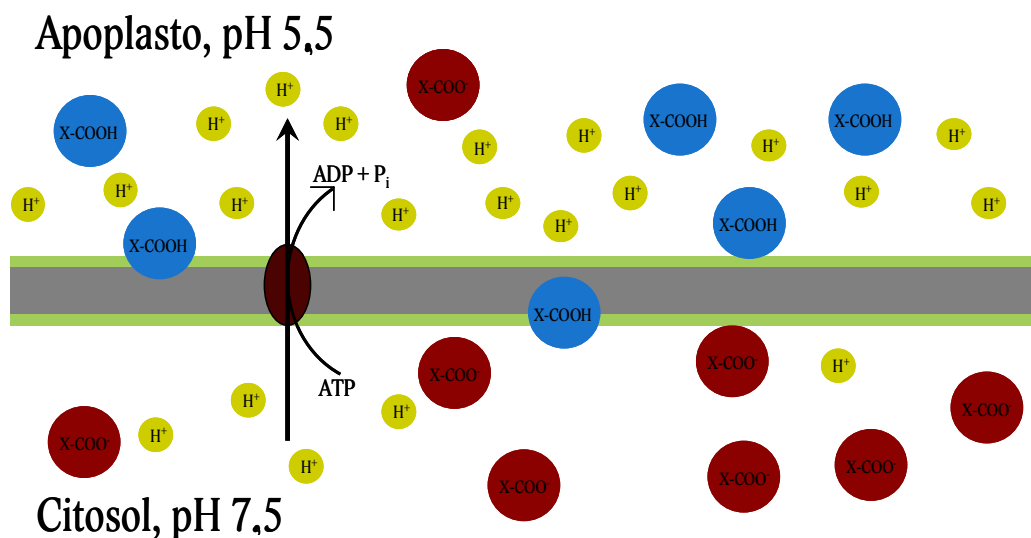


Figura V.4. Esquema del efecto “ion trap” producto de la bomba de protones presente en la membrana celular, responsable de la acumulación de ácidos débiles al interior de la célula.

Algunos de los factores con mayor repercusión sobre el efecto “*ion trap*” se enlistan a continuación:

- permeabilidad de la membrana a las formas neutra y aniónica del compuesto,
- gradiente de pH y
- potencial de la membrana.

V.3. Contextualización y estructura del capítulo

En el presente capítulo se presentan resultados correspondientes a dos estudios dentro del marco del proyecto de investigación “*Prevenió del risc sanitari derivat de l’aprofitament d’aigües regenerades com a aigües de reg agrícola*” financiado por la Agència Catalana de Seguretat Alimentària. Dichos resultados han tenido como fruto, dos artículos científicos: *Uptake of organic emergent contaminants in spath and lettuce: an in vitro experiment* y *Foliar uptake of emerging and priority contaminants. An in vitro evidence*.

Los resultados que se describen y discuten son los siguientes:

- Evaluación de la incorporación vía radicular (Artículo 4) y foliar (Artículo 5) de microcontaminantes orgánicos presentes en aguas de riego agrícola.
- Evaluación de la trascendencia de las propiedades fisicoquímicas de los microcontaminantes orgánicos durante los procesos de incorporación, y destino final en plantas (Artículos 4 y 5).

V.4. Artículo científico 4

Uptake of Organic Emergent Contaminants in Spath and Lettuce: An in Vitro Experiment.

Calderón-Preciado, D., Renault, Q., Matamoros, V., Cañameras, N. and Bayona, J.M. (2012). Journal of Agricultural and Food Chemistry. DOI: 10.1021/jf2046224

Uptake of Organic Emergent Contaminants in Spath and Lettuce: An In Vitro Experiment

Diana Calderón-Preciado,[†] Quentin Renault,[†] Víctor Matamoros,[‡] Núria Cañameras,[§] and Josep Maria Bayona^{*,†}

[†]Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research, Spanish Council for Scientific Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona 18-26, E-08034, Barcelona, Spain

[‡]Department of Chemistry, University of Girona, Campus Montilivi, E-17071, Girona, Catalonia, Spain

[§]Department of Agri-food Engineering and Biotechnology, Polytechnic University of Catalonia, E-08860 Castelldefels, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Although a myriad of organic microcontaminants may occur in irrigation waters, little attention has been paid to their incorporation in crops. In this work, a systematic approach to assess the final fate of both ionizable and neutral organic contaminants taken up by plants is described. In vitro uptake of triclosan (TCS), hydrocinnamic acid (HCA), tonalide (TON), ibuprofen (IBF), naproxen (NPX), and clofibrac acid (CFA) were studied in lettuce (*Lactuca sativa* L) and spath (*Spathiphyllum* spp.) as model plants. After 30 days incubation, analyte depletion from the culture medium was 85–99% (lettuce) and 51–81% (spath). HCA, NPX, and CFA exhibited the highest depletion rate in both plant species. Lettuce plant tissue analysis revealed an accumulation of all compounds except for HCA. These compounds reached a peak in tissue concentration followed by a sudden drop, probably due to the plant detoxification system and analyte depletion from the culture medium. Kinetic characterization of the uptake and detoxification processes was fitted to a pseudo-first-order rate. Compounds with a carboxylic group in their structure exhibited higher uptake rates, possibly due to the contribution of an ion trap effect. Molecular weight and log K_{ow} played a direct role in uptake in lettuce, as proven by the significant correlation of both properties to depletion and by the correlation of molecular weight to kinetic uptake rates.

KEYWORDS: Plant uptake, emerging organic contaminants, K_{ow} , molecular weight, plant tissue

■ INTRODUCTION

Hydrological cycles and freshwater resources are constrained by global changes, for example, increases in water demand, increases in drought frequency, or limited renewable freshwater resources that are moreover threatened by pollution.^{1,2} Consequently, the use of reclaimed water for crop irrigation is viewed as an excellent sustainable water source.³ Indeed, since agricultural activities consume approximately 70% of all freshwater resources, and since only 1% of the bulk water used is reclaimed water, water reuse could have a greater impact in this sector.

However, wastewater treatment plant (WWTP) effluents are one of the main sources of emerging organic contaminants in the aquatic environment.^{4–6} In fact, they are either not removed at all or only partially removed in wastewater reclamation. In addition to reclaimed water, treated sewage sludge is also commonly used worldwide in agriculture, and for the latter, land application is largely the most used method of disposal.⁷ Following irrigation with reclaimed water or treated sewage sludge disposal, crops are exposed to a myriad of pharmaceuticals and other organic microcontaminants.⁸ These compounds can either be mobilized and enter into the hydrological cycle, and then they can become adsorbed on the organic matter of the soil, or those that are recalcitrant enough can be taken up by plants and possibly enter into the food chain.^{9–11} These contaminants can exert chronic toxic effects even at very low concentrations (nanograms per liter)

because of their chemical properties, such as high membrane solubility, persistence, and bioactivity.¹²

Xenobiotics are expected to enter the plant through passive diffusion unless the compound exhibits a hormone-like structure, in which case active transport may be possible.¹³ The most relevant uptake pathways are (i) root uptake,^{14–17} (ii) vapor uptake from the surrounding atmosphere,^{18,19} and (iii) contaminant diffusion through deposition on plant surfaces.²⁰ Once the xenobiotic has entered the plant, a posterior translocation, driven by the transpiration process, can take place. The extent of distribution within the plant will depend on the compound's physicochemical properties.²¹

One of the most useful chemical descriptors of organic contaminants for plant uptake is their K_{ow} . Uptake is greatest for compounds with a log K_{ow} in the range of 1–4.²² In this regard, Briggs et al.²³ predicted the concentration of nonionic compounds in a plant transpiration stream from the concentration in soil solution and log K_{ow} . The maximum transpiration stream concentration factor was obtained for chemicals with a log K_{ow} of 1.8–3.1. Compounds with a log K_{ow} within the optimum range are thought to be hydrophobic enough to move through the lipid bilayer of membranes yet

Received: November 11, 2011

Revised: January 30, 2012

Accepted: January 31, 2012

Published: January 31, 2012

water-soluble enough to travel into the cell fluids.²⁴ If the compound is too hydrophilic, it will be unable to cross hydrophobic lipid membranes, while high lipophilicity will impair its efficiency to cross the endodermis, possibly due to adsorption on the lipid material.²⁵ In addition, if a compound dissociates in the physiologically relevant pH range, this will influence both uptake velocity and level.²⁶

Although there are several studies involving the plant uptake of neutral microcontaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs),^{27–29} some pharmaceuticals,^{12,30,31} and flame retardants,³² little attention has been paid to the plant uptake of ionizable molecules. For example, Calderón-Preciado et al.¹¹ reported in a field study the uptake of ibuprofen and naproxen in *Medicago sativa* and *Malus domestica*.

Plants have developed multiple mechanisms to respond to alterations in their environment.³³ Continuous exposure to potentially toxic chemicals is one of these alterations. Such organic compounds cannot be exploited for nutritional purposes or as a source of energy, yet they are still taken up by plants.³⁴ Plants have developed detoxification systems for xenobiotic elimination, since catabolization is not possible. The cellular detoxification systems by which plants dispose of xenobiotics have been termed “green liver”³⁵ and comprise a network of enzymatic reactions. In addition to the intrinsic metabolic detoxification systems of plants, the presence of endophytic bacteria may alter xenobiotic degradation. Internal plant tissues may be colonized by these bacteria without showing external signs of infection or negative effects³⁶

In this paper, an in vitro study was designed to assess the uptake of selected emerging organic contaminants, commonly identified in WWTP effluents, by lettuce *Lactuca sativa*, a commercial commodity, and spath, *Spathiphyllum* sp., an ornamental plant. The six compounds studied were four pharmaceuticals (clofibric acid, CFA; naproxen, NPX; ibuprofen, IBF; and triclosan, TCS) and two fragrances (tonalide, TON; and hydrocinnamic acid, HCA). The target analytes were selected on the basis of their high occurrence and abundance in reclaimed waters^{6,11} and due to their wide range of physical and key chemical properties in the uptake and translocation of xenobiotics in plants (e.g., log K_{ow} , Henry's law constant, dissociation constant, and molecular weight). Spath and lettuce plants were chosen as models because they have different growth rates and can be grown in a sterile medium spiked with emerging organic contaminants. Time series of both growing medium and vegetation were analyzed, along with suitable controls to calculate the uptake and depletion kinetics. Finally, the experimental kinetic constants were correlated with physicochemical properties of the selected contaminants.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Pharmaceuticals and fragrances [ibuprofen (IBF), clofibric acid (CFA), tonalide (TON), and hydrocinnamic acid (HCA)] were purchased from Sigma–Aldrich (Bornem, Belgium). Trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) and triclosan (TCS) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland), and naproxen (NPX) was bought from Riedel–de Haën (Seelze, Germany). The remaining reagents used were analytical-grade (97–99% purity) and their detailed information is provided in Supporting Information.

Stock solutions of each individual compound were prepared in methanol or ethyl acetate at a concentration of 5000 mg·L⁻¹. All prepared standards were stored in the darkness at -20 °C

and used to prepare the single and mixed working standards solutions.

Experimental Setup. The experiment consisted of four treatments (Figure 1): (A) plantlets grown in the presence of

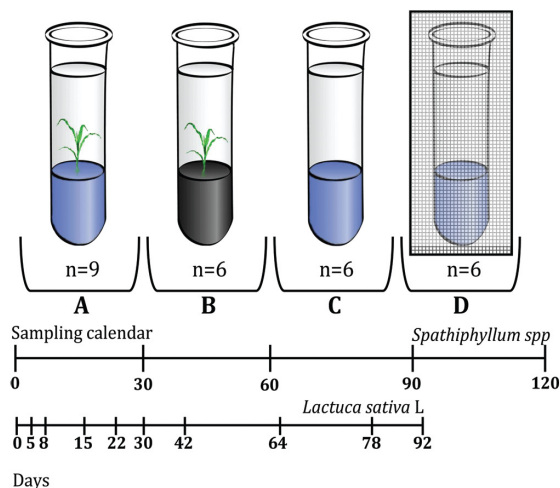


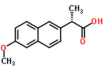


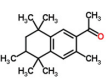


Figure 1. Experimental treatments to determine uptake behavior of target analytes through time: (A) plantlets grown in presence of target analytes, (B) plantlets grown in absence of target analytes, (C) spiked culture medium without plantlets, and (D) spiked culture medium without plantlets in darkness.

target analytes (CFA, NPX, IBF, TCS, HCA, and TON; Table 1); (B) plantlets grown in the absence of target analytes; (C) spiked culture medium without plantlets; and (D) spiked culture medium without plantlets in darkness. All treatments were incubated under the same conditions (23 °C under fluorescent lamps, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Treatments C and D were employed for control purposes. Both lettuce and spath samples were randomly sampled at the time intervals shown in Figure 1. For treatment A, nine individuals for lettuce and four for spath were taken at each sampling point (90 and 20 individuals total, respectively), while for treatments B–D, six individuals for lettuce and four for spath were taken (180 and 60 individuals total, respectively). Target analytes were spiked into the corresponding treatments to obtain a final concentration of 100 ng·mL⁻¹. Although this concentration was higher than those found in reclaimed waters (0.1–1 ng·mL⁻¹), it was chosen to ensure quantitation of the target analytes in plant material.

Germination and Plant Culture. Lettuce seeds were obtained from Utah State Crop Physiology Laboratory (Logan, UT). Seeds were disinfected in a flask containing a 2% chlorine aqueous solution and 50 μL of Tween 20. Seeds were stirred in the solution with a magnetic bar for 20 min and then washed three times with sterile distilled water. To initiate germination, seeds were placed in Petri dishes containing damp sterile filter paper and kept at 23 °C. The *Spathiphyllum* material used in the uptake assays was obtained through micropropagation from lateral buds. Plantlets were transferred to test tubes containing Murashige and Skoog culture medium, at a final pH of 5.5.³⁷ The test tubes appropriately identified with the corresponding treatment were placed in a growth chamber under the following conditions: 16 h light/8 h dark, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at 23 °C.

Table 1. Physicochemical Properties of Target Analytes

Analyte	Structure	MW	log K_{ow}	pK _a	Solubility, mg L ⁻¹	Henry Law constant*
Clofibric acid (CFA), 2-(4-Chlorophenoxy)-2-methylpropanoic acid		214	2.84	2.84	582.5	8.96 E-7
Hydrocinnamic acid (HCA), 3-phenylpropanoic acid		150	1.84	4.66	5046	2.40 E-6
Naproxen (NPX), (2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid		230	3.18	4.2	144.9	1.39 E-8
Ibuprofen (IBF), 2-(4-(2-methylpropyl)phenyl)propanoic acid		206	3.79	4.31	41.05	6.20 E-6
Triclosan (TCS), 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol		289	4.66	7.9	4.621	2.04 E-7
Tonalide (TON), 1-(3, 5, 5, 6, 8, 8-hexamethyl-6, 7-dihydronaphthalen-2-yl)ethanone		258	5.9	NA	0.239	1.73 E-3

*Dimensionless. NA: Not Applicable.

Extraction and Determination of Target Analytes.

Culture Medium. The extraction of target analytes from the culture medium was carried out as follows. Test tubes containing the culture medium were heated in a water bath at 80 °C for 4 min and then vortexed until the medium was homogeneous. Afterward, 25 μ L of HCl, surrogate standards (fenoprop and 2,2'-dinitrobiphenyl), and 2 g of NaCl were added to the test tube. The medium was thoroughly mixed. Ethyl acetate (10 mL) was then added, and the sample was mixed again. Test tubes were frozen at -20 °C before the organic phase was collected. This procedure was repeated twice. The raw extracts were evaporated to 2 mL under a nitrogen stream and percolated through a Na₂SO₄ column. Next, the extract was evaporated to approximately 20 μ L under a gentle nitrogen stream, and 25 μ L of triphenylamine solution (9.9 μ g·mL⁻¹) were added as an internal standard. The vial was reconstituted to 300 μ L with ethyl acetate.

Methylation of the acidic carboxyl group in all samples was performed in the GC injector port at 270 °C by adding 10 μ L of TMSH solution (0.25 mol·L⁻¹ in methanol) to a 50 μ L sample aliquot before injection. Derivatized samples were injected (1 μ L volume) onto a Trace GC-MS (Thermo Scientific) in the electron impact mode (70 eV ionization energy) fitted with a 20 m \times 0.18 mm i.d. \times 0.18 μ m film thickness Sapiens SMS (Teknokroma, Barcelona, Spain). Helium was used as carrier gas (99.9995% purity) at a constant flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. The oven temperature was held at 65 °C for 1 min. It was then programmed at 15 °C·min⁻¹ to 120 °C, at 6 °C·min⁻¹ to 160 °C, at 9 °C·min⁻¹ to 180 °C, at 6 °C·min⁻¹ to 220 °C, and finally at 8 °C·min⁻¹ to 315 °C, with the final temperature held for 7 min. Compound individual recoveries were carried out in a triplicate at a spiking level of

100 ng·L⁻¹, and ranged from 82% (NPX) to 117% (IBF). Recoveries for fenoprop and 2,2'-dinitrobiphenyl were 87% and 98%, respectively.

Plant Tissue. The fresh lettuce biomass was extracted as previously reported,³⁸ details are provided in Supporting Information. Sample analysis was carried out by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Compound individual recoveries were carried out in a triplicate at a spiking level of 100 ng·L⁻¹, and ranged from 50% (CFA) to 106% (TON). Repeatability ranged from 1% (CFA) to 12% (TON). Limits of detection and quantification ranged from 0.001 to 4 μ g·kg⁻¹ fresh weight (FW).

Statistical Data Treatment. All statistical analyses were undertaken with the SPSS 15 package (Chicago, IL). Data were checked for normality (Kolmogorov–Smirnov test), followed by one-way analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni correction method in the case of multiple comparisons, and Pearson correlation to establish relationships between properties.

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of Physiological Plant Parameters. Phytotoxicity, such as bleaching or necrotic spots, did not appear on the lettuce or spath, meaning that both plant species were tolerant to the target analytes at the studied concentration and compound combination.

Fresh weight and length of whole spath and lettuce plants were recorded prior to tissue processing so as to assess growth evolution and recognize possible phytohormonal effects on the plants. Spath appearance was markedly different between treatments. Both length and mass differences in the tissue were found to be statistically significant ($\alpha < 0.05$) by the Bonferroni

correction method (Figure 2). For both parameters, spath grown in the presence of target analytes displayed significant

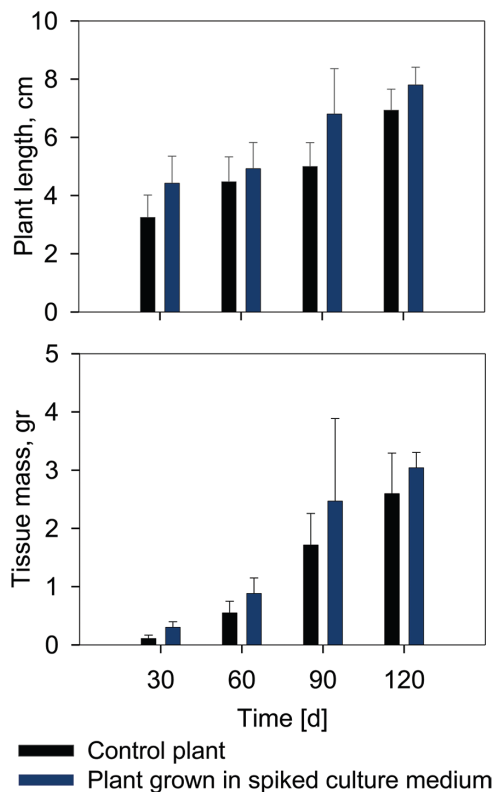


Figure 2. Physiological differences between treatments through time: (top) spath tissue mass (FW); (bottom) length in whole plants. Differences between treatments at all sampling times were significant ($\alpha < 0.05$).

differences compared to the control. The largest differences, 27% in tissue length and 64% in tissue mass, were found at 30 days. These differences declined with time and by the end of the experiment, at 120 days, stood at 11% and 15% respectively.

