



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Instituto de Diagnóstico Ambiental
y de Estudios del Agua
Departamento de Química Ambiental**

**Análisis y presencia de Compuestos Disruptores
Endocrinos en ríos de la Península Ibérica**

“PhD Thesis”

“PhD Program in Environmental Science and Technology”

Marina Gorga López

Supervisado por:

Prof. Mira Petrovic

Prof. Damià Barceló Cullerès

Tutor Académico:

Dra. Montserrat Sarrà Adroguer

Septiembre 2022

La investigación llevada a cabo en esta memoria ha estado posible gracias al proyecto SCARCE (CSD-2009-00065) financiado por el Departamento de Economía y Competitividad; y a la Beca Pre-Doctoral AGAUR concedida por el Gobierno de la Generalitat de Catalunya.

Aquesta tesis està dedicada a
les persones que de veritat m'estimen
i en especial al meu pare

Li fa veure Bohí, eixa flor que's bada
y d'aqueix bosch de puigs, ombres estranyes,
la Roca dels dos Homes Encantats
y, dant més brida á les esquerpes daynes,
al cim de Neto malehit s'enfila,
com qui, vistos los baixos de la vila,
vol vèurela millor desde'ls terrats
Jacint Verdaguer

Agraïments

En primer lloc, m'agradaria agrair als meus directors, la Professora Mira Petrovic i el Professor Damià Barceló, la oportunitat d'executar una tesis doctoral amb ells.

Investigadors sobradament coneguts i reconeguts arreu del món, per les seves aportacions a la ciència en general, i més concretament a l'àmbit mediambiental, intentant així, a través de la recerca i divulgació, conscienciar de la importància de cuidar el medi, en especial el medi aquàtic, per gaudir d'un món més sostenible.

Per altra banda, vull agrair a la meva tutora la Doctora Montserrat Sarrà, l'oportunitat que m'ha brindat podent finalitzar una tesis complicada d'assumir. També vull donar les gràcies a la Cristina Duran, i en general al Institut de Ciència i tecnologia Ambiental (ICTA-UAB), la seva col·laboració i paciència.

No vull oblidar nombrar la Doctora Ethel Eljarrat, la primera persona del grup de recerca on he realitzat aquesta tesis, dins del Institut IDAEA-CSIC, que va creure en mi, i em va iniciar de veritat, en la meva carrera com a investigadora de màster.

També vull fer menció a l'ICRA, i a totes les persones que el conformen, per donar-me un cop de mà en la part més experimental d'aquesta tesis, i on se'm va acollir com una més, després que els meus directors de tesis impulsessin ja fa més d'una dècada, el que en aquells anys era un nou centre de recerca mediambiental especialitzat en aigües, ara ja consolidat.

Després dels agraïments que considero imprescindibles i necessaris plasmar en aquesta memòria, però que tenen un toc una mica massa formal pel meu gust, vull continuar aquest escrit des d'un punt de vista més emocional.

Poder aconseguir finalitzar aquesta tesis, per a mi, té un significat i una repercussió personal que va més enllà de la meva vida professional. M'ha acompanyat en moments de la meva vida feliços, però també en moments extremadament difícils.

Espero, per tant, que dipositant i presentant aquesta tesis, tancar una part de la meva vida agredolça, i no per les dificultats que m'hagi pogut presentar l'execució d'una tesis doctoral, precisament considero que, haver tingut aquest repte davant meu, ha fet que superi moments molt complicats.

*Per tant, amb aquest treball **vull tancar i tancaré, un cicle de la meva vida.***

*Deixant entrar encara amb més força la llum, que faci desaparèixer del tot la negativitat del meu voltant, i que aflori encara més, la positivitat, que m'aporten totes les persones que jo considero que **de veritat** m'aprecien i m'estimen tal com soc, i a les que **vull dedicar aquests últims paràgrafs**.*

Primerament, una altre vegada vull nombrar els meus directors de tesis, però no per la seva vàlua professional indiscutible, sinó per la seva vàlua personal, que a mi almenys m'ha impressionat moltíssim i que admiro profundament. De vegades, i més en l'àmbit laboral professional, oblidem que darrera pot haver-hi més que un càrrec.

Sense la Mira i el Damià, i la seva gran confiança en la meva vàlua com a persona i no com a doctoranda, mai hagués pogut finalitzar aquesta tesis i aquesta etapa de la meva vida, el regal que m'han fet, és el millor que he rebut en molt temps, potser el millor que recordo.

Evidentment, junt amb aquestes 2 grans persones, en aquest llarg viatge m'han acompanyat sempre la meva família i els que considero els meus amics de veritat, amics de tota la vida, i amics que he anat coneixent durant aquest llarg període i que espero conservar.

També vull nombrar els nous companys, ja amics, que últimament s'han anat sumant, i que espero que em segueixin acompanyant.

No vull plasmar cap nom en concret, perquè les persones que m'aprecien de veritat, saben, sobradament, que aquestes paraules van per ells i elles. Espero estar a la vostra alçada com a persona i que seguim tots junts millorant, per assolir el que jo almenys m'he proposat, que és un camí ple de llum i felicitat, i que m'ajudeu i jo també us ajudi, a treure la foscor que de vegades ens envolta i que no ens deixa veure amb claredat.

Tothom qui vulgui acompanyar-me o seguir gaudint dels meus coneixements, amistat i alegria serà benvingut a la meva vida, els altres ja poden anar fent les maletes i apartar-se definitivament.

Índice general

Resumen y estructura de la tesis	i
Abreviaturas y acrónimos	vii
Capítulo 1. Introducción general	1
1.1 Regulación EU relativa a la calidad del agua.....	3
1.2 Los EDCs y compuestos relacionados estudiados	8
1.2.1 Origen, producción, aplicaciones e impacto	10
1.2.2 Propiedades físico-químicas.....	19
1.2.3 Ecotoxicidad y estrogenicidad	26
1.3 Distribución, transformación y eliminación de los EDCs estudiados en el medio acuático	29
1.4 Niveles de los EDCs estudiados en el medio ambiente acuático	39
1.4.1 Aguas y sedimentos de río	40
1.4.2 Aguas residuales y lodos de depuradora	42
1.5 Métodos de análisis de los compuestos estudiados	45
1.5.1 Tratamiento de muestra.....	47
1.5.2 Análisis instrumental.....	51
Capítulo 2. Objetivos	65
Capítulo 3. Desarrollo de métodos analíticos	69
3.1 Introducción	71
3.2 Determinación de EDCs en aguas mediante análisis online LC-MS/MS	79
<u>Basado en la publicación científica 1: <i>Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry</i> (2013)</u>	
3.3 Determinación de EDCs en sedimentos y lodos mediante TurboFlow-LC-MS/MS	95
<u>Basado en la publicación científica 2: <i>Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> (2014)</u>	
3.4 Discusión/Estado actual	111
Capítulo 4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica	115
4.1 Introducción	117
4.2 Niveles determinados en aguas y sedimentos de río	119
<u>Basado en la publicación científica 3: <i>Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers</i> (2014)</u>	
4.3 Niveles determinados en aguas residuales y lodos de depuradora	141
<u>Propuesta de publicación científica 4: <i>Occurrence and fate of EDCs and related compounds in wastewaters and sewage sludge in principals WWTPs of Iberian rivers</i> (No publicada)</u>	
4.4 Discusión	161
4.4.1 Niveles determinados en aguas y sedimentos de río.....	161
4.4.2 Niveles en aguas residuales y lodos de depuradora.....	164

Índice general

Capítulo 5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios	167
5.1 Introducción	169
5.2 Comparación de los niveles de EDCs en distintos tipos de aguas estudiadas	171
5.2.1 Niveles determinados en aguas superficiales del centro de España (<i>Publicación 5, 2014</i>)	171
5.2.2 Niveles en aguas de grifo del centro de España (<i>Publicación 6, 2014</i>)	174
5.2.3 Niveles en aguas de bebida del centro de España (<i>Publicación 7, 2018</i>)	176
5.2.4 Niveles en agua dulce en la región de la Península Antártica norte (<i>Publicación 8, 2016</i>)	179
5.2.5 Discusión	184
5.3 Eliminación de EDCs en aguas de hospital mediante tratamiento fúngico (<i>Publicación 9, 2014</i>).....	188
Conclusiones generales	191
Bibliografía	199
Anexo A. Lista de tablas y figuras	251
Anexo AI: Lista de tablas	253
Anexo AII: Lista de figuras	259
Anexo B. Información adicional capítulos 3 y 4	265
Anexo BI: Información adicional capítulo 3	267
Anexo BII: Información adicional capítulo 4	275
Anexo C. Lista de publicaciones y participaciones a congresos	299
Anexo CI: Publicaciones descritas o resumidas en la tesis	301
Anexo CII: Otras publicaciones en que se participó durante la tesis	302
Anexo CIII: Participaciones a congresos	302

Resumen y estructura de la tesis

Resumen

El agua es un bien cada vez más escaso e imprescindible para la vida, en las últimas décadas la sociedad parece haber empezado a ser consciente de ello, dado que la actividad humana tiene un gran impacto sobre el medioambiente y en consecuencia también en el medio acuático. Los estudios medioambientales, por tanto, están cobrando cada vez más relevancia, siendo imprescindibles para la evaluación de la calidad de este bien tan preciado.

Hoy en día, y debido en parte a la creciente regulación de las distintas agencias mundiales en términos de calidad del agua, existen muchos estudios, enfocados a la evaluación de distintas familias de contaminantes que pueden causar cierto impacto en el medio acuático. Un ejemplo de ello son los compuestos disruptores endocrinos (EDCs), un grupo de sustancias exógenas que interfieren con el sistema endocrino e interrumpen la función fisiológica de las hormonas. Algunos de estos contaminantes, con diferentes estructuras y propiedades, se encuentran en una gran variedad de productos comúnmente utilizados en la vida diaria y, en consecuencia, se detectan en el medio ambiente acuático.

El estudio de EDCs se ha enfocado a lo largo de las últimas décadas desde distintos ángulos, estos contaminantes han sido estudiados por ejemplo como parte de un grupo principal de sustancias que no solo tienen relevancia por los efectos endocrinos de algunos de sus compuestos, sino que presentan otras características nocivas, grados de toxicidad elevados, persistencia y bioacumulación, como es el caso de los pesticidas, productos farmacéuticos, compuestos químicos halogenados, entre otros. Esta tesis se ha centrado solamente en la evaluación de distintos grupos de contaminantes desde el punto de vista de su más o menos grado de disrupción endocrina, así como de otros compuestos relacionados, estos, han sido escogidos según criterios de grado de disrupción y/o por su alta producción o uso, siendo este último factor importante ya que contaminantes con poco potencial disruptor, ya sea por cantidad o exposición constante pueden llegar a ser igualmente perjudiciales.

Las metodologías analíticas disponibles en la literatura para el análisis de EDCs en el medio ambiente acuático son muy variadas, aunque la mayoría de estos métodos cubren solo uno o dos grupos de compuestos que contienen polaridades similares, estructuras similares o actividades similares, cada vez existen más autores que proponen métodos multicompuestos para la determinación de una amplia gama de EDCs, aunque algunos de estos, usan distintos métodos de extracción y/o modos de elución, durante el análisis, lo que resulta tedioso y lento.

Utilizando la tecnología de inyección directa mediante una columna de preconcentración o bien una de purificación seguida de una separación cromatográfica líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (EQuan/TFC-LC-MS/MS), optimizadas en esta tesis, se solventaron parte de las limitaciones expuestas anteriormente, creando métodos online automatizados para el análisis de los distintos grupos de EDCs en matrices acuosas, sedimentos y lodos.

Resumen y estructura de la tesis

Estas metodologías se pudieron aplicar de forma rápida y eficaz para la determinación del nivel de contaminación de EDCs en cuatro de las cuencas Mediterráneas más importantes de la Península Ibérica, motores del desarrollo socio económico de esta región. Siendo estas cuencas, debido tanto a la manipulación de esta hidrología como los constantes cambios según las estaciones climáticas, una de las regiones más vulnerables del mundo al cambio global, sumado a la alta actividad cerca de los ríos mediterráneos, ya sea por la industria o la agricultura, el uso intensivo de los recursos hídricos y la alta densidad de población en estas zonas.

Estructura de la tesis

Esta memoria se divide en 5 capítulos

En el capítulo 1 presenta una introducción general, empezando con la regulación de la Unión Europea respecto a la calidad del agua, apartado 1.1. Debido tanto a la extensa bibliografía que existe como a la gran cantidad de compuestos que en mayor o menor grado pueden presentar efectos disruptores, el apartado 1.2, se ha focalizado en la descripción concreta de los compuestos monitoreados en esta tesis, tan solo al inicio del apartado se ha contextualizado y clasificado los EDCs.

Siguiendo los siguientes subapartados del 1.2.1 al 1.2.3 solo centrados en la descripción de los compuestos concretos estudiados. Exponiendo su origen, producción, aplicaciones e impacto en el medioambiente, y para una mayor comprensión de estos también se presentan sus propiedades fisicoquímicas más relevantes, así como su ecotoxicidad y estrogenicidad.

Como esta tesis se basa principalmente en la creación de métodos analíticos, así como en la evaluación de los EDCs estudiados en el medio acuático, tanto los niveles reportados en la literatura a lo largo principalmente de las dos últimas décadas, y las metodologías creadas para el estudio de estos contaminantes han sido ampliamente tratadas en los apartados 1.4 y 1.5. Para una mayor comprensión, sobre todo del apartado 1.4 que resume los niveles de EDCs, en el apartado anterior a este, 1.3 se ha expuesto una breve descripción de la distribución, transformación y eliminación de estos compuestos en el medio.

Después de presentar los objetivos de esta tesis en el capítulo 2, los 2 capítulos siguientes exponen el trabajo experimental principal desarrollado durante la realización de esta tesis, presentando los tres artículos publicados. Concretamente, el capítulo 3 describe las metodologías online optimizadas para el estudio de los EDCs y compuestos relacionados analizados en aguas de río y residuales, sedimentos y lodos de depuradora. El capítulo 4, hace referencia a los niveles determinados de los contaminantes estudiados tanto en aguas de río como en aguas residuales, en las 4 cuencas de la Península Ibérica que fueron analizadas dentro del proyecto SCARCE.

Debido a que el estudio experimental de esta tesis se realizó durante el período entre 2010 y 2014, y por tanto las referencias bibliográficas publicadas en los artículos no son actuales, las referencias bibliográficas han sido actualizadas y expuestas durante el capítulo 1, otro motivo por el cual este capítulo de introducción solo se ha centrado tanto en los compuestos estudiados en esta tesis.

El apartado 4.3, sin embargo, y aunque el estudio/análisis se realizó durante el período experimental de esta tesis, ha sido redactado durante la escritura de esta memoria, por tanto, no ha sido publicado, aunque se presenta en el mismo formato que a los apartados anteriores, concretamente se le ha dado estructura de artículo científico, pero con las referencias actualizadas. Por último, en los apartados 3.4 y 4.4 de discusión, también se exponen de manera resumida el estado actual de los estudios relacionados con lo aportado en esta tesis realizada entre el 2010-2014.

El capítulo 5 resume estudios en que se colaboró gracias a los métodos desarrollados durante la parte experimental del trabajo realizado, al ser publicaciones de otros autores, solo se presentarán las aportaciones a estas, concretamente la determinación y análisis de los EDCs. En él se pueden encontrar niveles de EDCs en aguas superficiales y de consumo, aprovechando para realizar una breve comparación y discutir los niveles determinados aplicando la misma metodología en distintos tipos de aguas de distintas zonas geográficas. Por último, en el apartado 5.3, se ha resumido una aplicación donde se usaron las metodologías creadas para el estudio de eliminación de EDCs mediante un tratamiento fúngico, aportando principalmente los resultados obtenidos.

Abreviaturas y acrónimos

Abreviaturas y acrónimos

Generales

AA: Annual Average; Porcentaje Anual

Afl: afluente

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization; Ionización Química a Presión Atmosférica

APPI: Atmospheric Pressure Photoionization; Fotoionización de Presión Atmosférica

ASE: Accelerated Solvent Extraction; Extracción Acelerada de Solvente

ASEAN: Association of Southeast Asian Nations; Asociación de Naciones del Sudeste Asiático

bdl: below detection limit; por debajo del límite de detección

CAS: Conventional Activated Sludge; Lodos Activados Convencionales

COMMPS: Combined Monitoring-based and Modelling-based Priority Setting; Establecimiento de prioridades basadas en la supervisión y la modelización combinadas

Conc. Máx.: Concentración Máxima

Conc. Med.: Concentración Mediana

Conc. Mín.: Concentración mínima

Conc. Tot.: Concentración Total

CSED: Community Strategy for Endocrine Disruptors; Estrategia Comunitaria para los Disruptores Endocrinos

DBO: Demanda Biológica de Oxígeno

DLLME: Liquid-Liquid Dispersive Microextraction; Microextracción Dispersiva de Líquido-Líquido

DMA: Directiva Marco del Agua

DSPME/DSPE: (micro) Solid Phase Dispersive Extraction, (micro) Extracción Dispersiva en Fase Sólida

dw: dry weight; peso en seco

EC/CE: European Commission; Comisión Europea

EC50: Half Maximal Effective Concentration; Concentración Efectiva Media Máxima

ECD: Electron Capture Detector; Detector de Captura de Electrones

ECHA: European Chemicals Agency; Agencia Europea de Sustancias Químicas

EDCs: Endocrine Disruptors Compounds; Compuestos Disruptores Endocrinos

EDSP: Endocrine Disruptor Screening Program; Programa de Detección de Disruptores Endocrinos

EDTA: Endocrine Disruptors Testings and Assessment; Pruebas y Evaluación de Disruptores Endocrinos

EEA: European Environmental Agency; Agencia Ambiental Europea

EEFi: Relative Estrogenicity Factor; Factor de Estrogenicidad relativo

EEQ: Estradiol equivalents; Equivalentes de Estradiol

Efl: afluente

EFRA: European Flame Retardants Association; Asociación Europea de Retardantes de Llama

EQS/NCA: Environmental Quality Standards; Estándares de Calidad Ambiental

EQSD/DNCA: Environmental Quality Standards Directive; Directiva de Normas de Calidad Ambiental

ESE: Enhanced Solvent Extraction; Extracción Mejorada con Solvente

Abreviaturas y acrónimos

ESI: Electrospray Source Ionization; Fuente de Ionización por Electrospray

EU: European Union; Unión Europea

FDA: Food and Drug Administration; Administración de Alimentos y Drogas

FID: Flame Ionization Detector; Detector de Ionización de Llama

Frec.: Frecuencia

Frec.Det.: Frecuencia de Detección

GC: Gas Chromatography; Cromatografía de Gases

GCB: Graphitized Carbon Black;

GPC: Gel Permeation Chromatography; Cromatografía de Permeación en Gel

HF-LPME: Hollow Fiber Microextraction; Microextracción de Fibra Hueca

HLB: Hydrophobic-Lipophilic Balanced; Equilibrado Hidrofóbico-Lipofílico

HPLC: High Performance Liquid Chromatography; Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

HRMS: High Resolution Mass Spectrometry; Espectrometría de Masas de Alta Resolución

IC50: Half Maximal Inhibitory Concentration; Concentración Inhibitoria Media Máxima

IPCS: International Programme on Chemical Safety; Programa Internacional de Seguridad Química

IPPC: Integrated Prevention and Pollution Control; Control Integrado de Prevención y Contaminación

LC: Liquid Chromatography; Cromatografía Líquida

LC50: Half Maximal Lethal Concentration; Concentración Letal Media Máxima

LLE: Liquid-Liquid Extraction; Extracción Líquido-Líquido

LOD: Limit of Detection; Límite de Detección

logKow: coeficiente de reparto octanol-agua

LOQ: Limit of Quantification; Límite de Cuantificación

LRAT: Long-Range Atmospheric Transport; Transporte Atmosférico de Largo Alcance

LTQ-Orbitrap: Linear Ion Trap-Orbitrap; Trampa iónica lineal-Orbitrap

MA: Máximo Admisible

MAC: Maximum Allowable Concentration; Concentración Máxima Admisible

MAE: Microwave Assisted Extraction; Extracción asistida por Microondas

MS/MS: tandem Mass Spectrometry; Espectrometría de Masas en tándem

MS: Mass Spectrometry; Espectrometría de Masas

msnm: metros sobre el nivel del mar

n.a: no aplicable

NC: Non Collected; No Colectada

NCA: Norma de Calidad Ambiental

nd: not detectable; no detectable

ND: Not determined; No Determinado

NI: Negative Ionization; Ionización Negativa

NOEC: Not Observed Effects Concentration; Concentración de Efectos No Observados

nq: not quantifiable; no cuantificable

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development; Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

PhACs: Pharmaceutically active compounds; Compuestos farmacéuticamente activos

PI: Positive Ionization; Ionización Positiva

- pKa:** logaritmo negativo (-log) de la constante de disociación ácida
- PLE:** Pressurized Liquid Extraction; Extracción Líquida a Presión
- PM:** Peso Molecular
- PNEC:** Predicted No Effect Concentration; Concentración Prevista Sin Efecto
- PSA:** Primary/Secondary Amine; Amina Primaria/Secundaria
- PTARs:** Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales
- QqQ:** Triple Quadrupole; Triple Quadrupolo
- QqTOF:** Quadrupole-Quadrupole-Time-of-Flight; Quadrupolo-Quadrupolo-Tiempo de Vuelo
- QuEChERS:** Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe; Rápidos, Fáciles, Baratos, Efectivos, Resistentes y Seguros
- REACH:** Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals Products; Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Productos Químicos
- RM:** Región de Madrid
- RSD:** Relative Standard Deviation; Desviación Estándar Relativa
- SBSE:** Stir Bar Sorptive Extraction; Extracción absorbente con Barra de Agitación
- SCCP:** Scientific Committee on Consumer Products; Comité Científico de Productos de Consumo
- SCCS:** European Commission Scientific Committee on Consumer Safety; Comité Científico de la Comisión Europea sobre Seguridad del Consumidor
- SDME:** Single Drop Microextraction; Microextracción de Gota Única
- Sed:** sedimento
- SIM:** Selected Ion Monitoring
- SPE:** Solid Phase Extraction; Extracción en Fase Sólida
- SPE:** Solid Phase Extraction; Extracción en Fase Sólida
- SPEED '98:** Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors '98; Programas Estratégicos sobre Disruptores Endocrinos Ambientales '98
- SPME:** Solid Phase Microextraction; Microextracción en Fase Sólida
- SRM:** Selected Reaction Monitoring
- STP:** Sewage Treatment Plant; Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
- SVHC:** Substances of Very High Concern; Sustancias Altamente Preocupantes
- TFC:** Turbulent Flow Chromatography; Cromatografía de Flujo Turbulento
- TOC:** Total Organic Carbon; Carbono Orgánico Total
- TW:** Tap Water; Agua de grifo
- UAE:** Ultrasonic Assisted Extraction; Extracción Asistida por Ultrasonidos
- UNEP:** United Nations Environment Programme; Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
- UPLC:** Ultra Performance Liquid Chromatography; Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento
- US:** United States; Estados Unidos
- USE:** Ultrasonic extraction; Extracción por Ultrasonidos
- USEPA/EPA:** United States Environmental Protection Agency; Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
- Vol.:** volumen
- VTG:** Vitellogenin; Vitelogenina

Abreviaturas y acrónimos

WHO: World health Organization; Organización Mundial de la Salud

WWD: WasteWater Discharge; Descarga de Aguas Residuales

WWTPs: WasteWater Treatment Plants

Compuestos

Acet.: acetone; acetona

ACN: acetonitrile; acetonitrilo

APECs: alkylphenol carboxylates/alkylphenoxy carboxylic acids; alquilfenol carboxilados/ácidos alquilfenoxi carboxílicos

APEOs: alkylphenol ethoxylates; alquilfenol etoxilados

APs: alkylphenols; alquilfenoles

BeP: benzylparaben; bencilparabeno

BPA: bisphenol A; bisfenol A

BSTFA: N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida

BT: 1H-benzotriazole; 1H-benzotriazol

BTs: benzotriazoles; benzotriazoles

Caff: caffeine; cafeína

DCM: dichloromethane; diclorometano

DDE: dichloro diphenyl dichloroethylene; dicloro difenil dicloroetileno

DDT: dichloro diphenyl trichloroethane; dicloro difenil tricloroetano

DES: diethylstilbestrol; dietilestilbestrol

DOEOs: dodecylphenol ethoxylates; dodecilfenol etoxilados

E1: estrone; estrona

E1-3G: estrone 3-glucuronide; estrona 3-glucurónido

E1-3S: estrone-3-sulfate; estrona-3-sulfato

E2: 17 β -estradiol; 17 β -estradiol

E2-17G: estradiol 17-glucuronide; estradiol 17-glucurónido

E3: estriol; estriol

E3-16G: estriol 16-glucuronide; estriol 16-glucurónido

E3-3S: estriol-3-sulfate; estriol-3-sulfato

EE2: ethinylestradiol; etinilestradiol

EtOAc: ethyl acetate; acetato de etilo

EtP: ethylparaben; etilparabeno

H₂O: water; agua

H₂SO₄: sulfuric acid; ácido sulfúrico

HBCDD: hexabromocyclododecane; hexabromociclododecano

HCB: hexachlorobenzene; hexaclorobenceno

HCH: hexachlorocyclohexane, hexaclorociclohexano

HFBA: heptafluorobutyric acid; ácido heptafluorobutírico

HPCs: halogenated phenolic chemical compounds; compuestos químicos fenólicos halogenados

Hx: hexane; hexano

MeOH: methanol; metanol

MeP: methylparaben; metilparabeno

MeTCS: methyltriclosan; metiltriclosán

MTBSTFA: N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide; N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida

NH₄F: ammonium fluoride; fluoruro de amonio

NH₄OH: ammonium hydroxide; hidróxido de amonio

Non-HPCs: non-halogenated phenolic chemical compounds; compuestos químicos fenólicos no halogenados

NP: 4-nonylphenol; 4-nonilfenol

NP1EC: nonylphenol monocarboxylate/nonylphenoxy carboxylic acid; nonilfenol monocarboxilado/ácido nonilfenoxi carboxílico

NP1EO: nonylphenol monoethoxylate; nonilfenol monoetoxilado

NP2EO: nonylphenol diethoxylate; nonilfenol dietoxilado

NPEOs: nonylphenol ethoxylates; nonilfenol etoxilados

NSAIDs: nonsteroidal anti-inflammatory drug; droga anti-inflamatoria libre de esteroides

OP: 4-tert-octylphenol; 4-tert-octilfenol

OP1EC: octylphenol monocarboxylate/octylphenoxy carboxylic acid; octilfenol monocarboxilado/ácido octilfenoxi carboxílico

OP1EO: octylphenol monoethoxylate; octilfenol monoetoxilado

OP2EO: octylphenol diethoxylate; octilfenol dietoxilado

OPEOs: octylphenol ethoxylates; octilfenol etoxilados

OPFRs: organophosphorus flame retardants; retardantes de llama organofosforados

OPs: organophosphorus; organofosforados

PACs: polycyclic aromatic chemicals; compuestos químicos aromáticos policíclicos

PBBs: polybrominated biphenyls; bifenilos polibromados

PBDEs: polybrominated diphenyl ethers; difenil éteres polibromados

PCBs: "polychlorinated biphenyls", bifenilos policlorados

PCDDs: polychlorinated dibenzodioxins; dibenzodioxinas policloradas

PCDFs: polychlorinated dibenzofurans; dibenzofuranos policlorados

PCPs: personal care products; productos de cuidado personal

PET: polyethylene terephthalate; tereftalato de polietileno

PFCAs: perfluorinated carboxylic acids; ácidos carboxílicos perfluorados

PFOS: perfluorooctanesulfonic acid; ácido perfluorooctanosulfónico

POPs: persistent organic pollutants; contaminantes orgánicos persistentes

PPCPs: pharmaceuticals and personal care products; productos farmaceuticos y de cuidado personal

PrP: propylparaben; propilparabeno

SCCP: short-chain chlorinated paraffins; parafinas cloradas de cadena corta

TBAB: tetrabutylammonium bromide; bromuro de tetrabutilamonio

TBAHS: tetrabutylammonium hydrogensulfate; hidrogenosulfato de tetrabutilamonio

TBEP: tris(butoxyethyl) phosphate; tris(butoxietyl) fosfato

TBS: tert-butyldimethylsilyl; t-butildimetilsilil

Abreviaturas y acrónimos

TCC: triclocarban; triclocarbán

TCEP: tris(2-chloroethyl) phosphate; tris(2-cloroetil) fosfato

T CPP: tris(chloroisopropyl) phosphate; tris(cloroisopropil) fosfato

TCS: triclosan; triclosán

TDCP: tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate; tris (1,3-dicloro-2-propil)fosfato

THF: tetrahydrofuran; tetrahidrofurano

TiBP: tri-iso-butyl phosphate (TiBP); tri-iso-butil fosfato

TMA: trimethylamine; trimetilamina

TMCS: trimethylchlorosilane; trimetilclorosilano

TMS: trimethylsilyl; trimetilsilil

TnBP: tri-n-butyl phosphate; tri-n-butil fosfato

TT: tolyltriazole; toliltriazol

Capítulo 1

Introducción general

1.1 Regulación EU relativa a la calidad del agua

Introducción a la Directiva Marco del Agua de la EU

Tanto los ciudadanos, las organizaciones ambientales, la naturaleza, los sectores que utilizan el agua, así como también a nivel económico, necesitan ríos y lagos, aguas subterráneas y aguas de baño más limpias. La protección del agua es, por lo tanto, una de las prioridades de la Política Europea del Agua, centrándose en volver descontaminar las aguas y garantizar que estas aguas naturales recuperaran su estado original.

La legislación europea sobre el agua comenzó con estándares en los ríos y lagos utilizados para la extracción de agua potable en 1975, y culminó en 1980 al establecer objetivos vinculantes de calidad para el agua potable, incluyendo también otras aguas de uso y subterráneas. Siendo su principal objetivo el control de emisiones, en una segunda fase se abordó la contaminación de las aguas residuales urbanas y de la agricultura, adoptando en 1991 una serie de medidas:

- La Directiva sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, que preveía el tratamiento secundario (biológico) de las aguas residuales y un tratamiento aún más estricto cuando fuera necesario (Directiva 91/271/CEE), modificada en 1998 por la (Directiva 98/15/CE).
- La Directiva sobre nitratos, que abordaba la contaminación del agua por nitratos procedentes de la agricultura (Directiva 91/676/CEE).

Otras medidas legislativas de acción de la Comisión Europea (CE) relacionadas fueron:

- La Directiva para el Control Integrado de Prevención y Contaminación (IPPC), adoptada en 1996, que abordaba la contaminación de grandes instalaciones industriales, luego transformada en la Directiva de Emisiones Industriales (Directiva 96/61/CE).
- Una nueva Directiva sobre agua potable, adoptada en noviembre de 1998, que revisaba los estándares de calidad (Directiva 98/83/CE).

Igualmente, la presión para un replanteamiento de la política comunitaria del agua llegó a un punto crítico a mediados de 1995, la CE, que ya había estado considerando la necesidad de un enfoque más global de la política del agua, llegó a la conclusión que, si bien se habían logrado considerables progresos en la resolución de problemas individuales, la política del agua estaba fragmentada, tanto en términos de objetivos como de medios, por tanto, era necesaria una sola pieza legislativa marco.

1. Introducción general

Directiva Marco del Agua (DMA), Directiva 2000/60/CE

El 23 de octubre de 2000, la (Directiva 2000/60/CE, <https://ec.europa.eu/environment/water/>) del Parlamento Europeo y del Consejo establecía un marco para la acción comunitaria en el ámbito de la política del agua.

El objetivo fue establecer las normas para detener el deterioro del estado de las masas de agua de la EU y conseguir un «buen estado» de los ríos, lagos y aguas subterráneas europeos en 2015.

En particular, esto incluía:

- La protección de todos los tipos de agua (superficiales, subterráneas, continentales y de transición).
- La regeneración de los ecosistemas de dentro de estas masas de agua y su alrededor.
- La reducción de la contaminación en las masas de agua.
- La garantía de un uso sostenible del agua por parte de los particulares y las empresas.

Puntos clave:

La legislación confería responsabilidades claras a las autoridades nacionales, debiendo:

- Especificar las cuencas hidrográficas situadas en su territorio nacional, es decir, los terrenos circundantes que drenan hacia determinados sistemas fluviales.
- Designar a las autoridades de gestión de las cuencas en consonancia con la reglamentación de la UE
- Analizar las características de cada cuenca hidrográfica, incluyendo la incidencia de la actividad humana y un análisis económico del uso de las aguas.
- Controlar el estado del agua de cada cuenca.
- Registrar las zonas protegidas, como las que se utilizaban para el agua potable, que requerían una especial atención.
- Elaborar y aplicar «planes hidrológicos de cuenca» para evitar el deterioro de las aguas superficiales, proteger y mejorar las aguas subterráneas y conservar las zonas protegidas.
- Garantizar la recuperación de los costes de los servicios relacionados con el agua, de manera que los recursos se utilizasen de forma eficiente y que quienes contaminaran pagaran.
- Proporcionar servicios de información pública y de consulta sobre los planes hidrológicos de cuenca.

Estrategia contra la contaminación química de las aguas superficiales

La regulación de los contaminantes químicos en el agua comenzó con la (Directiva 76/464/CEE), codificada más adelante en la DMA como 2006/11/CE, centrándose en contaminación causada por descargas de ciertas sustancias peligrosas. La introducción de disposiciones en virtud de la DMA incluía elementos transitorios de modo que partes de la legislación anterior fueran aplicables hasta finales de 2012.

Todo ello para establecer medidas contra la contaminación química de las aguas superficiales mediante la selección de:

- Sustancias prioritarias, constituyendo la mayor parte de la estrategia contra la contaminación química de las aguas superficiales, requería de la regulación y establecimiento de una lista con aquellas sustancias que presentasen un riesgo significativo para el medio ambiente acuático, propuestas de controles para reducir las emisiones, descargas y pérdidas de todas las sustancias.
- Contaminantes específicos de cuencas fluviales, por parte de los estados miembros de sustancias de interés nacional o local, para el control en el nivel pertinente.

Aunque ya en 2001, la DMA 2000/60/CE, mediante la (Decisión n° 2455/2001/CE) estableció la primera lista de sustancias prioritarias, Anexo X de la Directiva.

La preparación de la primera lista de sustancias prioritarias implicó un procedimiento denominado COMMPS, establecimiento de prioridades basadas en la supervisión y la modelización combinadas, que se desarrolló para identificar las sustancias de mayor preocupación a nivel comunitario. La lista identificó 33 sustancias o grupos de sustancias que se consideraron de mayor preocupación para las aguas europeas. Dentro de esta lista, se identificaron 11 sustancias como sustancias peligrosas prioritarias y, por lo tanto, sujetas a la interrupción o eliminación gradual de descargas, emisiones y pérdidas dentro de un calendario apropiado que no excediera los 20 años. Se identificaron otras 14 sustancias como sujetas a revisión posterior.

En este Anexo X se incluyeron 2 compuestos de los estudiados en esta tesis:

N°24, Nonilfenoles, CAS 25154-52-3, sustancia peligrosa prioritaria, al estar formada en realidad por un grupo de compuestos, se fijó el (4-(para)-nonilfenol), CAS 104-40-5, como sustancia prioritaria individual representativa típica como parámetro orientativo.

N° 25, Octilfenoles CAS:1806-26-4, esta sustancia prioritaria estaba sujeta a estudio para su identificación como posible "sustancia peligrosa prioritaria". Al estar formada también por un grupo de compuestos se fijó el (para-tert-octilfenol) CAS 140-66-9, como sustancia prioritaria individual representativa típica como parámetro orientativo.

En 2008, el estado de esta lista se abordó en la propuesta de la Comisión sobre estándares de calidad ambiental que se convirtió en la Directiva de Normas de Calidad Ambiental (EQSD/DNCA) (Directiva 2008/105/CE), que estableció las normas según lo exigido el Artículo 16 (8) de la DMA. El Anexo II del EQSD reemplazó al Anexo X de la DMA 2000/60/CE. Además, modificaba y posteriormente derogaba las Directivas del Consejo 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE.

La Directiva-EQSD estableció:

- En el Anexo I, límites a las concentraciones de las sustancias prioritarias en las aguas superficiales de 33 sustancias prioritarias y otros 8 contaminantes. Incluyendo concentraciones límite para los 2 compuestos individuales nombrados anteriormente en el Anexo X de la DMA 2000/60/CE, estudiados en esta tesis, Decisión n° 2455/2001/CE, ver **Tabla 1.1**.

1. Introducción general

Tabla 1.1 Extracto del Anexo I. Normas de la calidad ambiental para sustancias prioritarias y para otros contaminantes, Directiva 2008/105/CE

Nº	Nombre de la sustancia	Nº CAS	EQS-AA ^a	EQS-AA ^a	EQS-MAC ^b	EQS-MAC ^b
			Aguas superficiales continentales	Otras aguas superficiales	Aguas superficiales continentales	Otras aguas superficiales
24	Nonilfenol (4-Nonilfenol)	104-40-5	0.3 µg/L	0.3 µg/L	2.0 µg/L	2.0 µg/L
25	Octilfenol ((4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenol))	140-66-9	0.1 µg/L	0.01 µg/L	no aplicable	no aplicable

^a Este parámetro es la norma de calidad ambiental expresada como valor medio anual (EQS-AA). Salvo que se especifique otra cosa, se aplica a la concentración total de todos los isómeros.

^b Este parámetro es la norma de calidad ambiental expresada como concentración máxima admisible (EQS-MAC). Cuando en EQS-MAC se indica «no aplicable», se considera que los valores EQS-AA protegen contra los picos de contaminación a corto plazo en el caso de los vertidos continuos, ya que son significativamente inferiores a los valores calculados sobre la base de la toxicidad aguda.

^c Las aguas superficiales continentales incluyen los ríos y lagos y las masas de agua artificiales o muy modificadas conexas.

- En el Anexo II, la lista de 33 sustancias prioritarias, reemplazando el Anexo X de la DMA 2000/60/CE. Quedando redactado de la siguiente manera en el caso de los compuestos estudiados en esta tesis: N°24, Nonilfenol, CAS 25154-52-3, sustancia peligrosa prioritaria, al estar formada en realidad por un grupo de compuestos, se fijó el (4-nonilfenol), CAS 104-40-5, como sustancia peligrosa prioritaria individual representativa y característicos como parámetro indicativo.
- Nº 25, Octilfenol CAS:1806-26-4, esta sustancia prioritaria, al estar formada también por un grupo de compuestos se fijó el (4-(1,1',3,3'tetrametilbutilfenol) CAS 140-66-9, como sustancia prioritaria individual representativa y característicos como parámetro indicativo.
- La posibilidad de aplicar EQS para sedimentos y biota.
- La posibilidad de designar zonas de mezcla adyacentes a los puntos de descarga donde se esperara que las concentraciones de las sustancias en el Anexo I excedieran sus EQS.
- Un requisito para que los Estados miembros establecieran un inventario de emisiones, descargas y pérdidas de las sustancias en el Anexo I.
- Obligación de revisar la lista de sustancias prioritarias antes del 13 de enero de 2011. Incluyendo considerar, para una posible identificación como sustancias prioritarias, las sustancias establecidas en el Anexo III de la Directiva 2008/105/CE, donde se incluyó el BPA CAS: 80-05-7, como una de esas sustancias a considerar.

En 2009, para mejorar la calidad de los datos de monitoreo obtenidos en virtud de la DMA, la Comisión adoptó la (Directiva 2009/90/CE) que establecía especificaciones técnicas para el análisis químico y el monitoreo del estado del agua.

Finalmente, en 2013, y con la aprobación de la (Directiva 2013/39/UE), se modificaban las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, a fin de establecer normas de calidad y medidas de control de las emisiones a escala comunitaria, al considerar: "La contaminación química de las aguas superficiales una amenaza para el medio acuático, con efectos tales como toxicidad aguda y crónica en organismos acuáticos, acumulación de contaminantes en el ecosistema y pérdida de hábitats y de biodiversidad, y también suponer una amenaza para la salud humana".

Por tanto, y con carácter prioritario, era preciso identificar las causas de la contaminación y tratar las emisiones de contaminantes en la fuente misma, de la forma más eficaz en términos económicos y ambientales.

La revisión de la lista de sustancias prioritarias con arreglo al artículo 16, apartado 4, de la Directiva 2000/60/CE y al artículo 8 de la Directiva 2008/105/CE, no sólo modificó la lista de sustancias prioritarias, mediante la identificación de nuevas, para acciones prioritarias a escala de la Unión, pasando de 33 a 45, sino que estableció las nuevas EQSs para dichas sustancias, revisó algunas EQSs en algunas de sustancias ya existentes en función del progreso científico, y estableció algunas de biota.

Respecto a los compuestos estudiados en esta tesis, en esta nueva Directiva 2013/39/UE, ni los compuestos individuales nombrados en el Anexo II de EQS, ni sus EQSs fueron modificados. Pero si se especificaron más compuestos individuales de estos 2 grupos de nonilfenoles y octilfenoles:

Nº24, Nonilfenoles: Nonilfenol CAS 25154-52-3, con inclusión de los isómeros 4-nonilfenol CAS 104-40-5 y 4-nonilfenol, ramificado, CAS 84852-15-3.

Nº 25, Octilfenol: Octilfenol CAS 1806-26-4, con inclusión del isómero 4-(1,1',3,3'-tetrametilbutil)fenol CAS 140-66-9.

La Decisión (UE) 2015/495/CE, “The Watch List”

Para limitar la concentración de ciertas sustancias químicas en las aguas superficiales de la EU que representaran un riesgo significativo para el medio ambiente o la salud humana, la modificación de 2013 de la Directiva de Normas de Calidad Ambiental 2008/105/CE pidió un mecanismo que pudiera proporcionar información específica, de alta calidad, en toda la UE sobre las concentraciones de sustancias de posible preocupación en el medio ambiente acuático. Este mecanismo se refería a contaminantes emergentes y otras sustancias para las cuales los datos de monitoreo disponibles eran insuficientes o de calidad insuficiente para una evaluación de riesgos a nivel de la EU.

En 2015, mediante la (Decisión de Ejecución (UE) 2015/495) se estableció una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Esta lista preveía un número limitado de sustancias, supervisadas durante un máximo de cuatro años, incluyendo un número máximo de 10 sustancias o grupos de sustancias en la primera lista de vigilancia, aumentando en uno en cada actualización, hasta un máximo de 14 sustancias o grupos. Las revisiones frecuentes de la lista deberían asegurar una identificación rápida de estas sustancias con el fin de mantener los costes de monitoreo a niveles razonables. Con los datos recopilados estos compuestos podrían incluirse en la lista de contaminantes prioritarios.

Durante el desarrollo de esta primera lista, se estudió el BPA, aunque finalmente no fue incluido (Watch List Development, 2015). Los compuestos estudiados en esta tesis, objetos seguros de estudio fueron las hormonas sintéticas y naturales, E2, E1 y EE2. En el Anexo de la Decisión de Ejecución (UE)

1. Introducción general

2015/495), se incluyeron también los métodos de análisis para garantizar la compatibilidad de resultados y los límites de detección máximos aceptables:

-EE2: CAS 57-63-6, SPE-LC-MS-MS en grandes volúmenes, LOD < 0.035 ng/L.

-E2 y E1: CAS 50-28-2 y 53-16-7, SPE-LC-MS-MS LOD < 0.4 ng/L.

Con el fin de ser una lista dinámica actualizada periódicamente, en junio de 2018, apareció la segunda versión actualizada (Decisión de Ejecución (UE) 2018/840), donde permanecían objetos de vigilancia los estógenos nombrados anteriormente.

1.2 Los EDCs y compuestos relacionados estudiados

Los compuestos químicos con actividad hormonal, es decir, posibles disruptores endocrinos, incluyen: hormonas naturales de cualquier animal y humanas; compuestos químicos naturales, incluidas las toxinas producidas por los componentes de las plantas (los llamados fitoestrógenos) y ciertos hongos; productos farmacéuticos producidos sintéticamente que están destinados a ser altamente activos hormonalmente, como la píldora anticonceptiva; productos químicos y subproductos artificiales

En la **Tabla 1.2** se presenta una posible clasificación de los Compuestos Disruptores Endocrinos (EDCs) conocidos y/o estudiados a lo largo de las últimas décadas y que aparecen más extensamente descritos y nombrados en varias revisiones e informes, concretamente esta tabla está extraída de la página 190 del informe “State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals-2012” (WHO/UNEP, 2012). Las distintas clases de EDCs descritas en ella, incluyen productos químicos que se producen actualmente para fines comerciales y otros que ya no se fabrican o se pretende limitar o eliminar su producción.