This was not the case for lettuce, for which no statistically significant differences were found between treatments with regard to either tissue mass or length (not shown). Differences in size between treatments may have been masked by the apical dominance displayed by the lettuce plantlets, whereby predominant growth of the main shoot suppresses the outgrowth of auxiliary buds.³⁹

Analyte Depletion from Culture Medium. Figure 3 shows target analyte behavior in the culture medium throughout the experiment for lettuce. Light control analysis showed a marked decline in concentration for TCS, TON and NPX, whose total respective masses had degraded to 49%, 51%, and 70% of the original content at 64 days. On the other hand, HCA, CFA, and IBF remained almost constant, with total mass decaying 4%, 7%, and 14%, respectively. All treatment tubes were sterile and therefore devoid of microorganism activity. Hence, the decline in analyte mass was solely attributed to photodegradation, as no significant changes in compound concentration were found in the control samples kept in darkness. This behavior was not unexpected, since photolysis of all three compounds has already been documented.^{40–42}

Target analyte concentration in the culture medium in the presence of plants is shown for both spath (Figure S1.1 in Supporting Information) and lettuce (Figure 3). For spath, analyte mass in the medium was depleted by 75–80% at 60 days and 95–98% at 90 days, while in lettuce the decline in analyte mass reached 80–95% loss in 22 days and then became asymptotic until the end of the experiment. HCA was the fastest depleted analyte in both plant species, with 99% loss in 30 days. These results support previous reports claiming that, in addition to certain physicochemical properties, uptake also heavily depends on the plant species.^{14,43} Kinetic behavior of the target analytes was obtained from the concentration data over time. All target analytes in both plant species conformed well to pseudo-first-order kinetic behavior. Thus, rate constants for photolysis and depletion were calculated from experimental data (Table 2). It should be stressed that although photo-

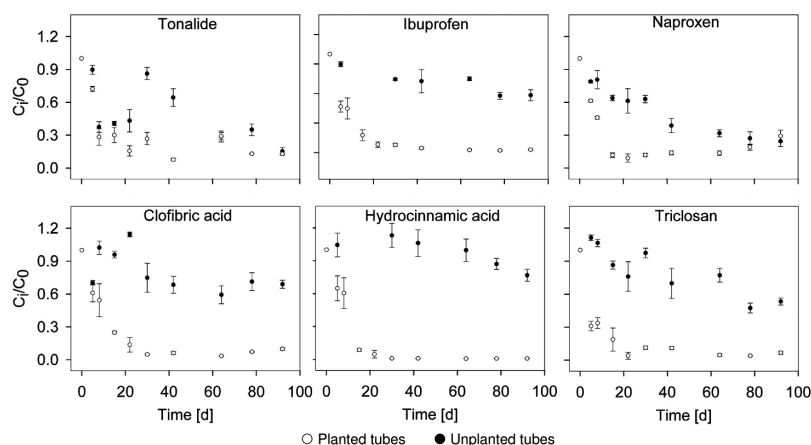


Figure 3. Normalized concentration of target analytes in culture medium through time for lettuce. For unplanted and planted tubes, $n = 6$ and 9 , respectively. Error bars correspond to ± 1 standard deviation.

Table 2. Calculated Kinetic Constant Rates for Target Analytes

analyte	spath		lettuce		
	$k_{\text{photo}}, \text{d}^{-1} (R^2)$	$k_{\text{depletion}}, \text{d}^{-1} (R^2)$	$k_{\text{depletion}}, \text{d}^{-1} (R^2)$	$k_{\text{uptake}}, \text{d}^{-1} (R^2)$	$k_{\text{metabolism}}, \text{d}^{-1} (R^2)$
clofibric acid (CFA)	0.003 (0.76)	0.0409 (0.95)	0.103 (0.95)	0.184 (0.98)	0.106 (0.99)
hydrocinnamic acid (HCA)	0.004 (0.85)	0.0432 (0.94)	0.179 (0.97)	-	-
naproxen (NPX)	0.010 (0.96)	0.0253 (0.89)	0.117 (0.99)	0.101 (0.97)	0.208 (0.99)
ibuprofen (IBF)	0.002 (0.42)	0.0388 (0.97)	0.064 (0.87)	0.236 (0.99)	0.089 (0.93)
triclosan (TCS)	0.009 (0.44)	0.0315 (0.91)	0.081 (0.70)	0.077 (0.78)	0.154 (0.99)
tonalide (TON)	0.020 (0.93)	0.0224 (0.88)	0.050 (0.92)	0.087 (0.99)	0.125 (0.81)

degradation proved to be very effective in reducing the concentrations of TCS, TON, and NPX over the 64 days of the experiment, it had a smaller impact at 22 days, by which sampling time the analytes had been almost completely depleted from the culture medium, mainly due to lettuce uptake. The loss of analyte mass at 22 days was 7% for TON, 15% for TCS, and 27% for NPX. For the rest of the analytes, mass loss ranged from 1% to 3%. However, photodegradation would play a bigger role in the case of spath, which has the slower uptake rate of the two model plants.

The highest kinetic uptake rates in both plant species were found for HCA, as expected in light of its faster depletion. In spath, it was followed by CFA, while in lettuce it was followed by NPX. Interestingly, these three compounds may exert phytohormonal activity on the model plants: HCA is a documented growth inhibitor,⁴⁴ CFA is a putative auxin inhibitor,⁴⁵ and NPX is an inhibitor of abscisic acid biosynthesis.⁴⁶ This could mean that these compounds enter the plant not merely by diffusion but also through active transport. In addition, they exhibit $\log K_{ow}$ values within the optimum uptake range, that is, 1.8–3.1. However, since all compounds except TON have ionizable carboxylic or hydroxyl groups, D_{ow} was applied. D_{ow} is K_{ow} corrected for the effect of ionized groups on K_{ow} -dependent distribution. This is related to the acid–base coefficient (pK_a) of the compound and the medium pH. It can be calculated from the following equation: $D_{ow} = K_{ow}(1 + 10^{pH-pK_a})^{-1}$.⁴⁷ A significant correlation between compound depletion from the medium and D_{ow} was expected but was not found. Although the medium pH remained constant at 5.5 throughout the experiment period, it has been reported that plants exude organic and inorganic acids through the roots, which modifies the medium pH near the root surface (1–2 mm) over time.⁴³ These differences in the medium pH lead to inaccurate D_{ow} calculations since the ionized and neutral forms of the contaminants may occur at the same time in the medium and in the first millimeters surrounding the root surface, respectively. The latter behavior could explain the lack of correlation between D_{ow} and analyte depletion from the culture medium for both plants.

K_{ow} was used for correlation analysis, along with compound molecular weight, because the use of D_{ow} was deemed inappropriate due to its dependence on medium pH. Statistically significant negative correlations ($p < 0.05$) were found between rate constants of depletion and molecular weight and $\log K_{ow}$, with Pearson coefficients of 0.69 and 0.90, respectively, in lettuce (Figure 4). However, spath depletion constants correlated only with $\log K_{ow}$. The correlation between $k_{\text{depletion}}$ and molecular weight translates into a higher potential uptake for compounds with lower molecular weights, which is in accordance with previous studies,⁴⁸ while the second correlation taking place between $k_{\text{depletion}}$ and $\log K_{ow}$ shows

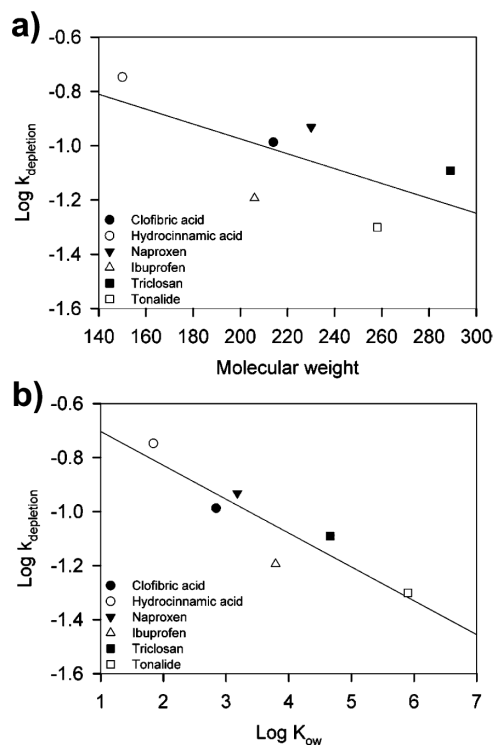


Figure 4. Statistical correlation ($p < 0.05$) between target analyte depletion from culture medium in lettuce: (a) molecular weight ($R = 0.69$) and (b) $\log K_{ow}$ ($R = 0.90$) for the studied compounds.

higher uptake potential for those compounds within the range of optimum $\log K_{ow}$ values.

It is important to note that, as stated before, root exudates contain released ions (i.e., H^+), inorganic and organic acids, proteins, and enzymes but mainly consist of carbon-based compounds. Enzymes, namely peroxidases and hydrolases,⁴⁹ could act on xenobiotics and lead to their degradation. Compound degradation due to exudates could be especially important in the final stages of the experiment, since exudation rates vary according to the plant developmental stage. Root exudation is positively correlated with root growth, which translates into a higher secretion of exudates in actively growing root systems.⁵⁰

Uptake Kinetics in Plant Tissue. Since lettuce uptake of the target analytes was clearly faster than spath uptake, and lettuce is a food commodity of commercial value, further analyses were conducted on lettuce. Analyses were performed on tissue samples taken at 5, 8, 15, 22, and 64 days. All target

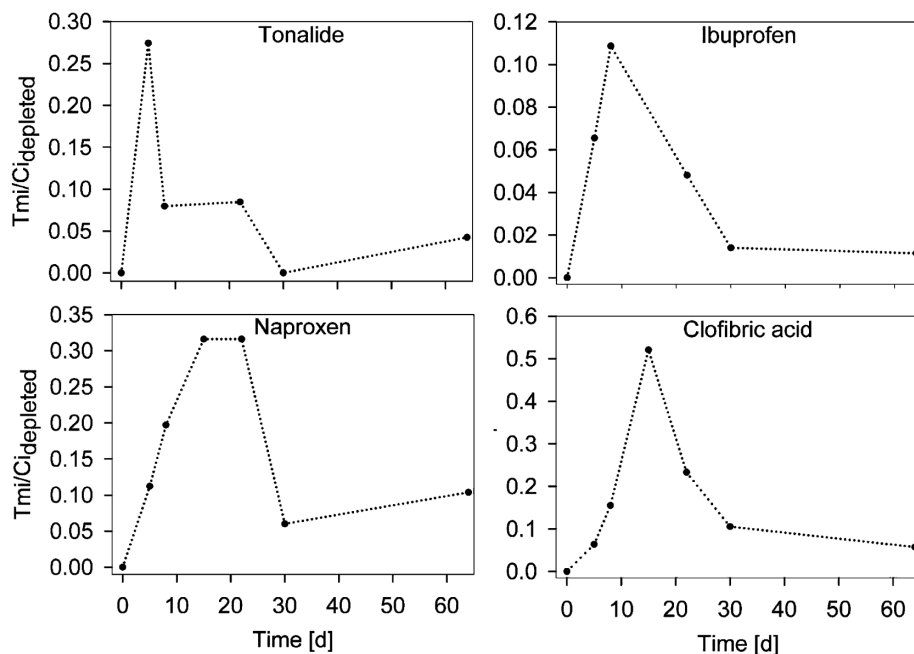


Figure 5. Normalized concentration of target analytes in lettuce tissue (whole plant), grown in spiked medium, through time. Each point in the graph corresponds to the quotient between the analysis of a tissue pool made of three plants (Tmi) and the depleted concentration from the medium culture (Cidepleted).

compounds except HCA were detected in their parent form at all sampling times. As HCA is a growth inhibitor, it may have a faster metabolization pathway, which would impair its free-form detection.

The determined levels of target analytes in the tissue are due to both plant translocation and lipophilic absorption in cell membranes. However, lipophilic absorption would be important only for TON, as its effect would be negligible for weak acids, which are predominantly in their ionic forms at the physiological pH range, 5.5–8.²⁶

A maximum analyte concentration was observed in all cases from 15 to 22 days. Following this maximum, a sudden drop in the free-form compound concentration in tissue was detected. These results suggest the existence of a detoxification system for these compounds in lettuce. This behavior has already been reported in other studies involving acetaminophen uptake by Indian mustard¹² and phenanthrene uptake by ryegrass.⁵¹

The kinetic behavior of target analytes was obtained from plantlet tissue concentration data over time (Figure 5). The first plot segment, representing analyte incorporation into the tissue, was used to calculate the relative uptake rate. It should be noted that this segment also includes the detoxification rate, which was lower than the uptake rate at this stage of the experiment. Additionally, based on the second plot segment, the plant detoxification system was used to obtain the respective metabolic rate constant. Since the analytes had been almost completely depleted from the culture medium by this stage of the experiment, uptake was deemed negligible.

All target analytes for both detoxification and uptake behavior closely followed pseudo-first-order kinetics ($R^2 > 0.81$). Accordingly, rate constants for relative uptake and plant detoxification were obtained and are shown in Table 2.

Interestingly, with regard to relative uptake rate constants, compounds whose structure includes a carboxylic group exhibited higher uptake rates. These compounds, which are weak acids with pK_a between 2.84 and 4.66, were in their neutral form because the culture medium, as noted above, should have a lower pH due to plant exudates. This facilitates their uptake by roots, which in turn could explain the higher uptake rates for these compounds. In addition, their translocation could be supported by an ion trap effect,⁵² which depends on the chemical pK_a and $\log K_{ow}$ and the pH of the solution, cytoplasm, vacuole, and apoplast of the cell, as well as the permeability ratio between neutral and ionic molecules.²⁶ Nonionic acid can pass through the membrane, dissociate to the anion in the plant compartment with higher pH, the apoplast (pH \sim 5.5), and then accumulate in the phloem (pH \sim 8–8.5) as a result of ion trapping in this compartment.

Statistically significant negative correlations ($p < 0.05$) were found to exist between rate constants of uptake and molecular weight, $R = 0.89$. As stated before, this correlation translates into a higher uptake potential for compounds with lower molecular weights. Neither $\log K_{ow}$ nor $\log D_{ow}$ correlated significantly with uptake rate constants. Both molecular weight and hydrophilicity/hydrophobicity are properties related to diffusion and thus passive transport. Perhaps the lack of correlation with $\log K_{ow}$ and $\log D_{ow}$ suggests that these compounds may enter the plant by active transport, which would not be unexpected since these compounds exhibit both hormonelike structures and effects. For instance, the hormone-like structure 2,4-D, a phenoxy acid compound like CFA, is known to be taken up by active transport through influx carriers.⁵³ In addition, phloem mobility is optimal for compounds of intermediate hydrophobicity ($\log K_{ow}$ 1–3)

and weak acidity (pK_a 3–6).⁵⁴ Those conditions are fulfilled by CFA and NPX (IBF has a slightly higher $\log K_{ow}$), which would further enhance their uptake and translocation.

As for detoxification rate constants, the highest rate was displayed by NPX, while the lowest was displayed by CFA. Neither $\log K_{ow}$ nor $\log D_{ow}$ nor molecular weight correlated significantly with detoxification constant rates. No trend was apparent regarding the magnitudes of the constant rate of detoxification for the studied analytes.

However, all the compounds in this study except for TON are thought to be detoxified by glycosyltransferases, since these enzymes act on -OH, -NH₂, -SH, and -COOH functional groups in molecules. In contrast, tonalide could undergo glutathione conjugation, catalyzed by glutathione S-transferases, since the presence of conjugated double bonds or halogen functions triggers these enzymes.⁵⁵ It is also worth mentioning that these compounds are functionalized with -COOH and -OH groups suitable for their direct entrance at stage II,³⁴ which would increase their displayed detoxification rate constants.

In addition, the rates of chemical transformation and the types of metabolites formed will also depend strongly on the plant species.³⁴ It is thus necessary to examine the conjugates formed by the plant detoxification system more closely. For instance, glucose conjugation is a frequent inactivation pathway in plants that yields glycosylate compounds that may be better absorbed and more bioavailable through the food chains than their aglycon counterparts.¹⁴ Although in this study we did not determine metabolites or conjugates, the elucidation of xenobiotic metabolization pathways and conjugate formation could be undertaken with the use of isotopically labeled standards, which could allow the characterization of the xenobiotic behavior upon entrance to the plant. Study of conjugates is important, as these compounds could be further hydrolyzed in animal digestive tracts, rendering possibly toxic molecules.

The plant uptake and fate of neutral compounds have been frequently addressed. However, this is not the case with ionic compounds, for which numerous uncertainties remain. This study offers insight into plant uptake of both ionic and neutral organic contaminants via root in commercially relevant plant species. However, care should be taken in extrapolating the results obtained in this study since plants grown *in vitro* are mixotropic, meaning they are not fully dependent on photosynthesis, because of the low light intensity in which they develop, and carbohydrate content of the medium.⁵⁶ Nevertheless, since plant root is fully functional, the compound uptake behavior under these controlled conditions is a valid first step in understanding this complex process. The study of ionic compounds is particularly meaningful, because in a real environment, weak electrolytes have high accumulation and translocation potential due to their low lipophilic sorption to the soil matrix. This could translate to high bioavailability with simultaneous high accumulation due to the ion trap effect.⁵⁷

■ ASSOCIATED CONTENT

5 Supporting Information

Additional text with details of reagents and plant tissue analysis; one table listing GC-MS/MS product ion information; and one figure showing behavior of target analytes in the presence of spath. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone +34 934006119, e-mail jbtqam@cid.csic.es.

Funding

This research was funded by the Catalan Food Safety Agency (ACSA) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2011-24844).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

D.C.-P. acknowledges a predoctoral fellowship awarded by the Mexican National Council on Science and Technology (CONACYT). V.M. acknowledges a Juan de la Cierva postdoctoral fellowship awarded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN).

■ ABBREVIATIONS USED

CFA, clofibric acid; HCA, hydrocinnamic acid; NPX, naproxen; TCS, triclosan; TON, tonalide

■ REFERENCES

- (1) Jiménez, B.; Asano, T. In *Water Reuse. An international survey of current practice issues & needs*, 1st ed.; IWA Publishing: London, 2008.
- (2) Oki, T.; Kanae, S. Global hydrological cycles and world water resources. *Science* **2006**, *313*, 1068–1072.
- (3) Chen, P. H.; Leung, K. C.; Wang, J. T. Investigation of a ponding irrigation system to recycle agricultural wastewater. *Environ. Int.* **2000**, *26*, 63–68.
- (4) González Alonso, S.; Catalá, M.; Maroto, R. R.; Gil, J. L. R.; de Miguel, Á. G.; Valcárcel, Y. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ. Int.* **2010**, *36*, 195–201.
- (5) Matamoros, V.; Garcia, J.; Bayona, J. M. Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Res.* **2008**, *42*, 653–660.
- (6) Onesios, K.; Yu, J.; Bouwer, E. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation* **2009**, *20*, 441–466.
- (7) Wu, C.; Spongberg, A. L.; Witter, J. D.; Fang, M.; Czajkowski, K. P. Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 6157–6161.
- (8) Kinney, C. A.; Furlong, E. T.; Werner, S. L.; Cahill, J. D. Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*, 317–326.
- (9) Huang, A. T.; Batterman, S. Sorption of trihalomethanes in foods. *Environ. Int.* **2010**, *36*, 754–762.
- (10) Boxall, A. B. A.; Johnson, P.; Smith, E. J.; Sinclair, C. J.; Stutt, E.; Levy, L. S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2288–2297.
- (11) Calderón-Preciado, D.; Jiménez-Cartagena, C.; Matamoros, V.; Bayona, J. M. Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading. *Water Res.* **2011**, *45*, 221–231.
- (12) Bartha, B.; Huber, C.; Harpaintner, R.; Schroder, P. Effects of acetaminophen in *Brassica juncea* L. Czern.: investigation of uptake, translocation, detoxification, and the induced defense pathways. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2010**, *17*, 1553–1562.
- (13) Trapp, S.; McFarlane, C. *Plant Contamination*; Lewis Publisher: Boca Raton, FL, 1995.
- (14) Pascal-Lorber, S.; Alsayeda, H.; Jouanin, I.; Debrauwer, L.; Canlet, C.; Laurent, F. Metabolic fate of [¹⁴C]diuron and [¹⁴C]linuron in wheat (*Triticum aestivum*) and radish (*Raphanus sativus*). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10935–10944.