Tabla 1.2 Clasificación de los EDCs (WHO/UNEP, 2012)

Clasificación	Ejemplos específicos de EDCs
<u>Compuestos químicos halogenados persistentes y bioacumulativos</u>	
Contaminantes orgánicos persistentes (POPs)	PCDDs/PCDFs, PCBs, HCB, PFOS, PBDEs, PBBs, clordano, mirex, toxafeno, DDT/DDE, lindano, endosulfán
Otros compuestos químicos persistentes y bioacumulativos	HBCDD, SCCP, PFCA, octafluorobifenilo, PCBmetilsulfonas
<u>Compuestos químicos menos persistentes y menos bioacumulativos</u>	
Plastificantes y otros aditivos en materiales	Ésteres de ftalato, fosfato de trifenilo, adipato de bis (2-etilhexilo), n-butilbenceno, triclocarbán, hidroxianisol butilado
Compuestos químicos aromáticos policíclicos (PACs)	Benzo (a) pireno, benzo (a) antraceno, pireno, antraceno
Compuestos químicos fenólicos halogenados (HPCs)	2,4-diclorofenol, pentaclorofenol, hidroxil-PCB, hidroxil-PBDE, tetrabromobisfenol A, 2,4,6-tribromofenol, triclosán
Compuestos químicos fenólicos no halogenados (Non-HPCs)	BisfenolA, bisfenolF, bisfenolS, nonilfenol, octilfenol, resorcinol
<u>Pesticidas, productos farmacéuticos e ingredientes para el cuidado personal</u>	
Pesticidas de uso actual	2,4-D, atrazina, carbaril, malathion, mancozeb, vinclozolin, procloraz, procymidone, chlorpyrifos, fenitrothion, linuron
Productos farmacéuticos, promotores de crecimiento y ingredientes para productos de cuidado personal	Endocrino activo (p.Ej., dietilestilbestrol, etinilestradiol, tamoxifeno, levonorgestrel), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, galaxolida, alcanfor de 3-bencilideno
<u>Otros compuestos químicos</u>	
Metales y compuestos organometálicos	Arsénico, cadmio, plomo, mercurio, metilmercurio, tributiltin, trifentiltin
Hormonas naturales	17β-Estradiol, estrona, testosterona
Fitoestrógenos	Isoflavonas, coumestans, micotoxinas, prenilflavonoides

Como se puede ver, por tanto, la clasificación y estudio de los EDCs es complicada, no solo son importantes sus características y propiedades químicas comunes y estructurales, sino que su uso, fuentes y origen antropogénico o natural también se han de tener en cuenta. Por otro lado, los distintos grupos de EDCs, pueden tener además otros efectos toxicológicos, importantes para su clasificación. Además, algunos de ellos, son persistentes y bioacumulables, otros EDCs son menos persistentes en el medio ambiente y no permanecen en él durante mucho tiempo (vidas semicortas), más específicamente, no son bioacumulativos pero son una preocupación porque la exposición a ellos es en realidad continua debido a su gran uso. Estos productos químicos han sido clasificados como "pseudo-persistentes", es decir, a través de la emisión continua al ambiente esencialmente se convierten en contaminantes "persistentes" (Mackay et al., 2014).

Debido a este tipo de características descritas, muchos de estos compuestos no son evaluados prese como EDCs, su mayor o menor grado de disrupción endocrina queda englobado dentro de otras características medioambientales, como su persistencia y/o toxicidad, por lo tanto, son estudiados y agrupados en familias de contaminantes más allá de este efecto concreto.

Basándonos únicamente en la problemática a nivel de disrupción endocrina, objeto de este estudio, existen distintos grupos de contaminantes a evaluar, concretamente en esta tesis se han escogido los siguientes grupos, además de la cafeína como indicador de la contaminación antropogénica:

- Estrógenos naturales y sintéticos, principalmente por su gran poder disruptor.
- Productos de cuidado personal (PCPs), como los desinfectantes y conservantes (parabenos), con poder disruptor bajo, pero utilizados a diario.
- Detergentes industriales como los tensioactivos alquilfenólicos, concretamente, sus productos de degradación, algunos de ellos como el nonilfenol y octilfenol legislados por su evidencia disruptora.
- El bisfenol A, añadido a las formulaciones industriales durante la fabricación principalmente de resinas epoxídicas y policarbonatos usados en todo tipo de productos de consumo humano.
- Compuestos que añaden características concretas a los productos finales, como los anticorrosivos, retardantes de llama y plastificantes, usados en grandes volúmenes.

El origen de los contaminantes estudiados, su producción, aplicaciones e impacto nos permite poder interpretar el riesgo de estos según los niveles determinados en el medioambiente y, por tanto, regularlos en función de ello, esto será tratado en el siguiente subapartado.

Para poder definir mejor la importancia, impacto y distribución de los contaminantes en el medioambiente, es importante conocer sus propiedades fisicoquímicas, ecotoxicidad y estrogenicidad, subapartados 1.2.2 y 1.2.3, respectivamente.

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos permite obtener cierta información necesaria para la optimización de los métodos analíticos desarrollados en esta tesis.

La ecotoxicidad y estrogenicidad, se enfocará desde el punto de vista de aportar valores específicos al impacto de los EDCs estudiados, por tanto, el subapartado 1.2.3 pretenderá ampliar la información

1. Introducción general

aportada a continuación, subapartado 1.2.1, donde solamente se expondrá de manera general, para cada grupo de compuestos estudiados, una breve explicación acompañada de una serie de referencias bibliográficas del impacto de estos contaminantes en el medio acuático.

1.2.1 Origen, producción, aplicaciones e impacto

Estrógenos

Los estrógenos esteroides pueden clasificarse como hormonas naturales o sintéticas. Los estrógenos naturales son hormonas biológicamente activas derivadas del colesterol y liberadas por la corteza suprarrenal, los testículos, los ovarios y la placenta en humanos y animales (Ying et al., 2002a). Antes de la excreción a través de la orina, los estrógenos libres se esterifican y forman los estrógenos conjugados con grupos glucurónidos y/o sulfatos, mecanismo común para desintoxicar/excretar parcialmente los estrógenos libres. Estos conjugados polares con un gran peso molecular, son biológicamente inactivos y más solubles en agua en comparación con su correspondiente equivalente libre o no conjugado (Khanal et al., 2006), ver apartado 1.2.2, pág. 19.

Aunque la mayoría de los estrógenos totales producidos por el cuerpo se excretan en forma conjugada por vía urinaria (Adlercreutz et al., 1987), los estrógenos naturales no metabolizados en sus formas conjugadas, son aportados constantemente al medio, predominantemente por humanos y ganado a través de heces y orina (Shore and Shemesh, 2016). Dependiendo de la fuente publicada, y en promedio, las mujeres embarazadas excretan entre 260–790 y 280–600 $\mu\text{g}/\text{día}$ de E1 y E2, respectivamente y entre 6000 a casi 10000 $\mu\text{g}/\text{día}$ de E3. Estos niveles son mucho más altos que los niveles correspondientes de estos estrógenos excretados en mujeres con la menopausia que reciben un tratamiento de terapia de reemplazo hormonal, aunque este sigue siendo 1.7 veces mayor que la tasa de excreción promedio por persona sin estas circunstancias (Adeel et al., 2017). También se tiene que tener en cuenta la aportación animal, por ejemplo, las vacas lecheras excretan 3600–28800 y 1200–3600 $\mu\text{g}/\text{día}$ de E1 y E2, respectivamente (Johnson et al., 2006; Shore and Shemesh, 2003).

El EE2, es un derivado de la hormona natural E2, se usa en casi todas las formulaciones modernas de píldoras anticonceptivas orales combinadas (Aris et al., 2014), con dosis medias de 30-40 $\mu\text{g}/\text{pastilla}$ (Muller et al., 2010). Además de la anticoncepción, el EE2 también se usa como medicamento para el síndrome menopáusico y posmenopáusico, terapia de reemplazo fisiológico en estados carenciales, tratamiento del cáncer de próstata y cáncer de seno en mujeres posmenopáusicas, osteoporosis, y otras dolencias (Aris et al., 2014; Kuster et al., 2005).

Algunos esteroides naturales y sintéticos pueden ser utilizados como promotores del crecimiento en la cría de animales y para el desarrollo de peces de un solo sexo en acuicultura (Hoga et al., 2018; Hurley et al., 2004; Kolok et al., 2018). El DES, se usó desde mediados del siglo XX durante unos años en el ganado vacuno, dando resultados muy satisfactorios (Rumsey et al., 1981). Este compuesto también se utilizó para prevenir abortos espontáneos en mujeres embarazadas, entre otros tratamientos, hasta que se comprobó era cancerígeno (Herbst et al., 1971; Wade, 1972). Las crecientes preocupaciones relativas a la seguridad del compuesto finalmente llevaron a que se prohibiera su uso como agente

promotor del crecimiento en 1979, lo que abrió un mercado para nuevos compuestos promotores del crecimiento (Epstein, 1990). Sin embargo, en la EC, el uso de sustancias hormonales para la promoción del crecimiento animal está prohibido (Directiva 96/22/CE). La prohibición se aplicó internamente sin discriminación y a las importaciones procedentes de terceros países a partir del 1 de enero de 1989 (Durant et al., 2002; Kuster et al., 2005).

En resumen, la población humana mundial, 7 mil millones, descarga aproximadamente 30000 kg/año. de estrógenos esteroideos naturales (E1, E2 y E3) y 700 kg/año de estrógenos sintéticos (EE2) únicamente como uso contraceptivo. Sin embargo, la liberación de estrógenos al medioambiente del ganado es mucho más alta, por ejemplo, en USA y la EU, la descarga anual de estrógenos por el ganado, 83000 kg/año, es más del doble de la tasa de descarga humana. (Hanselman et al., 2003; Ray et al., 2013).

Desinfectantes

El TCC y el TCS son agentes antimicrobianos, desinfectantes, que podemos encontrar en más de 2000 productos de consumo diario. El TCC se agrega principalmente a los jabones antimicrobianos, el uso de TCS es más amplio e incluye aplicaciones en enjuagues bucales y pasta de dientes, artículos para el hogar, como tablas de cortar de plástico, equipos deportivos, textiles y muebles, también es utilizado como agente estabilizante en multitud de detergentes y cosméticos (Adolfsson-Erici et al., 2002; Bester, 2003; Halden, 2014; McAvoy et al., 2002). El TCC se usa normalmente en concentraciones que varían de aproximadamente 0.5% a 2% en peso (Halden, 2014), que son concentraciones mucho mayores que las aplicadas de TCS, principalmente en el rango de 0.1 a 0.3% en peso (Chalew and Halden, 2009; Sabaliunas et al., 2003).

En 1998, la producción anual mundial de TCS fue de aproximadamente 1500 toneladas, con una mayoría producida en Europa, 350 toneladas, y en USA, 450 toneladas (G. S. Dhillon et al., 2015). En 2006, se utilizaron unas 450 toneladas de TCS en la UE, en 2007, se estimó que el 85% del volumen total de TCS en la UE se utilizó en productos de cuidado personal y cosméticos según el Comité Científico de la Comisión Europea sobre Seguridad del Consumidor (SCCS) en comparación con el 5% para textiles y el 10% para plásticos y materiales en contacto con alimentos (SCCP/1251/09, 2010).

Debido a los efectos nocivos en los organismos de estos compuestos, entre ellos su toxicidad y posible potencial estrogénico, su estudio y regulación ha empezado a coger importancia en los últimos años (Brausch and Rand 2011; Dhillon et al. 2015; Halden 2014; Halden et al. 2017). Por ejemplo, el TCS se eliminó en 2010 de la lista de aditivos de la UE para su uso en materiales plásticos en contacto con alimentos (Decisión 2010/169).

En el caso del TCS en los productos cosméticos, la regulación difiere según el país donde se comercializa (Bedoux et al., 2012), por ejemplo, según la UE, las normas japonesas y las autoridades canadienses, el TCS figura en una lista positiva, ingrediente autorizado, regulando las concentraciones límites :

1. Introducción general

- EU y en todo tipo de cosméticos, máx. 0.3% en peso, (Directiva 76/768/CEE; Reglamento (CE) N° 1223/2009).
- Japón, en drogas y productos cosméticos, máx. 0.1% en peso, (Notification No.331 of 2000) del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, Ley de Asuntos Farmacéuticos.
- Canadá, en enjuagues bucales, máx. 0.03% en peso, en otros cosméticos y drogas no prescritas, máx. 0.3% en peso, previa aprobación al mercado, (Cosmetics Alliance, Canada website).

En Estados Unidos, el TCS en cosméticos y drogas no prescritas, está regulado por la EPA y la Administración de Alimentos y Drogas (FDA), previa aprobación al mercado, básicamente, la EPA regula los usos de triclosán como pesticida (Office of Pesticide Programs, EPA website), mientras que la FDA se preocupa de los otros usos (Triclosan Federal Register, FDA website).

Parabenos

Los conservantes comúnmente llamados parabenos son una clase de compuestos que se han utilizado durante casi 100 años por sus propiedades bactericidas y fungicidas. Usados por primera vez como conservantes a mediados de la década de 1920 para productos farmacéuticos, la utilización de parabenos se expandió rápidamente a alimentos y cosméticos principalmente (Guo and Kannan, 2013; Soni et al., 2005). Comercialmente, se producen por esterificación del ácido p-hidroxibenzoico con un alcohol apropiado en presencia de un catalizador (por ejemplo, ácido sulfúrico concentrado o ácido p-toluenosulfónico) (Liao et al., 2002).

Los parabenos cumplen varios de los criterios de un conservante ideal, ya que poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, especialmente contra mohos y levaduras (Weber, 1993), son relativamente seguros de usar (es decir, relativamente no irritantes y de baja toxicidad), tienen costes de producción bajos, son biodegradables, son estables a la temperatura y en cuanto a la variación de pH (efectivos entre pH 4.5-7.5) y son suficientemente solubles en agua para producir la concentración efectiva en fase acuosa (Błędzka et al., 2014). Generalmente, la replicación microbiana ocurre en la fase acuosa y, por lo tanto, la cantidad de parabeno disuelto en la fase acuosa determina la capacidad conservante. A medida que aumenta la longitud de la cadena del grupo éster de parabeno, aumenta la actividad antimicrobiana, pero disminuye la solubilidad en agua (Charnock and Finsrud, 2007), ver apartado 1.2.2, pág. 20.

En la industria alimenticia, los parabenos se han agregado a los alimentos durante más de 50 años, generalmente los ésteres inferiores, metilo y propilo, son las opciones prácticas. Este uso de parabenos en la alimentación ha ido aumentando constantemente debido a la gran cantidad de productos que hoy en día se comercializan; vegetales procesados, productos horneados, grasas y aceites, condimentos, sustitutos del azúcar, extractos de café, jugos de frutas, encurtidos, salsas, refrescos y productos lácteos congelados.

Por producto, podemos encontrar distintas concentraciones y proporciones de ellos; en pasteles, glaseados, coberturas, rellenos y refrescos entre un 0.03–0.06% de MeP y PrP en proporción 3:1. Cremas, pastas, aceitunas y encurtidos contienen concentraciones del 0.1% de una combinación de

parabenos. En mermeladas, jarabes, jaleas y conservas podemos encontrar sobre un 0.07% de MeP y PrP en una relación 2:1 (Soni et al., 2005).

Los parabenos también son usados habitualmente como conservantes en productos de cuidado personal, porque, como ya se apuntado anteriormente, tienen una serie de propiedades que los hacen idóneos, específicamente, en la industria cosmética, los parabenos se formulan porque no tienen un olor o sabor perceptible, no producen decoloración, son efectivos a pH neutros y no causan endurecimiento o enturbiamiento. Además, pueden entrar en contacto con la piel, el cabello y el cuero cabelludo, los labios, las mucosas, las axilas y las uñas. Por lo tanto, pueden estar presentes en aproximadamente el 80% de los productos de cuidado personal (A. Pouillot et al., 2006; Rastogi et al., 1995). Sin embargo, otros estudios apuntan un uso más moderado, por ejemplo, en un informe del mercado danés, el 36% de los 751 productos considerados contenían parabenos, otro estudio noruego reveló que los parabenos estaban presentes en el 32% de 117 productos para el cuidado del bebé (Eriksson et al., 2008). Por otro lado, entre los distintos tipos de parabenos estudiados, las concentraciones más altas encontradas en varios productos cosméticos fueron el MeP seguido del PrP, EtP y en dosis menores el BeP (Matwiejczuk et al., 2020).

Desde principios de este siglo y debido al número creciente de estudios sobre los efectos de los parabenos tanto en el medio ambiente como en la salud humana (Błędzka et al., 2014; Brausch and Rand, 2011; Cashman and Warshaw, 2005; Golden et al., 2005; Juliano and Magrini, 2017), algunos fabricantes han alterado la composición de sus productos cosméticos y han reemplazado los parabenos por otros sistemas conservantes e introducir así las llamadas fórmulas "libres de parabenos".

En preparaciones farmacéuticas, el PrP es uno de los fungistatos más efectivos utilizados, por tanto, se incluyen en una gran variedad de formulaciones de medicamentos; supositorios, anestésicos, píldoras, jarabes, soluciones para aumentar de peso, soluciones inyectables y anticonceptivos. La concentración de uso de parabenos varía de un producto a otro, pero rara vez supera el 1% (Soni et al., 2005).

La regulación de estos conservantes varia no sólo dependiendo del país donde se comercializa sino del producto que se le añade. El uso de parabenos como aditivos alimentarios está autorizado en la EU (Reglamento (CE) N° 1333/2008), en cosmética, el uso también está regulado, con un máximo de 0.4% para uno sólo y del 0.8% para mezclas, (Directiva 76/768/CEE; Reglamento (CE) N° 1223/2009). El MeP es una de las sustancias controladas por las regulacion del Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Productos Químicos (REACH) (EC/List N° 202-785-7, ECHA), los otros parabenos actualmente solo están registrados en la lista de candidatos. Aunque la opinión sobre los parabenos de la SCCS, estima que la seguridad de los consumidores está garantizada siempre que el contenido total de butilparabeno y PrP en productos cosméticos terminados no supere el 0,19% (SCCS/1514/13, 2013). En USA, FDA, y en Canadá, "Health Canada", han recomendado el mismo umbral para los parabenos que la EU, aunque no existe una legislación que regule las concentraciones de estos conservantes en cosméticos en ninguno de esos países (Kirchhof and Gannes, 2013), en Japón la concentración máxima total de parabenos permitida es del 1.0% (Masten, 2005).

1. Introducción general

Bisfenol A

El BPA es el monómero de partida para la producción de polímeros de policarbonato y resinas epoxídicas (Hoekstra and Simoneau, 2013; Staples et al., 1998), debido a su versatilidad en aplicaciones técnicas, también es utilizado como; agente estabilizador en plásticos, antioxidante en la producción de neumáticos, producto de partida para la producción del retardante de llama tetrabromobisfenol A, y como un aditivo en papeles térmicos o recubrimientos de papel (Heemken et al., 2001).

Los polímeros de policarbonato, termoplásticos, proporcionan características de rendimiento únicas, alta resistencia a la rotura al calor y al fuego, biocompatibilidad, facilidad de esterilización, transparencia y ductilidad. Las resinas epoxi proporcionan una alta protección contra la corrosión, estabilidad térmica y resistencia mecánica. Debido a estas propiedades, estos materiales son usados principalmente como recubrimientos de toda clase de consumibles y productos industriales. Por tanto, podemos encontrar BPA en todo tipo de productos; CD, equipos médicos, techos transparentes, cascos de seguridad, carcasas para electrónica, productos en contacto con alimentos como botellas de agua y contenedores de almacenamiento de alimentos de uso múltiple, entre otros (Huang et al., 2012). Las resinas epoxi son, por ejemplo, utilizadas como recubrimientos de protección contra la corrosión en edificios y en la construcción o para aspas de molinos, también como compuestos que aportan dureza en piezas de automoción y artículos de ocio, o en productos de higiene.

El BPA fue reportado por primera vez por Dianin, 1891, luego fue sintetizado por Zincke, 1905, a partir de fenol y acetona (Brunelle, 2005). Debido a sus propiedades y a la gran variedad de productos dónde se utiliza, la producción de BPA ha crecido de manera exponencial, mientras que, por ejemplo, en 1964, se produjeron 42 toneladas de BPA en los Estados Unidos. Para 2003, la producción mundial de BPA era aproximadamente de 3,2 millones de toneladas (Michałowicz, 2014). Esta, ha seguido creciendo en los últimos años, llegando en 2010 a los 5 millones de toneladas (Flint et al., 2012; Huang et al., 2012).

Si miramos por países, en 1995, la producción de BPA en Alemania ascendió a 210000 toneladas y contribuyó con aproximadamente la mitad del requerimiento anual de Europa Occidental (Leisewitz and Schwarz, 1997). Actualmente, aproximadamente 0.78 millones de toneladas de BPA se sintetizan y se usan como materia prima para la fabricación de resinas de plástico y policarbonato de policarbonato en los Estados Unidos por año, lo que lleva a la designación de BPA como un químico de alto volumen de producción (Corrales et al., 2015). En resumen, el crecimiento de la producción global ha oscilado constantemente entre 0% y 5% anual, siendo ultimamente el más fuerte el que se está produciendo en China (Burrige, 2008), de hecho, entre 2000 y 2006, el mercado BPA en Asia solo creció a un promedio del 13% anual (Huang et al., 2012).

Además de su alto consumo y aunque inicialmente el BPA se consideró un estrógeno ambiental débil, cada vez más estudios demuestran su considerable poder como disruptor endocrino (Crain et al., 2007;

Fan et al., 2017; Flint et al., 2012; Sonavane and Gassman, 2019; Tsai, 2006). Además se ha probado que el BPA puede filtrarse de los productos que lo contienen y por tanto ser ingerido a través de las bebidas y los alimentos (Rubin, 2011). Todas estas evidencias, añadidas a la gran producción de este contaminante en todo el mundo ha llevado a la necesaria regulación de este producto (Nelson and Long, 2012; Vogel, 2009).

Según la ECHA, el BPA tiene que estar sometido a control (BPA, ECHA website). En diciembre de 2016, la UE decidió de restringir el uso del BPA en el papel térmico, esta prohibición entró en vigor en 2020, dando a los fabricantes, importadores y usuarios de papel térmico el tiempo necesario para eliminarlo y encontrar una alternativa (Pivnenko et al., 2018). La UE también incluyó en 2017, el BPA en la lista de sustancias candidatas extremadamente preocupantes debido a sus propiedades de toxicidad para la reproducción. En enero de 2018, la entrada del BPA se actualizó con objeto de recoger un motivo adicional para su inclusión en esta lista de sustancias candidatas, debido a sus propiedades de alteración endocrina que causan efectos adversos en el medio ambiente, con arreglo a la propuesta de Alemania.

Por todo ello, aunque el uso del BPA en materiales que están en contacto con alimentos está permitido, hay una cantidad máxima que se permite que se desprenda del material. Además, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) está revaluando los riesgos para la salud pública relacionados con la presencia de BPA en los alimentos. Por último, desde junio de 2011, está prohibido el uso del BPA en biberones para bebés en toda la UE, siendo algunos países de la UE aun más restrictivos, y desde noviembre de 2018, existe un límite de 0.04 mg/L de BPA que puede desprenderse de los juguetes para niños de hasta tres años.

En los Estados Unidos, los usos de todas las sustancias que migran de los envases a los alimentos, incluido el BPA, están sujetos a la aprobación previa a la comercialización por parte de la FDA como aditivos alimentarios indirectos o sustancias en contacto con alimentos (BPA, FDA website). En Australia y Nueva Zelanda, se evaluó la seguridad del BPA y los plastificantes en biberones y finalmente en junio de 2010 comenzó una eliminación voluntaria por parte de los principales minoristas (BPA, Food Standards Australia New Zealand website). En Canadá, el BPA se considera como una sustancia que puede estar ingresando al medio ambiente y que puede constituir un peligro para la vida o la salud humana en Canadá (BPA, Environment Canada and Health Canada website; Buka, Osornio-Vargas, and Walker 2009). La prohibición de la publicidad, venta e importación de biberones de policarbonato que contienen BPA entró en vigencia en marzo de 2010.

Compuestos alquilfenólicos

Uno de los principales grupos de tensioactivos no iónicos son los compuestos de alquilfenol etoxilados (APEOs), capaces de concentrarse en diferentes superficies y formar micelas en soluciones. La estructura anfipática de la molécula tensioactiva, que tiene una parte polar (hidrófila) y no polar (hidrofóbica), es la razón de su actividad superficial. El carácter hidrofílico de los APEOs se debe a una cadena de 1 a 40 unidades de etoxilado. la propiedad hidrofóbica opuesta la proporcionan los alquilfenoles con cadenas de hidrocarburos ramificados que contienen ocho, nueve o doce átomos de

1. Introducción general

carbono (Thiele et al., 1997). Los APEOs más comunes son los etoxilados de octilfenol (OPEOs), los etoxilados de nonilfenol (NPEOs) y los etoxilados de dodecilfenol (DOEOs) (White et al., 1994).

Debido a sus propiedades como tensioactivos, los APEOs se han usado ampliamente para formulaciones de limpieza, detergentes, y como ayudas de procesos industriales. Por lo tanto, históricamente han tenido una amplia gama de aplicaciones, como agentes dispersantes en la producción de papel y pulpa, agentes emulsionantes en pinturas de látex y formulaciones de pesticidas, agentes de flotación, limpiadores industriales (superficies metálicas, procesamiento de textiles y la industria alimentaria), limpiadores en frío para automóviles, y limpiadores domésticos (Thiele et al., 1997).

El principal compuesto para la síntesis de APEOs es el fenol, dependiendo del APEO deseado, existen diferentes rutas posibles para la síntesis de estos tensioactivos no iónicos. La alquilación de fenol con trimetilpenteno, produce 4-tert-OP, en una reacción catalizada por ácido con una mezcla de isómero noneno, el producto es una mezcla de 4-NP, productos precursores para la síntesis de APEOs, que se sintetizan luego mediante una reacción con óxido de etileno e hidróxido de potasio/etanol como catalizador (Priac et al., 2017; Thiele et al., 1997).

El consumo mundial anual de APEOs en 2000 fue de aproximadamente 700 kilotoneladas, de los cuales los NPEOs representaban el 80 al 85%, una década después y solo con respecto a los NPEOs, sus emisiones se calcularon por encima de 11 y 160 kilotoneladas por año en la EU y América del Norte, respectivamente (Acir and Guenther, 2018; Zgoła-Grzeškowiak et al., 2015). Después de su uso y eliminación, los APEOs se liberan en el medio ambiente y posteriormente se biodegradan a productos más tóxicos, estrogénicos y persistentes (Acir and Guenther, 2018; Chiu et al., 2010; Khanal et al., 2006; Priac et al., 2017; Soares et al., 2008), ver apartado 1.3, pág 36.

Debido a esto, el uso de estos tensioactivos ha sido evaluado ampliamente en las últimas décadas, llegando a restricciones de uso ya sean voluntarias o reguladas en muchos países, en Europa, los NPEOs se eliminaron de los detergentes domésticos y su uso se restringió (Directiva 2003/53/CE) (Renner 1997; Sheahan et al. 2002), finalmente la ECHA incluyó a NP en la lista de candidatos de sustancias muy preocupantes para su inclusión en el Anexo XIV del (Reglamento (CE) no 1907/2006) (REACH), aunque en constante evaluación, la directiva estipula que los NPs y los NPEOs “no pueden comercializarse ni utilizarse como sustancia o componente de preparados en concentraciones iguales o superiores al 0.1% en masa” y con esto queda regulado la mayoría de aplicaciones industriales, como formulaciones de plaguicidas, limpieza industrial, producción textil industrial e industria metalmeccánica. En la misma lista de candidatos, el OP y sus etoxilados se incluyeron por las mismas razones que NP, pero incluso ahora todavía no existen restricciones de uso sobre el OPs (Acir and Guenther, 2018). Además, la EU a través de la DMA, también regula estos compuestos en el mediambiente, ver apartado 1.1, pág 5.

Existen regulaciones de estos compuestos en otros países, en 1999, el gobierno canadiense incluyó el NP y sus etoxilados en la lista de sustancias tóxicas de la Ley de Protección Ambiental de Canadá, y en 2002, se publicaron directrices medioambientales con respecto a los niveles ambientales de NP para

la protección de la vida acuática (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2002). La EPA, en 2012, publicó una evaluación de alternativas a través de su programa “Safer Choice”, que identificó ocho clases de tensioactivos que son más seguros que los NPEOs. En el marco de la iniciativa de administración de detergentes más seguros, la EPA implementó una eliminación voluntaria de los NPEOs en los detergentes industriales para ropa, mediante la cual las empresas se comprometieron a poner fin a su uso en detergentes líquidos para 2013 y en detergentes en polvo para 2014, proponiendo en 2014 una nueva regla de uso, para revisar y evaluar cualquier uso nuevo o reanudado de NPs y NPEOs (EPA, 2014). En Asia, la Asociación de Naciones del Sudeste Asiático (ASEAN) comunicó en 2011, en el contexto de armonizar las normas nacionales con estándares internacionales, incluyó una regulación de NPs y NPEOs similar a la de la UE, sin embargo en África, parece no haber regulaciones aún (Acir and Guenther, 2018).

Benzotriazoles

Los benzotriazoles estudiados, BT y TT, previenen de la corrosión en metales y aceros, especialmente de cobre y latón (Hart et al., 2004; Martín-Rilo et al., 2018). Esto es debido a las propiedades complejantes a metales de su grupo NH, ver apartado 1.2.2, pág. 21, que forman una delgada película en la superficie del metal (Chadwick and Hashemi, 1978). Por esta razón, se usan en la industria de acabado de metales, en la industria de semiconductores (Hollingsworth et al., 2005), en el procesamiento de leche (Verheyen et al., 2009), se agregan a varios fluidos que entran en contacto con metales, tales como líquidos de deshielo y anticongelante de aeronaves, líquidos refrigerantes e hidráulicos, líquidos de frenos, fluidos para trabajar metales, entre otros (Breedveld et al., 2003; Cancilla et al., 2003; Gruden et al., 2001). El BT también se usa en detergentes para la protección de los lavavajillas (Janna et al., 2011; Ort et al., 2005; Vetter and Lorenz, 2013), y puede emplearse en el proceso de desarrollo en la industria fotográfica (Bergthaller, 2002)

Debido a su gran uso en todo tipo de productos, estos compuestos químicos son una clase de productos considerados de alto volumen de producción. En 2006, se informó que la producción anual de benzotriazoles estaba en el rango de 9000 toneladas/año en todo el mundo (Reemtsma et al., 2010), en 2012 la producción en USA fue del rango de 850 toneladas (Giraud et al., 2017); y en Australia de 100 toneladas, cuando por sus altas temperaturas, estos productos no tiene tantos usos (Loi et al., 2013). Su alto volumen de producción, con constantes descargas en el medioambiente (Asimakopoulos et al., 2013; McNeill and Cancilla, 2009; Weiss et al., 2006), junto con las evidencias sobre sus efectos adversos tóxicos (Cornell et al., 2000; Z. Q. Shi et al., 2019) y estrogénicos (Liang et al., 2014; Seeland et al., 2012), los clasifican como contaminantes emergentes (Bell et al., 2011; Giger et al., 2006a; Richardson, 2008).

Compuestos organofosforados

Los compuestos organofosforados que se emplean como retardantes de llama y plastificantes en una gran variedad de productos de consumo. Los organofosforados clorados TCEP y TCPP se usan predominantemente como retardantes de llama mientras que el éster no clorado TBEP, se aplica principalmente como plastificante, agente antiespumante y aditivo (Andresen et al., 2004; Marklund et

1. Introducción general

al., 2003; Reemtsma et al., 2008). Existen en el mercado otros compuestos considerados retardantes de llama organofosforados (OPFRs), como el tris (1,3-dicloro-2-propil)fosfato (TDCP), el tri-iso-butil fosfato (TiBP) y el tri-n-butil fosfato (TnBP), entre otros (Pantelaki and Voutsas, 2019; Regnery et al., 2011), pero no són objeto de esta tesis.

Centrandonos en los retardantes de llama, estos son aditivos químicos incorporados en materiales combustibles para evitar un incendio o para retrasar su inicio y propagación al interrumpir o dificultar el proceso de combustión. El uso de estas sustancias ha demostrado ser un salvavidas y también un factor clave para prevenir lesiones y pérdidas de propiedad (EFRA). Se dividen en 3 categorías principales según su composición química: retardantes de llama inorgánicos, halogenados (bromados y clorados) y retardantes que contienen organofosforados (Van der veen and Boer, 2012).

A pesar de sus beneficios, algunas clases de retardantes de llama, pueden persistir en el medio ambiente y ser peligrosos para las personas, como el caso de los PBDEs considerados y clasificados como POPs (Stockholm Convention website). Debido a las restricciones y/o prohibición de algunos de estos retardantes, el consumo de OPFRs, debería aumentar (Iqbal et al., 2017).

En 2016, los compuestos organofosforados representaron el segundo grupo de retardantes de llama más producido, alcanzando el 18% del mercado total en todo el mundo. El consumo global de OPFRs aumentó de 186000 toneladas en 2001 a 680000 en 2015 (Van der Veen y de Boer, 2012; Wang et al., 2015). Según una encuesta de la EPA, el TBEP y TCEP, se enumeraron como productos químicos de alto volumen de producción (Pantelaki and Voutsas, 2019).

Existen evaluaciones del riesgo para la salud y el medioambiente de los compuestos organofosforados estudiados debido a su posible toxicidad (Andresen et al., 2004; Du et al., 2019; ECHA, 2009, 2008; Ren et al., 2008; Wei et al., 2015) y estrogenicidad (X. Liu et al., 2012; Q. Zhang et al., 2014). Y aunque estos compuestos no están regulados, de hecho, ya en los años 90, los productores europeos de isocianato recomendaban su sustitución, remplazándolo por ejemplo por el TCPP (Quednow and Püttmann, 2009).

Cafeína

La cafeína es un alcaloide que se encuentra en más de 60 especies de plantas, por ejemplo, en las semillas del árbol de café y el cacao. Se usa en una gran variedad de bebidas, café, té, refrescos con cafeína, y de numerosos productos alimenticios, chocolate, pasteles y postres lácteos. El café, el té, el cacao y la cola contienen aproximadamente 100, 50, 10 y 40 mg de cafeína por porción, respectivamente, siendo el consumo promedio global es de aproximadamente 70 mg por persona por/día. También es usada en productos farmacéuticos, para mejorar el efecto de ciertos analgésicos en medicamentos para la tos, el resfriado y el dolor de cabeza, como estimulante cardíaco, cerebral y respiratorio y como diurético (Buerge et al., 2003). Aunque el cuerpo humano es eficaz para metabolizar este estimulante, finalmente se excreta entre un 0,5 y un 10%, principalmente en la orina. Además, la cafeína de uso doméstico puede llegar directamente al sistema de alcantarillado debido a la eliminación de bebidas no consumidas (Ferreira et al., 2005).

Por todo ello, es considerada un producto químico de alto volumen de producción y un contaminante emergente vinculado a las actividades humanas (Bruton et al., 2010). Además, varios estudios han demostrado que la cafeína es un buen indicador de la contaminación antropogénica en varios tipos de matrices, como el agua del río (Dafouz et al., 2018; Ferreira et al., 2005; Peeler et al., 2006).

1.2.2 Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas de los EDCs y compuestos relacionados estudiados que se han considerado más relevantes, $\log K_{ow}$, pKa y solubilidad a 20 o 25°C en agua, sus estructuras químicas, peso molecular (PM), así como el nombre del compuesto y n° CAS se reportan al final de este subapartado, en las **Tablas 1.3.a-d**.

Estrógenos

Los estrógenos naturales son esteroides de 17 carbonos, tienen una estructura común formada por cuatro anillos; uno fenólico/cetónico, dos ciclohexanos y un ciclopentano. Las diferencias estructurales entre ellos se encuentran en la configuración del anillo de pentano, en función del grupo funcional que se haya en el carbono de la posición 16 o 17. Por ejemplo, E1 tiene un grupo carbonilo en C17, el E2 tiene un grupo hidroxilo en C17, mientras que el E3 tiene dos grupos alcohol en C16 y C17. El grupo hidroxilo C17 del E2 puede apuntar hacia abajo o hacia arriba en el plano molecular, formando el compuesto α -E2 o β -E2, este último el estudiado en esta tesis, debido a su mayor estrogenicidad, y comúnmente denominado E2, ver apartado 1.2.3, pág. 26.

Los estrógenos naturales conjugados, se forman por esterificación de estrógenos libres por grupos glucurónidos y sulfatos en las posiciones C16 o C17 del anillo de pentano, o bien en el caso de los estrógenos conjugados, E1-3S, E3-3S y E1-3G, se enlazan mediante el grupo -OH del anillo fenólico C3 (Adeel et al., 2017; Hamid and Eskicioglu, 2012; Khanal et al., 2006). La estructura química del EE2 sólo difiere por un grupo etinil en el C17 del anillo de pentano de la del E2. En cambio el DES, es un estrógeno sintético no esteroideo derivado del estilbena, formado por una cadena de 3-hexadieno sustituido por dos grupos fenilo en posición trans.

Centrándonos en sus propiedades, entre los estrógenos libres, el E2 tiene la mayor hidrofobicidad, pero todos los otros son moderadamente hidrofóbicos, $\log K_{ow}$ entre 2.4 y 4.0. La solubilidad en agua de los estrógenos naturales está fuertemente relacionada con el pH, la temperatura, la presión de vapor y la fuerza iónica, así como con la materia orgánica suspendida y disuelta (Shareef et al., 2006a; Silva et al., 2012). Por otra parte, la presencia de grupos sulfatos y glucurónidos aumenta en gran medida la solubilidad de los estrógenos conjugados que son de 2 a 5 órdenes de magnitud más altos que los libres.

El valor de pKa de los estrógenos libres, 10.33, los hace ácidos débiles, la introducción de grupos ácidos, sulfato o glucurónido, conduce a la disminución del pKa de las formas conjugadas, ~3.3 y 1.75 para glucurónidos y sulfatos, respectivamente. Además, a menudo se observa una sorción más fuerte a un pH cercano al valor de pKa porque un mayor grado de protonación resulta en una mejor interacción

1. Introducción general

con la fase sólida (Zhang et al., 2016). En resumen, los estrógenos naturales, especialmente los libres con baja solubilidad en agua, alto $\log K_{ow}$ y valor de pK_a , son propensos a sorberse en la partición en fase sólida (Luo et al., 2014; Tran et al., 2018; Yu et al., 2019a).

Los estrógenos sintéticos EE2 y DES, igual que los estrógenos naturales, no son muy soluble en agua, teniendo el EE2, de hecho la menor solubilidad de todos los estrógenos estudiados, 4.8 mg/L, además también son un tipo de compuestos no polares e hidrófobos (Aris et al., 2014; Kuster et al., 2004).

La volatilidad de estos compuestos, es insignificantes bajo presión y temperatura normales en comparación con los compuestos orgánicos volátiles (Hamid and Eskicioglu, 2012), por lo tanto, son compuestos no volátiles, como así también lo indican sus bajas presiones de vapor (Adeel et al., 2017).

Desinfectantes

El TCC, tiene dos anillos fenil clorados, esta estructura es similar a los compuestos de carbanilida que a menudo se encuentran en los pesticidas como el diuron (Giacomazzi and Cochet, 2004). El TCS se clasifica como un hidrocarburo aromático halogenado que tiene una subestructura fenólica, difeniléter y bifenilo policlorado, esta, le confiere propiedades químicas relacionadas con muchos compuestos tóxicos como los PCBs, PBDEs, BPA y dioxinas (G. S. Dhillon et al., 2015). El TCS y TCC son compuestos orgánicos no volátiles, con presiones de vapor bajas, son poco solubles en agua, hidrofóbicos y ácidos débiles (Zhao et al., 2010).

Parabenos

Los parabenos o parahidroxibenzoatos son ésteres del ácido parahidroxibenzoico, de ahí el nombre común. Todos los miembros de esta clase de compuestos comparten el mismo esqueleto químico con un anillo de benceno, un grupo hidroxilo y un grupo éster en la posición para del anillo. Los compuestos difieren en la longitud de la cadena alquílica (Haman et al., 2015). Los parabenos estudiados se pueden clasificar en dos categorías: los parabenos de cadena corta, MeP y EtP, y parabenos de cadena larga, es decir, PrP y BeP (Soni et al., 2005).

Estos compuestos son moderadamente solubles en agua, de 160 mg/L para BeP a 2500 mg/L para MeP, a 25°C. Mientras que su solubilidad disminuye con el aumento de la longitud de la cadena, su $\log K_{ow}$ sigue el patrón opuesto, de 1.96 para MeP a 3.27 para BeP. Sus valores de pK_a d'entre 8.17 y 8.50 dependiendo de las especies de parabenos, los hacen ácidos débiles. Tampoco son muy volátiles, con presiones de vapor bajas y puntos de ebullición relativamente altos (Andersen, 2008; Petersen et al., 2007; Soni et al., 2005).

Bisfenol A

El BPA, formado por la condensación de fenol con acetona, es un compuesto que pertenece al grupo de los derivados de difenilmetano y bisfenoles con 2 grupos hidroxifenil. La presencia de grupos hidroxilo en BPA determina su buena reactividad, de manera similar a otros fenoles, el BPA puede

convertirse en éteres, ésteres y sales. Además, el BPA puede sufrir una sustitución electrofílica como nitración, sulfonación o alquilación (Flint et al., 2012; Vandenberg et al., 2007). Su estructura química, además, es similar a la de la hormona DES (Fenichel et al., 2013).

Es una sustancia sólida cristalina blanca con un punto de fusión de 156°C y un punto de ebullición de 220°C y baja presión de vapor, por tanto se espera baja volatilidad (Cousins et al., 2002; Michałowicz, 2014). Su log K_{ow} de 3.32, muestra una hidrofobicidad baja o moderada, es un ácido débil (Careghini et al., 2015; Mohapatra et al., 2010) y tiene una buena solubilidad en grasas y baja en agua (Shareef et al., 2006b, 2006a).

Compuestos alquilfenólicos

Aunque esta tesis se centra en ciertos productos de degradación de los compuestos alquilfenólicos es conveniente presentar la estructura general de los diferentes APnEOs, ver **Figura 1.1**, donde n es el número promedio de moles de óxido de etileno por mol de NP o OP, que varía de 1 a 100. El grado de etoxilación depende de la relación molar de NP/OP en la olefina (óxido de etileno en este caso).

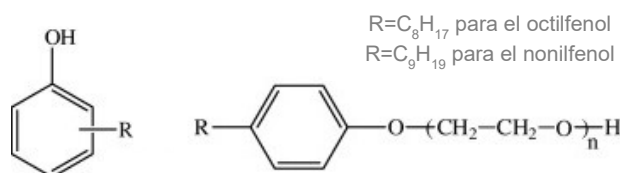


Figura 1.1 Estructura molecular general para alquilfenoles (izquierda) y APnEOs (derecha) donde n es el número promedio de moles de óxido de etileno por mol de OP/NP

La solubilidad de un tensioactivo APnEOs depende del número de grupos polares que forman la parte hidrófila de la molécula. Los oligómeros APnEOs inferiores (EO <5) se describen habitualmente como "insolubles en agua" o lipófilos, mientras que los oligómeros superiores se describen como "solubles en agua" o hidrófilos. Las solubilidades de los OPEO1–4 varían de 8 a 24.5 mg/L en agua, siendo la del OP de 12.6 mg/L, estas son superiores a las encontradas en los derivados de NP, que oscilan entre 3.02 y 9.48 mg/L a 20°C, para los NPEO1–4, siendo la del NP de 5.43 mg/L (Ahel and Giger, 1993). También podemos ver esta tendencia en los valores de log K_{ow} , encontrado valores entre 3.90 a 4.21 para los APEO1-4, de 4.12 para el OP y el valor más elevado de 4.48 para el NP.

Benzotriazoles

Los benzotriazoles se componen de un anillo de 1,2,3-triazol fusionado con un anillo de benceno. Concretamente, los compuestos estudiados han sido el BT, y su derivado metílico, el TT, que es como comúnmente se nombra a los isómeros de la mezcla técnica, principalmente compuesta por metilbenzotriazoles substituidos en las posiciones 4 y 5, conteniendo pequeñas cantidades de otros isómeros (Weiss and Reemtsma, 2005; Wolschke et al., 2011)

El BT y TT se caracterizan por una alta solubilidad en agua, 28 y 7 g/L, respectivamente, baja presión de vapor y bajos log K_{ow} , 1.23 y 1.89, respectivamente. Otra característica a tener en cuenta es que los

1. Introducción general

benzotriazoles a diferencia de muchas otras aminas aromáticas, son heterociclos ácidos, debido al grupo funcional NH, pKa 8.2-8.5, por lo tanto, pueden disociarse y aparecer como aniones a pHs ligeramente básicos o en contacto con cationes metálicos. A pH neutro en solución acuosa, se espera que los benzotriazoles sean no iónicos en lugar de catiónicos (Alotaibi et al., 2015b; Giger et al., 2006a; Hart et al., 2004; Reemtsma et al., 2010).