- (15) Fismes, J.; Perrin-Ganier, C.; Empereur-Bissonnet, P.; Morel, J. L. Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *J. Environ. Qual.* **2002**, *31*, 1649–1656.
- (16) Mattina, M. I.; Isleyen, M.; Eitzer, B. D.; Iannucci-Berger, W.; White, J. C. Uptake by Cucurbitaceae of soil-borne contaminants depends upon plant genotype and pollutant properties. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 1814–1821.
- (17) Rao, T. P.; Yano, K.; Iijima, M.; Yamauchi, A.; Tatsumi, J. Regulation of rhizosphere acidification by photosynthetic activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings. *Ann. Bot.* **2002**, *89*, 213–220.
- (18) Uzu, G.; Sobanska, S.; Sarret, G.; Munoz, M.; Dumat, C. Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 1036–1042.
- (19) Lee, W. Y.; Iannucci-Berger, W. A.; Eitzer, B. D.; White, J. C.; Mattina, M. I. Plant uptake and translocation of air-borne chlordane and comparison with the soil-to-plant route. *Chemosphere* **2003**, *53*, 111–121.
- (20) Keyte, I.; Wild, E.; Dent, J.; Jones, K. C. Investigating the foliar uptake and within-leaf migration of phenanthrene by moss (*Hypnum cupressiforme*) using two-photon excitation microscopy with autofluorescence. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 5755–5761.
- (21) Simonich, S. L.; Hites, R. A. Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 2905–2914.
- (22) McCutcheon, S. C.; Schnoor, J. L. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*; Wiley Inter-Science: Hoboken, NJ, 2003.
- (23) Briggs, G. G.; Bromilow, R. H.; Evans, A. A. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pest. Sci.* **1982**, *13*, 495–504.
- (24) Pilon-Smits, E. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, *56*, 15–39.
- (25) Trapp, S.; McFarlane, J. C. *Plant Contamination: Modelling and Simulation or Organic Chemical Processes*, 1st ed.; CRC Press: London, 1994; p 272.
- (26) Trapp, S. Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Manage. Sci.* **2000**, *56*, 767–778.
- (27) Lin, H.; Tao, S.; Zuo, Q.; Coveney, R. M. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. *Environ. Pollut.* **2007**, *148*, 614–619.
- (28) Wild, E.; Dent, J.; Thomas, G. O.; Jones, K. C. Visualizing the air-to-leaf transfer and within-leaf movement and distribution of phenanthrene: further studies utilizing two-photon excitation microscopy. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *40*, 907–916.
- (29) Kang, F.; Chen, D.; Gao, Y.; Zhang, Y. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 210.
- (30) Wu, C.; Spongberg, A. L.; Witter, J. D.; Fang, M.; Czajkowski, K. P. Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 6157–6161.
- (31) Kong, W. D.; Zhu, Y. G.; Liang, Y. C.; Zhang, J.; Smith, F. A.; Yang, A. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environ. Pollut.* **2007**, *147*, 187–193.
- (32) Li, Y.; Zhou, Q.; Wang, Y.; Xie, X. Fate of tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane brominated flame retardants in soil and uptake by plants. *Chemosphere* **2011**, *82*, 204–209.
- (33) Robert, H. S.; Friml, J. Auxin and other signals on the move in plants. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 325–332.
- (34) Coleman, J.; Blake-Kalff, M.; Davies, E. Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 144–151.
- (35) Sandermann, H. Higher-plant metabolism of xenobiotics - The green liver concept. *Pharmacogenetics* **1994**, *4*, 225–241.
- (36) Ryan, R. P.; Germaine, K.; Franks, A.; Ryan, D. J.; Dowling, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *278*, 1–9.
- (37) Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* **1962**, *15*, 473–479.
- (38) Calderon-Preciado, D.; Jimenez-Cartagena, C.; Peñuela, G.; Bayona, J. M. Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1319–1327.
- (39) Shimizu-Sato, S.; Tanaka, M.; Mori, H. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol. Biol.* **2009**, *69*, 429–435.
- (40) Aranami, K.; Readman, J. W. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere* **2007**, *66*, 1052–1056.
- (41) Buerge, I.; Buser, H. R.; Müller, M.; Poiger, T. Behavior of the polycyclic musks HCHB and AHTN in lakes, two potential anthropogenic markers for domestic wastewater in surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 5636–5644.
- (42) Packer, J. L.; Werner, J. J.; Latch, D. E.; McNeill, K.; Arnold, W. A. Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen. *Aquat. Sci.* **2003**, *65*, 342–351.
- (43) Schroder, P.; Collins, C. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *Int. J. Phytoremed.* **2002**, *4*, 247–265.
- (44) Xuan, T. D.; Toyama, T.; Fukuta, M.; Khanh, T. D.; Tawata, S. Chemical interaction in the invasiveness of cogongrass (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9448–9453.
- (45) Chung, K. R.; Shilts, T.; Erturk, U.; Timmer, L. W.; Ueng, P. P. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *226*, 23–30.
- (46) Hansen, H.; Grossmann, K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 1437–1448.
- (47) Stuer-Lauridsen, F.; Birkved, M.; Hansen, L. P.; Holten Lützhøft, H. C.; Halling-Sørensen, B. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* **2000**, *40* (7), 783–793.
- (48) Reichenauer, T. G.; Germida, J. J. Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem* **2008**, *1*, 708–717.
- (49) Narasimhan, K.; Basheer, C.; Bajic, V. B.; Swarup, S. Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 146–153.
- (50) Badri, D. V.; Vivanco, J. M. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* **2009**, *32*, 666–681.
- (51) Kang, F. X.; Chen, D. S.; Gao, Y. Z.; Zhang, Y. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 10.
- (52) Castro, S.; Davis, L. C.; Erickson, L. E. Temperature and pH effects on plant uptake of benzotriazoles by sunflowers in hydroponic culture. *Int. J. Phytoremed.* **2004**, *6*, 209–225.
- (53) Tromas, A.; Perrot-Rechenmann, C. Recent progress in auxin biology. *C.R. Biol.* **2010**, *333*, 297–306.
- (54) Trapp, S. Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2004**, *11*, 33–39.
- (55) Verkleij, J. A. C.; Golan-Goldhirsh, A.; Antosiewicz, D. M.; Schwitzguebel, J. P.; Schroder, P. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environ. Exp. Bot.* **2009**, *67*, 10–22.
- (56) Dubranszki, J.; da Silva, J. A. T. Micropropagation of apple - A review. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28* (4), 462–488.
- (57) Bromilow, R. H.; Chamberlain, K.; Evans, A. A. Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Sci.* **1990**, *38*, 305–314.

SUPPORTING INFORMATION

FOR

Uptake of organic emergent contaminants in two plant species. A in vitro experiment

**Diana Calderón-Preciado[†], Quentin Renault[†], Victor Matamoros[§], Núria Cañameras[‡]
& Josep Maria Bayona^{†✉}**

[†]Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, E-08034, Barcelona, Spain.

[§]Department of Chemistry, University of Girona, Campus Montilivi, E-17071, Girona, Catalonia, Spain.

[‡]Department of Agri-food Engineering and Biotechnology, Polytechnic University of Catalonia, E-08860 Castelldefels, Spain.

S1. Materials and methods

S1.1. Materials and reagents

Florisil, myo-inositol, and vitamins B1 and B3 were ordered from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium sulfate anhydrous and sodium chloride were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Disodium hydrogen citrate sesquihydrate was bought from Aldrich (Milwaukee, WI). Trisodium citrate dihydrate and vitamin B6 were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Gas chromatography grade acetone, methanol, hexane and ethyl acetate were purchased from Merck. Bacto™ Agar was bought from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France). Hydrogen chloride, ammonium citrate, boric acid, calcium and cobalt chlorides, magnesium, cupric, ferrous, manganese, and zinc sulfates, potassium phosphate, nitrate and iodide, and sodium molybdate were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulfate was purchased from Fluka. The Na₂SO₄ was baked for 5 hours at 450 °C in a muffle furnace. Reagent water was deionized in the laboratory using the ultrapure water system Arium 611 from Sartorius (Aubagne, France).

S1.2. Analytical methodology

S1.2.1. Plant tissue. Lettuce was extracted as previously reported (Calderon-Preciado et al., 2009). Briefly, a matrix solid-phase dispersion procedure was applied to the samples. A pulverized 0.5 g sample aliquot was transferred to a porcelain mortar. One g of Florisil was blended with the sample using a pestle. Then, 0.2 g of Na₂SO₄, 0.05 g of Na₃-citrate dihydrate, 0.05 g of NaCl, 0.02 g of Na₂H-citrate sesquihydrate, and 3 g of Hydromatrix were added and blended until a thoroughly homogenous mixture was obtained. This mixture was subjected to pressurized fluid extraction (Applied Separations, Allentown, PA) using acetone/hexane (1:1). Two 13.5 min extraction cycles were carried out at a temperature of 104 °C and 110 bar. The raw extract was evaporated to 5 mL under a nitrogen stream. Following the addition of 3 mL of a 0.6% K₂CO₃ aqueous solution to the vial, the hexane phase was recovered, and the remaining aqueous phase was further extracted with 3 x 3 mL hexane. The hexane phase was percolated through a Florisil-Na₂SO₄ column. This procedure rendered the neutral fraction. Subsequently, 3 mL of ethyl acetate and 75 µL of HCl were added to the aqueous phase. The organic phase was recovered, and the aqueous phase was further extracted with 2 x 3 mL ethyl acetate and percolated through a Na₂SO₄ column to remove residual water. This procedure rendered the acid fraction. Both the neutral and acid fractions were gently evaporated to approximately 300 µL. This step was followed by the addition of 25 µL of TPA solution (9.9 µg mL⁻¹) as an internal standard. Both neutral and acid fractions were gently evaporated to approximately 300 µL, this step was followed by the addition of 246 ng of triphenylamine as internal standard. The neutral fraction was directly analyzed by GC-MS/MS, while the acid fraction was derivatized adding 10 µL of TMSH to a 40 µL sample aliquot. The determination was performed by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Derivatized samples were injected onto a 7000 A GC/MS Triple Quad (Agilent Technologies) fitted with a 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 µm film thickness Sapiens (Teknokroma, Barcelona, Spain).

S1.2.1. Culture Medium. A volume of 2 µL of sample was injected in the splitless mode. The temperature of the injector was set at 270 °C. Helium was used as carrier gas (99.9995% purity) at a constant flow rate of 1.0 mL

min^{-1} nitrogen was used as collision gas. The temperature program used was the same already detailed in S1.2.1. The running time was of 35.22 min, divided into 4 segments. The QqQ mass spectrometer was used under the following conditions: ionization with electron impact at 70 eV in MRM. In the optimization of the MS/MS conditions, full scan spectra were obtained to select precursor ions, followed by the acquisition of product ion spectra by collision-induced dissociation (CID) with nitrogen (1.5 mL min^{-1}).

Table S1. GC-MS/MS product ion information

Segment	Compound	Rt	Precursor ion	Product ion (m/z) (collision energy, eV)
1	HCA	8.555	104	78 , 103, 52(18)
1	Clofibric acid	12.354	128	65 , 100 (22)
			169	129, 111 (15)
1	Ibuprofen	13.081	161	119 , 105 (15)
			220	161 (5)
2	Tonalide	18.174	243	171 , 213, 143 (17)
3	Triclosan	21.965	302	252 , 189 (20)
4	Naproxen	20.478	185	170 , 153, 129 (15)

Bold numbers indicate quantitation ion

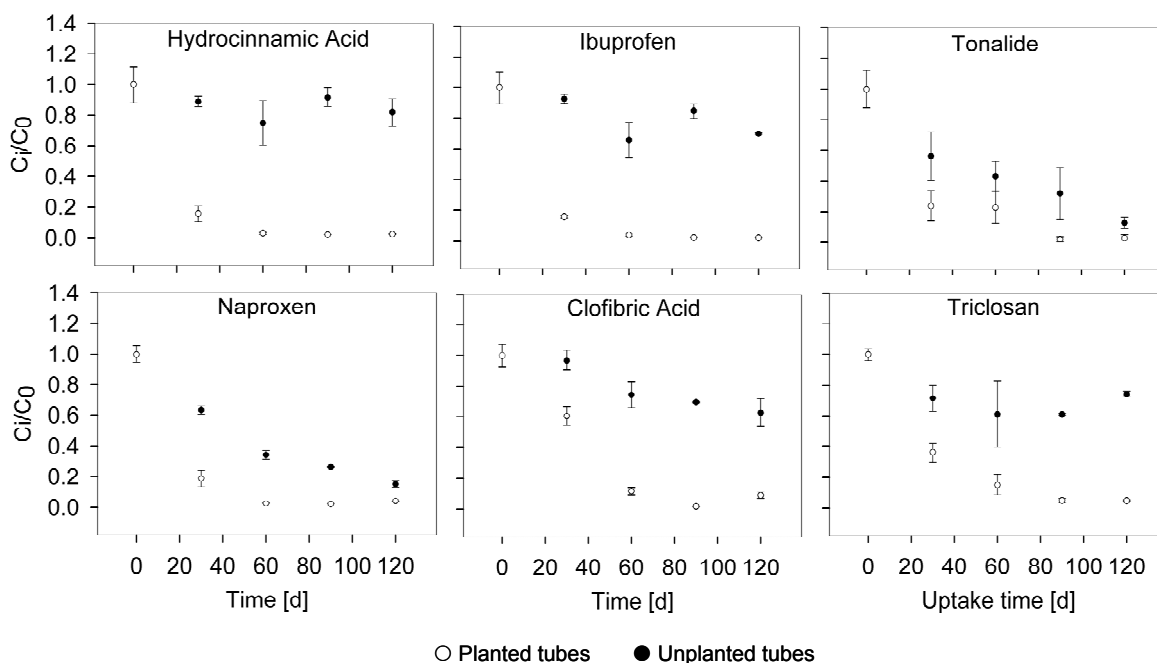


Figure SI.1. Normalized concentration of target analytes in culture medium through time in spath. For unplanted and planted tubes n equals 4. Error bars correspond to ± 1 sd.

V.5. Artículo científico 5

Foliar uptake of emerging and priority organic contaminants. An in vitro evidence.

Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., Biel, C., Save, R., Bayona, J.M. (2012)

Submitted to Journal of Food Chemistry.

Foliar Uptake of Emerging and Priority Organic Contaminants by Lettuce. An in vitro Evidence

Diana Calderón-Preciado^a, Víctor Matamoros^a, Carme Biel^b, Robert Save^b and Josep M. Bayona^{a*}

^a IDAEA-CSIC, Jordi Girona, 18. E-08034 Barcelona. Spain

^b IRTA-Torre Marimón, E-08140 Caldes de Montbui, Spain.

*Corresponding author phone +34934006119

e-mail: josep.bayona@idaea.csic.es

ABSTRACT

Crop production in arid and semiarid worldwide regions must be sustained by irrigation. However, irrigation waters contain a variety of contaminants that may be introduced into the alimentary food chain by the intake of crops irrigated with those waters. In this paper, an *in vitro* experiment was designed to simulate sprinkle irrigation with polluted waters under two extreme relative humidities (i.e. 40 and 90%). In this regard, shed lettuce heart's leaves were spiked with an aqueous solution containing organic contaminants widespread in reclaimed water, such as pharmaceuticals (i.e. ibuprofen, diclofenac, clofibric acid, carbamazepine), fragrances (tonalide), biocides (triclosan), insecticides (lindane), herbicides (atrazine), phenolic estrogen (bisphenol A) and polycyclic aromatic hydrocarbons (pyrene and phenanthrene). Following an incubation period (48 h), treated shed leaves were water rinsed and both the rinsing aqueous solution (aqueous compartment) and the washed leaves (leaf compartment) were independently analysed to investigate the foliar uptake of the target contaminants. The occurrence of neutral-basic compounds was predominant in the leaf compartment, whereas acidic compounds were predominant in the rinsing water. The mass distribution between compartments at two studied relative humidities was not statistically significant ($p < 0.05$) for any compound. Nevertheless, the statistical analysis showed that solubility, volatility (k_H) and polarity play an important role in the foliar uptake of studied contaminants by lettuce.

Keywords: Emerging organic contaminants, priority contaminants, foliar uptake, relative humidity.

INTRODUCTION

Water scarcity already impacts worldwide and almost one-fifth of the world population lives in areas where it is physically scarce.(UN-Water, 2007). Among the different water uses, agricultural activities represent the bulk of the world water demand, which account for the 70% of freshwater resources (Jiménez y Asano, 2008). Indeed, this demand will increase in the near future according with the different climate change scenarios and population growth. Bearing this in mind, reclaimed water usage is emerging as a sustainable water resource for the agricultural sector.

However, wastewater treatment plant (WWTP) effluents are one of the main sources of emerging organic contaminants in the aquatic environment (Kolpin et al., 2002), simply because these compounds are either partially removed or not removed at all in conventional wastewater reclamation. In addition, the occurrence of emerging organic contaminants in water bodies is not regulated neither by the European Water Framework Directive nor the Clean Water Act of the USEPA. Both emerging contaminants and priority pollutants can enter into the hydrological cycle and likely reach to the food chain (Arora et al., 2008; Calderon-Preciado et al., 2011).

Organic contaminants may access plants via three major pathways: (i) root uptake (Calderón-Preciado et al., 2011; Su et al., 2009) (ii) vapor uptake from the surrounding atmosphere (Yoon et al., 2003), and (iii) deposition of contaminated soils and dusts on plant cuticles and subsequent contaminant diffusion through plant surfaces (Keyte et al., 2009; Rey-Salgueiro et al., 2008).

Green plants carry out gas and vapor exchange (e.g. O₂, CO₂ and H₂O) mainly at leaf surface level. To perform this function, leaves have an important number of stomata, which provide a very effective way to gas exchange because they exert a fine regulation according to internal and external conditions (Casson y Hetherington, 2009). Under environmental stresses, mainly draught, stomata close and plant survival relies on several factors, being its cuticle properties the most important. The cuticle acts as the last barrier to avoid water loss and uncontrolled exchange of abiotic and biotic material (Kerstiens, 2006; Santrucek et al., 2004; Schreiber y Schönherr, 2009).

Cuticles are solid-state lipid membranes, covering aerial primary organs of higher plants, made up of cutin, cutan, and waxes. However, in addition to lipophilic components, cuticles always contain small amounts of cellulose and pectins but these polar constituents are confined to the inner cuticular layer (Schönherr, 2006). Nevertheless, the coupling of stomata and cuticle protection mechanisms, does not completely prevent leaves from the intrusion or loss of solutes, e.g. nutrient leaching (Tukey, 1970), foliar uptake of non-volatile pollutants (Cape, 1993), crop protection agents (Kirkwood, 1999) and fertilizers (Tan et al., 1999).

Foliar uptake of microcontaminants is a complex process, which depend on a number of factors such as compound physicochemical properties, plant leaf surface area, and environmental conditions. Among the most significant physicochemical properties affecting foliar uptake of microcontaminants are their lipophilicity, molecular weight and concentration on the leaf surface (Wang y Liu, 2007). Environmental factors could affect leaf cuticle absorption of compounds in different ways. Ambient humidity can improve cuticular penetration of hydrated ions by reducing the hydrophobic properties of the cuticle surface, causing cuticle swelling, delaying droplet drying and by maintaining deposits in hydrated form and/or redissolving the salt deposits (e.g. hydrophilic pathway) (Tagliavini et al., 2005). In addition to the hydrophilic pathway for solute uptake, a solid-state pathway has also been reported (Eichert et al., 2008). Stomata enable the uptake of suspended nanoparticles and their diffusion within the apoplasm. The stomatal pathway is considered as highly capacitive because of its large size exclusion limit of 10 nm – 1 μ m and its high transport velocity.

Furthermore, chemicals in contact with foliage may partition onto the cuticle with the possibility of translocation to other plant compartments, or can diffuse into the plant through stomata though the relative importance of the latter pathway is still a matter of controversy (Paterson et al., 1990; Tagliavini et al., 2005).

In the present study, an experimental set up was designed and carried out to evaluate the final fate of selected emerging and priority organic contaminants in the foliar compartment under simulated sprinkle irrigation. The selection criteria of contaminants relied on their ubiquity in WWTP effluents and wide range of physicochemical properties such as hydrophobicity, solubility, molecular weight and volatility. The experimental design consisted of two shed leaf sets spiked with a variety of analytes at two relative humidities (RHs) to assess the importance of physicochemical properties of contaminants and environmental conditions in the contaminant foliar uptake. After an incubation period, shed leaves were rinsed and both the vegetable tissue and the recovered rinsing water were analyzed, this allowed to study the compartmentalisation between both the sorbed and the deposited fractions.

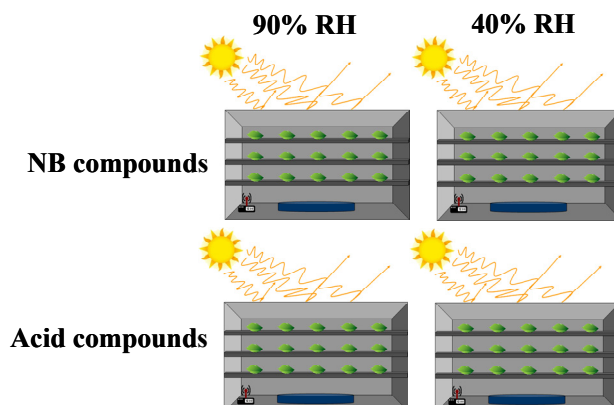
MATERIALS AND METHODS

Materials and Reagents. Pharmaceuticals, fragrances and a phenolic estrogen (i.e., ibuprofen, carbamazepine, diclofenac, clofibrac acid, tonalide, bisphenol A) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium), trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) and triclosan were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and pesticides (i.e., lindane, and atrazine) were bought from Riedel de Haën (Seelze, Germany).

Florisil was ordered from Merck (Darmstadt, Germany). Anhydrous sodium sulfate and sodium chloride were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Disodium hydrogencitrate sesquihydrate was bought from Aldrich (Milwaukee, WI). Trisodium citrate dihydrate was from Sigma (St. Louis, MO). GC grade acetone, methanol, dichloromethane, hexane and ethyl acetate were purchased from Merck. The Na_2SO_4 was baked for 5 hours at 450 °C in a muffle furnace before using.

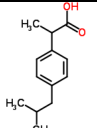
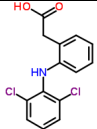
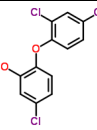
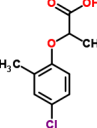


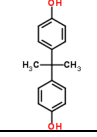





Experimental Set-up. The experiment consisted in spiking of every single lettuce leaves with the target analytes followed by an exposure to a set RH (Fig. 1). To this end, leaves were divided into two sets, the first was spiked with compounds of acidic nature, while the second one with neutral and basic compounds (Table 1).

Figure 1. Experimental set-up depicting the incubation conditions and different treatments of the heart's leaves (NB, neutral & basic compounds). See Table 1 for compound identity.



Spiking solutions were prepared from stock solutions in Milli-Q water to a final compound individual concentration of $4 \mu\text{g mL}^{-1}$. All leaves were identified, weighed and their petioles protected with aluminium foil prior to spiking. Spiking was carried out by atomization of the corresponding spiking solution on both upper and lower surfaces of the leaf until the drip point was reached. After spiking, the excess of spiking solution was removed and then the leaf weight recorded. Both leaf sets were split in two subsets, one exposed to at 40% RH and the other one to 90% RH. Both leaf sets were incubated for 48 h in the corresponding RH controlled chamber. Temperature and relative humidity within the chambers were monitored using data loggers, mean temperature in the chambers throughout the experiment was $22.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ while RH ranged from $40 \pm 2\%$ to $94 \pm 12\%$. At the end of analyte exposure period, leaves were recovered, and five sets containing three leaves were formed within each subset (20 groups total). Every group was immediately rinsed with 200 mL of Milli-Q water and then carefully wrapped in aluminium foil. The rinsing water for each group was recovered and stored in amber glass bottles. A third leaf set was employed as a blank for analytical quality control proposes following the above mentioned steps, employing as spiking solution Milli-Q water and exposed only to a 90% RH.