Compuestos organofosforados

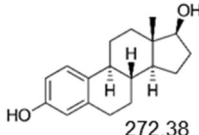
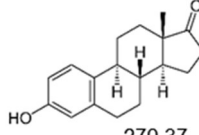
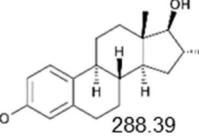
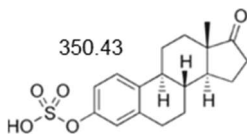
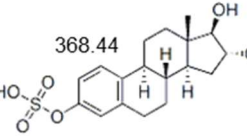
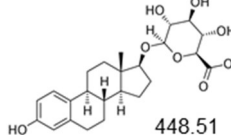
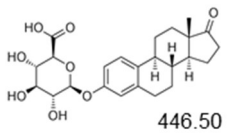
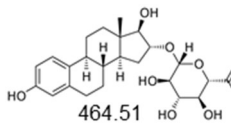
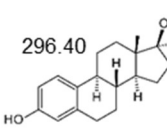
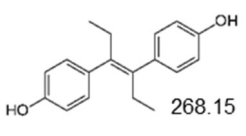
Las propiedades fisicoquímicas son bastante variables y dependen de los restos de alcohol esterificados al ácido fosfórico (Reemtsma et al., 2008), aunque todos los triésteres comparten por ejemplo la basicidad de enlace H del grupo fosfato y tienen volatilidades bajas debido a sus presiones de vapor (Adeel et al., 2017; Hamid and Eskicioglu, 2012; Regnery et al., 2011; Wei et al., 2015). Es importante también recalcar que el fosfato de tris (cloropropilo) (TCPP), se compone de cuatro isómeros con siete estructuras posibles y ocho números CAS siendo el isómero más abundante y más frecuentemente informado el fosfato de tris(cloroisopropil) (Truong et al., 2017)

De los tres OPs estudiados, el compuesto organofosforado no clorado TBEP, es el que presenta un $\log K_{ow}$ más alto, 3.8.

Cafeína

La cafeína es un alcaloide de la familia de la metilxantina, contiene dos anillos fusionados, de pirimidinediona e imidazol. La cafeína anhidra pura es un polvo blanco, inodora y de sabor amargo con un punto de fusión de 235-238°C, con un $\log K_{ow}$ inferior a 1, ligeramente ácida, pKa~6, es moderadamente soluble en agua a temperatura ambiente, 2g/100mL, pero muy soluble en agua hirviendo (Abdul Mumin et al., 2006; Lin et al., 2010).

Tabla 1.3.a Compuesto, nº CAS, logK_{ow}, pKa, solubilidad a 25°C en agua, estructura química y PM de los estrógenos y sus conjugados estudiados

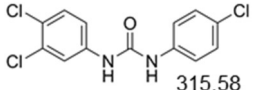
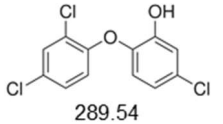
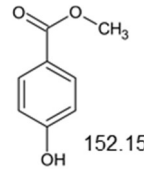
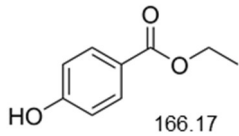
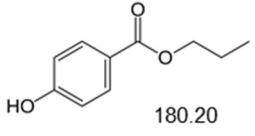
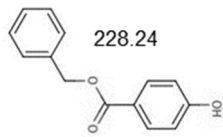
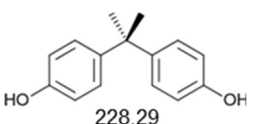
	Compuesto	Nº CAS	logK _{ow}	pKa	Solubilidad (mg/L)	Estructura química y PM (g·mol ⁻¹)
Estrógenos naturales	17-β-Estradiol (E2) ¹	50-28-2	3.94	10.6	5.4-13.3 ²	 272.38
	Estrona (E1) ¹	53-16-7	3.43	10.3	0.8-12.4 ²	 270.37
	Estriol (E3) ³	50-27-1	2.45	10.3	3.2-13.3 ²	 288.39
Estrógenos conjugados naturales	Estrona-3-sulfato (E1-3S) ³	481-97-0	2.81	-1.75	6329	 350.43
	Estriol-3-sulfato (E3-3S) ³	481-95-8	1.71	-1.75	1.75x10 ⁵	 368.44
	Estradiol 17-glucuronido (E2-17G) ¹	1806-98-0	3.81	3.63	1.12x10 ⁵	 448.51
	Estrona-3-glucuronido (E1-3G) ³	2479-90-5	1.14	3.3	8472	 446.50
	Estriol 16-glucuronido (E3-16G) ³	1852-50-2	2.34	3.46	1.0x10 ⁶	 464.51
Estrógenos sintéticos	Etinilestradiol (EE2) ¹	57-63-6	3.67	10.4	4.8	 296.40
	Dietilestilbestrol (DES) ⁴	6898-97-1	5.07	-	12	 268.15

Nota general: a menos que se indique lo contrario, los datos de propiedades se toman de las referencias indicadas en el nombre del compuesto.

¹(Adeel et al., 2017), ²(Khanal et al., 2006)³(Yu et al., 2019a), ⁴(Kuster et al., 2004).

1. Introducción general

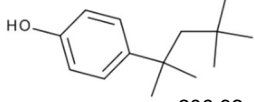
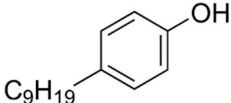
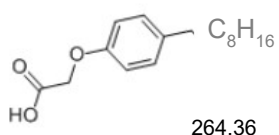
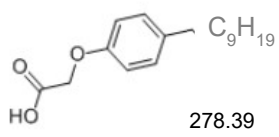
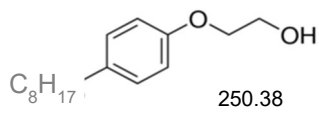
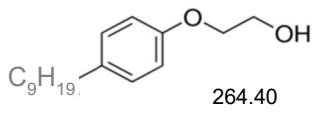
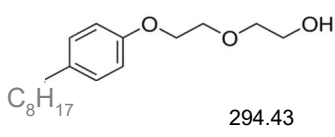
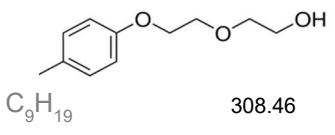
Tabla 1.3.b Compuesto, nº CAS, logK_{ow}, pKa, solubilidad a 25°C en agua, estructura química y PM de los desinfectantes, parabenos y BPA estudiados

	Compuesto	Nº CAS	logK _{ow}	pKa	Solubilidad (mg/L)	Estructura química y PM (g·mol ⁻¹)
Desinfectantes	Triclocarbán (TCC) ¹	101-20-2	4.9	12.7 ²	11	 315.58
	Triclosán (TCS) ¹	3380-34-5	4.7	8.14	12	 289.54
Parabenos	Metilparaben (MeP) ³	99-76-3	1.96	8.17	2500	 152.15
	Etilparaben (EtP) ³	120-47-8	2.47	8.22	885	 166.17
	Propilparaben (PrP) ³	94-13-3	3.04	8.35	500	 180.20
	Benzilparaben (BeP) ³	94-18-8	3.27	8.50	160	 228.24
BPA	Bisfenol A (BPA) ⁴	80-05-7	3.32	9.59 ⁵	120-200	 228.29

Nota general: a menos que se indique lo contrario, los datos de propiedades se toman de las referencias indicadas en el nombre del compuesto.

¹(Zhao et al., 2010), ²(Wu et al., 2009), ³(Haman et al., 2015), ⁴(Mohapatra et al., 2010), ⁵(Shareef et al., 2006b).

Tabla 1.3.c Compuesto, nº CAS, logK_{ow}, solubilidad a 20°C en agua, estructura química y PM de los compuestos alquilfenólicos estudiados

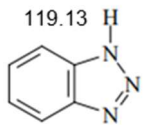
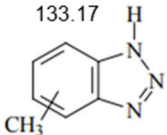
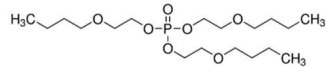
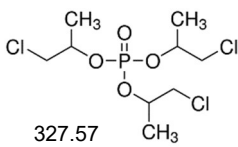
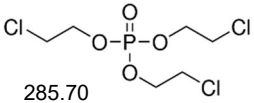
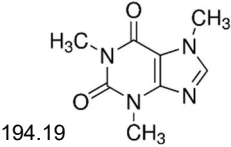
	Compuesto ¹	Nº CAS ^a	logK _{ow}	Solubilidad (mg/L)	Estructura química y PM (g·mol ⁻¹)
Alquilfenoles (APs)	4-tert-Octilfenol (OP)	140-66-9	4.12	12.6	 206.32
	4-Nonilfenol (NP)	84852-15-3	4.48	5.43	 220.35
Alquilfenol carboxilados (APECs)	Octilfenol monocarboxilado (OP1EC)	15234-85-2	-	-	 264.36
	Nonilfenol monocarboxilado (NP1EC)	3115-49-9	-	-	 278.39
Alquilfenol etoxilados (APEOs)	Octilfenol monoetoxilado (OP1EO)	51437-89-9	4.10	8.0	 250.38
	Nonilfenol monoetoxilado (NP1EO)	104-35-8	4.17	3.02	 264.40
	Octilfenol dietoxilado (OP2EO)	51437-90-2	4.00	13.2	 294.43
	Nonilfenol dietoxilado (NP2EO)	20427-84-3	4.21	3.38	 308.46

^a El nº CAS indicado corresponde al compuesto/patrón empleado en las determinaciones analíticas desarrolladas durante el estudio de esta tesis.

¹(Ying et al., 2002b)

1. Introducción general

Tabla 1.3.d Compuesto, n° CAS, logK_{ow}, pKa, solubilidad a 25°C en agua, estructura química y PM de los benzotriazoles, compuestos organofosforados estudiados y cafeína

	Compuesto	N° CAS ^a	logK _{ow}	pKa	Solubilidad (mg/L)	Estructura química y PM (g·mol ⁻¹)
Benzotriazoles (O)	1H-Benzotriazol (BT) ¹	95-14-7	1.23	8.2	28000 ²	119.13 
	Toliltriazol (TT) ¹	29385-43-1	1.89	8.5	7000 ²	133.17 
Organofosforados (OPs)	Tris(butoxietil) fosfato (TBEP) ³	78-51-3	3.8	-	1300 ⁴	 398.47
	Tris(cloroisopropil) fosfato ^b (TCPP) ³	13674-84-5	2.6	-	1080 ⁴	 327.57
	Tris(2-cloroetil) fosfato (TCEP) ³	115-96-8	1.7	-	7820 ⁴	 285.70
Cafeína	Cafeína (Caff) ⁵	58-08-2	0.16	-	-	194.19 

Nota general: a menos que se indique lo contrario, los datos de propiedades se toman de las referencias indicadas en el nombre del compuesto.

^a El n° CAS indicado corresponde al compuesto/patrón empleado en las determinaciones analíticas desarrolladas durante el estudio de esta tesis. ^b Isómero principal.

¹(Hart et al., 2004), ²(Giger et al., 2006b), ³(Reemtsma et al. 2008) ⁴(Regnery et al., 2011), ⁵(Reyes-Contreras et al., 2012)

1.2.3 Ecotoxicidad y estrogenicidad

Ecotoxicidad

La concentración prevista sin efecto (PNEC), ha sido obtenida de la base de datos NORMAN (NORMAN-Network, <http://www.norman-network.com/>). En la **Tabla 1.4** se presentan los valores de PNEC disponibles de los compuestos estudiados en agua dulce y sedimentos.

Tabla 1.4 Valores de PNEC de los compuestos estudiados en agua dulce y sedimentos

Compuesto	CAS	Tipo PNEC	Especie	Endpoint/Duración/Efecto	PNEC en agua dulce (µg/L)	PNEC en sedimento (µg/kg dw)
E2	50-28-2	EQS chronic water (=AA-EQS)	<i>HC5</i>	n.r./n.r./n.r.	0.0004	0.016
E1	53-16-7	EQS-proposal	<i>Danio rerio</i>	n.r./n.r./n.r.	0.0036	38.4
E3	50-27-1	PNEC	n.r.	n.r./n.r./n.r.	0.06	547
EE2	57-63-6	EQS chronic water (=AA-EQS)	<i>HC5</i>	n.r./n.r./n.r.	3.50E-05	-
DES	6898-97-1	P-PNEC pred	<i>Pimpephales promelas</i>	LC50/96 h/mortalidad	0.44	-
E1-3S	481-97-0	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	LC50/96 h/mortalidad	20.5	4190
E3-3S	481-95-8	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	IC50/72 h/tasa de crecimiento	21.2	-
E2-17G	1806-98-0	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC50/72 h/inmovilización	6.58	1043
E1-3G	2479-90-5	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	IC50/72 h/tasa de crecimiento	8.38	1348
E3-16G	1852-50-2	-	-	-	-	-
TCC	101-20-2	PNEC chronic	<i>Americamysis bahia</i>	n.r./n.r./n.r.	0.0011	0.23
TCS	3380-34-5	JD-UQN	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	n.r./n.r./n.r.	0.02	8.34
MeP	99-76-3	P-PNEC exp	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	n.r./n.r./n.r.	5	21.9
EtP	120-47-8	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	IC50/72 h/tasa de crecimiento	13.3	128
PrP	94-13-3	P-PNEC exp	<i>Dugesia japonica</i>	n.r./n.r./n.r.	12.3	116
BeP	94-18-8	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	IC50/72 h/tasa de crecimiento	2.95	23.1
BPA	80-05-7	EQS chronic water (=AA-EQS)	<i>Salmo trutta</i>	n.r./n.r./n.r.	0.24	15.1
OP	140-66-9	EQS chronic water (=AA-EQS)	n.r.	n.r./n.r./n.r.	0.1	8.26
NP	84852-15-3	EQS chronic water (=AA-EQS)	n.r.	n.r./n.r./n.r.	0.3	0.48
OP1EC	15234-85-2	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC50/72 h/inmovilización	0.58	65.6
NP1EC	3115-49-9	JD-UQN proposal	n.r.	n.r./n.r./n.r.	2	3.2
OP1EO	26636-32-8	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC50/72 h/inmovilización	0.79	1.27
NP1EO	104-35-8	P-PNEC pred	<i>Pimephales promelas</i>	LC50/96 h/mortalidad	0.64	62.3
OP2EO	51437-90-2	-	-	-	-	-
NP2EO	20427-84-3	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	IC50/72 h/tasa de crecimiento	0.37	47.5
BT	95-14-7	P-PNEC pred	<i>Selenastrum capricornutum</i>	IC50/72 h/tasa de crecimiento	7.77	31.2
TT	29385-43-1	-	<i>Daphnia galeata</i>	n.r./n.r./n.r.	8	12.8
TBEP	78-51-3	P-PNEC pred	<i>Daphnia magna</i>	LC50/48 h/tasa de crecimiento	0.14	0.23
T CPP	13674-84-5	AA-QSwater_eco	<i>algae</i>	n.r./n.r./n.r.	120	1189
TCEP	115-96-8	JD-UQN proposal	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	NOEC/n.r./n.r.	4	9.27
Caff	58-08-2	JD-UQN proposal	<i>Daphnia magna</i>	n.r./n.r./n.r.	1.2	5.61

(dw) dry weight, peso en seco. (n.r) not reported, no reportado.

EC50: Half Maximal Effective Concentration; Concentración Efectiva Media Máxima. LC50: Half Maximal Lettal Concentration; Concentración Letal Media Máxima. IC50: Half Maximal Inhibitory Concentration; Concentración Inhibitoria Media Máxima. NOEC: No Observed Effects Concentration; Concentración de Efectos No Observados

1. Introducción general

Estrogenicidad

La actividad estrogénica total en muestras ambientales se puede determinar en relación con la actividad del estrógeno natural E2, expresada como Equivalentes de Estradiol (EEQ), usando la siguiente fórmula, $EEQ = C_i * EEF_i$:

Donde C_i es la concentración ambiental medida de cada compuesto, quedando las unidades de EEQ generalmente expresadas en ng E2/L en matrices acuosas (aguas de río y residuales), y en ng E2/g en matrices sólidas (sedimentos y lodos). EEF_i es el factor de estrogenicidad relativo de los compuestos estudiados, calculado como la relación entre las concentraciones efectivas medias (EC50) de cada compuesto en relación con la EC50 de E2. Donde EC50 es la concentración de contaminante que produce un 50% de respuesta máxima estrogénica.

Existen en la literatura diferentes técnicas de bioensayo para la determinación de los EC50 y por tanto de los EEF_i s, en la **Tabla 1.5** se presentan varios de los valores de EEF_i reportados en la literatura.

Tabla 1.5 Valores de EEF_i encontrados en la literatura para los EDCs estudiados

Compuesto	EEF_i mín.-máx	EEF_i mediana	Referencias
E2	1	-	-
α -E2	0.0076-0.02	-	(Gadd et al., 2010; Yost et al., 2014)
E1	0.019-0.80	0.265	(Céspedes et al., 2004; Gadd et al., 2010; Kunz et al., 2017; Song et al., 2006; Van den Belt et al., 2004; Yost et al., 2014)
E3	0.0076-0.34	0.0565	(Céspedes et al., 2004; Gadd et al., 2010; Yost et al., 2014)
EE2	0.17-6.1	1.2	(Céspedes et al., 2004; Kunz et al., 2017; Rutishauser et al., 2004; Van den Belt et al., 2004)
DES	0.046-0.52	-	(Céspedes et al., 2004; Terasaki et al., 2009)
E1-3S	1.2×10^{-5} – 0.013	-	(Gadd et al., 2010; Yost et al., 2014)
E3-3S	6.2×10^{-6} – 5.5×10^{-4}	-	(Gadd et al., 2010; Yost et al., 2014)
E2-17G	3.7×10^{-4} – 0.012	-	(Gadd et al., 2010; Yost et al., 2014)
E1-3G	2.9×10^{-5} – 5.3×10^{-4}	-	(Gadd et al., 2010; Yost et al., 2014)
OP	1.4×10^{-6} – 1.3×10^{-3}	2.0×10^{-5}	(Céspedes et al., 2004; Legler et al., 2002; Rutishauser et al., 2004; Song et al., 2006)
NP	1.0×10^{-6} – 1.1×10^{-3}	8.8×10^{-5}	(Céspedes et al., 2004; Legler et al., 2002; Rutishauser et al., 2004; Song et al., 2006; Van den Belt et al., 2004)
NP1EO	3.8×10^{-6} – 1.3×10^{-5}	-	(Céspedes et al., 2004; Legler et al., 2002)
NP2EO	1.1×10^{-6}	-	(Legler et al., 2002)
BPA	4.9×10^{-6} - 2.5×10^{-3}	4.5×10^{-5}	(Céspedes et al., 2004; Kunz et al., 2017; Rutishauser et al., 2004)
MeP	3.0×10^{-7} – 7.5×10^{-7}	-	(Morohoshi et al., 2005; Terasaki et al., 2009)
EtP	3.0×10^{-6} – 7.1×10^{-5}	-	(Morohoshi et al., 2005; Terasaki et al., 2009)
PrP	3.0×10^{-5} – 4.4×10^{-4}	5.1×10^{-5}	(Morohoshi et al., 2005; Terasaki et al., 2009)
BeP	2.5×10^{-4}	-	(Morohoshi et al., 2005)
Parabens ^b	1.0×10^{-4} - 2.5×10^{-6}	-	(Routledge et al., 1998)

^a El valor de la mediana ha sido calculado en el caso de tener más de 3 valores de referencia. ^b BeP>PrP>EtP>MeP

1.3 Distribución, transformación y eliminación de los EDCs estudiados en el medio acuático

Los contaminantes, y por lo tanto los EDCs, acaban en el medio acuático a través de aguas residuales industriales; escorrentía de la agricultura, ganadería y acuicultura; lixiviados de vertederos; y los efluentes domésticos y hospitalarios, (Barbosa et al., 2016; Lapworth et al., 2012; Yang et al., 2017), ver **Figura 1.2**.

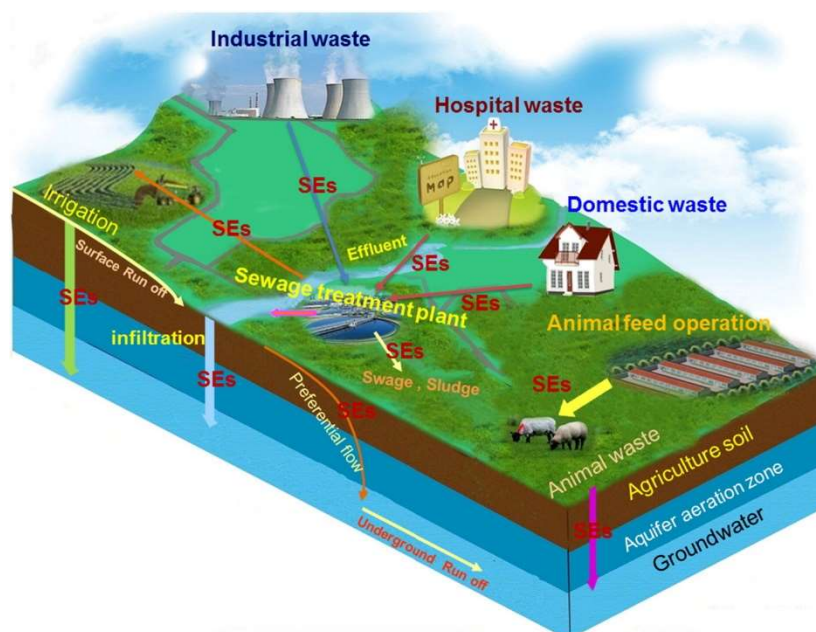


Figura 1.2 Ilustración esquemática de las principales fuentes de liberación de EDCs al medio ambiente. Fuente (Adeel et al., 2017; ver también Ting and Praveena, 2017)

El comportamiento de los EDCs, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, fijaran su destino y distribución, siendo claves los procesos de naturales para evaluar su impacto en el medio acuático.

Transformación, atenuación a través los ríos

Una vez los contaminantes estudiados entran en el sistema acuático a través de las distintas vías ya mencionadas sufren un proceso de atenuación natural que comprende mecanismos físicos, químicos y/o biológicos (Barbosa et al., 2016; Campbell et al., 2006).

Siendo la volatilización, dispersión, dilución, sorción, fotólisis, biodegradación/transformación y mineralización los principales procesos. Si bien la volatilización tiene un impacto menor, la dispersión y la dilución pueden conducir a una disminución significativa en las concentraciones de contaminantes (Gurr and Reinhard, 2006). La fotólisis indirecta o directa también puede conducir a la eliminación, pero depende en gran medida de la presencia de materia suspendida y radiación solar. Los EDCs también pueden degradarse por enzimas bacterianas (Khan et al., 2004).

1. Introducción general

La sorción en sedimentos y sólidos en suspensión también reduce la concentración de EDCs en agua, pero en realidad no se puede considerar una atenuación de los contaminantes, ya que simplemente quedan acumulados en otro compartimento acuático (Zhou et al., 2007). Otro proceso a tener en cuenta es la bioacumulación, fuente de concentración de los contaminantes en los organismos acuáticos (Geyer et al., 2000). Debido a que todos estos fenómenos se producen de forma natural y por tanto son incontrolables, la descarga de estos y otros contaminantes en el medio debe ser controlada, para ello, las plantas de tratamiento de aguas residuales deberían jugar un papel clave.

Las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs)

El funcionamiento de una EDAR involucra diferentes procesos físicos, químicos y biológicos para mejorar la calidad de las aguas residuales para su reutilización o descarga “segura y saludable” en las aguas receptoras, **ver Figura 1.3**.

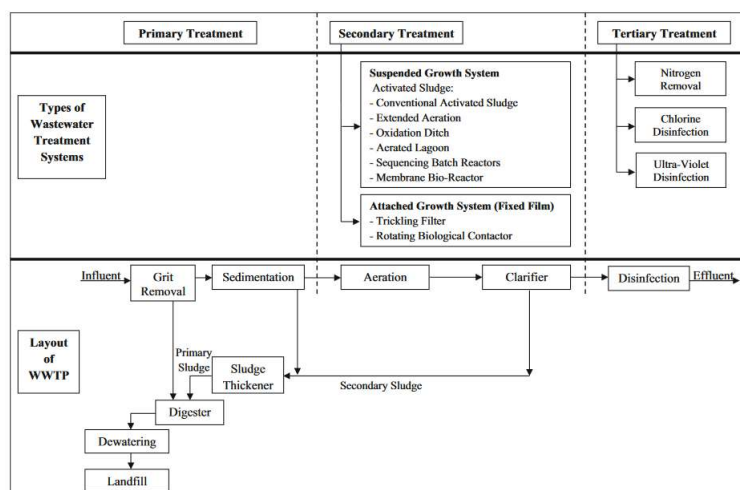


Figura 1.3 Diagrama esquemático de los distintos tipos de sistema de tratamiento de aguas residuales en las EDARs. Fuente (Ting and Praveena, 2017)

Aunque como indica la figura existen distintos sistemas de tratamiento de aguas residuales, las EDARs fueron y en muchos casos siguen diseñadas principalmente para la eliminación de sustancias orgánicas biodegradables, sólidos suspendidos, nutrientes (nitrógeno y fósforo), patógenos, metales pesados, inorgánicos disueltos, contaminantes prioritarios y orgánicos refractarios, en los procesos comúnmente denominados tratamientos convencionales.

De forma resumida, todos los procesos de diseño de las EDARs convencionales incluyen un tratamiento preliminar que consta de una serie de rejillas y filtros y de una unidad de eliminación de aceites y grasas, que se utilizan para eliminar los restos orgánicos e inorgánicos más grandes y pesados, con el fin de proteger el equipamiento y evitar interferencias con el proceso. Posteriormente, el sólido no disuelto se separa en un tanque de sedimentación por gravedad primaria para reducir la carga orgánica del siguiente proceso. Durante el proceso biológico, comúnmente llamado proceso de crecimiento aeróbico suspendido, una serie de microorganismos son utilizados para procesar las aguas residuales, dentro de este proceso, uno de los sistemas más utilizados es el proceso convencional de lodos activados (CAS), principalmente por su coste competitivo y su “alta” eficiencia. Después de este proceso, la

mezcla es transferida a un reactor de clarificación, finalmente las aguas residuales se filtran y desinfectan antes de su descarga (Metcalf et al., 2004).

Este tipo de plantas convencionales que constan principalmente de un proceso primario y un secundario biológico, no están diseñadas específicamente para los compuestos emergentes, como los EDCs, por tanto estos, son eliminados de manera más o menos eficaz según el compuesto (Carballa et al., 2004). Por ese motivo, en los últimos años, se están centrando esfuerzos en la mejora del diseño de las EDARs, para incluir tecnologías de tratamiento avanzadas, a través de los denominados procesos terciarios, con el objetivo de transformar los contaminantes no eliminados en los tratamientos convencionales en compuestos menos dañinos o incluso mineralizarlos (Auriol et al., 2006; Bolong et al., 2009; Cases et al., 2011; Citulski and Farahbakhsh, 2010; Liu et al., 2009; Sudhakaran et al., 2013; Tijani et al., 2013; Yang et al., 2017)

Por último, se ha de tener en cuenta también el proceso que sufren los lodos utilizados en las EDARs una vez quedan descartados del circuito, después de su recirculación. Estos, deben ser estabilizados, un paso muy importante en todo el tratamiento debido a que los lodos generados contienen una gran cantidad de macrocontaminantes. La digestión anaeróbica es el principal proceso de estabilización de lodos, destruyendo la mayoría de patógenos presentes, reduciendo también volumen de lodo y creando energía en forma de producción de biogas.

Dependiendo de la calidad del proceso, el lodo y las regulaciones, este podrá ser utilizado en la agricultura, en particular como fertilizante, una práctica común para mejorar la estructura del suelo y proporcionar nutrientes, pero que puede representar una fuente de contaminación ambiental (Mohapatra et al., 2016; Stasinakis, 2012; Verlicchi and Zambello, 2015). Aunque hoy en día, como ya se ha comentado, estos lodos deben ser tratados mediante digestión anaeróbica, compostaje u otros procesos biológicos y cumplir las normativas de uso (Sewage Sludge, EC website), la eliminación de ciertos contaminantes orgánicos es difícil debido al mecanismo de adsorción y la formación de intermedios (Zhang et al. 2014), por tanto, es importante implementar nuevas tecnologías en su tratamiento (Barnabé et al., 2009; Carballa et al., 2006; Dichtl et al., 2007; Johnson and Sumpter, 2001).

Comportamiento de los distintos grupos de EDCs estudiados en el medio acuático y en las EDARs

Como ya se ha comentado anteriormente, las fuentes de entrada en el medio acuático de los distintos EDCs estudiados en esta tesis son bastante variables, desechos domésticos, industriales, ganaderos, entre otros. Además, según el grupo de EDCs y sus propiedades fisicoquímicas, ver apartado 1.2.2, pág.19, los procesos naturales nombrados anteriormente, así como su comportamiento en las EDARs variaran y condicionaran su destino final.

Estrógenos

Una de las principales fuentes de estrógenos naturales y sintéticos proviene de la industria ganadera (Duncan et al., 2015; Shrestha et al., 2012), ver apartado 1.2.1, pág. 10. Los desechos de estos

1. Introducción general

animales, heces y estiércol líquido, pueden filtrarse por el suelo y acabar en el medio ambiente como residuos, aunque existe otra problemática más preocupante, y es la aplicación de abonos animales para tierras agrícolas, fuente de nutrientes para la agricultura orgánica (Xuan et al., 2008) y una de las fuentes principales de estrógenos en el medio ambiente (Andaluri et al., 2012; Arnon et al., 2008; J. van Donk et al., 2013; Khanal et al., 2006). Una vez descargados al medioambiente, los estrógenos debido a su hidrofobicidad, disminuyen significativamente sus concentraciones en la fase acuosa. Sus vidas medias son cortas, varios días, excepto en el caso del EE2, que es de varias semanas, indicando su mayor persistencia en el medio (Adeel et al., 2017; Jürgens et al., 2002; Ying et al., 2002a).

En la transformación que sufren estos compuestos tanto en las EDARs como en el medioambiente, la biodegradación juega un papel muy importante a la hora de comprender los procesos de degradación de estos compuestos y su bioconversión entre ellos, ver **Figura 1.4**.

Por ejemplo, el E1, E2 y E3 se encuentran en vías metabólicas de interconexión (Adeel et al., 2017; Casey et al., 2003), por lo tanto, los microorganismos ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas pueden interconvertir estos estrógenos o bien degradar-los, estos procesos también pueden ocurrir en mayor o menor grado para el estrógeno sintético EE2 (Czajka and Londry, 2006; Haiyan et al., 2007). Las formas conjugadas de estos compuestos, muchos menos activas y principales formas de excreción de estrógenos en los animales y humanos, pueden sufrir procesos de desconjugación y volver a sus formas más activas, los estrógenos libres (Kumar et al., 2012; Yu et al., 2019b). En condiciones anaeróbicas, estos no se degradan tan claramente, lo que indica que el estado oxidativo de la fuente tiene una influencia crítica en la vida media y la tasa de degradación (Ying et al., 2003; Ying and Kookana, 2005).

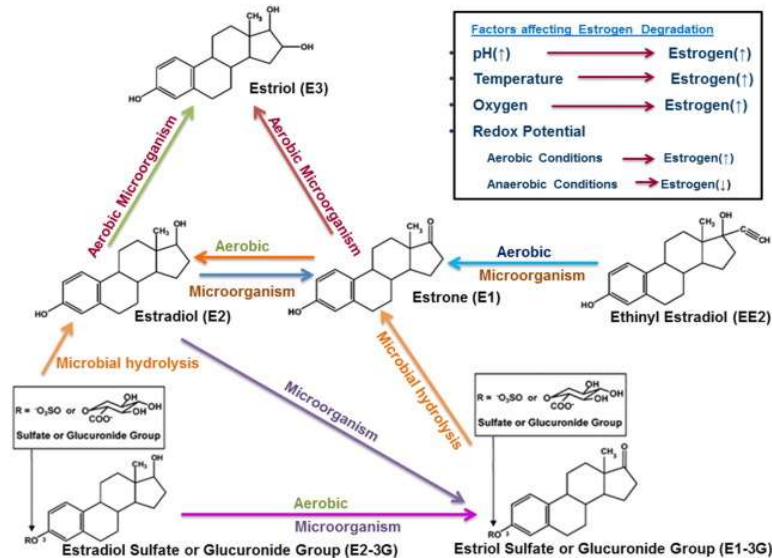


Figura. 1.4 Vías de interconversión de estrógenos naturales y sintéticos, y los factores que afectan a su degradación. Fuente (Adeel et al., 2017)

Los estrógenos como E2 y EE2 en ambientes acuáticos también son susceptibles de descomposición por fotocatalisis y fotólisis, su grado de degradación dependerá de su estructura química (Zuo et al., 2013).

Por otro lado, una de las vías de entrada de los estrógenos en el medioambiente es a través de los efluentes de las EDARs, y aunque estos compuestos tienden a quedar retenidos en los lodos, teniendo en cuenta que el proceso CAS es el más utilizado, y por tanto la sorción de estos compuestos ocurre rápidamente, debido a sus moderadas hidrofobicidades y poca volatilidad, y considerando que la biodegradación es el principal medio de eliminación, el tratamiento secundario o biológico es la etapa más importante para la eliminación de estos contaminantes (Racz and Goel, 2010).

Teniendo en cuenta que el tratamiento secundario juega un papel clave, como ya se ha apuntó en la Figura 1.4, la eliminación de estrógenos en condiciones aeróbicas en general es rápida, pero en condiciones anaeróbicas ésta es mucho menos eficiente, característica que influencia negativamente en el caso de la sorción de estrógenos en el lodo y su posterior tratamiento (Andersen et al., 2005; Clara et al., 2004). Otro problema reside en las tasas de desconjugación de estrógenos conjugados y la interconversión de estos compuestos entre ellos, normalmente, los glucurónidos de estrógeno se desconjugan más rápido que los sulfatos de estrógeno (Barnabé et al., 2009; Liu et al., 2015).

Existen en la bibliografía muchos estudios de los rendimientos de eliminación de los estrógenos en las EDARs, con resultados bastante variables (Ting and Praveena, 2017). Esto es debido a las características de estos compuestos, muy dependientes de las condiciones de los procesos de tratamiento en la EDARs, siendo necesario la optimización de las instalaciones en términos de sus parámetros operativos muy relevantes para una mejor y homogénea eliminación de los estrógenos naturales, sintéticos y sus conjugados (Citulski and Farahbakhsh, 2010; Gabet-Giraud et al., 2010; Hamid and Eskicioglu, 2012; Silva et al., 2012). Para tener una idea general, las capacidades promedio de eliminación de estrógenos naturales son del 75% o más en el caso de E2 y E3, y algo menores para la E1, esto se puede deber a la oxidación de E2 a E1 por los microorganismos en condiciones aeróbicas y la estabilidad de los conjugados de estrona, especialmente los conjugados de sulfato (Schlüsener and Bester, 2008). El EE2, debido a su naturaleza recalcitrante, presenta también menor eliminación (De Gussemé et al., 2009).

Desinfectantes

El TCS y TCC son persistentes en el medio ambiente, se predice que ambos compuestos tienen vidas medias del orden de 60 días en agua, 120 días en el suelo y 540 días en sedimentos (Halden and Paull, 2005). Además, son hidrófobos y se bioacumulan en organismos que viven en sistemas acuáticos, como gusanos de agua dulce y peces (Chalew and Halden, 2009; Coogan et al., 2007; Higgins et al., 2009; Schebb et al., 2011), especialmente a través de las partículas y sedimentos (Miller et al., 2008).

Además, el TCS es una "pre-dioxina" y está asociada con la formación de dioxinas policloradas y furanos, clorofenoles y cloroformo, de alta persistencia, bioacumulación y toxicidad. Estos productos de degradación son provocados en su gran mayoría por fotólisis (Aranami and Readman, 2007; Latch et al., 2003; Mezcua et al., 2004). y durante el tratamiento de aguas, especialmente en la desinfección con cloro (Buth et al., 2011, 2009; Canosa et al., 2005; Fiss et al., 2007; Rule et al., 2005). El TCS también puede transformarse en metiltriclosán,(MeTCS) aún más persistente (Dann and Hontela, 2011;

1. Introducción general

S. G. Dhillon et al., 2015; Rolf U. Halden et al., 2017). El TCC por su parte, se degrada por biodegradación aeróbica y fotólisis en 4-cloroanilina y 3,4-dicloroanilina (Ding et al., 2013).

Las EDARs eliminan TCS y TCC de las aguas residuales con una alta eficiencia del 97-98%, conduciendo a niveles bajos en el efluente descargado a las aguas superficiales (Heidler and Halden, 2007; McAvoy et al., 2002; Singer et al., 2002; Tran et al., 2016). Sin embargo, la eliminación de estos en las aguas residuales no necesariamente equivale a su degradación, o aunque ocurra puede dar lugar a subproductos de degradación como en el caso del TCS a MeTCS (Lozano et al., 2013; Miller et al., 2010). Durante el tratamiento de las aguas residuales, ambos antimicrobianos se distribuyen preferentemente en lodos de aguas residuales ricos en lípidos y carbono, acumulándose así en este abundante subproducto del tratamiento biológico (Davis et al., 2015; Heidler et al., 2006; Langdon et al., 2012). La reutilización de estos lodos en suelos, conlleva por ejemplo, una bioacumulación de estos desinfectantes en lombrices de tierra (Kinney et al., 2008; Macherius et al., 2014). Otra problemática es la posible emisión de subproductos como dioxinas durante la incineración de lodos de depuradora que contengan TCS y TCC que no hayan estado eliminados en los procesos de tratamiento previo de lodos en las EDARs (Doudrick et al., 2010).

Parabenos

Los parabenos tienen una persistencia baja en los ambientes acuáticos, aunque esta parece aumentar ligeramente con la longitud de la cadena alquílica (González-Mariño et al., 2011). Son fácilmente biodegradables en condiciones aeróbicas, teniendo algunos organismos la capacidad de degradarlos en fenol y ácido p-hidroxibenzoico y utilizar estos metabolitos como fuente de carbono (Amin et al., 2010; Valkova et al., 2001), en condiciones anaeróbicas, estos se degradan en menor grado (Hernández Leal et al., 2010).

Los parabenos también pueden experimentar una ligera fotodegradación y sus vidas medias pueden oscilar entre 9.5 a 20 h, según experimentos realizados con agua de río (Haman et al., 2015). La hidrólisis al ácido carboxílico correspondiente no se espera que sea un proceso de destino importante en ambientes acuáticos, según sus valores de pKa entre 8.17 y 8.50, ocurrirá por encima de pH neutro (Madsen et al., 2001). La baja presión de vapor de estos compuestos indica que no se espera su volatilización de las aguas superficiales. Su adsorción en sólidos o sedimentos suspendidos depende en gran medida del contenido orgánico de la materia sólida presente y de la hidrofobicidad de los parabenos, mayor según aumenta la longitud de la cadena alquílica (Yamamoto et al. 2007a), igual que su potencial de bioconcentración (Błędzka et al., 2014).

Los estudios muestran que, cualquiera que sea el proceso de purificación implementado en las EDARs, la eficiencia de eliminación de los parabenos es superior al 90% (Canosa et al., 2005; Li et al., 2015), según varios estudios, la eliminación de parabenos está prácticamente completa después del paso del tratamiento biológico (Andersen et al. 2007; Eriksson et al. 2009; Yamamoto et al. 2007b). Finalmente, solo hasta cierto punto, pueden unirse a la fracción sólida, partículas suspendidas o lodos de depuradora, debido a su moderada hidrofobia (Hernández Leal et al., 2010; Liao et al., 2013).

Bisfenol A

La liberación de BPA puede ocurrir durante su fabricación o procesamiento, otro punto importante es su filtración de los policarbonatos y resinas epoxídicas (Biles et al., 1997; Krishnan et al., 1993; Mountfort et al., 1997), así como durante la fabricación o reciclaje de papel donde se emplea (Rigol et al., 2002), ver apartado 1.2.1, pág. 14. La lixiviación en los vertederos, por hidrólisis de BPA a partir de plásticos (Wintgens et al., 2003), la combustión de residuos domésticos y la descomposición natural de los plásticos en el medio ambiente, también liberan grandes cantidades de este compuesto al medioambiente (Fuerhacker, 2003; Im and Löffler, 2016; Kang et al., 2007).

Según sus propiedades físico-químicas y su capacidad moderada de bioacumulación, ocurriendo principalmente a dosis altas (Corrales et al., 2015; Fent et al., 2003; Roberts et al., 2014), se estima que los compartimentos ambientales más grandes de BPA son abióticos y están asociados con agua y sólidos en suspensión ~53%, suelo ~25 o sedimentos ~23% (Cousins et al., 2002; Shareef et al., 2006a). La fotodegradación es la principal vía no biológica de la descomposición de BPA en el medio ambiente acuático, ya que la hidrólisis en condiciones ambientales es baja debido a la ausencia de grupos hidrolizables (Careghini et al., 2015). La fotodegradación del BPA es lenta en agua pura, pero puede acelerarse en presencia de disolventes de materia orgánica, incluido el ácido húmico y fúlvico (Kang et al., 2007). La biodegradación del BPA es relativamente rápida en agua, con una vida media de entre 2.5 y 4 días (Dorn et al., 1987). También se puede biodegradar fácilmente en el suelo y los sedimentos en condiciones aeróbicas, con valores de vida media estimados en suelos entre 3 y 37,5 días (Careghini et al., 2015), en cambio su degradación en suelos anaeróbicos es muy inferior (Chang et al., 2011). Por tanto, debido a su comportamiento en el medioambiente, el BPA no es considerado un contaminante persistente (Michałowicz, 2014). Pero si es un químico pseudo persistente, ya que a pesar de su corta vida media, es omnipresente en el medio ambiente debido a su liberación continua (Oehlmann et al., 2009).

Existen diferencias considerables de eliminación de BPA en las EDARs a gran escala dependen de las diferencias en el tipo de plantas, tipo de tratamientos, condiciones operativas y la composición de los afluentes (Melcer and Klečka, 2011). Para dos plantas con el mismo proceso de tratamiento y características de afluentes, las eficiencias de eliminación pueden diferir debido a las diferentes condiciones operativas, pero en general se reportan eliminaciones medias de entre el 70 y 90%. Estas eliminaciones en aguas residuales se deben principalmente a su biodegradación durante los tratamientos, pero también a su sorción en lodos (Mohapatra et al., 2010; Zhao et al., 2008), una problemática a tener en cuenta para este contaminante ya que la fuente principal de BPA en suelos es la aplicación a la tierra de lodos de depuradora o biosólidos. Anualmente, se estima que se aplican 4×10^6 y 2.4×10^6 toneladas secas de biosólidos en los Estados Unidos y Europa, respectivamente, principalmente a los campos agrícolas (Kinney et al., 2008). Dadas estas tasas, los aportes de BPA a los ecosistemas terrestres pueden ser sustanciales, a pesar de los niveles potencialmente bajos de BPA en estos (Kinney et al., 2006).

1. Introducción general

Compuestos alquilfenólicos

Los tensioactivos APEOs, usados durante los procesos industriales de limpieza principalmente, se descargan en las aguas residuales municipales e industriales y luego se transportan a las EDARs. Durante las diferentes etapas del tratamiento de aguas residuales, los APEOs se someten a un complejo proceso de biodegradación en el que varios microorganismos metabolizan los APEOs por su cadena etoxi y forman varios productos de degradación, que incluyen carboxilados de alquilfenol (APECs), etoxilados de alquilfenol (APEOs) y alquilfenoles (APs), estos últimos utilizados inicialmente para sintetizar ese tipo de detergentes (Acir and Guenther, 2018; Ying et al., 2002b), ver **Figura 1.5**.

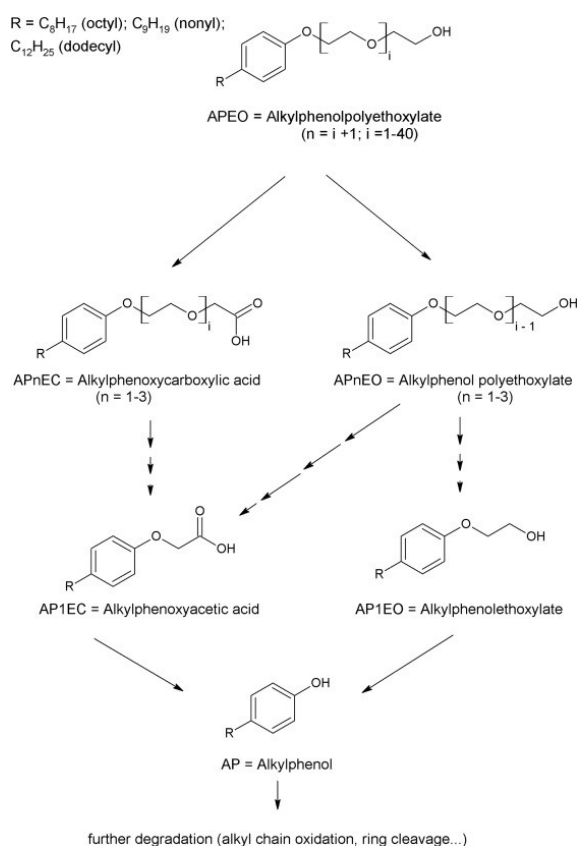


Figura 1.5 Vía de degradación esquemática, simplificada y general de los APEOs. Fuente (Acir and Guenther, 2018)

La formación y/o degradación de estos distintos compuestos alquilfenólicos en las EDARs dependerá del tipo de tratamiento y condiciones particulares del proceso usado, siendo por ejemplo importante los procesos aeróbicos-anaeróbicos que se producen en estas plantas en la formación de unos u otros compuestos alquilfenólicos (Ahel et al., 1994a; Minamiyama et al., 2006; Thiele et al., 1997).