Table 1. Relevant physicochemical properties of the selected compounds

Compound	Chemical structure	Physicochemical properties					
		Solubility (mg L ⁻¹)	Molecular weight (Da)	pKa	Molar volume, (m ³ mol ⁻¹)	Henry Law constant (dimensionless)	Log D _{ow} *
Acidic compounds							
Ibuprofen		41.1	206	4.4	182.1	6.2 x 10 ⁻⁶	1.10
Diclofenac		17.8	295	4.0	206.8	1.94 x 10 ⁻¹⁰	1.17
Triclosan		17.0	289	7.9	194.3	2.04 x 10 ⁻⁷	4.61
Mecoprop		620	214	3.1-3.8	169.6	7.45 x 10 ⁻⁷	-0.86
Clofibric acid		583	214	3.46	169.5	8.96 x 10 ⁻⁷	-1.32
Neutral and basic compounds							
Carbamazepine		17.7	236	13.4	186.6	4.42 x 10 ⁻⁹	2.25
Bisphenol A		300	228	9.5	199.5	3.74 x 10 ⁻¹⁰	3.64
Tonalide		0.24	258	N	280.8	1.73 x 10 ⁻³	5.80
Lindane		10.0	290	N	182.6	1.05 x 10 ⁻²	4.26
Atrazine		30.0	215	N	169.8	1.83 x 10 ⁻⁷	2.82
Pyrene		0.14	202	N	161.9	3.39 x 10 ⁻⁴	4.93
Phenanthrene		1.29	178	N	157.6	2.10 x 10 ⁻³	4.35

N: neutral. *D_{ow} was calculated as follows:

$$D_{ow} = \frac{K_{ow}}{1 + 10^{pH - pKa}}$$

Analytical Methodologies

Rinsing Water. The 200 mL recovered in the rinsing step is considered as the aqueous compartment (AqC). The determination of compounds in the AqC was carried out following a previously described methodology (Matamoros y Bayona, 2006). Briefly, a sample volume of 200 mL was spiked with 1.5 µg of a surrogate standard mix (i.e., fenoprop for the acidic compounds, 2,2'-dinitrophenyl for musks and dihydrocarbamazepine for neutral compounds). Samples were percolated through an activated polymeric solid-phase extraction cartridge, 100 mg Strata X from Phenomenex (Torrance, CA). Cartridges were eluted with 10 mL of the solvent mixture hexane/ethyl acetate (1:1). The extract was evaporated to approximately 20 µL under a gentle nitrogen stream, and 246 ng of triphenylamine (TPA) were added as internal standard. Next, the vial was reconstituted to 300 µL with ethyl acetate.

Vegetable Tissue. Lettuce was extracted as previously reported (Calderón-Preciado et al., 2009). Briefly, matrix solid-phase dispersion procedure was applied to the vegetable samples. A 0.5 g of comminuted sample aliquot was transferred to a porcelain mortar, vigorously blended using a pestle with florisil, Na₂SO₄, Na₃-citrate dihydrate, NaCl, Na₂H-citrate sesquihydrate and Hydromatrix. This mixture underwent pressurized fluid extraction (Applied Separations, Allentown, PA) using acetone/hexane (1:1), two extraction cycles (13.5 min, 104 °C, 110 bar). A neutral-basic and acid fractions were obtained by solvent partitioning at neutral and acid pH and gently evaporated under a nitrogen stream. Then, the TPA was added as internal standard.

Target Analyte Determination. Methylation of the acidic carboxyl group (acidic compounds) both aqueous and vegetable was performed in the GC injector port at 270 °C by adding 10 µL of TMSH solution (0.25 mol L⁻¹ in methanol) to a 50 µL sample aliquot before injection. Obviously, this step was unnecessary for samples belonging to the neutral and basic set. Both derivatized and non-derivatized samples were injected onto a TRACE GC-MS (Thermo Scientific) in the electron impact mode (70 eV ionization energy) fitted with a 20 m × 0.18 mm ID × 0.18 µm film thickness Sapiens 5MS (Teknokroma, Barcelona, Spain). Helium was used as carrier gas (99.9995% purity) at a constant flow rate of 0.6 mL min⁻¹. The oven temperature was held at 65 °C for 1 min and then the temperature was programmed at 15 °C min⁻¹ to 120 °C, at 6 °C min⁻¹ to 160 °C, at 9 °C min⁻¹ to 180 °C, at 6 °C min⁻¹ to 220 °C, and finally at 8 °C min⁻¹ to 315 °C holding the final temperature for 7 min. A volume of 1 µL of extract dissolved in ethyl acetate was injected in the splitless mode.

Method Performance. GC-MS instrumental linearity for neutral and acidic analytes ranged from 0.005 to 4.06 µg mL⁻¹, the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) for both water and vegetable tissue analysis were defined as the mean background noise in a blank triplicate plus three and ten times, respectively the standard deviation of the background. LODs and LOQs for aqueous samples ranged from 0.002 to 0.087 µg L⁻¹ and 0.003 to 0.075 µg L⁻¹, respectively. For vegetable tissues, LODs and LOQs ranged from 6.6 to 33 µg kg⁻¹ fresh weight (fw) and from 7.6 to 40 µg kg⁻¹ (fw). Validation of method performance for vegetable tissue was achieved by means of analyte recovery evaluation from a spiked matrix (0.1 µg g⁻¹ fw). Recoveries and repeatability were calculated from triplicate replicates. Recoveries ranged from 51% (carbamazepine) to 107% (diclofenac), while relative standard deviations ranged from 9.5% (phenanthrene) to 23% (tonalide).

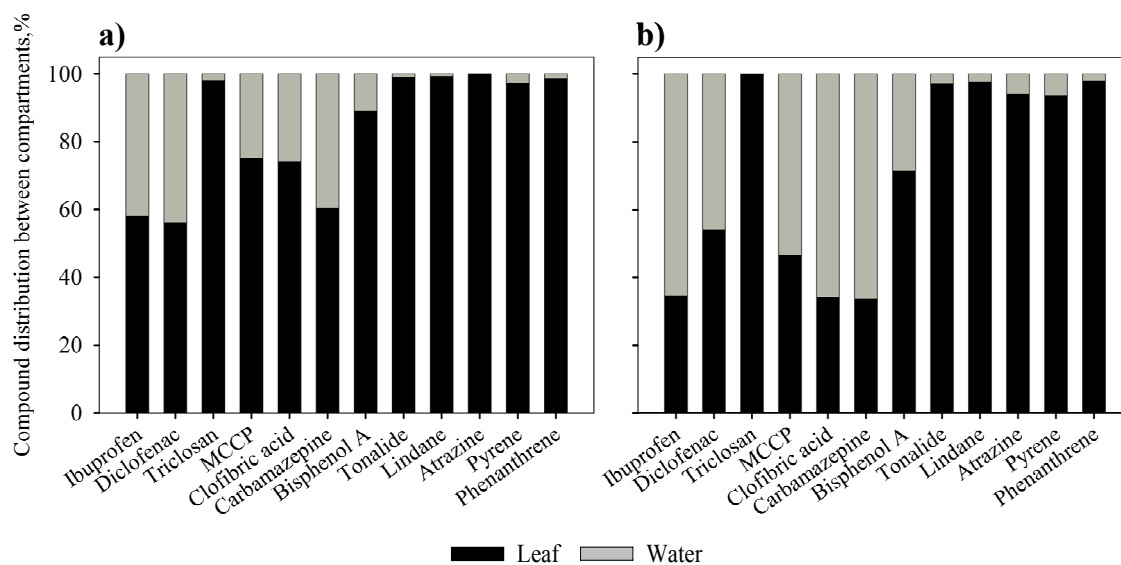
Statistical Data Treatment. All statistical analyses were undertaken using the SPSS 15 package (Chicago, IL). In order to perform mean comparisons, data were first checked for normality using the Kolmogorov-Smirnov test, followed by one way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. Before performing correlation and multiple regression analysis, data were normalized by calculating the ratio of total compound mass and spiked total compound mass recorded for each leaf subset. Data normalization was carried out to suppress the error introduced by differences in leaf surface area. Normalized data were arranged in matrices prior to the statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Contaminant Distribution between Leaf-Aqueous Compartments. Overall recoveries from the studied compounds following the incubation step varied greatly depending on their physico-chemical properties. They were generally lower for neutral and basic compounds, which ranged from 1% (tonalide) to 83% (atrazine) and 0.3 (lindane) to 42% (atrazine) for 40% and 90% RH, respectively. Acidic compound recoveries were higher ranging from 93% (diclofenac) to 108% (MCCP) for 40% and 90% RHs, respectively. Compound recoveries may have been hindered by losses attributable to volatilization, adsorption to chamber walls and other unaccounted processes. Specifically, the low recoveries obtained for lindane and tonalide can be ascribed to their high volatility ($k_H = 1.05 \times 10^{-2}$ and 1.73×10^{-3} , respectively). However, all concentrations were well above the quantification limits.

Figure 2 displays the final normalized analyte distribution between aqueous and leaf compartments. Neutral and basic (NB) compounds namely, tonalide, lindane, atrazine, pyrene, and phenanthrene were predominant in the leaf compartment. The latter was expected since it has been documented that hydrophobic compounds are able to cross leaf cuticles by dissolving and diffusing in lipophilic domains made up of cutin and amorphous cuticular waxes (Schonherr, 2002).

Figure 2. Final analyte distribution between the aqueous and leaf compartments at: a) 40% RH and b) 90% RH.



there is an apparent higher mass of compounds in the aqueous compartment, no statistical significant differences ($p < 0.05$) between treatments for any of the studied compounds including NB were found.

Impact of Physicochemical Properties on Cuticle Penetration. Foliar uptake of solutes is a complex process, which depends on many factors such as leaf surface, plant characteristics, physicochemical properties of compounds and environmental conditions (Wang y Liu, 2007). In this section, the influence of some relevant physicochemical properties (i.e. solubility, molecular weight, molar volume, Henry law constant, and D_{ow}) on compound distribution was assessed by correlation analysis.

Overall contaminants. Pearson correlations were carried out between normalized compound mass in leaf stratified by relative humidity and taking into account the above mentioned variables and all the studied compounds (Table 1). No statistically significant ($p < 0.05$) correlations were found at 40% RH. However at 90% RH, the solubility logarithm, k_H and D_{ow} were correlated ($p < 0.01$) with normalized compound mass in leaf (Figure 3). $\log k_H$ displayed a negative correlation with compound mass in leaf, which translates into a higher accumulation of compounds with smaller $\log k_H$ and thus least volatile. Generally, NB compounds with k_H ranging from 1.83×10^{-7} (atrazine) to 1.05×10^{-2} (lindane) showed a lower accumulation in leaf than acidic compounds with k_H ranging from 1.94×10^{-10} (diclofenac) to 6.2×10^{-6} (ibuprofen). As expected, $\log D_{ow}$ and solubility displayed an opposite effect on the mass recovered in the leaf compartment. The inverse relationship between $\log D_{ow}$ and solubility is consistent, since a decrease on water solubility usually leads to an increase in hydrophobicity. Overall, these correlations suggest that at higher RH, the most water soluble and thus more polar compounds are able to reach the leaf surface and diffuse in some extent through the cuticle while hydrophobic compounds are forced into the air-water interface, which combined with their large k_H aides to their loss by volatilization

Furthermore, no statistically significant ($\alpha < 0.05$) differences were found between both RHs with regard to mass for any compound. This might suggest that, under experimental conditions, stomata opening in lettuce have little relevance on compound occurrence on the leaf compartment, and instead other processes are more meaningful.

Acidic vs. Neutral-Basic Compounds. In order to gain further insight into the processes that might take place between target analytes and the foliar system, their mass distribution between rinsing water and leaf compartment were further stratified by compound nature (i.e. acidic vs. neutral-basic) in addition to RH. In this way, the relevance of physicochemical properties could be statistically discerned. Table 2 shows the significant dependence of normalized compound mass distribution with relevant physicochemical properties for acidic and NB compounds at the studied RHs.

Table 2. Correlation of normalized compound mass on relevant physicochemical properties

Property	Leaf				Rinsing water			
	Neutral-basics (NB)		Acids		Neutral-basics (NB)		Acids	
	40% RH	90% RH	40% RH	90% RH	40% RH	90% RH	40% RH	90% RH
S	0.549**	0.469*	0.629**	0.428**	-0.592**	0.643**	-0.389*	0.381*
Mw	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Mv	NC	NC	0.449**	NC	-0.430*	NC	NC	-0.494**
Log H	-0.527**	NC	NC	NC	0.573**	-0.656**	-0.434**	0.474**
Log D_{ow}	-0.486**	-0.514*	-0.440**	-0.316*	NC	NC	-0.874**	-0.567**

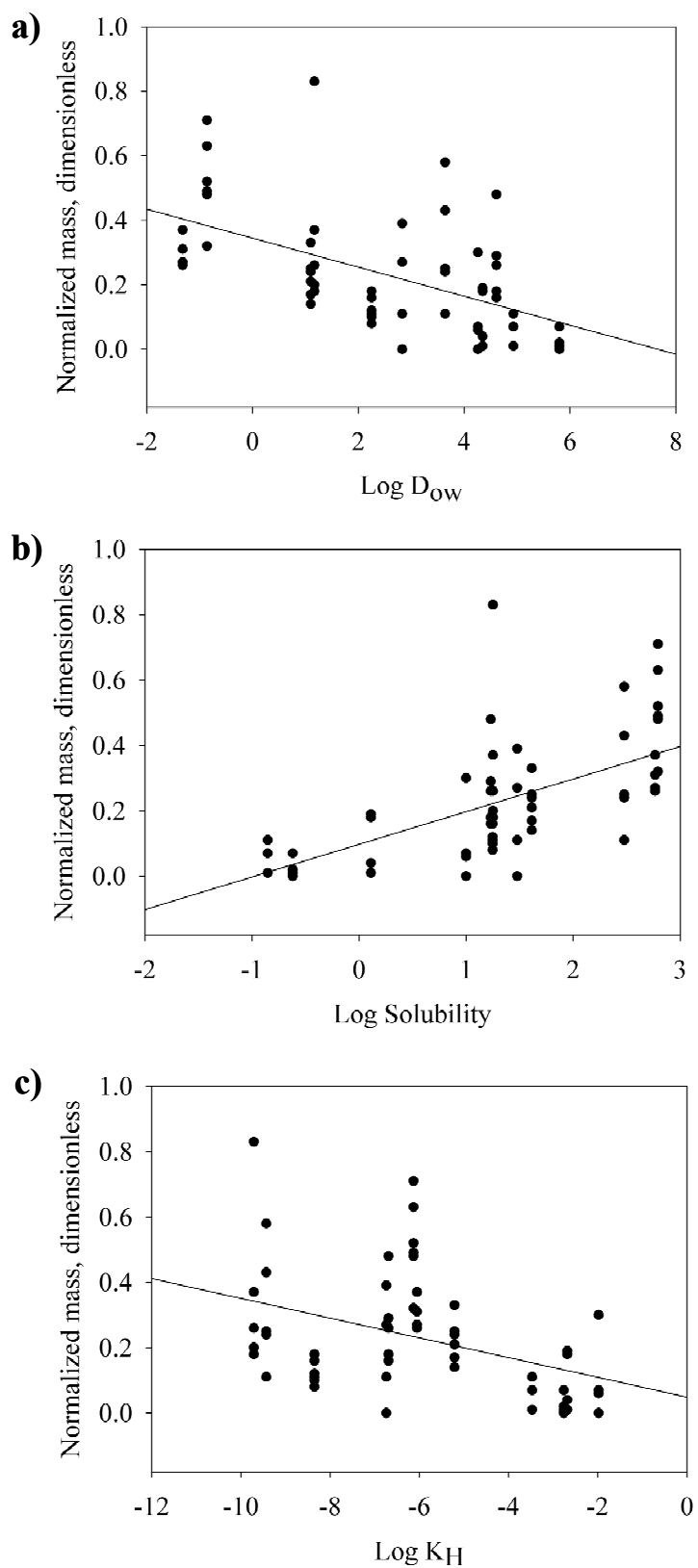
Pearson correlation coefficient

NC: No significant correlation

* Significant at 0.05 bilateral

** Significant at 0.01 bilateral

Figure 3. Correlation of normalized contaminant mass retained on leaves, a) $\text{Log } D_{ow}$ ($r = 0.552$, $p < 0.01$, $n = 62$), b) Log solubility ($r = 0.534$, $p < 0.01$, $n = 62$) and c) $\text{Log } K_H$ ($r = 0.410$, $p < 0.01$, $n = 62$) at 90% of relative humidity.



Leaf Compartment (LC), The normalized concentrations of NB and acidic compounds in the leaf correlated positively with solubility and negatively with $\log D_{ow}$ at both studied RHs. This indicates that with an increase in hydrophobicity, the compound tendency to be pushed out solution and into the water surface increases, limiting its contact with the leaf cuticle and thus diminishing its occurrence in the LC. On the other hand, the more water soluble analytes have a higher sorption potential because they remain dissolved in the water layer surrounding the leaves, which enhances their interaction with the cuticle. The latter behavior is in accordance with the overall correlation results.

Solubility plays a crucial role in analyte behavior, especially at 90% RH, where the leaf would still be coated with water drops making cuticle contact easier for those compounds with higher water solubilities. The latter was true for both acidic and NB compounds. These findings are in agreement with those found by Schonherr (Schonherr, 2001) who suggested that high RHs enhance transport capacity of hydrophilic solutes by increasing size and/or number of aqueous pores. Conversely, compound solubility was not expected to have a large relevance at 40% RH, since it has been documented that cuticle hydration decreases with decreasing humidity (Chamel et al., 1992; Luque et al., 1995), thus reducing the permeability of the hydrophilic route (Schonherr et al., 2000). However decreasing humidity also causes a drastic increase in the equilibrium concentration of foliar-applied solutes, which in turn increases penetration rates (Fernandez y Eichert, 2009). This effect could explain the relevancy of solubility at this RH.

In addition to solubility and polarity, LC data for NB compounds at 40% RH strongly correlates with $\log k_H$. This negative relationship suggests that occurrence of compounds with larger $\log k_H$ will be hindered by their volatilization potential at low RH.

For acidic compounds at 40% RH, molar volume gains importance in compound distribution within the LC, its positive correlation implies that compounds with larger molar volumes which in this study are those that exhibit two aromatic rings (i.e. diclofenac, triclosan, bisphenol A) may interact more strongly with the leaf surface and/or aqueous pore functional groups.

Aqueous Compartment (AqC). The normalized concentration of acidic and NB compounds in the AqC correlated with both solubility and $\log K_H$ at the studied RHs, whereas only the normalized concentration of acidic compounds correlated with the $\log D_{ow}$.

Although the occurrence of acidic compounds in the AqC at 40% RH was determined by their solubility, hydrophobicity and volatility, hydrophobicity dominated their occurrence in this compartment. The latter suggests that analytes with higher $\log D_{ow}$ values interacted more with the leaf surface, and thus became adsorbed, whereas compounds with lower values were kept in the water phase.

At 90% RH, acidic analytes with higher volatility and lower molar volume were expected to be found in the AqC. The relevancy of molar volume for acidic compounds in AqC may be explained by a possibly stronger interaction of compounds exhibiting two aromatic rings in their structure, thus making them more prone to occur in the LC rather than in the AqC. This analyte behavior meshes well with the correlations obtained at the same RH in the LC.

Finally, molecular volume was only relevant in some specific conditions. At 40% RH this property was negatively correlated to both compound groups favoring the occurrence of the least water soluble compounds in the AqC, indicating that those more soluble would have remained in the leaf compartment.

Conversely, the impact of solubility at 90% RH was positive for both compound groups. However this correlation was much stronger for NB compounds than for acidic, embodied by their correlation coefficients 0.643

($p < 0.01$) and 0.381 ($p < 0.05$) respectively. The latter suggests that presence of more soluble compounds in this compartment is favoured.

The log K_H correlated with both compound groups at both RHs. Volatility affected compound behavior differently depending on RH. While at 40% RH, NB compounds exhibiting higher volatilities were more prone to appear in the AqC, at 90% RH was the opposite. Conversely, acidic compounds exhibiting higher volatility presented higher tendency to appear in the AqC at 40% HR than at 90% HR. This may be explained due to the higher volatility of NB compounds in comparison with the acidic compounds.

In summary, compound occurrence in the leaf and aqueous compartments displayed a correlation with solubility and volatility for both NB and acidic compounds regardless of RH. Nevertheless in the AqC, the effect of solubility on distribution depended on RH. Volatility ($\log k_H$) correlated with acidic and NB compounds but this property was more relevant in AqC than in LC, presumably due to the higher transference of these compounds from the water to the air than from the leaf to the air.

Irrigation Regimes and Food Safety Implications. Nowadays all water reuse standards and guidelines for agricultural irrigation are directed primarily at health protection through the control of human exposure to pathogenic organisms or toxic chemicals (Lazarova y Bahri, 2005) while emerging organic contaminants have been left aside from the guidelines and regulations for the moment being. The same occurs with the irrigation technique selection, in which the most important factor taken into account is meeting the plants hydric requirements in an optimum manner, while balancing the intrinsic sanitary risk of a given irrigation technique. In this study we have demonstrated for the first time that the foliar uptake of emerging and priority contaminants by plants such as lettuce is possible and that depends on the physico-chemical properties of the contaminants. This information could help decision-makers to choose the most suitable irrigation regimes and techniques to minimize human and environment exposure to microcontaminants.

CONCLUSIONS

An experimental design aiming to evaluate the foliar uptake of selected organic microcontaminants was carried out at two RHs. The distribution between sorbed and deposited was feasible by vegetable tissue rinsing at the end of the incubation period. The occurrence of NB compounds, were predominant in the leaf compartment, while acidic compounds are partitioned between the leaf tissue and rinsing water.

No statistically significant ($\alpha < 0.05$) differences were found between RHs with regard to mass distribution between compartments for any compound. However, the impact of the compound physicochemical properties in its final compartmental distribution was evidenced with the use of correlation analysis. This statistical analysis showed that solubility, volatility (k_H) and polarity play an important role in the final fate of the target compound and their foliar uptake potential in lettuce.

These conclusions could be useful to get further insight in the foliar uptake of organic microcontaminants by crops in fields irrigated with reclaimed water and to minimize population and environment exposure.

Funding

This study was funded by the Catalan Food Safety Agency (ACSA) and the Spanish Ministry of Economy and Competiveness (CGL2011-24844).

ACKNOWLEDGMENTS

Dr. VM acknowledges a Juan de la Cierva and JAE-Doc contracts from the Spanish Ministry of Science and Innovation and CSIC-European Social Fund.

REFERENCES

- Arora, M., Kiran, B., Rani, S., Rani, A., Kaur, B., & Mittal, N. (2008). Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. *Food Chemistry*, 111(4), 811-815.
- Calderón-Preciado, D., Jimenez-Cartagena, C., Matamoros, V., & Bayona, J. M. (2011). Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading. *Water Research*, 45(1), 221-231.
- Calderón-Preciado, D., Jimenez-Cartagena, C., Penuela, G., & Bayona, J. M. (2009). Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(5), 1319-1327.
- Calderón-Preciado, D., Renault, Q., Matamoros, V., Cañameras, N., & Bayona, J. M. (2012). Uptake of organic emergent contaminants in two plant species and estimate of the metabolized fraction. Submitted to *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, in press, dx.doi.org/10.1021/jf2046224.
- Cape, J. N. (1993). Direct damage to vegetation caused by acid-Rain and polluted cloud- definition of critical levels for forest trees. *Environmental Pollution*, 82(2), 167-180.
- Casson, S. A., & Hetherington, A. M. (2009). Environmental regulation of stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(1), 90-95.
- Chamel, A., Escoubes, M., Baudrand, G., & Girard, G. (1992). Determination of Water sorption by cuticles isolated from fir tree needles. *Trees-Structure and Function*, 6(2), 109-114.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U., & Goldbach, H. E. (2008). Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum*, 134(1), 151-160.
- Fernandez, V., & Eichert, T. (2009). Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(1-2), 36-68.
- Fuerhacker, M. (2009). EU Water Framework Directive and Stockholm Convention Can we reach the targets for priority substances and persistent organic pollutants? *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 92-97.
- Jiménez, B., & Asano, T. (2008). *Water Reuse. An international survey of current practice issues & needs*. London: IWA Publishing.
- Kerstiens, G. (2006). *Plant Cuticles, an Integrated Functional Approach*. Oxford: Garland Science.
- Keyte, I., Wild, E., Dent, J., & Jones, K. C. (2009). Investigating the foliar uptake and within-leaf migration of phenanthrene by moss (*Hypnum cupressiforme*) using two-photon excitation microscopy with autofluorescence. *Environmental Science and Technology*, 43(15), 5755-5761.
- Kirkwood, R. C. (1999). Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. *Pesticide Science*, 55(1), 69-77.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36(6), 1202-1211.
- Lazarova, V., & Bahri, A. (2005). *Water reuse for irrigation. Agricultura, landscapes and turf grass*. Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Lee, W. Y., Iannucci-Berger, W. A., Eitzer, B. D., White, J. C., & Mattina, M. I. (2003). Plant uptake and translocation of air-borne chlordane and comparison with the soil-to-plant route. *Chemosphere*, 53(2), 111-121.
- Luque, P., Gavara, R., & Heredia, A. (1995). A study of the hydration Process of isolated cuticular membranes. *New Phytologist*, 129(2), 283-288.
- Matamoros, V., & Bayona, J. M. (2006). Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands. *Environmental Science and Technology*, 40(18), 5811-5816.
- Paterson, S., Mackay, D., Tam, D., & Shiu, W. Y. (1990). Uptake of organic- Chemicals by plants - a review of processes, correlations and models. *Chemosphere*, 21(3), 297-331.
- Rey-Salgueiro, L., Martinez-Carballo, E., Garcia-Falcon, M. S., & Simal-Gandara, J. (2008). Effects of a chemical company fire on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant foods. *Food Chemistry*, 108(1), 347-353.

- Santrucek, J., Simanova, E., Karbulkova, J., Simkova, M., & Schreiber, L. (2004). A new technique for measurement of water permeability of stomatous cuticular membranes isolated from *Hedera helix* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55(401), 1411-1422.
- Schonherr, J. (2001). Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions, and adjuvants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164(2), 225-231.
- Schonherr, J. (2002). A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across astomatous cuticular membranes. *Pest Management Science*, 58(4), 343-351.
- Schonherr, J. (2006). Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*, 57(11), 2471-2491.
- Schonherr, J., Baur, P., & Uhlig, B. A. (2000). Rates of cuticular penetration of 1-naphthylacetic acid (NAA) as affected by adjuvants, temperature, humidity and water quality. *Plant Growth Regulation*, 31(1-2), 61-74.
- Schreiber, L., Schönherr, J. (2009). *Water and Solute Permeability of Plant Cuticles: Measurement and Data Analysis*. Berlin: Springer-Verlag.
- Sheffield, J., & Wood, E. F. (2008). Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. *Climate Dynamics*, 31(1), 79-105.
- Su, Y. H., Zhu, Y. G., & Liang, Y. C. (2009). Interactions of mixed organic contaminants in uptake by rice seedlings. *Chemosphere*, 74(7), 890-895.
- Tagliavini, M., Toselli, M., & Daniel, H. (2005). Foliar applications of Nutrients. *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 53-59). Oxford: Elsevier.
- Tan, X. W., Ikeda, H., & Oda, M. (1999). Absorption, translocation, and assimilation of foliar-applied urea compared with nitrate and ammonium in tomato plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45(3), 609-616.
- Tukey, H. B. (1970). Leaching of substances from plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 21, 305-324.
- UN-Water (2007). *Coping with water scarcity challenge of the twenty-first century*.
- Wang, C. J., & Liu, Z. Q. (2007). Foliar uptake of pesticides - Present status and future challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(1), 1-8.

V.6. Discusión general de resultados

El presente capítulo consta de dos artículos científicos cuyo objetivo conjunto es profundizar en los procesos involucrados en la incorporación de microcontaminantes orgánicos en plantas vía radicular y foliar. Es por esta razón que los estudios realizados en los artículos 4 y 5 de la presente Tesis podrían considerarse como complementarios. La concepción de los dos artículos científicos descritos en este capítulo se basó en los resultados obtenidos en los artículos 2 y 3 (Capítulo IV). En ambos estudios se describió la presencia de microcontaminantes orgánicos en aguas de riego agrícola, adicionalmente, en el artículo 2 (sección IV.5.), se puso de manifiesto la incorporación de microcontaminantes orgánicos en cultivos irrigados con agua regenerada en condiciones reales. El siguiente paso lógico fue intentar evaluar los procesos de incorporación de microcontaminantes orgánicos específicos tomando las vías foliar y radicular como modelo de una irrigación por aspersión y goteo, respectivamente.

En una primera fase se evaluó la incorporación de microcontaminantes orgánicos vía radicular, los resultados obtenidos en dicho estudio se describen en el artículo científico titulado: *Uptake of organic emergent contaminants in spath and lettuce: an in vitro experiment*. La idea central de este experimento fue la de cultivar una planta modelo en un medio fortificado con microcontaminantes específicos bajo condiciones de crecimiento y exposición lo más controladas posible. Los contaminantes incluidos en el estudio se seleccionaron en base a la ubicuidad de éstos en las aguas de riego agrícola (Capítulo IV). Además de los dos criterios descritos anteriormente, se quiso cubrir en la selección un rango amplio de propiedades físicas y químicas de interés en los procesos de incorporación vía radicular: constante de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$), masa molecular (MW) y constante de disociación (pK_a). Además, en el caso de este experimento se conocía de la susceptibilidad de triclosan, tonalida y naproxeno a sufrir reacciones fotoquímicas derivadas de su exposición a la luz solar (Aranami y Readman, 2007; Buerge et al., 2003; Packer et al., 2003). Debido a estos antecedentes, se incluyó en el diseño experimental un tratamiento para evaluar las pérdidas de estos compuestos como resultado de su exposición a la luz.

Se seleccionó el cultivo *in vitro* para el crecimiento y exposición de las plantas modelo a los microcontaminantes orgánicos diana. Al tratarse de un sistema semi-cerrado, se mantuvo un alto control del nivel de dopaje inicial y se evitaron pérdidas por volatilización y biodegradación (condiciones estériles). Por último, se seleccionaron dos plantas modelo: lechuga, *Lactuca sativa*, y espatifilo, *Spathiphyllum* sp., la primera una planta de interés comercial y consumo masivo, mientras que la segunda tiene un uso ornamental. Una de las ventajas del uso de las técnicas de crecimiento *in vitro* fue la de realizar el experimento en condiciones de esterilidad eliminando el factor de la degradación biótica. De este modo, la atenuación de los analitos diana en el medio es debida a la incorporación de estos por parte de la planta o a su degradación por parte de exudados liberados por la raíz de la planta. Sin embargo, la importancia de estos últimos es debatible ya que las raíces de las plantas modelo eran jóvenes, por lo que se esperaba que la producción de estos exudados fuese limitada (Badri y Vivanco, 2009). Por tanto, cabe esperar que el mayor impacto de la desaparición de estos contaminantes del medio de cultivo sea atribuible en gran medida a la absorción por parte de la planta.

El estudio constó de 4 tratamientos: A) Medio dopado + planta, B) Medio no dopado + planta, C) Medio dopado y D: Medio dopado en la oscuridad (sección V.4., Figura 1 del artículo 4) que permitieron evaluar la incorporación de analitos selectos en dos plantas modelo con el tiempo de exposición. Con este objetivo se monitorizaron tanto la concentración del medio de cultivo como del tejido de la planta. Es importante remarcar que en este estudio se ha llevado a cabo la determinación de microcontaminantes orgánicos en el tejido vegetal, para evaluar su incorporación real. En muchos otros de los estudios llevados a cabo hasta la fecha, se evalúa la incorporación de dichos contaminantes de manera indirecta, es decir, midiendo únicamente la concentración en el medio de cultivo a lo largo del tiempo y asumiendo que cualquier disminución en éste, está directamente relacionada a una incorporación por parte de la planta (Gao y Collins, 2009; Kong et al., 2007; Yifru y Nzungung, 2006). Los resultados obtenidos por este planteamiento, pueden falsear en mayor o menor grado la incorporación real de estos compuestos en la planta.

La Figura V.5. muestra como las plántulas de lechuga y espatifilo crecieron vigorosamente sin ningún síntoma de estrés aparente. No obstante, un estudio realizado por Bartha et al. (2010), reportó daño foliar extenso en *Brassica juncea*, incluyendo zonas necróticas a los 7 días de incubación (tiempo final del estudio) en una solución de Hoagland dopada con paracetamol. Sin embargo, dicho daño puede atribuirse a la elevada concentración a la que la planta fue expuesta (151 mg L^{-1}) en comparación con nuestro estudio (0.1 mg L^{-1}). La concentración utilizada en ese estudio dista mucho de las concentraciones ambientales posibles aun en caso de contaminación severa del medio, por lo que no se esperan estos efectos en condiciones reales de cultivo.

En la incorporación de xenobióticos vía radicular, existe una penetración de éstas al apoplasto de la raíz. La velocidad en la que este proceso ocurre es directamente proporcional a la concentración del compuesto en el medio (Kvesitadze et al., 2006b). Esto explicaría las elevadas tasas de incorporación obtenidas por algunos estudios empleando concentraciones de dopaje entre 1 y 150 mg L^{-1} (Bartha et al., 2010; Su y Zhu, 2007).

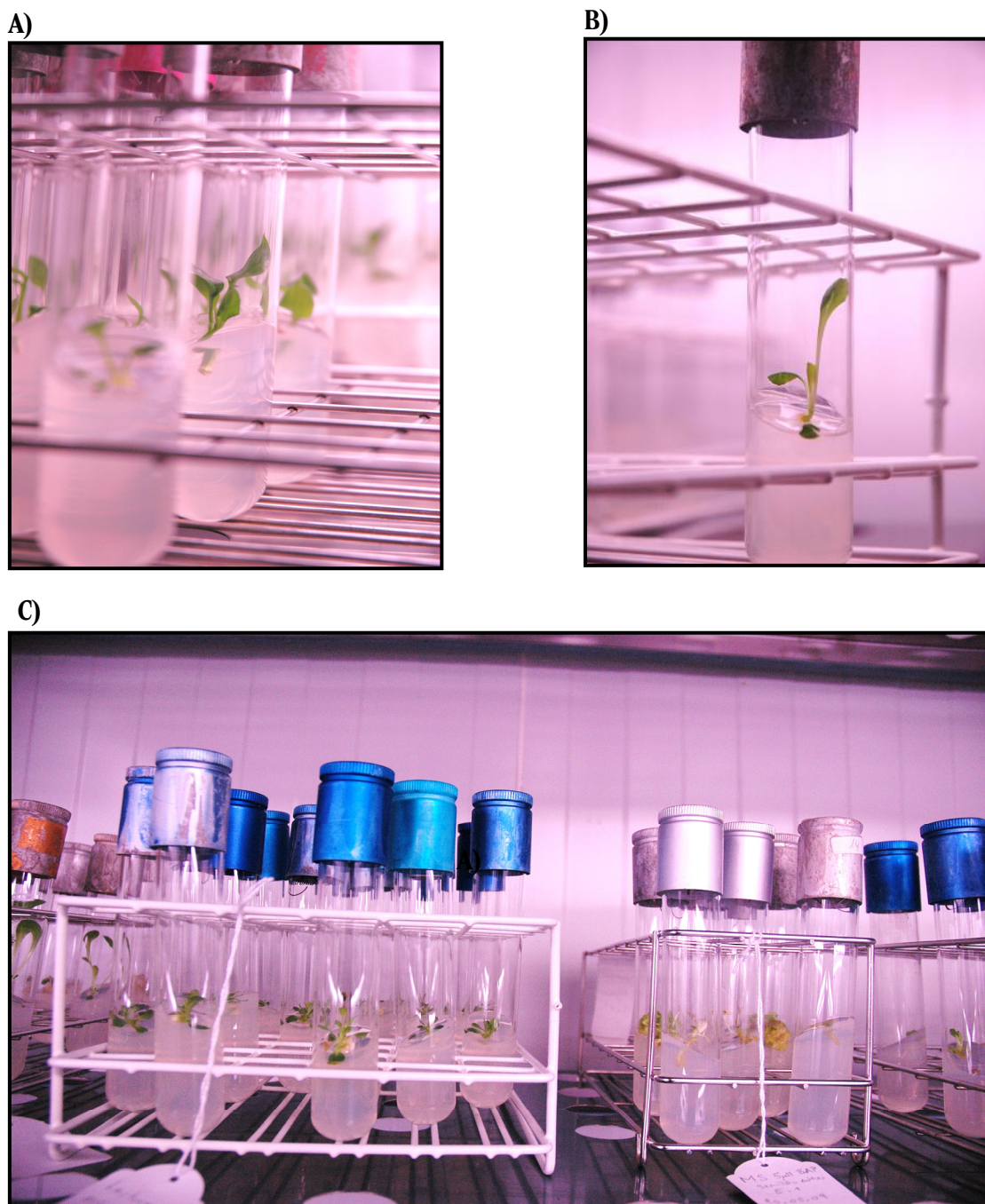


Figura V.5. Fotografías correspondientes al experimento de incorporación de contaminantes orgánicos *in vitro* para la evaluación de la vía de incorporación radicular. A) Espatifilo B) lechuga y C) diferentes tratamientos utilizados en el experimento (lechuga)

El pH del medio en el que crece una planta tiene un gran impacto en el potencial de incorporación de microcontaminantes orgánicos ionizables. En este sentido, además del pH intrínseco del medio, debe tomarse en cuenta también la capacidad que tiene la raíz de la planta, mediante la liberación de exudados, de modificar el pH en los primeros milímetros del medio que la rodea (Figura V.6.). De manera general, la acidificación de la rizosfera es debida a la liberación de protones (Riley y Barber, 1971), ácidos orgánicos, aminoácidos y CO_2 (Badri y Vivanco, 2009; Rao et al., 2002). La acidificación de la rizosfera tiene implicaciones importantes en la nutrición de la planta, ya que se ha documentado que puede ayudar a solubilizar nutrientes presentes en el entorno de la planta y por tanto coadyuvar en su incorporación en ésta (Hinsinger y Gilkes, 1995). Tal implicación se vio reflejada en el experimento que se describe y detalla en el artículo 4, donde la acidificación del medio más próximo a la raíz explicaría las mayores constantes cinéticas tanto de incorporación en la planta como de desaparición en el medio observadas para compuestos ácidos. Lo anterior se puede atribuir a que una parte de los compuestos ácidos se encontrarían en su estado no iónico facilitando su entrada en la raíz.

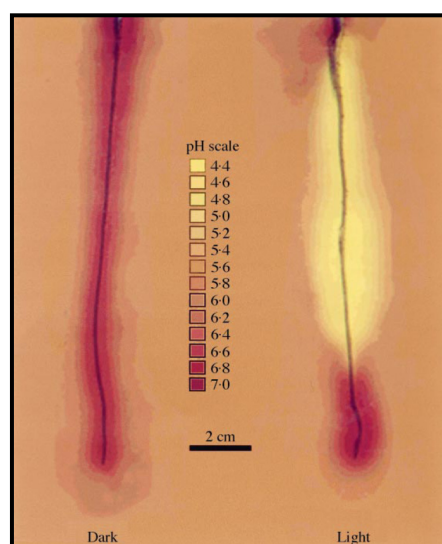


Figura V.6. Cambios de pH en la rizosfera mostrados en la raíz de *Vigna unguiculata* en condiciones de oscuridad (izquierda) y luz (derecha) después de 6 h de incubación en gel de agar con un indicador de pH (púrpura de bromocresol) y 1mM de nitrato de potasio. Reimpreso de Rao et al., 2002.

Con el objetivo determinar la existencia de relaciones significativas entre las constantes cinéticas calculadas para ambas especies vegetales (k_{uptake} y $k_{\text{depletion}}$) y las propiedades fisicoquímicas de los analitos diana ($\log K_{\text{ow}}$, k_{H} , volumen molar y solubilidad) se aplicó una prueba de estadística univariante y la correlación de Pearson. Como se ha detallado ya en el artículo científico 4 (sección V.4, Tabla 2), se encontraron correlaciones significativas entre las $k_{\text{depletion}}$ tanto de lechuga como de espatifilo y la masa molecular y $\log K_{\text{ow}}$ de los analitos diana. En el caso de la k_{uptake} para lechuga se encontró una correlación significativa con la masa molecular. No es de extrañar que para ambas constantes la masa molecular haya resultado significativo, ya que esta propiedad ha sido reportada como el factor limitante en la entrada de xenobióticos a la raíz (Kvesitadze et al., 2006b). Cabe mencionar que otras de las propiedades que se evaluaron fueron solubilidad en agua, constante de la ley de Henry y volumen molar. Sin embargo, en ninguno de los casos se obtuvo una correlación

significativa ($p < 0,05$). Debido a que la relación entre las propiedades físicas y químicas de los analitos diana anteriormente mencionadas y las constantes cinéticas calculadas podrían ser interdependientes, se aplicó una regresión lineal múltiple. Sin embargo, ninguno de los modelos probados resultó significativo, poniendo de manifiesto la complejidad de estos procesos.

Aunque los resultados obtenidos en este estudio son de gran relevancia ya que es la primera en reportar las tasas de incorporación de microcontaminantes orgánicos específicos en cultivos de interés agrícola como la lechuga. Cabe mencionarse que el diseño experimental utilizado en este estudio no contempló el análisis de la producción de exudados por parte de la planta, ni tampoco el efecto que estos podrían tener sobre los analitos diana. Adicionalmente, no se incluyó la determinación de metabolitos, una tarea laboriosa que requiere del establecimiento de una metodología específica para su extracción y determinación. Así pues, la identificación de exudados y metabolitos se plantean como futuras tareas a abordar.