Con respecto a la eliminación de estos productos, por tanto, existen estudios con una amplia variabilidad de resultados, jugando un papel importante los procesos terciarios (Pria et al., 2017). Mientras que los los APECs apenas son eliminados, evidenciado su poder recalcitrante (Chiu et al., 2010), los estudios apuntan a unas eliminaciones promedio por ejemplo para el NP1EO, NP2EO y NP

del 46%, 54% y 96%, respectivamente (González et al., 2007). Otro factor a tener en cuenta, como ya se ha comentado para otros compuestos estudiados en esta tesis, es la hidrofobicidad del compuesto, siendo en esos casos la eliminación por adsorción en los lodos de depuradora la que juega un papel importante, como es el caso del NP, creando un problema en la reutilización de estos desechos, si los tratamientos a que se someten antes de su aplicación no eliminan este tipos de contaminantes (Cirelli et al., 2010; Hernandez-Raquet et al., 2007; La Guardia et al., 2001; Langford et al., 2005).

Debido a la naturaleza por tanto de estos compuestos tensoactivos y su comportamiento en las EDARs, numerosos estudios coinciden en que la ocurrencia de los metabolitos de APEOs, se correlaciona principalmente con la descarga de efluentes de las EDARs, especialmente en las zonas que tratan aguas residuales de áreas industrializadas/urbanas entre otras actividades antropogénicas relacionadas (Hale et al., 2000; Ying et al., 2002b).

Además se ha de tener en cuenta que estos compuestos, también son inestables en el medioambiente, y por tanto experimentan tanto procesos de degradación produciendo los metabolitos ya nombrados, más estables y más persistentes, encontrándose en consecuencia, presentes en muchas matrices ambientales relevantes como aguas de río y sedimentos (Ahel et al., 1994b, 1994c; Chokwe et al., 2017; Maguire, 1999; Montgomery-Brown and Reinhard, 2003).

El potencial de acumulación de metabolitos APEOs, especialmente en varias especies acuáticas, se ha confirmado en muchos estudios (Correa-Reyes et al., 2007; Lv et al., 2019; Servos, 1999; Staniszewska et al., 2017), siendo el NP de especial importancia no solo por su persistencia en el medio y su moderada bioacumulación sino por su toxicidad y estrogénicidad (Soares et al., 2008), datos mostrados en el apartado anterior.

Benzotriazoles

Los principales mecanismos de eliminación de contaminantes que emergen en el medio acuático son la sorción y biodegradación, debido a las propiedades físico-químicas de estos compuestos polares estos procesos son menos eficaces (Alotaibi et al., 2015a; Z.-Q. Shi et al., 2019). Sus bajas hidrofobicidades, hacen que la sorción no juegue un papel importante en la eliminación de los benzotriazoles en las EDARs, en consecuencia, la proporción de distribución de estos en fase particulada, lodos, es baja (Asimakopoulos et al., 2013). Siendo por tanto en principio la biodegradación la parte principal de la eliminación de benzotriazoles en las EDARs, sus tasas de eliminación son muy variables, los valores más ampliamente encontrados en literatura sitúan la eliminación de BT entre un 30 y un 60 % y para el TT, entre un 20 y un 70% (Karthikraj and Kannan, 2017; Reemtsma et al., 2010).

Cabe también destacar tasas de eliminación negativas de BT en EDARs (Voutsas et al., 2006), pudiendo ser atribuidas a la transformación de otras moléculas complejas, o la descomposición de derivados conjugados de BT ya presentes en aguas residuales (Y.-S. Liu et al., 2011; Molins-Delgado et al., 2015). Por ejemplo, podrían explicarse por la formación de productos de biodegradación durante el proceso de derivados de BT también presentes en las aguas residuales, como el xilitriazol y 5-cloro-benzotriazol.

1. Introducción general

Otro factor a tener en cuenta en la eficiencia de eliminación de los benzotriazoles en las EDARs se atribuye al proceso de tratamiento (con unidad biológica o no), el tiempo de retención hidráulica (TRH), la temperatura y la carga de aguas residuales (Stasinakis et al., 2013). Liu y Col. (2012) informaron que un 40% de la cantidad total de BT se había eliminado durante el tratamiento en la laguna de estabilización, mientras que solo el 20% del BT total durante las unidades biológicas (Y.-S. Liu et al., 2012). Otra posibilidad sería un contenido de carbono relativamente bajo durante el proceso secundario en las EDARs, eso obligaría a los organismos a utilizar compuestos no fácilmente degradables como los BT (Herzog et al., 2013). Los procesos terciarios en las EDARs como membranas de ultrafiltración, filtración de arena e irradiación UV, podrían también mejorar significativamente su eliminación (Herrero et al., 2014a; Weiss et al., 2006).

Compuestos organofosforados

Los OPs están presentes como aditivos en lugar de adherirse químicamente a los productos finales, lo que resulta en una liberación simple mediante volatilización, abrasión y/o lixiviación durante su vida útil, incluidos los procesos de producción, uso, eliminación y reciclaje (Wei et al., 2015), incluso siendo sus presiones de vapor bastante bajas, es probable que se produzca la liberación de estos productos al aire (Lai et al., 2015; Marklund et al., 2005).

La presencia de estos en regiones remotas/polares implica el posible transporte atmosférico de largo alcance (LRAT) similar a lo que ocurre con los contaminantes orgánicos persistentes, POPs tradicionales (Möller et al., 2012; Wenhan et al., 2017). Y aunque no se consideran contaminantes orgánicos persistentes según lo definido por el Convenio de Estocolmo porque se degradan fácilmente a la luz solar, particularmente a través de procesos radicales OH y tienen una vida media corta, lo que indica un bajo riesgo para el medio ambiente con respecto a los criterios LRAT (Liagkouridis et al., 2015), su presencia en áreas árticas remotas sugiere un comportamiento similar al POP (Pantelaki and Voutsas, 2019). Además, se ha señalado que la deposición atmosférica puede ser una fuente importante de OPs en el medio ambiente de agua superficial (Möller et al., 2011; Regnery and Püttmann, 2010).

Otra fuente importante de estos compuestos son las EDARs, aunque las tasas de eliminación para el TBEP normalmente degradan el 50 % de este, llegando incluso al 90%, en general, las EDARs no degradan bien estos compuestos, siendo los compuestos organofosforados clorados los más recalcitrantes y por tanto resistentes a la eliminación (Liang and Liu, 2016; Meyer and Bester, 2004; T. Reemtsma et al., 2008).

1.4 Niveles de los EDCs estudiados en el medio ambiente acuático

Una vez expuesto en los apartados anteriores el origen, producción, características fisicoquímicas responsables de la distribución de los compuestos estudiados, así como los tratamientos principales empleados en las EDARs que llevan a la transformación y/o eliminación de estos, en este apartado se presentan una serie de gráficos de los niveles determinados tanto en el medio acuático como en las EDARs. Con ellos, se pretende presentar de manera visual lo que se ha estado discutiendo en los apartados anteriores.

Estos gráficos se han elaborado a partir principalmente de artículos “review” de autores que han compilado datos de los niveles de los compuestos estudiados más relevantes encontrados en la literatura en los últimos 20 años (Alotaibi et al., 2015a; Aris et al., 2014; Careghini et al., 2015; Haman et al., 2015; Hamid and Eskicioglu, 2012; Liu and Wong, 2013; Liu et al., 2009; López-Pacheco et al., 2019; Martín-Pozo et al., 2019; Montes-Grajales et al., 2017; Pantelaki and Voutsas, 2019; Z.-Q. Shi et al., 2019; Ting and Praveena, 2017; Vymazal et al., 2015; Yang et al., 2017; Zuloaga et al., 2012). También se han compilado los datos encontrados en los artículos consultados durante esta tesis.

En los 2 subapartados siguientes, se presentan 2 tipos de gráficos:

El primer tipo se ha elaborado a partir de los niveles máximos y mínimos encontrados, representado la mediana de estos, respectivamente, siendo ciertos compuestos y matrices no reportadas en las gráficas por no existir datos suficientes.

Para los compuestos más relevantes y que por tanto existen más estudios de niveles medioambientales, como en el caso de los estrógenos naturales y el EE2, el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas superficiales y residuales, además de la mediana de los datos mínimos y máximos, se ha aplicado la estadística descriptiva de diagrama de cajas y bigotes, donde se puede ver la distribución de estos niveles máximos y mínimos.

Para la representación de los niveles mínimos, ya sea para el cálculo de la mediana, como para la representación en forma de diagrama de cajas, no se han tenido en cuenta para la elaboración de los gráficos los datos inferiores al LOD, aunque al pie de cada gráfico se presentan el % de LODs obviados en la estadística, de esta manera en realidad se presentan los niveles mínimos detectados encontrados en el medioambiente, pretendiendo de esta manera representar el rango de valores mínimos y máximos positivos encontrados en la bibliografía

Por último, también se facilitarán datos y referencias bibliográficas de algunos de los niveles encontrados en la literatura para los compuestos estudiados en esta tesis, donde no existen suficientes datos de niveles medioambientales para su representación gráfica.

1. Introducción general

1.4.1 Aguas y sedimentos de río

Los niveles medianos máximos y mínimos detectados para los estrógenos naturales y el estrógeno sintético EE2 en aguas de río y sedimento, se presentan en la **Figura 1.6.a**, para aguas de río, también se presenta la distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas en forma de diagrama de caja con y bigotes, **Figura 1.6.b**.

En el caso de los estrógenos naturales conjugados, las concentraciones encontradas por varios autores en aguas de río varían entre niveles de nd a 14 ng/L para los conjugados en forma de sulfato, y nd para conjugados glucurónidos (Brix et al., 2010; Naldi et al., 2016; Pedrouzo et al., 2009; Yao et al., 2018).

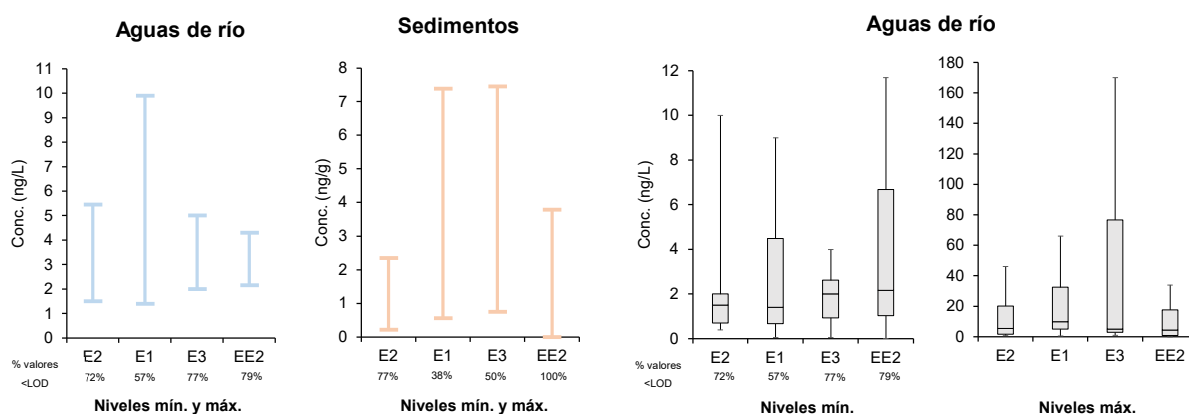


Figura 1.6.a Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los estrógenos E2, E1, E3 y EE2 en aguas de río y sedimentos

Figura 1.6.b Distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas para los estrógenos E2, E1, E3 y EE2 en aguas de río representadas mediante diagrama de caja y bigotes

Los niveles medianos máximos y mínimos detectados para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas de río y sedimentos, se presentan en la **Figura 1.7.a**, para aguas de río también se presenta la distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas en forma de diagrama de caja con y bigotes, **Figura 1.7.b**.

Los niveles reportados para los APEOs mono y dietoxilados, en aguas de río, muestran concentraciones de hasta unos 300 ng/L, siendo el NPE2O el que presenta las concentraciones más elevadas (Jonkers et al., 2010; Loyo-Rosales et al., 2010; Micić and Hofmann, 2009; Ying, 2006). Aunque es en el caso de los APECs donde se pueden encontrar los niveles más altos llegando a concentraciones de $\mu\text{g/L}$ (Brix et al., 2010). Los niveles más altos en sedimentos de río se encuentran para los compuestos de NP2EO y NP1EC (Loyo-Rosales et al., 2007; Micić and Hofmann, 2015; Ying et al., 2002b), con niveles máximos por ejemplo de 818 y 95 ng/g, respectivamente (Petrović and Barceló, 2001).

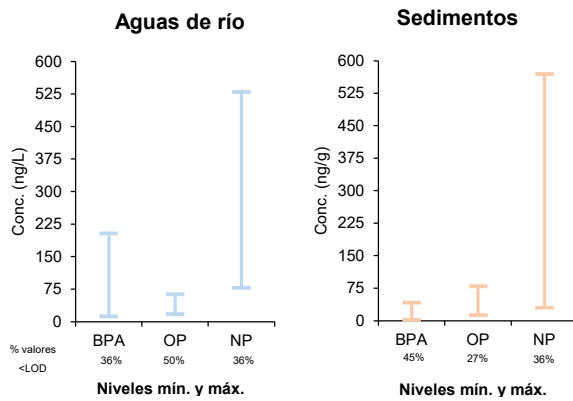


Figura 1.7.a Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas de río y sedimentos

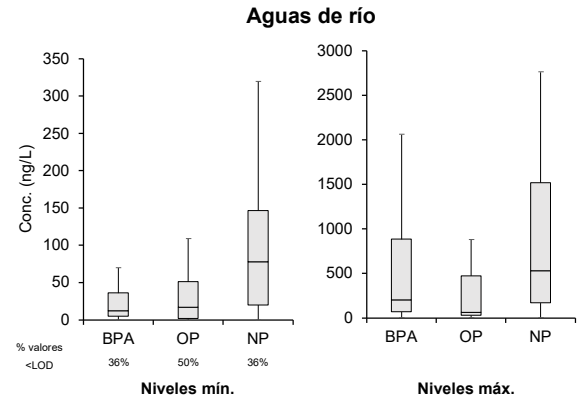


Figura 1.7.b Distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas de río representadas mediante diagrama de caja y bigotes

Los niveles medianos máximos y mínimos detectados para los desinfectantes, parabenos, bezotriazoles y compuestos organofosforados en aguas de río y sedimentos, se presentan en las **Figuras 1.8 y 1.9**.

Existen pocos datos sobre los niveles para el conservante BeP, debido a su menor uso, no siendo por tanto reportados en las gráficas. El BeP, normalmente no se detecta en aguas de río (Blanco et al., 2009; González-Mariño et al., 2009; Jonkers et al., 2010; Terasaki et al., 2012; Yamamoto et al., 2007a), y los niveles encontrados son menores que para los otros parabenos con máximos de por ejemplo 4.4 ng/L (Jonkers et al., 2009).

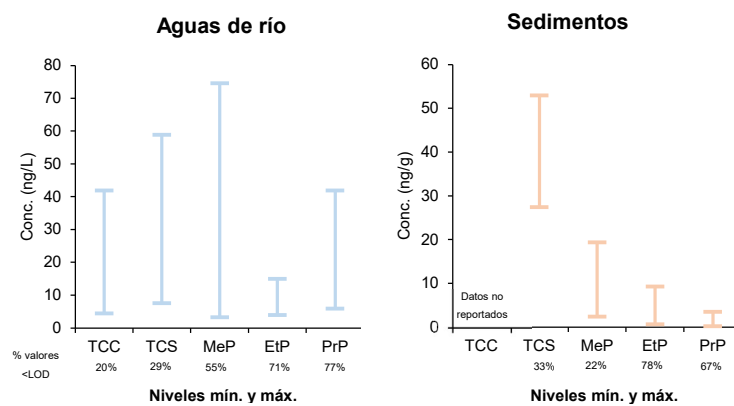


Figura 1.8 Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los desinfectantes TCC y TCS, y los parabenos MeP, EtP y PrP en aguas de río y sedimentos

1. Introducción general

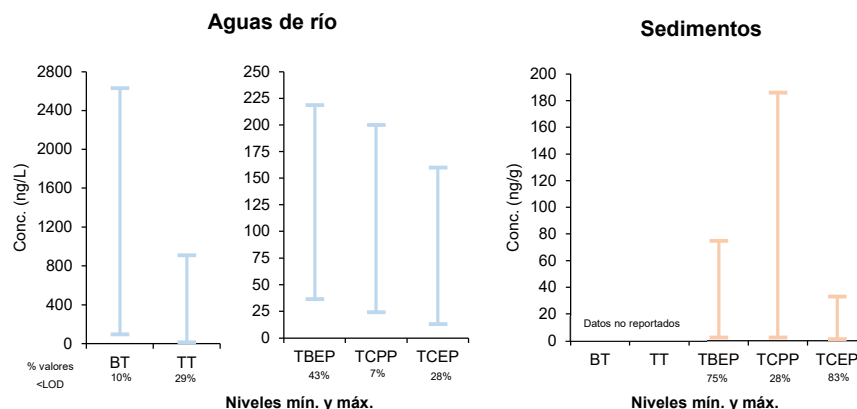


Figura 1.9 Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los benzotriazoles y los compuestos organofosforados TBEP, TCPP y TCEP en aguas de río y sedimentos

1.4.2 Aguas residuales y lodos de depuradora

Los niveles medianos máximos y mínimos detectados para los estrógenos naturales y el estrógeno sintético EE2 en aguas residuales y lodos de EDARs, se presentan en la **Figura 1.10.a**, para aguas residuales también se presenta la distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas en forma de diagrama de caja con y bigotes, **Figura 1.10.b**.

En el caso de los estrógenos naturales conjugados, las concentraciones encontradas por varios autores varían entre nd-160 y nd-35 ng/L para los conjugados en forma de sulfatos en aguas de afluente y efluente, respectivamente, y entre nd-19 y nd-0.7 ng/L para las formas conjugadas glucurónidas en afluente y efluente respectivamente (D'Ascenzo et al., 2003; Naldi et al., 2016; Pedrouzo et al., 2009; Reddy et al., 2005). Para el estrógeno sintético DES no se han encontrado niveles detectables (Wu et al., 2017).

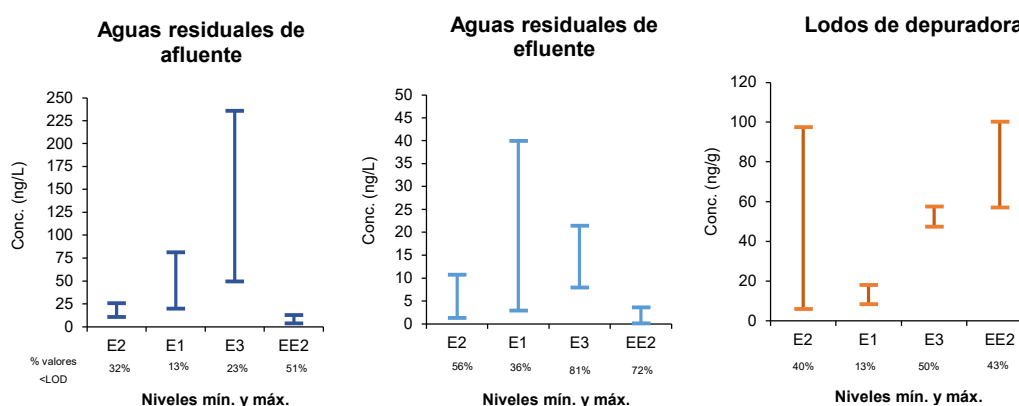


Figura 1.10.a Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los estrógenos E2, E1, E3 y EE2 en aguas residuales de afluentes y efluentes, y lodos de EDARs

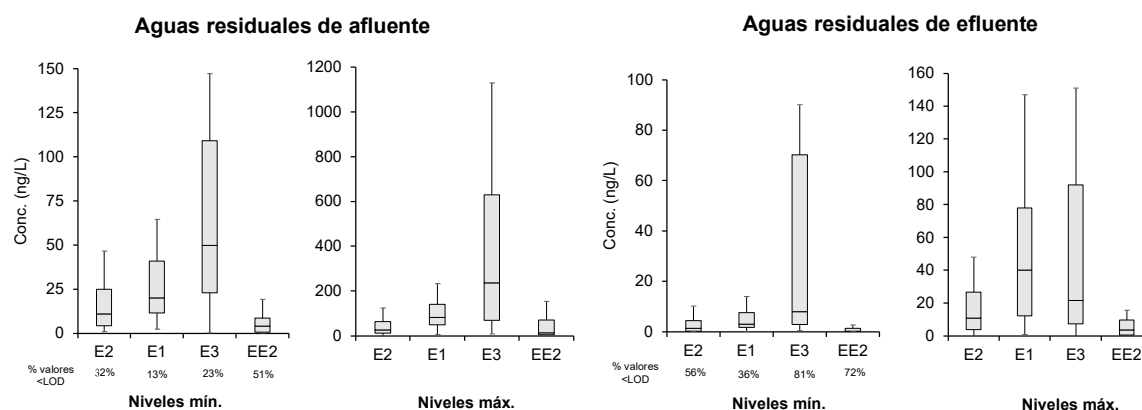


Figura 1.10.b Distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas para los estrógenos E2, E1, E3 y EE2 en aguas residuales de afluentes y efluentes de EDARs, representadas mediante diagrama de caja y bigotes

Los niveles medianos máximos y mínimos detectados para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas residuales y lodos de EDARs, se presentan en la **Figura 1.11.a**, para aguas residuales también se presenta la distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas en forma de diagrama de caja con y bigotes, **Figura 1.11.b**.