En el segundo estudio realizado, se evaluó la incorporación de microcontaminantes orgánicos específicos por la vía foliar. Los resultados obtenidos se detallan y discuten en el artículo científico 5 titulado: *Foliar uptake of emerging and priority contaminants. An in vitro evidence*. El objetivo perseguido en este estudio fue el de determinar el potencial de incorporación foliar de 11 microcontaminantes orgánicos pertenecientes a 6 clases químicas: fármacos, fragancias, biocidas, insecticidas, herbicidas, fenoles estrogénicos e hidrocarburos aromáticos. Los 11 microcontaminantes se dividieron en ácidos y neutros-básicos (NB). En el diseño experimental se tomaron en cuenta un amplio rango de propiedades fisicoquímicas de interés ($\log K_{ow}$, k_H , solubilidad, volumen molar y masa molecular). Por otra parte se incluyeron en el diseño dos humedades relativas representativas de una atmósfera saturada (90 %) y una atmósfera más seca (40%), que tendrían un efecto sobre la apertura estomática. Analitos NB y ácidos se aplicaron vía atomización a hojas escindidas de lechuga de cogollo de Tudela (*Lactuca sativa*) y puestas en cámaras plásticas de humedad relativa controlada. Como se describe en el artículo 5, los analitos NB se encontraron predominantemente en la hoja, mientras que los ácidos se distribuyeron entre los compartimientos acuoso y vegetal. Se esperaba observar una diferencia en la masa de los analitos presentes en la hoja como resultado de la apertura o cierre estomáticos en función de la humedad relativa del medio. Sin embargo, al aplicar el método comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Este comportamiento podría atribuirse a que el experimento se llevó a cabo en oscuridad ocasionando posiblemente el cierre de los estomas (Greene et al., 1977). No obstante, debe mencionarse que en los últimos años se ha puesto en duda la significancia de los estomas como vía de entrada de microcontaminantes a través de la hoja (Kvesitadze et al., 2006b)

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante correlaciones de Pearson para evaluar la significancia de las propiedades fisicoquímicas de los analitos diana sobre su destino final en el sistema. Las propiedades de mayor influencia fueron sin lugar a duda la solubilidad, lipofilicidad ($\log K_{ow}$) y en menor medida volatilidad (k_H). La trascendencia de estas propiedades en la incorporación foliar de microcontaminantes orgánicos se debe a que la solubilidad y lipofilicidad son elementos determinantes en la difusión de estos compuestos a través de la cutícula.

Entre los analitos diana ácidos, la incorporación de este grupo de compuestos a través de la cutícula se ve favorecida si se encuentran en un estado no disociado, ya que de esta forma tienen una polaridad inferior y con ello pueden penetrar más fácilmente a través de la cutícula (Rolson et al., 1975; Schönherr et al., 1978). No obstante, debido a que los compuestos ácidos se encontraban en su forma ionizada (pH=7), en el pH predominante en que se suele encontrar el agua de riego agrícola, cuando se atomizaron en la hoja, su incorporación fue menor.

Estos resultados ponen de manifiesto el riesgo potencial asociado al riego por aspersión en la incorporación de microcontaminantes orgánicos específicos presentes en aguas regeneradas y superficiales.

Contextualización Global de la Tesis

“Satisfaction lies in the effort, not in the attainment,
full effort is full victory”

Mahatma Gandhi

Contextualización global de la Tesis.

El capítulo I de esta Tesis presenta una introducción completa acerca del uso de aguas regeneradas, enfocada en el riego agrícola, la presencia de microcontaminantes orgánicos en el medio acuático y sus vías principales de incorporación en plantas. Tal introducción pretende situar al lector en el contexto de la realización de los estudios plasmados en el presente manuscrito.

En el capítulo IV de esta Tesis se caracterizó la calidad química de las aguas utilizadas para riego en dos zonas agrícolas de Cataluña: Torroella de Montgrí (TM) y el Parc Agrari del Baix Llobregat (PABL). Tales resultados fueron plasmados en los artículos científicos “*Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading*” y “*Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network*”, respectivamente. En la localidad de TM se constató la presencia de 26 de los 47 microcontaminantes diana, mientras que para el PABL se determinó la presencia de 22 microcontaminantes orgánicos de los 40 analizados (objetivo específico 3).

En el estudio realizado en la zona de TM se aplicó la metodología de análisis de componentes principales para encontrar los diferentes factores que influenciaban la distribución y niveles de microcontaminantes orgánicos diana. Los factores determinantes fueron el origen de la contaminación (agua de río o efluente de la EDAR local), variabilidad temporal (periodo de sequía o no) y asociación o no a material particulado en suspensión (objetivo específico 4).

Por otra parte, en el estudio realizado en PABL se evaluó la incorporación potencial de microcontaminantes orgánicos en cultivos vegetales a través de la aplicación de dos modelos matemáticos, distinguiéndose entre compuestos ionizables y neutros (objetivo específico 5). Tal estimación tuvo como base la concentración e hidrofobicidad ($\log K_{ow}$) de los contaminantes en el agua de riego así como la fracción orgánica del suelo. Las concentraciones estimadas en el tejido vegetal seco oscilaron entre $<0.001 - 7.67 \mu\text{g kg}^{-1}$. Debido a que estos resultados apuntaron claramente a una incorporación potencial por parte de los cultivos de los microcontaminantes presentes en las aguas de riego, se realizó el análisis del tejido vegetal de dos cultivos de la localidad de TM: alfalfa, *Medicago sativa*, y hoja de manzano, *Malus domestica*. Para este propósito se desarrolló y optimizó una metodología analítica específica para la determinación de estos compuestos en matrices vegetales (objetivo específico 1). Tal metodología se recoge en el capítulo III de la Tesis, concretamente en el artículo científico “*Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination*”. Así, se estableció la presencia de 5 de los analitos diana estudiados: ibuprofeno, naproxeno, metil dihidrojasmonato, cafeína y tonalida, en las matrices vegetales anteriormente mencionadas (objetivo específico 2).

A raíz de las conclusiones obtenidas en el capítulo IV de la Tesis, donde se confirmó la incorporación de microcontaminantes orgánicos por parte de tejidos vegetales en condiciones de campo reales, se consideró necesaria la caracterización de los procesos más relevantes en la incorporación de estas sustancias en plantas. En este sentido en el capítulo V se evaluó la incorporación radicular y foliar de microcontaminantes orgánicos mediante estudios *in vitro*. Los resultados obtenidos se recogen en dos artículos científicos: “*Uptake of Organic Emergent Contaminants in Spath and Lettuce: An In Vitro Experiment*” y “*Foliar uptake of emerging and priority contaminants. An in vitro evidence*”, respectivamente. En la evaluación de la incorporación vía

radicular se consideraron 6 microcontaminantes orgánicos con diferentes características fisicoquímicas y dos plantas modelo (espatifilo, *Spathiphyllum* sp., y lechuga, *Lactuca sativa*). Tanto la reducción de la concentración de los analitos diana en el medio de cultivo, como resultado de la presencia de las plantas, la incorporación de éstos en el tejido, así como su metabolización, fueron procesos que se ajustaron a cinéticas de reacción de primer orden. En la velocidad de estos procesos fue determinante la estructura química del analito diana así como sus propiedades fisicoquímicas ($\log K_{ow}$, peso molecular). La incorporación en la planta de los analitos ionizables pareció verse favorecida con el efecto *ion trap*, traduciéndose en constantes cinéticas de incorporación más elevadas (objetivo específico 6).

Por otro lado, se evaluó la incorporación foliar *in vitro* de 11 microcontaminantes orgánicos en cogollos de lechuga, *Lactuca sativa*. Se determinó que bajo las condiciones de experimentación la humedad relativa (40 vs. 90%) no tenía una repercusión estadísticamente significativa en la sorción de los analitos diana en la hoja. Sin embargo, mediante el uso de correlaciones estadísticas, se evidenció a la solubilidad, volatilidad y polaridad eran las propiedades fisicoquímicas de los compuestos con mayor impacto sobre el potencial de incorporación foliar de estos contaminantes (objetivo específico 7).

Conclusiones

“The only source of knowledge is experience”





Albert Einstein

Metodología para la determinación de microcontaminantes orgánicos en matrices ambientales







- 🌳 Se optimizó la metodología analítica de HS-SPME-GC-ECD para la determinación de THMs en aguas regeneradas y superficiales.
- 🌳 Se desarrolló y validó la metodología de SPE-GC(PCI)-MS para la determinación de N-nitrosaminas en aguas regeneradas y superficiales.
- 🌳 Se desarrolló y validó una metodología multiresiduo para la determinación de 13 microcontaminantes orgánicos en lechuga mediante el uso de superficies de respuesta y la función de deseabilidad. Tal método se basó en la combinación de 2 metodologías extractivas (MSPD y PLE), separación mediante GC y detección mediante MS/MS.

Evaluación de la calidad química de las aguas de riego utilizadas en dos zonas agrícolas catalanas

- 🌳 Se identificaron y cuantificaron 26 microcontaminantes orgánicos de un total de 47 analizados, en aguas de riego agrícola del municipio de Torroella de Montgrí, durante un estudio llevado a cabo entre 2007 y 2008.
- 🌳 La zona de riego influenciada por la EDAR presentó una mayor cantidad de contaminantes recalcitrantes como la carbamazepina, mientras la zona influenciada por el río Ter presentó mayores concentraciones de compuestos fácilmente eliminables por las EDARs, p. ej., cafeína, ibuprofeno, metil dihidrojasmonato, galaxolida y tonalida.
- 🌳 Los factores espacial, temporal y concentración de material particulado fueron las componentes con más peso en la distribución de microcontaminantes orgánicos en la zona de riego de Torroella de Montgrí.
- 🌳 Se estimó la aportación másica de microcontaminantes orgánicos a los suelos agrícolas a partir de los regímenes de riego. Tal estimación estuvo comprendida en un rango de g ha^{-1} por ciclo de cultivo.
- 🌳 Se determinó la presencia de ibuprofeno, naproxeno, metil dihidrojasmonato, cafeína y tonalida en dos especies vegetales (hojas de manzano y alfalfa) cultivadas en condiciones de campo reales bajo regímenes de irrigación que combinan aguas superficiales (río Ter) y efluente de EDAR (EDAR-TM).
- 🌳 Se identificaron y cuantificaron 22 microcontaminantes de un total de 40 analizados, en aguas de riego agrícola del Baix-Llobregat. La presencia de estos microcontaminantes osciló entre 0,001 y 5,13 $\mu\text{g L}^{-1}$.
- 🌳 Debido al alto impacto que tienen las aguas depuradas sobre la riera Rubí que alimenta al Canal de la Infanta, éste último exhibió la mayor presencia de microcontaminantes.

-  Procesos ambientales tales como la sorción, biodegradación, fotodegradación y volatilización parecen contribuir a la atenuación de microcontaminantes orgánicos en el sistema a cielo abierto de canales de irrigación utilizado en el Parc Agrari del Baix Llobregat.
-  Se estimó la concentración de los microcontaminantes cuantificados en el tejido de los cultivos irrigados, mediante la aplicación de 2 modelos matemáticos, diferenciando entre compuestos ionizables y neutros. Las concentraciones estimadas oscilaron entre $<0,001$ y $7,68 \mu\text{g kg}^{-1}$, ps.
-  Se evaluó la aplicabilidad de los modelos mediante la comparación de concentraciones estimadas con concentraciones obtenidas experimentalmente. Tal evaluación fue considerada satisfactoria, a pesar de que se observó cierta desviación entre los valores estimados y experimentales, puesto que ambos fueron de la misma magnitud.
-  Se calculó la exposición humana a los microcontaminantes orgánicos cuantificados en base al consumo de frutas y vegetales cifrándose de <1 a 461 ng por persona y día.

Incorporación vía radicular y foliar in vitro de dos plantas modelo

-  Se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento (peso y talla) de plántulas de espatifilo cultivadas en medio dopado con respecto a las plantas control, mientras estas diferencias no fueron significativas en el caso de la lechuga.
-  La fotólisis fue un factor importante en la reducción de triclosan, tonalida y naproxeno del medio de cultivo, llegándose a una pérdida del 70% a los 64 días del estudio. Por otro lado, la concentración de ácido hidrocínámico, ácido clofíbrico e ibuprofeno permaneció constante.
-  Se evidenció, al cabo de 30 días, una mayor reducción de los analitos diana en los cultivos con lechuga (85-99%) que en aquellos con espatifilo (51-81%).
-  La eliminación de los analitos del medio de cultivo se ajustó a cinéticas de pseudo primer orden en ambas especies vegetales. En el caso de la lechuga esta constante se correlacionó con el peso molecular y $\log K_{ow}$, mientras que la constante calculada para espatifilo únicamente se correlacionó con esta última propiedad. Las constantes de depleción para el ácido hidrocínámico, ácido clofíbrico y naproxeno fueron las más elevadas en ambas especies ($0,025\text{--}0,179 \text{ d}^{-1}$). Este comportamiento se puede atribuir a su actividad fitohormonal y a sus propiedades fisicoquímicas.
-  Se observó un máximo en la concentración de los analitos en el tejido (día 15 – 22) seguido de una disminución drástica. Este comportamiento se atribuyó al sistema de detoxicación de la planta.
-  La incorporación de microcontaminantes orgánicos en el tejido vegetal de lechuga se ajustó a una cinética de pseudo primer orden ($0,077\text{--}0,236 \text{ d}^{-1}$), correlacionándose con el peso molecular.

- 🌳 Se observó que después de la atomización de hojas de lechuga con agua dopada con 11 microcontaminantes orgánicos, el destino final de los analitos neutros y básicos era la superficie foliar, mientras que los analitos de naturaleza ácida, se distribuían entre la superficie foliar y el agua de lavado.
- 🌳 No se observaron diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) en la distribución (fase acuosa y tejido vegetal) de microcontaminantes entre hojas expuestas a bajas (40%) o altas (90%) humedades relativas.
- 🌳 Mediante la aplicación de análisis estadístico univariante, se determinó el impacto de las propiedades fisicoquímicas del compuesto en cuestión en el destino final de éste. Las propiedades que ejercieron un mayor impacto fueron solubilidad, volatilidad (k_H) y $\log K_{ow}$.

Referencias

“Cuando bebas agua recuerda la fuente”

Proverbio chino

- Abraham, E.P. and Chain, E. (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146, 837-837.
- ACA (2008) Cataluña bajo los efectos de la sequía 2007 - 2008, Agència Catalana de l'aigua.
- Aeppli, C., Berg, M., Hofstetter, T.B., Kipfer, R. y Schwarzenbach, R.P. (2008) Simultaneous quantification of polar and non-polar volatile organic compounds in water samples by direct aqueous injection-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1181(1-2), 116-124.
- Aga, D. (2008) Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment, CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Agilent Technologies (2009) Highly sensitive and rugged GC/MS/MS Tool: for pesticide multiresidue analysis in food samples.
- Alexander, F.E., Patheal, S.L., Biondi, A., Brandalise, S., Cabrera, M.-E., Chan, L.C., Chen, Z., Cimino, G., Cordoba, J.-C., Gu, L.-J., Hussein, H., Ishii, E., Kamel, A.M., Labra, S., Magalhaes, I.Q., Mizutani, S., Petridou, E., de Oliveira, M.P., Yuen, P., Wiemels, J.L. y Greaves, M.F. (2001) Transplacental Chemical Exposure and Risk of Infant Leukemia with MLL Gene Fusion. *Cancer Research* 61(6), 2542-2546.
- Allonier, A.S., Khalanski, M., Bermond, A. y Camel, V. (2000) Determination of trihalomethanes in chlorinated sea water samples using a purge-and-trap system coupled to gas chromatography. *Talanta* 51(3), 467-477.
- Almeida Bezerra, M., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. y Escalera, L.A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76(5), 965-977.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D. y Schenck, F.J. (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86(2), 412-431.
- Angeles, G., Bond, B., Boyer, J.S., Brodribb, T., Brooks, J.R., Burns, M.J., Cavender-Bares, J., Clearwater, M., Cochard, H., Comstock, J., Davis, S.D., Domec, J.C., Donovan, L., Ewers, F., Gartner, B., Hacke, U., Hinckley, T., Holbrook, N.M., Jones, H.G., Kavanagh, K., Law, B., Lopez-Portillo, J., Lovisolo, C., Martin, T., Martinez-Vilalta, J., Mayr, S., Meinzer, F.C., Melcher, P., Mencuccini, M., Mulkey, S., Nardini, A., Neufeld, H.S., Passioura, J., Pockman, W.T., Pratt, R.B., Rambal, S., Richter, H., Sack, L., Salleo, S., Schubert, A., Schulte, P., Sparks, J.P., Sperry, J., Teskey, R. y Tyree, M. (2004) The Cohesion-Tension theory. *New Phytologist* 163(3), 451-452.
- Aranami, K. y Readman, J.W. (2007) Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere* 66(6), 1052-1056.
- Arnot, J.A., Simeonov, L.I. y Hassanien, M.A. (2009), pp. 69-91, Springer Netherlands.
- Asano, T. (1998) Wastewater Reclamation and Reuse: Water Quality Management Library, CRC Press, Boca ratón, Florida.
- Asano, T. y Levine, A.D. (1996) Wastewater reclamation, recycling and reuse: Past, present, and future. *Water Science and Technology* 33(10-11), 1-14.
- Ashley, R.P. y Lloyd, J.W. (1978) An example of the use of factor analysis and cluster analysis in groundwater chemistry interpretation. *Journal of Hydrology* 39(3-4), 355-364.
- AWWA (1999) Water quality and treatment: a handbook of community public water supplies, McGraw-Hill, New York.
- AWWA (1995) Water Sources: Principles and Practices of Water Supply Operations., Denver.
- Badri, D.V. y Vivanco, J.M. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell and Environment* 32(6), 666-681.
- Barber, L.B., Leenheer, J.A., Pereira, W.E., Noyes, T.I., Brown, G.K., Tabor, C.F. y Writer, J.H. (1995) Organic Contamination of the Mississippi River from Municipal and Industrial Wastewater in Contaminants in the Mississippi River, U.S.Geological.Survey, Reston,VA.
- Barker, S. (2007) Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70(2), 151-162.
- Bartelt-Hunt, S., Snow, D.D., Damon-Powell, T. y Miesbach, D. (2011) Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *Journal of Contaminant Hydrology* 123(3-4), 94-103.

- Bartelt-Hunt, S.L., Snow, D.D., Damon, T., Shockley, J. y Hoagland, K. (2009) The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environmental Pollution* 157(3), 786-791.
- Bartha, B., Huber, C., Harpaintner, R. y Schröder, P. (2010) Effects of acetaminophen in *Brassica juncea* L. Czern.: investigation of uptake, translocation, detoxification, and the induced defense pathways. *Environmental Science and Pollution Research* 17(9), 1553-1562.
- Bauer, H. y Schonherr, J. (1992) Determination of mobilities of organic compounds in plant cuticles and correlation with molar volumes. *Pesticide Science* 35(1), 1-11.
- Baur, J.R., Bovey, R.W. y Riley, I. (1974) Effect of pH on foliar uptake of 2,4,5-T-1-C-14. *Weed Science* 22(5), 481-486.
- Baur, P., Marzouk, H., Schönherr, J. y Bauer, H. (1996) Mobilities of organic compounds in plant cuticles as affected by structure and molar volumes of chemicals and plant species. *Planta* 199(3), 404-412.
- Bellar, T.A., Lichtenberg, J.J. y Kroner, R.C. (1974) Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters. *Journal American Water Works Association* 66(12), 703-706.
- Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R. y Loge, F.J. (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* 122(3), 195-204.
- Bhandari, A., Surampalli, R., Adams, C., Champagne, P., Ong, S., Tyagi, R.D. y Zhang, T. (2009) Contaminants of Emerging Environmental Concern, American Society of Civil Engineers Reston, Virginia.
- Biziuk, M., Namiesnik, J., Czerwinski, J., Gorlo, D., Makuch, B., Janicki, W. y Polkowska, Z. (1996) Occurrence and determination of organic pollutants in tap and surface waters of the Gdansk district. *Journal of Chromatography A* 733(1-2), 171-183.
- Boreen, A.L., Arnold, W.A. y McNeill, K. (2003) Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 65(4), 320-341.
- Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E.J. y Croxford, A. (2004) Veterinary medicines in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 180 180, 1-91.
- Boxall, A.B.A., Johnson, P., Smith, E.J., Sinclair, C.J., Stutt, E. y Levy, L.S. (2006) Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(6), 2288-2297.
- Briggs, G.G., Bromilow, R.H. y Evans, A.A. (1982) The relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide Science* 13, 459 - 504.
- Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A.A. y Willams, M. (1983) Relationship between lipophilicity and the distribution of non-ionized chemicals in barley shoot following uptake by the root. *Pesticide Science* 14, 492 - 500.
- Bromilow, R.H., Chamberlain, K. y Evans, A.A. (1990) Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Science* 38(3), 305-314.
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M. and La Point, T.W. (2003) Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology Letters* 142(3), 169-183.
- Brown, D., Bridgeman, J. y West, J.R. (2011) Predicting chlorine decay and THM formation in water supply systems. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* 10(1), 79-99.
- Buerge, I., Buser, H.R., Müller, M. y Poiger, T. (2003) Behavior of the Polycyclic Musks HHCB and AHTN in Lakes, Two Potential Anthropogenic Markers for Domestic Wastewater in Surface Waters. *Environmental Science and Technology* (37), 5636-5644.
- Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D. y Buser, H.-R. (2003) Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental Science and Technology* 37(4), 691-700.
- Buser, H.-R., Poiger, T. y Müller, M.D. (1999) Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science and Technology* 33(15), 2529-2535.
- Buser, H.-R., Poiger, T. y Müller, M.D. (1998) Occurrence and Fate of the Pharmaceutical Drug Diclofenac in Surface Waters: Rapid Photodegradation in a Lake. *Environmental Science and Technology* 32(22), 3449-3456.

- Buszewski, B. y Ligor, T. (2001) Application of Different Extraction Methods for the Quality Control of Water. *Water, Air, & Soil Pollution* 129(1), 155-165.
- Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Matamoros, V. y Bayona, J.M. (2011) Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading. *Water Research* 45(1), 221-231.
- Campillo, N., Vinas, P., Lopez-Gacia, I., Aguinaga, N. y Hernandez-Cordoba, A. (2004) Purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection for volatile halogenated organic compounds determination in waters and beverages. *Journal of Chromatography A* 1035(1), 1-8.
- Carballa, M., Omil, F. y Lema, J.M. (2008) Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. *Chemosphere* 72(8), 1118-1123.
- Caro, J., Serrano, A. y Gallego, M. (2007) Direct screening and confirmation of priority volatile organic pollutants in drinking water. *Journal of Chromatography A* 1138(1-2), 244-250.
- Castro, S., Davis, L.C. y Erickson, L.E. (2004) Temperature and pH effects on plant uptake of benzotriazoles by sunflowers in hydroponic culture. *International Journal of Phytoremediation* 6(3), 209-225.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A. y Barceló, D. (2006) Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385(6), 992-1000.
- Charrois, J.W.A., Arend, M.W., Froese, K.L. y Hrudey, S.E. (2004) Detecting N-Nitrosamines in Drinking Water at Nanogram per Liter Levels Using Ammonia Positive Chemical Ionization. *Environmental Science and Technology* 38(18), 4835-4841.
- Chen, D.H., Zeng, X.Y., Sheng, Y.Q., Bi, X.H., Gui, H.Y., Sheng, G.Y. y Fu, J.M. (2007) The concentrations and distribution of polycyclic musks in a typical cosmetic plant. *Chemosphere* 66(2), 252-258.
- Chen, J., Fluharty, F.L., St-Pierre, N., Morrison, M. y Yu, Z. (2008) Technical note: Occurrence in fecal microbiota of genes conferring resistance to both macrolide-lincosamide-streptogramin B and tetracyclines concomitant with feeding of beef cattle with tylosin. *Journal of Animal Science* 86, 2385-2391.
- Chen, Z. y Valentine, R.L. (2007) Formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from humic substances in natural water. *Environmental Science and Technology* 41(17), 6059-6065.
- Chen, Z. y Valentine, R.L. (2006) Modeling the formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from the reaction of natural organic matter (NOM) with monochloramine. *Environmental Science and Technology* 40(23), 7290-7297.
- Cho, D.-H., Kong, S.-H. y Oh, S.-G. (2003) Analysis of trihalomethanes in drinking water using headspace-SPME technique with gas chromatography. *Water Research* 37(2), 402-408.
- Choi, J.H. y Valentine, R.L. (2002) Formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from reaction of monochloramine: a new disinfection by-product. *Water Research* 36(4), 817-824.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N. y Kroiss, H. (2005) Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* 39(19), 4797-4807.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. y Soto, A.M. (1994) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Impact Assessment Review* 14(5-6), 469-489.
- Coleman, J.O.D., BlakeKalf, M.M.A. y Davies, T.G.E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* 2(4), 144-151.
- Collier, A.C. (2007) Pharmaceutical contaminants in potable water: Potential concerns for pregnant women and children. *Ecohealth* 4(2), 164-171.
- Costa Ferreira, S.L., Bruns, R.E., da Silva, E.G.P., dos Santos, W.N.L., Quintella, C.M., David, J.M., de Andrade, J.B., Breitkreitz, M.C., Jardim, I.C.S.F. y Neto, B.B. (2007) Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A* 1158(1-2), 2-14.

- Culea, M., Cozar, O. y Ristoiu, D. (2006) Methods validation for the determination of trihalomethanes in drinking water. *Journal of Mass Spectrometry* 41(12), 1594-1597.
- Curren, M.S.S. y King, J.W. (2002) New sample preparation technique for the determination of avoparcin in pressurized hot water extracts from kidney samples. *Journal of Chromatography A* 954(1-2), 41-49.
- Daughton, C.G. y Ternes, T.A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107, 907-938.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C. y Hartemann, P. (2011) Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*; 214, 442-8.
- Dixon, H.H. y Joly, J. (1895) On the Ascent of Sap. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. B 186, 563-576.
- Down, R. y Lehr, J. (2005) Environmental Instrumentation and Analysis Handbook, Jon Wiley and Sons Inc., New Jersey.
- Edzwald, J. (2011) Water quality and treatment, McGraw-Hill, New York.
- Eichert, T. y Goldbach, H.E. (2008) Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces - further evidence for a stomatal pathway. *Physiologia Plantarum* 132(4), 491-502.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. y Goldbach, H.E. (2008) Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum* 134(1), 151-160.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Eggen, R.I.L. y Richter, M. (2005) In Vitro Assessment of Modes of Toxic Action of Pharmaceuticals in Aquatic Life. *Environmental Science and Technology* 39(9), 3090-3100.
- Elosegui, A. and Pozo, J. (1994) Spatial versus temporal variability in the physical and chemical characteristics of the Aguera stream (northern Spain). *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* 15(5), 543-559.
- Espadaler, I., Caixach, J., Om, J., Ventura, F., Cortina, M., Paune, F. y Rivera, J. (1997) Identification of organic pollutants in Ter river and its system of reservoirs supplying water to Barcelona/Catalonia, Spain: A study by GC/MS and FAB/MS. *Water Research* 31(8), 1996-2004.
- FAO (2005) Managing water scarcity for water security, Food and Agriculture Organization.
- Fent, K., Weston, A.A. y Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76(2), 122-159.
- Ferrer, I., Zweigenbaum, J.A. y Thurman, E.M. (2010) Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. *Journal of Chromatography A* 1217(36), 5674-5686.
- Fidalgo-Used, N., Blanco-González, E. y Sanz-Medel, A. (2007) Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chimica Acta* 590(1), 1-16.
- Fismes, J., Perrin-Ganier, C., Empereur-Bissonnet, P. y Morel, J.L. (2002) Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 31(5), 1649-1656.
- Fong, P.P. (1998) Zebra Mussel Spawning Is Induced in Low Concentrations of Putative Serotonin Reuptake Inhibitors. *The Biological Bulletin* 194(2), 143-149.
- Fong, P.P., Huminski, P.T. y D'Urso, L.M. (1998) Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *Journal of Experimental Zoology* 280(3), 260-264.
- Fries, G.F. y Marrow, G.S. (1981) Chlorobiphenyl movement from soil to soybean plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29(4), 757-759.
- Fry, D.M. y Toone, C.K. (1981) DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213(4510), 922-924.
- Frye, C., Bo, E., Calamandrei, G., Calzà, L., Dessi-Fulgheri, F., Fernández, M., Fusani, L., Kah, O., Kajta, M., Le Page, Y., Patisaul, H.B., Venerosi, A., Wojtowicz, A.K. y Panzica, G.C. (2012) Endocrine Disruptors: A Review of Some

- Sources, Effects, and Mechanisms of Actions on Behaviour and Neuroendocrine Systems. *Journal of Neuroendocrinology*24(1), 144-159.
- Fuerhacker, M. (2009) EU Water Framework Directive and Stockholm Convention Can we reach the targets for priority substances and persistent organic pollutants? *Environmental Science and Pollution Research* 16, 92-97.
- Gallard, H. y von Gunten, U. (2002) Chlorination of natural organic matter: kinetics of chlorination and of THM formation. *Water Research* 36(1), 65-74.
- Garden Resources (2010) Photosynthesis. <http://www.tigersheds.com/garden-resources/?tag=/photosynthesis>.
- Gatermann, R., Hellou, J., Hühnerfuss, H., Rimkus, G. y Zitko, V. (1999) Polycyclic and nitro musks in the environment: A comparison between Canadian and European aquatic biota. *Chemosphere*38(14), 3431-3441.
- Gao, Y.Z. y Collins, C.D. (2009) Uptake pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons in white clover. *Environmental Science and Technology*43, 6190 - 6195.
- Gao, Y.Z., Ling, W.T. y Wong, M.H. (2006) Plant-accelerated dissipation of phenanthrene and pyrene from water in the presence of a nonionic-surfactant. *Chemosphere*63, 1560 - 1567.
- Gerecke, A.C. y Sedlak, D.L. (2003) Precursors of N-Nitrosodimethylamine in Natural Waters. *Environmental Science and Technology*37(7), 1331-1336.
- Gillett, J.W. (1983) A comprehensive prebiological screen for ecotoxicologic effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*2(4), 463-476.
- Glassmeyer, S.T., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Cahill, J.D., Zaugg, S.D., Werner, S.L., Meyer, M.T. y Kryak, D.D. (2005) Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination. *Environmental Science and Technology*39(14), 5157-5169.
- Golfinopoulos, S.K., Lekkas, T.D. y Nikolaou, A.D. (2001) Comparison of methods for determination of volatile organic compounds in drinking water. *Chemosphere*45(3), 275-284.
- Gonzalez-Gago, A., Marchante-Gayo, J.M. y Alonso, J.I.G. (2007) Determination of trihalomethanes in drinking water by GC-ICP-MS using compound independent calibration with internal standard. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*22(9), 1138-1144.
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D. y Gennaro, M.C. (2010) Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(25), 3929-3937.
- Government of Canada (1999) Canadian Environmental Protection Act. Canada Gazette Part III. 22.
- Grebel, J.E., Young, C.C. y Suffet, I.H. (2006) Solid-phase microextraction of N-nitrosamines. *Journal of Chromatography A* 1117(1), 11-18.
- Guimaraes, A.D., Carvalho, J.J., Goncalves, C. y Alpendurada, M.D. (2008) Simultaneous analysis of 23 priority volatile compounds in water by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and estimation of the method's uncertainty. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*88(3), 151-164.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C. y Jørgensen, S.E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 36(2), 357-393.
- Health Canada (2011) Guidelines for canadian drinking water quality: guideline technical document N-Nitrosodimethylamine (NDMA) Water, Air and Climate Change Bureau., Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Minister of Health.
- Heberer, T. (2003) Occurrence, fate, and assessment of polycyclic musk residues in the aquatic environment of urban areas - A review. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 30(5-6), 227-243.
- Heberer, T. (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131(1-2), 5-17.
- Heberer, T. y Adam, M. (2005) Hot Spot Pollutants: Pharmaceuticals in the Environment (Advances in Pharmacology), Elsevier Academic Press, Burlington, MA.

- Heberer, T., Reddersen, K. y Mechlinski, A. (2002) From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Science and Technology* 46(3), 81-88.
- Helena, B., Pardo, R., Vega, M., Barrado, E., Fernandez, J.M. y Fernandez, L. (2000) Temporal evolution of groundwater composition in an alluvial aquifer (Pisuerga River, Spain) by principal component analysis. *Water Research* 34(3), 807-816.
- Hetherington, A.M. y Woodward, F.I. (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424(6951), 901-908.
- Hinsinger, P. y Gilkes, R.J. (1995) Root-induced dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of lupins grown in alkaline soil. *Australian Journal of Soil Research* 33(3), 477-489.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. y Kratz, K.L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment* 225(1-2), 109-118.
- Hoffmann, E. y Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Wiley, Chichester.
- Hübschmann, H.J. (2001) *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*, Wiley VCH, Weinheim.
- Hülster, A., Müller, J.F. y Marschner, H. (1994) Soil-plant transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to vegetables of cucumber family (cucurbitaceae). *Environmental Science and Technology* 28(6), 1110-1115.
- IPCC (2007) *IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change 2007*. Pachauri, R.K. and Reisinger, A. (eds), IPCC, Geneva.
- Jacangelo, J.G. y Trussell, R.R. (2002) International report: water and wastewater disinfection - trends, issues and practices. 2nd World Water Congress: Water and Health-Microbiology, *Monitoring and Disinfection* 2(3), 147-157.
- Jeśman, C., Młodzik, A. y Cybulska, M. (2011) History of antibiotics and sulphonamides discoveries. *Polski Merkuriusz Lekarski* 179, 320.
- Jiménez, B. y Asano, T. (2008) *Water Reuse. An International Survey of current practice issues and needs*, IWA Publishing, London.
- Jjemba, P.K. (2008) *Pharma-Ecology: The Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Jobb, D.B., Hunsinger, R.B., Meresz, O. y Taguchi, V. (1994) Removal of N-Nitrosodimethylamine From the Ohsweken (Six Nations) Water Supply, Ontario Ministry of Environment and Energy, Toronto.
- Jolliffe, I.T. (2002) *Principal Component Analysis*, Springer-Verlag, New York.
- Kang, F., Chen, D., Gao, Y. y Zhang, Y. (2010) Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *BMC Plant Biology* 10(1), 210.
- Karnjanapiboonwong, A., Chase, D.A., Cañas, J.E., Jackson, W.A., Maul, J.D., Morse, A.N. y Anderson, T.A. (2011) Uptake of 17 α -ethynylestradiol and triclosan in pinto bean, *Phaseolus vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(5), 1336-1342.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M. y Guwy, A.J. (2007) Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography - positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1161(1-2), 132-145.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M. y Guwy, A.J. (2009) The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research* 43(2), 363-380.
- Kay, P., Blackwell, P.A. y Boxall, A.B.A. (2005) Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere* 59(7), 951-959.
- Keefer, L.K. y Roller, P.P. (1973) N Nitrosation by nitrite ion in neutral and basic medium. *Science* 181(4106), 1245-1247.

- Khuri, A. (2006) Response Surface Methodology, World Scientific Publishing Co., Singapore.
- Kinney, C.A., Furlong, E.T., Werner, S.L. y Cahill, J.D. (2006) Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(2), 317-326.
- Koch, R. (1881) Ueber Desinfection. *Mittheilungen aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt* 1, 234-282.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. y Buxton, H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36(6), 1202-1211.
- Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T. y Zaugg, S.D. (2004) Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of The Total Environment* 328(1-3), 119-130.
- Kong, W.D., Zhu, Y.G., Liang, Y.C., Zhang, J., Smith, F.A. y Yang, M. (2007) Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution* 147(1), 187-193.
- Korte, F., Kvesitadze, G., Ugrekhelidze, D., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Buadze, O., Zaalishvili, G. y Coulston, F. (2000) Organic Toxicants and Plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47(1), 1-26.
- Kosjek, T., Heath, E. y Krbavcic, A. (2005) Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment International* 31(5), 679-685.
- Koukouraki, E. y Diamadopoulos, E. (2003) Modelling the formation of THM (trihalomethanes) during chlorination of treated municipal wastewater, pp. 277-284.
- Kozani, R.R., Assadi, Y., Shemirani, F., Hosseini, M.R.M. y Jamali, M.R. (2007) Determination of trihalomethanes in drinking water by dispersive liquid-liquid microextraction then gas chromatography with electron-capture detection. *Chromatographia* 66(1-2), 81-86.
- Krasner, S., Westerhoff, P., Chen, B., Amy, G., Nam, S., Chowdhury, Z., Sinha, S. and Rittmann B. (2008) Contribution of Wastewater to DBP Formation. American Water Works Association Research.
- Krasner, S.W. (2009) The formation and control of emerging disinfection by-products of health concern. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* 367(1904), 4077-4095.
- Krasner, S.W., Westerhoff, P., Chen, B., Rittmann, B.E. y Amy, G. (2009) Occurrence of Disinfection Byproducts in United States Wastewater Treatment Plant Effluents. *Environmental Science and Technology* 43(21), 8320-8325.
- Krauss, M., Longrée, P., Dorusch, F., Ort, C. and Hollender, J. (2009) Occurrence and removal of N-nitrosamines in wastewater treatment plants. *Water Research* 43(17), 4381-4391.
- Kristenson, E.M., Ramos, L. y Brinkman, U.A.T. (2006) Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 25(2), 96-111.
- Kristich, M.A. y Schwarz, O.J. (1989) Characterization of ¹⁴C-naphthol uptake in excised root segments of clover (*Trifolium pratense* L.) and fescue (*Festuca arundinaceae* Scrb.). *Environmental Monitoring and Assessment* 13(1), 35-44.
- Kuehn, W. and Mueller, U. (2000) Riverbank filtration - An overview. *Journal American Water Works Association* 92(12).
- Kuivinen, J. y Johnsson, H. (1999) Determination of trihalomethanes and some chlorinated solvents in drinking water by headspace technique with capillary column gas-chromatography. *Water Research* 33(5), 1201-1208.
- Kümmerer, K. (2004) Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(2), 311-320.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Barata, C., Raldúa, D. y Barceló, D. (2008) Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 75(2), 390-401.
- Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T. y Ramsden, J. (2006) Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants Basis of Phytoremediation, Springer, Berlin Heidelberg.
- Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T. y Ramsden, J. (2006), pp. 55-102, Springer Berlin Heidelberg.

- Kwon, J.W. (2011) Mobility of Veterinary Drugs in Soil with Application of Manure Compost. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87(1), 40-44.
- Lazarova, V. y Bahri, A. (2005) Water reuse for irrigation. Agricultura, landscapes and turf grass, CRC Press, Boca ratón, Florida.
- Le Roux, J., Gallard, H. y Croue, J.P. (2011) Chloramination of nitrogenous contaminants (pharmaceuticals and pesticides): NDMA and halogenated DBPs formation. *Water Research* 45(10), 3164-3174.
- Leardi, R. (2009) Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 652(1-2), 161-172.
- Lee, C. y Yoon, J. (2007) UV-A induced photochemical formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) in the presence of nitrite and dimethylamine. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 189(1), 128-134.
- Lee, C., Yoon, J. y Von Gunten, U. (2007) Oxidative degradation of N-nitrosodimethylamine by conventional ozonation and the advanced oxidation process ozone/hydrogen peroxide. *Water Research* 41(3), 581-590.
- Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E. y Leepipatiboon, N. (2010) Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1217(16), 2548-2560.
- Leivadara, S.V., Nikolaou, A.D. y Lekkas, T.D. (2008) Determination of organic compounds in bottled waters. *Food Chemistry* 108(1), 277-286.
- Li, Y., Zhou, Q., Wang, Y. y Xie, X. (2011) Fate of tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane brominated flame retardants in soil and uptake by plants. *Chemosphere* 82(2), 204-209.
- Lin, H., Tao, S., Zuo, Q. y Coveney, R.M. (2007) Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. *Environmental Pollution* 148(2), 614-619.
- Linde, C.D. (1994) Physico-Chemical and Environmental Fate of Pesticides, USEPA, Sacramento, California.
- Lishman, L., Smyth, S.A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M. y Seto, P. (2006) Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment* 367(2-3), 544-558.
- Llop, A., Borrull, F. y Pocurull, E. (2010) Fully automated determination of N-nitrosamines in environmental waters by headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS-MS. *Journal of Separation Science* 33(23-24), 3692-3700.
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M. y Ternes, T. (2005) Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environmental Science and Technology* 39(14), 5209-5218.
- Loos, R., Locoro, G. y Contini, S. (2010) Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis. *Water Research* 44(7), 2325-2335.
- Loraine, G.A. y Pettigrove, M.E. (2005) Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California. *Environmental Science and Technology* 40(3), 687-695.
- Mackay, D. (2001) Multimedia Environmental Models: The Fugacity Approach, Second Edition, CRC Press, Boca Raton.
- MacLeod, M. y McKone, T.E. (2004) Multimedia persistence as an indicator of potential for population-level intake of environmental contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(10), 2465-2472.
- Manirakiza, P., Covaci, A. y Schepens, P. (1999) Solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric determination of capsaicin and some of its analogues from chili peppers (*Capsicum* spp.). *Journal of AOAC International* 82(6), 1399-1405.
- Marklund, A., Andersson, B. y Haglund, P. (2005) Organophosphorus Flame Retardants and Plasticizers in Swedish Sewage Treatment Plants. *Environmental Science and Technology* 39(19), 7423-7429.
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Sitka, A., Scharf, S. y Gans, O. (2007) Determination of selected organophosphate esters in the aquatic environment of Austria. *Science of the Total Environment* 388(1-3), 290-299.

- Mastovska, K. y Lehotay, S.J. (2004) Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A* 1040(2), 259-272.
- Matamoros, V., Arias, C., Brix, H. y Bayona, J.M. (2009) Preliminary screening of small-scale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. *Water Research* 43(1), 55-62.
- Matamoros, V. y Bayona, J.M. (2006) Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands. *Environmental Science and Technology* 40(18), 5811-5816.
- Matamoros, V., García, J. y Bayona, J.M. (2005) Behavior of Selected Pharmaceuticals in Subsurface Flow Constructed Wetlands: A Pilot-Scale Study. *Environmental Science and Technology* 39(14), 5449-5454.
- Matamoros, V., Jover, E. y Bayona, J.M. (2010) Part-per-Trillion Determination of Pharmaceuticals, Pesticides, and Related Organic Contaminants in River Water by Solid-Phase Extraction Followed by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 82(2), 699-706.
- Matamoros, V., Mujeriego, R. y Bayona, J.M. (2007) Trihalomethane occurrence in chlorinated reclaimed water at full-scale wastewater treatment plants in NE Spain. *Water Research* 41(15), 3337-3344.
- McAllister, T.A., Yanke, L.J., Inglis, G.D. y Olson, M.E. (2001) Is antibiotic use in dairy cattle causing antibiotic resistance? *Advances in Dairy Technology* 13, 229-242.
- McKay, L.D. (1998) Hydrogeology and Groundwater Contamination. In: S.D. Pillai (Ed.). *Microbial Pathogens within Aquifers*, Springer, New York.
- McKone, T.E. y MacLeod, M. (2003) Tracking multiple pathways of human exposure to persistent multimedia pollutants: Regional, Continental, and Global-Scale Models. *Annual Review of Environment and Resources* 28(1), 463-492.
- McCutcheon, S.C. and Schnoor, J.L. (2003) *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants*, Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey.
- Meinert, R., Schüz, J., Kaletsch, U., Kaatsch, P. y Michaelis, J. (2000) Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma in Childhood and Exposure to Pesticides: Results of a Register-based Case-Control Study in Germany. *American Journal of Epidemiology* 151(7), 639-646.
- Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M. y Coquery, M. (2009) Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. *Environmental Pollution* 157(5), 1721-1726.
- Miller, M.R., Wentz, E. y Ong, S. (1999) Acetaminophen alters estrogenic responses in vitro: inhibition of estrogen-dependent vitellogenin production in trout liver cells. *Toxicological Sciences* 48(1), 30-37.
- Mitch, W.A., Krasner, S.W., Westerhoff, P. y Dotson, A. (2008) Occurrence and formation of nitrogenous disinfection by products. American Water Works Association.
- Mitch, W.A. y Sedlak, D.L. (2002) Formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from dimethylamine during chlorination. *Environmental Science and Technology* 36(4), 588-595.
- Mitch, W.A., Sharp, J.O., Trussell, R.R., Valentine, R.L., Alvarez-Cohen, L. y Sedlak, D.L. (2003) N-nitrosodimethylamine (NDMA) as a drinking water contaminant: A review. *Environmental Engineering Science* 20(5), 389-404.
- Montgomery, D.C. (2001) *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley and Sons, New York.
- Munch, J.W. y Basset, M.V. (2004) Method 521. Determination of nitrosamines in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography with large volume injection and chemical ionization tandem mass spectrometry (MS/MS). laboratory, National exposure research laboratory, Cincinnati.
- Muñoz, I., López-Doval, J.C., Ricart, M., Villagrasa, M., Brix, R., Geiszinger, A., Ginebreda, A., Guasch, H., López de Alda, M.J., Romani, A.M., Sabater, S. y Barceló, D. (2009) Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the llobregat river basin (northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12), 2706-2714.
- Musikavong, C., Wattanachira, S., Marhaba, T.F. y Pavasant, P. (2005) Reduction of organic matter and trihalomethane formation potential in reclaimed water from treated industrial estate wastewater by coagulation. *Journal of Hazardous Materials* 127(1-3), 48-57.

- Najm, I. y Trussell, R.R. (2001) NDMA formation in water and wastewater. *Journal American Water Works Association* 93(2), 92-99.
- NASA (2010) Water cycle, NASA, Washington, DC. <http://science.nasa.gov/earth-science/oceanography/ocean-earth-system/ocean-water-cycle/>
- Nawrocki, J. y Andrzejewski, P. (2011) Nitrosamines and water. *Journal of Hazardous Materials* 189(1-2), 1-18.
- Nieuwenhuijsen, M.J., Toledano, M.B. y Elliott, P. (2000) Uptake of chlorination disinfection by-products; a review and a discussion of its implications for exposure assessment in epidemiological studies. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 10(6), 586-599.
- Nikolaou, A., Golfopoulos, S., Rizzo, L., Lofrano, G., Lekkas, T. y Belgiorno, V. (2005) Optimization of analytical methods for the determination of DBPs: Application to drinking waters from Greece and Italy. *Desalination* 176(1-3), 25-36.
- Nikolaou, A., Meric, S. y Fatta, D. (2007) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4), 1225-1234.
- Nikolaou, A.D., Lekkas, T.D., Golfopoulos, S.K. y Kostopoulou, M.N. (2002) Application of different analytical methods for determination of volatile chlorination by-products in drinking water. *Talanta* 56(4), 717-726.
- Nobel, P.S. (2009) Physicochemical and environmental plant physiology, Academic press, Oxford.
- NRC (2007) Models in Environmental Regulatory Decision Making, National Research Council, Washington, DC.
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Iqbal Chaudhry, M.J., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A. y Ahmed Khan, A. (2004) Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427(6975), 630-633.
- Ohkawa, H., Miyagawa, H. y Lee, P.W. (2007) Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, Wiley-VCH, New York.
- Oki, T. y Kanae, S. (2006) Global hydrological cycles and world water resources. *Science* 313(5790), 1068-1072.
- Onesios, K.M., Yu, J.T. y Bouwer, E.J. (2009) Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation* 20(4), 441-466.
- Paasivirta, J., Sinkkonen, S., Rantalainen, A.L., Broman, D. y Zebuhr, Y. (2002) Temperature dependent properties of environmentally important synthetic musks. *Environmental Science and Pollution Research* 9(5), 345-355.
- Packer, J.L., Werner, J.J., Latch, D.E., McNeill, K. y Arnold, W.A. (2003) Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen. *Aquatic Sciences* 65, 342-351.
- Paterson, S. y Mackay, D. (1994) A model of organic chemical uptake by plants from soil and the atmosphere. *Environmental Science and Technology* 28, 2259 - 2265.
- Pawliszyn, J. (1997) Solid Phase Microextraction: Theory and Practice, Wiley-VCH, New York.
- Pearson Education (2008) Publishing as Pearson Benjamin Cummings. Recogido del sitio web de la University of Miami.
- Pérez Pavón, J.L., Martín, S.H., García Pinto, C. y Moreno Cordero, B. (2008) Headspace-programmed temperature vaporizer-fast gas chromatography-mass spectrometry coupling for the determination of trihalomethanes in water. *Journal of Chromatography A* 1194(1), 103-110.
- Petrovic, M., Gonzalez, S. y Barcelo, D. (2003) Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 22(10), 685-696.
- Petrovic, M., Gros, M. y Barcelo, D. (2006) Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1124(1-2), 68-81.
- Phenomenex (2011) www.phenomenex.com
- Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56, 15-39.
- Pittermann, J. (2010) The evolution of water transport in plants: an integrated approach. *Geobiology* 8(2), 112-139.

- Planas, C., Palacios, O., Ventura, F., Rivera, J. y Caixach, J. (2008) Analysis of nitrosamines in water by automated SPE and isotope dilution GC/HRMS - Occurrence in the different steps of a drinking water treatment plant, and in chlorinated samples from a reservoir and a sewage treatment plant effluent. *Talanta* 76(4), 906-913.
- Ministerio de la Presidencia (2007) Real Decreto 1620/2007 por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Ministerio de la Presidencia.
- Prest, H.F. y Herrmann, R.E. (1999) An approach to the determination of N-nitrosodimethylamine at part-per-quadrillion levels using Positive Chemical Ionization and Large-Volume Injection. Agilent Technologies.
- Providenti, M.A., Lee, H. y Trevors, J.T. (1993) Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 379 - 395.
- Pyle, S.M. y Gurka, D.F. (1994) Volatile organic-analysis by direct aqueous injection. *Talanta* 41(11), 1845-1852.
- Quintana, J.B., Weiss, S. y Reemtsma, T. (2005) Pathway's and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research* 39(12), 2654-2664.
- Rao, T.P., Yano, K., Iijima, M., Yamauchi, A. y Tatsumi, J. (2002) Regulation of rhizosphere acidification by photosynthetic activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings. *Annals of Botany* 89(2), 213-220.
- Raven, P.H., Evert, R.F. y Eichhorn, S.E. (2004) *Biology of Plants*, W. H. Freeman, Worth, New York.
- Reemtsma, T., Weiss, S., Mueller, J., Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., Ventura, F. y Knepper, T.P. (2006) Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: A European perspective. *Environmental Science and Technology* 40(17), 5451-5458.
- Reichenauer, T.G. y Germida, J.J. (2008) Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil and Groundwater. *Chemosuschem* 1(8-9), 708-717.
- Reisenhofer, E., Adami, G. y Barbieri, P. (1998) Using chemical and physical parameters to define the quality of karstic freshwaters (Timavo river, north-eastern Italy): A chemometric approach. *Water Research* 32(4), 1193-1203.
- Richardson, S.D. (2012) Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry* 84(2), 747-778.
- Richardson, S.D. (2007) Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry* 75(12), 2831-2857.
- Riederer, M., Daiß, A., Gilbert, N. y Köhle, H. (2002) Semi-volatile organic compounds at the leaf/atmosphere interface: numerical simulation of dispersal and foliar uptake. *Journal of Experimental Botany* 53(375), 1815-1823.
- Riley, D. y Barber, S.A. (1971) Effect of Ammonium and Nitrate Fertilization on Phosphorus Uptake as Related to Root-Induced pH Changes at the Root-Soil Interface. *Soil Science Society of America Journal* 35(2), 301-306.
- Rodríguez, I., Quintana, J.B., Carpinteiro, J., Carro, A.M., Lorenzo, R.A. y Cela, R. (2003) Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A* 985(1-2), 265-274.
- Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A. y Kaminski, M. (2007) Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70(2), 253-261.
- Rook, J.J. (1974) Formation of Haloforms During Chlorination of Natural Waters. *Water Treatment and Examination* 23, 234-243.
- Rosegrant, M.W. y Cai, X. (2001) Water scarcity and food security: alternative futures for the 21st century. *Water Science and Technology* 43(4), 61-70.
- Ryan, J.A., Bell, R.M., Davidson, J.M. y Oconnor, G.A. (1988) Plant uptake of non-ionic organic chemicals from soils. *Chemosphere* 17(12), 2299-2323.
- Samuelsen, O.B., Torsvik, V. y Ervik, A. (1992) Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Science of the Total Environment* 114(0), 25-36.

- San Juan, P.M., Carrillo, J.D. y Tena, M.T. (2007) Fibre selection based on an overall analytical feature comparison for the solid-phase microextraction of trihalomethanes from drinking water. *Journal of Chromatography A* 1139(1), 27-35.
- Sandermann, H. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences* 17(2), 82-84.
- Sawhney, B.L. y Hankin, L. (1984) Plant contamination by PCBs from amended soils. *Journal of Food Protection* 47(3), 232-236.
- Shenker, M., Harush, D., Ben-Ari, J. and Chefetz, B. (2011) Uptake of carbamazepine by cucumber plants: A case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* 82(6), 905-910.
- Schonher, J. y Bukovac, M.J. (1972) Penetration of stomata by liquids - dependence on surface-tension, wettability, and stomatal morphology. *Plant Physiology* 49(5), 813.
- Schönherr, J. (2006) Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany* 57(11), 2471-2491.
- Schrag, S., Perrot, V. y Levin, B. (1997) Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proceeding of Biological Science* 264(1386), 1287.
- Schreiber, I.M. y Mitch, W.A. (2005) Influence of the order of reagent addition on NDMA formation during chloramination. *Environmental Science and Technology* 39(10), 3811-3818.
- Schreiber, I.M. y Mitch, W.A. (2006) Occurrence and fate of nitrosamines and nitrosamine precursors in wastewater-impacted surface waters using boron as a conservative tracer. *Environmental Science & Technology* 40(10), 3203-3210.
- Schroder, P. y Collins, C. (2002) Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *International Journal of Phytoremediation* 4(4), 247-265.
- Schroeder, P., Scheer, C.E., Diekmann, F. y Stampfl, A. (2007) How plants cope with foreign compounds - Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environmental Science and Pollution Research* 14(2), 114-122.
- Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B. y Heindel, J.J. (2011) Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127(3-5), 204-215.
- Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., von der Ohe, P.C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Streck, G. y Brack, W. (2010) Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environmental Pollution* 158(5), 1461-1466.
- Sedlak, D.L., Deeb, R.A., Hawley, E.L., Mitch, W.A., Durbin, T.D., Mowbray, S. y Carr, S. (2005) Sources and fate of nitrosodimethylamine and its precursors in municipal wastewater treatment plants. *Water Environment Research* 77(1), 32-39.
- Seidel, C.J., Mcguire, M.J., Scott Summers, R. y Via, S. (2005) Have utilities changed to chloramines? *American Water Works Association* 97(10), 87-97.
- Serrano, A. y Gallego, M. (2007) Rapid determination of total trihalomethanes index in drinking water. *Journal of Chromatography A* 1154(1-2), 26-33.
- Shen, R. y Andrews, S.A. (2011) Demonstration of 20 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as nitrosamine precursors during chloramine disinfection. *Water Research* 45(2), 944-952.
- Shenker, M., Harush, D., Ben-Ari, J. y Chefetz, B. (2011) Uptake of carbamazepine by cucumber plants -- A case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* 82(6), 905-910.
- Shia, J.C. (2009) Comparison of various QuEChERS approaches for the determination of pesticides in produce, Waters Corporation, Florida.
- Simonich, S.L. y Hites, R.A. (1995) Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science* 269(5232), 1851-1854.

- Simonich, S.L. y Hites, R.A. (1994) Vegetation atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 28, 939 - 943.
- Snyder, S.A., Westerhoff, P., Yoon, Y. and Sedlak, D.L. (2003) Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: Implications for the water industry. *Environmental Engineering Science* 20(5), 449-469.
- Stevens-Garmon, J., Drewes, J.E., Khan, S.J., McDonald, J.A. y Dickenson, E.R.V. (2011) Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids. *Water Research* 45(11), 3417-3426.
- Stumm-Zollinger, E. y Fair, G.M. (1965) Biodegradation of steroid hormones. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 37, 1506-1510.
- Su, Y.-H. y Zhu, Y.-G. (2007) Transport mechanisms for the uptake of organic compounds by rice (*Oryza sativa*) roots. *Environmental Pollution* 148(1), 94-100.
- Symons, J.M., Bellar, T.A., Carswell, J.K., Demarco, J., Kropp, K.L., Robeck, G.G., Seeger, D.R., Slocum, C.J., Smith, B.L. y Stevens, A.A. (1975) National organics reconnaissance survey for halogenated organics. *Journal American Water Works Association* 67(11), 634-647.
- Tibbetts, J. (1995) What's in the water: the disinfectant dilemma. *Environmental Health Perspective* 103(1).
- Tixier, C., Singer, H.P., Oellers, S. y Müller, S.R. (2003) Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environmental Science and Technology* 37(6), 1061-1068.
- Trapp, S. (2004) Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research* 11(1), 33-39.
- Trapp, S., Matthies, M., Scheunert, I. y Topp, E.M. (1990) Modeling the bioconcentration of organic chemicals in plants. *Environmental Science and Technology* 24, 1246 - 1252.
- Trapp, S. y McFarlane (1995) Plant Contamination, Lewis Publisher, Boca Ratón, Florida.
- Travis, C.C. y Arms, A.D. (1988) Bioconcentration of organics in beef, milk, and vegetation. *Environmental Science and Technology* 22(3), 271-274.
- Ugrekhelidze, D.S., Piriashvili, V.A. and Rukhadze, S.M. (1986) Uptake of salicylic acid and aniline by pea roots. *Soviet Plant Physiology* 33(1), 136-140.
- Unceta, N., Sampedro, M.C., Bakar, N.K.A., Gómez-Caballero, A., Goicolea, M.A. y Barrio, R.J. (2010) Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(20), 3392-3399.
- UN (2011) UN ramps up aid in drought-stricken Horn of Africa as number in need rises. UN News Centre. <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=39495>
- University of Illinois (2004) Lecture material online. http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lectures_f04am.htm.
- University of Maryland University College (2011) Phytoremediation: Organic Contaminants, Maryland.
- UNEP (2001) Final Act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environmental Program, Geneva.
- UNEP (2003) Global environment outlook. Yearbook 2003. UNEP.
- USEPA (2004) Guidelines for Water Reuse. USEPA.
- USEPA (2009) Fact Sheet: Final Third Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL 3) USEPA.
- USEPA (2010) Emerging contaminant –N-Nitrosodimethylamine (NDMA)
- Vega, M., Pardo, R., Barrado, E. y Deban, L. (1998) Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. *Water Research* 32(12), 3581-3592

- Veith, G.D., DeFoe, D.L. y Bergstedt, B.V. (1979) Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36(9), 1040-1048.
- Wang, W.F., Hu, J.Y., Yu, J.W. y Yang, M. (2010) Determination of N-nitrosodimethylamine in drinking water by UPLC-MS/MS. *Journal of Environmental Sciences-China* 22(10), 1508-1512.
- Ward, O.P., Singh, A. y Van Hamme, J. (2003) Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30, 260 - 270.
- Webber, M.D., Pietz, R.I., Granato, T.C. y Svoboda, M.L. (1994) Plant uptake of PCBs and other organic contaminants from sludge-treated coal refuse. *Journal of Environmental Quality* 23(5), 1019-1026.
- Wei, S.Q. y Pan, S.W. (2010) Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *Journal of Soils and Sediments* 10, 886 - 894.
- Weigel, S., Kuhlmann, J. y Hühnerfuss, H. (2002) Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Science of the Total Environment* 295(1-3), 131-141.
- Westerhoff, P. y Mash, H. (2002) Dissolved organic nitrogen in drinking water supplies: a review. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* 51(8), 415-448.
- Witte, W. (1998) Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture. *Science* 279(5353), 996-997.
- WHO (2008) Guidelines for drinking-water quality, third edition, incorporating first and second addenda, WHO, Geneva.
- WHO (2006) Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Vol 2- wastewater use in agriculture.
- WHO (2005) Trihalomethanes in drinking water: background document for development of WHO guidelines for drinking water quality. World Health Organization.
- WHO (2011) Pharmaceuticals in Drinking-water. WHO Press, WHO, Geneva.
- Wilczak, A., Assadi-Rad, A., Lai, H.H., Hoover, L.L., Smith, J.F., Berger, R., Rodigari, F., Beland, J.W., Lazzelle, L.J., Kinicannon, E.G., Baker, H. y Heaney, C.T. (2003) Formation of NDMA in chloraminated water coagulated with DADMAC cationic polymer. *Journal American Water Works Association* 95(9), 94-106.
- Wild, E., Dent, J., Thomas, G.O. y Jones, K.C. (2006) Visualizing the air-to-leaf transfer and within-leaf movement and distribution of phenanthrene: further studies utilizing two-photon excitation microscopy. *Environmental Science and Technology* 40, 907 - 916.
- Wild, E., Dent, J., Thomas, G.O. y Jones, K.C. (2005) Visualizing the Air-To-Leaf Transfer and Within-Leaf Movement and Distribution of Phenanthrene: Further Studies Utilizing Two-Photon Excitation Microscopy. *Environmental Science and Technology* 40(3), 907-916.
- Wild, E., Dent, J., Thomas, J. y Jones, K. (2005) Direct observation of organic contaminant uptake, storage, and metabolism within plant roots. *Environmental Science and Technology* 39, 3695 - 3702.
- Wright, G.D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57(10), 1451-1470.
- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., Fang, M. y Czajkowski, K.P. (2010) Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Soybean Plants from Soils Applied with Biosolids and Irrigated with Contaminated Water. *Environmental Science and Technology* 44(16), 6157-6161.
- Yang, L., Chen, Z.L., Shen, J.M., Xu, Z.Z., Liang, H., Tian, J.Y., Ben, Y., Zhai, X., Shi, W.X. y Li, G.B. (2009) Reinvestigation of the Nitrosamine-Formation Mechanism during Ozonation. *Environmental Science and Technology* 43(14), 5481-5487.
- Yifru, D.D. y Nzengung, V.A. (2006) Uptake of N-Nitrosodimethylamine (NDMA) from Water by Phreatophytes in the Absence and Presence of Perchlorate as a Co-Contaminant. *Environmental Science & Technology* 40(23), 7374-7380.
- Yoon, J., Choi, Y., Cho, S. y Lee, D. (2003) Low trihalomethane formation in Korean drinking water. *The Science of the Total Environment* 302(1-3), 157-166.

- Zezi, J. (2001) Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50(3), 229-243.
- Zhang, S., Wang, S., Li, H. y Li, L. (2011) Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43(3), 303-305.
- Zhang, S.Y., Zhang, Q.A., Darisaw, S., Ehie, O. y Wang, G.D. (2007) Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere* 66(6), 1057-1069.
- Zhao, R.S., Lao, W.J. y Xu, X.B. (2004) Headspace liquid-phase microextraction of trihalomethanes in drinking water and their gas chromatographic determination. *Talanta* 62(4), 751-756.
- Zhao, Y.-Y., Boyd, J., Hrudey, S.E. y Li, X.-F. (2006) Characterization of New Nitrosamines in Drinking Water Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Environmental Science and Technology* 40(24), 7636-7641.
- Zhao, Y.-Y., Boyd, J.M., Woodbeck, M., Andrews, R.C., Qin, F., Hrudey, S.E. y Li, X.-F. (2008) Formation of N-nitrosamines from eleven disinfection treatments of seven different surface waters. *Environmental Science and Technology* 42(13), 4857-4862.
- Zimmerman, J.B., Mihelcic, J.R. y Smith, J. (2008) Global stressors on water quality and quantity. *Environmental Science and Technology* 42(12), 4247-4254.
- Zwiener, C. y Frimmel, F.H. (2003) Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac. *Science of the Total Environment* 309(1-3), 201-211.
- Zwiener, C., Glauner, T. y Frimmel, F.H. (2000) Biodegradation of Pharmaceutical Residues Investigated by SPE-GC/ITD-MS and On-Line Derivatization. *Journal of High Resolution Chromatography* 23(7-8), 474-478.
- Zwiener, C. y Frimmel, F.H. (2004) Residues of Clofibric Acid, Ibuprofen and Diclofenac in the Aquatic Environment and Their Elimination in Sewage Treatment and Drinking Water Production. In: K. Kümmerer. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks.*, Springer, New York.

Per Angusta Ad Augusta