Los niveles reportados de compuestos alquilfenólicos carboxilados y etoxilados (Céspedes et al., 2008; Huang et al., 2014; Stasinakis et al., 2013; Wu et al., 2017), ponen en evidencia que estos compuestos no son totalmente degradados por las EDARs, encontrando por ejemplo niveles de NP1EO y NP2EO de 6.9 y 17.4 $\mu\text{g/L}$ en efluentes, respectivamente (Stasinakis et al., 2008). Concentraciones similares de los productos de degradación carboxilados los podemos encontrar también en aguas tratadas (Chiu et al., 2010; Koh et al., 2008).

Los estudios en los últimos 20 años que existen en la literatura sobre los APs en lodos de depuradoras son relativamente escasos dada la importancia de estos contaminantes en el medio. Además, aunque la mayoría apuntan a niveles de mg/Kg en esta matriz, (Aparicio et al., 2007; Céspedes et al., 2008; González et al., 2010; Mao et al., 2012), concretamente para el NP, algunos autores dan niveles máximos bastante inferiores (Samaras et al., 2011)

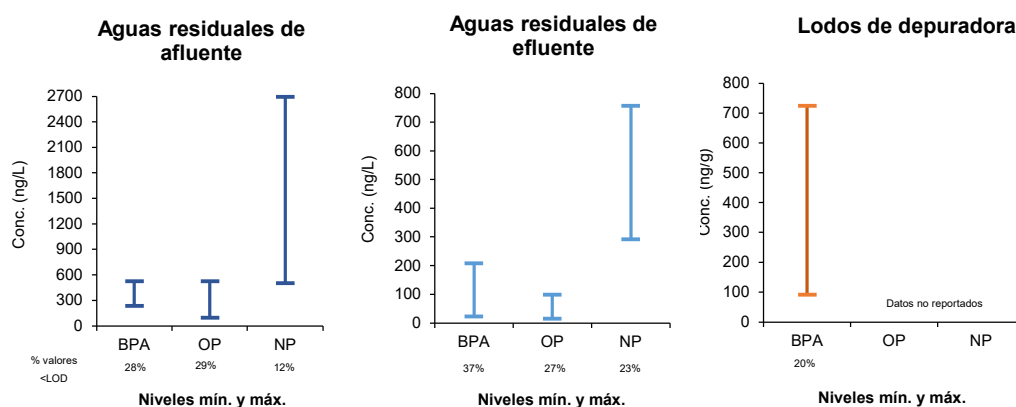


Figura 1.11.a Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas residuales de afluentes y efluentes, y lodos de EDARs

1. Introducción general

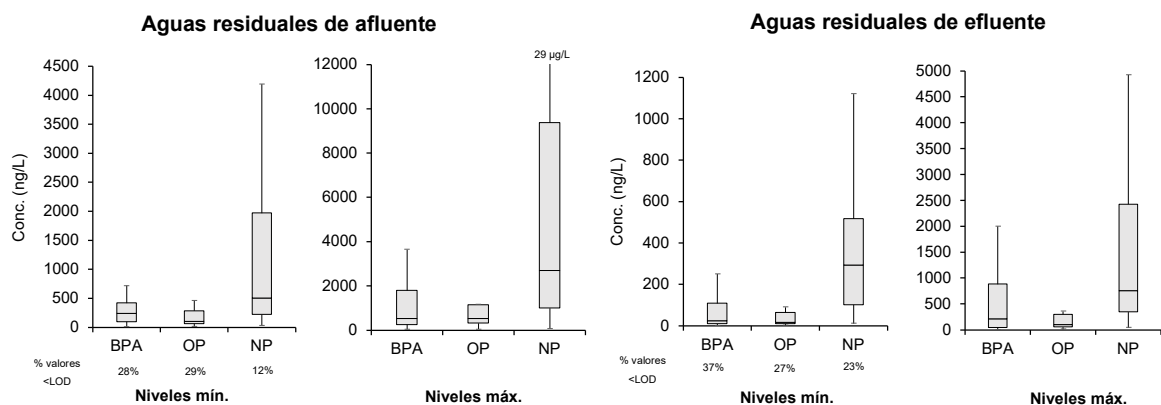


Figura 1.11.b Distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas residuales de afluentes y efluentes de EDARs, representadas mediante diagrama de caja y bigotes

Los niveles medianos máximos y mínimos detectados para los desinfectantes, los parabenos, benzotriazoles y compuestos organofosforados en aguas residuales y lodos de EDARs, se presentan en las **Figuras 1.12 y 1.13**.

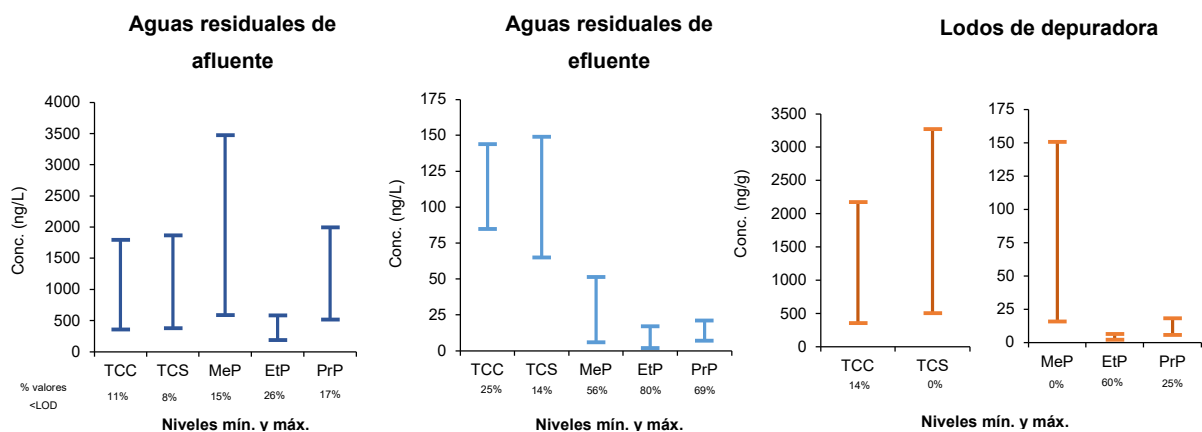


Figura 1.12 Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los desinfectantes TCC y TCS, y los parabenos MeP, EtP y PrP en aguas residuales de afluentes y efluentes, y lodos de EDARs

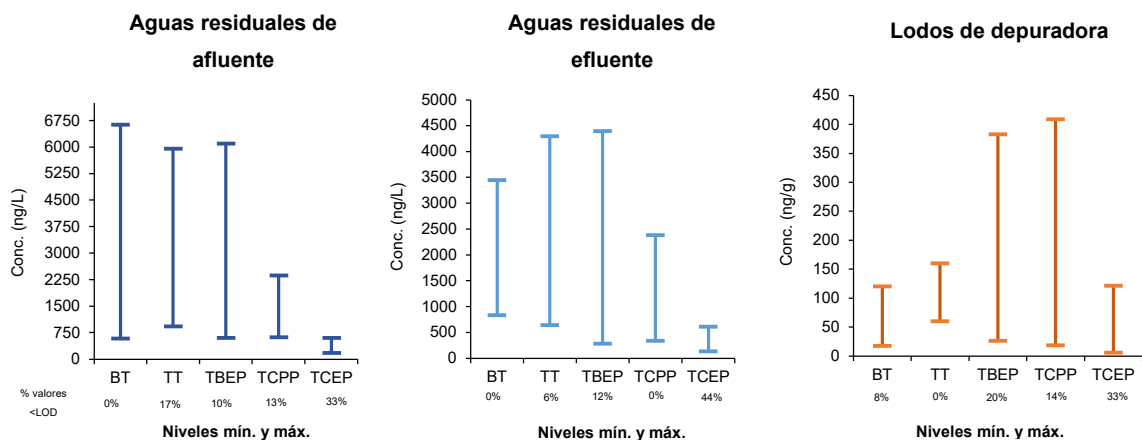


Figura 1.13 Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los benzotriazoles y los compuestos organofosforados TBEP, TCPP y TCEP en aguas residuales de afluentes y efluentes, y lodos de EDARs

1.5 Métodos de análisis de los compuestos estudiados

Las estrategias analíticas utilizadas para detectar y medir EDCs en matrices ambientales son bastantes variadas, esto se debe a la complejidad de estas y a la amplia gama de contaminantes EDCs, de propiedades físico-químicas distintas (Dimpe and Nomngongo, 2016; Guedes-Alonso et al., 2014; LaFleur and Schug, 2011; Omar et al., 2016; Quintana et al., 2008; Ribeiro et al., 2014; Sosa-Ferrera et al., 2012).

Una vez realizados los procesos de pretratamiento, almacenaje y conservación, los tratamientos de muestra pueden incluir procedimientos de preconcentración/extracción y purificación/limpieza para garantizar que los analitos se encuentren en un nivel de concentración adecuado y en extractos suficientemente limpios.

Aunque actualmente, la preparación de muestras se está centrando hacia el respeto al medio ambiente, bajo coste, miniaturización, automatización y simplicidad (Aufartová et al., 2011; Farré et al., 2010; Salgueiro-González et al., 2015), en siguiente subapartado, se describirán y/ referenciaran las técnicas de tratamiento más ampliamente utilizadas para el análisis de EDCs, focalizadas principalmente a su posterior determinación por técnicas cromatográficas acopladas a la espectrometría de masas, enfoque instrumental en que se basan los métodos desarrollados en esta tesis, descriptiva abordada en el subapartado 1.5.2, pág. 51.

Al final de este apartado, además, se presentan una serie de tablas resumen con varios ejemplos de las metodologías descritas y/o referenciadas a continuación para el análisis de los compuestos estudiados.

Concretamente, estas tablas se han dividido en 4, en las **Tablas 1.6.a y b**, se pueden encontrar de manera resumida metodologías offline/online para el análisis de EDCs en aguas, y en las **Tablas 1.7.a y b** se resumen estudios para estos mismos compuestos en sedimentos y lodos.

Por último, en la **Figura 1.14** describe de manera general, resumida y esquemática las principales estrategias para la determinación de EDCs acordes con las metodologías optimizadas en esta memoria.

Como existe una amplia variedad de enfoques, en este apartado sólo se describirán los más relevantes relacionadas con el estudio analítico que se realizó durante la ejecución experimental de la tesis, aunque se hará mención a otras estrategias mostradas en la Figura, aportando alguna referencia bibliográfica y algún ejemplo de ellas en las Tablas resumen 1.6 y 1.7

1. Introducción general

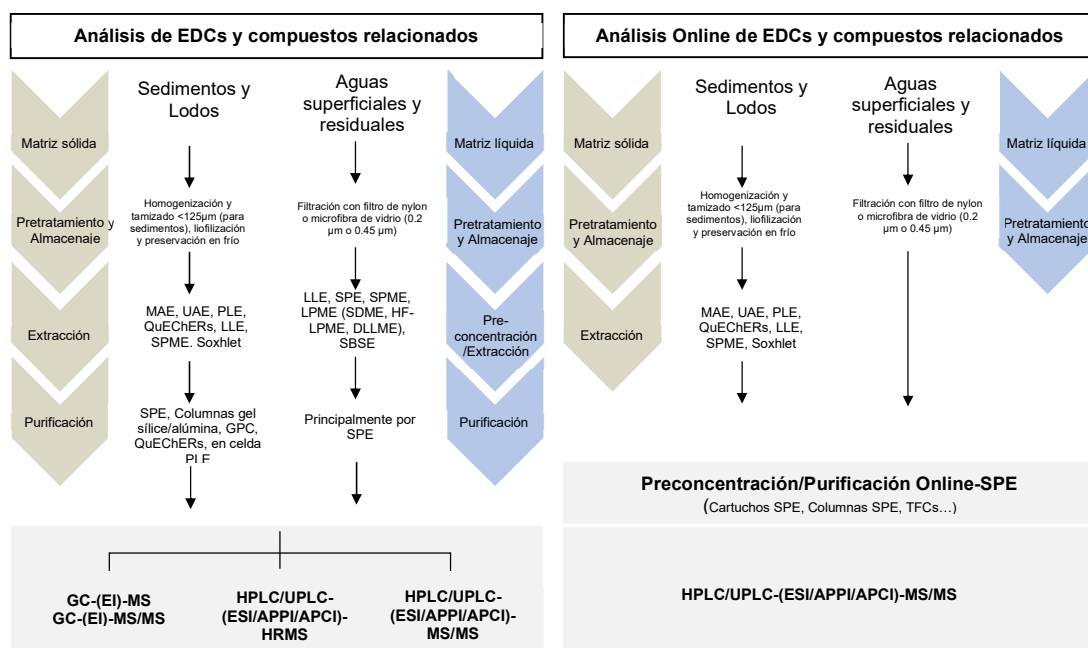


Figura 1.14 Descripción general de las principales estrategias analíticas, para la determinación de EDCs en matrices ambientales estudiadas en esta tesis

Pretratamiento, almacenaje y conservación

El manejo, el almacenamiento y la conservación de muestras son aspectos importantes para garantizar que el analito de interés esté bien conservado y retenido en las muestras ambientales recolectadas (Ort et al., 2010). Los principales factores que afectan las muestras incluyen la contaminación de la lixiviación del contenedor, la sorción del analito sobre la superficie del contenedor, la oxidación y la descomposición fotoquímica de los compuestos y la descomposición de los compuestos debido a microorganismos (Zhang 2006). La eliminación completa de los factores que afectan la contaminación de la muestra es imposible, pero los efectos pueden minimizarse siguiendo y siguiendo un procedimiento apropiado. En general, esto se puede lograr mediante tres enfoques: refrigerar inmediatamente las muestras a una temperatura particular, elegir un recipiente apropiado y agregar productos químicos conservantes a las muestras (Combalbert et al., 2010; Vanderford et al., 2011).

En el caso de las aguas, antes de esta conservación, es importante realizar una filtración de la muestra, paso de preextracción indispensable porque las aguas ambientales, especialmente las muestras de aguas residuales que tienen grandes cantidades de sólidos en suspensión que pueden afectar a los procesos de extracción y preconcentración posteriores. Muchos autores han informado de filtración mediante filtros de membrana o filtros de fibra de vidrio siendo los tamaños de poro más utilizados los de $0.45\ \mu\text{m}$ (Guedes-Alonso et al., 2014; Locatelli et al., 2016).

Para las matrices sólidas, además de la homogenización, y en el caso de los sedimentos tamización la mayoría de los estudios enfatizan el uso de liofilización para almacenamiento y conservación. Además de la técnica de liofilización, los investigadores también utilizan la técnica de secado al aire seguida del almacenamiento de las muestras en frío, especialmente para muestras de lodos, sedimentos y suelo (Omar et al., 2016).

1.5.1 Tratamiento de muestra

Aguas superficiales y residuales

Las inyecciones de muestra directas, concretamente en cromatografía líquida, no consiguen LODs suficientemente bajos (Alotaibi et al., 2015b; Hao et al., 2018). Es por ello que en las muestras de agua se deben preconcentrar los analitos de interés mediante procesos de extracción y aislamiento (Briciu et al., 2009; Pacáková et al., 2009), y dependiendo del tipo de aguas, han de someterse además a un proceso de limpieza y purificación, para minimizar los efectos matriz entre otros (Locatelli et al., 2016). La extracción líquido-líquido (LLE) (Andresen et al., 2004; Barber et al., 1999; Duong et al., 2010; Wu et al., 2013; Zhang et al., 2004), usa grandes volúmenes de solventes orgánicos que dañan el medio ambiente además de imposibilitar su automatización, entre otros (Barceló and Petrovic, 2007).

La extracción en fase sólida (SPE) es una de las técnicas de preparación de muestras más utilizadas para muestras ambientales, ya que es simple, flexible, selectiva, automatizada y rápida (Zwir-Ferenc and Biziuk, 2006), se desarrolló por primera vez en la década de 1980 y, desde entonces, ha demostrado ser una herramienta poderosa para el aislamiento y la purificación de los compuestos de interés (Buszewski and Szultka, 2012; Chang et al., 2009; Erger and Schmidt, 2014; Gentili et al., 2002). Permitiendo el paso de elevados volúmenes de muestra, mL de agua, a través de un sorbente donde quedan retenidos los compuestos para posterior elución con el solvente adecuado (Pacáková et al., 2009).

Los parámetros más importantes en la aplicación del método SPE son la elección de un adsorbente sólido adecuado para el analito de interés y los solventes para lavado y elución. Todos estos pasos tienen por tanto que ser optimizados para proporcionar una buena reproducibilidad y eficiencia de extracción, además de una adecuada limpieza de los extractos, todo ello no es una tarea sencilla en especial para el análisis multiresiduos.

Existen una gran variedad de sorbentes en el mercado y mucha literatura al respecto para una correcta elección según las propiedades de los compuestos a analizar (Alotaibi et al., 2015a; Fang et al., 2016; Pantelaki et al., 2019; T. Reemtsma et al., 2008).

En el caso de los compuestos estudiados, que tiene una amplia gama de propiedades fisicoquímicas distintas, el sorbente polimérico de fase inversa hidrofóbico-lipofílico equilibrado (HLB) es uno de los más utilizados por su versatilidad y eficiencia, lo que le ha convertido en un eficiente cartucho C18 para la extracción de analitos que cubre una amplia gama de polaridades y valores de pH. Además, dependiendo de los sorbentes HLB utilizados (como OASIS HLB, STRATA X, Super select HLB y Bond Elut Plexa, entre otros), pueden retener analitos ácidos, básicos y neutros (Bacaloni et al., 2007; Chen et al., 2016; DeArmond and DiGoregorio, 2013; González-Mariño et al., 2009; Jover et al., 2009; S. Liu et al., 2011; Lorenzo et al., 2016; Martín et al., 2014; Pedrouzo et al., 2009; Tijani et al., 2016; van Leerdam et al., 2009; Wang et al., 2012). Otros sorbentes comerciales, como Oasis MAX, Oasis MCX, LiChroult ENV+ i LiChroult C18 o EN, también son usados para la preparación de muestras acuosas

1. Introducción general

(Carpinteiro et al., 2012; Chen et al., 2007; Guedes-Alonso et al., 2013; Koh et al., 2007; Kuster et al., 2009; Rice and Hale, 2009), ver también Tabla 1.6.a.

Aunque la preconcentración/extracción de muestras de agua mediante SPE es uno de los enfoques más relevantes para la aproximación analítica tratada en esta tesis, existen otros enfoques para la determinación de EDCs en aguas. Aunque por sus características han sido básicamente aplicadas a la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS o GC-MS/MS), existiendo aun así algunas aplicaciones para LC-MS/MS (Padrón et al., 2014).

Por ejemplo, la microextracción en fase sólida (SPME) (Basheer et al., 2005; Carpinteiro et al., 2004; Chang et al., 2005; Mitani et al., 2005; Risticovic et al., 2009). Otras técnicas empleadas son la microextracción en fase líquida (LPME) que se puede dividir principalmente en tres categorías principales: microextracción de gota única (SDME) (Kawaguchi et al., 2006), microextracción de fibra hueca (HF-LPME) (Chao et al., 2013; Fabregat-Cabello et al., 2014; Gjelstad and Pedersen-Bjergaard, 2013) y microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) (Sarafraz-Yazdi and Amiri, 2010).

Entre estas últimas técnicas nombradas, cabe destacar la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) que utiliza un disolvente de extracción, cuya densidad es mayor que el agua, y un disolvente dispersivo que puede disolverse en ambas fases para producir una solución turbia. Debido al alto área de contacto entre el solvente orgánico y la muestra de agua, el tiempo de extracción de DLLME es muy corto. Sin embargo, los solventes de extracción utilizado en DLLME, limitados a tener una mayor densidad que el agua, son generalmente altamente tóxicos y no ecológicos. Algunos autores, han utilizado este tipo de extracción con modificaciones para minimizar estos efectos, aplicándola por ejemplo a la determinación de estrógenos, BPA y TCS entre otros (Pérez et al., 2016), o para el análisis de hormonas, optimizando el método con disolventes de mínimo impacto ambiental en la medida de lo posible (Chang and Huang, 2010). También se han determinado, en combinación con SPE, para ultrapreconcentrar, productos farmacéuticos y de higiene personal (desinfectantes y parabenos) (Celano et al., 2014), ver Tabla 1.6.a.

También podemos encontrar técnicas de tratamiento de muestras que no utilicen solventes de extracción, la extracción sportiva por barra de agitación (SBSE) es una extracción que generalmente se realiza en un agitador magnético de vidrio recubierto con polidimetilsiloxano, que tiene la capacidad de extraer compuestos orgánicos de muestras líquidas, como TCS, parabenos y estrógenos, entre otros contaminantes (Kawaguchi et al., 2004; Pintado-Herrera et al., 2014), aunque los compuestos polares se extraen poco debido a la no polaridad del polímero, entre otras limitaciones (Dimpe and Nomngongo, 2016), este procedimiento se ha sido aplicado por ejemplo, en la determinación de contaminantes emergentes y prioritarios polares y no polares, entre ellos hormonas, parabeno y compuestos alquilfenólicos (Aparicio et al., 2017), ver Tabla 1.6.a.

Muestras sólidas, sedimentos de río y lodos de depuradora

La determinación de EDCs y compuestos relacionados en muestras sólidas, concretamente en sedimentos de río y lodos de depuradora requiere principalmente 2 etapas, una primera de extracción

de los contaminantes de las matrices de estudio, y su subsiguiente etapa de purificación, para así obtener extractos suficientemente limpios para una buena detección por cromatografía acoplada a la espectrometría de masas (Hamid and Eskicioglu, 2012; Martín-Pozo et al., 2019; Salgueiro-González et al., 2018; Sosa-Ferrera et al., 2013; Zuloaga et al., 2012).

Métodos de extracción

Las técnicas clásicas de preparación de muestras como Soxtec, Soxhlet y la extracción líquido-líquido (LLE) todavía son aplicadas pero generalmente son demasiado suaves e inespecíficas (Omar et al., 2017; Woudneh et al., 2015; Zhang et al., 2011). Por tanto, debido a la complejidad de las matrices ambientales, así como los niveles a detectar de los compuestos a analizar, la introducción de varios procedimientos de extracción más efectivos y exhaustivos ha sido necesaria, también para minimizar los recursos empleados ya sea de tiempo, uso de solventes de extracción entre otros. (Dimpe and Nomngongo, 2016; Hawthorne et al., 2000).

La extracción de líquido a presión (PLE), una de las más aplicadas, conocida comúnmente como extracción acelerada de solvente (ASE), extracción de fluido a presión (PFE), extracción mejorada con solvente (ESE) o extracción con solvente a alta presión (HSE), aplica presión, normalmente usando los solventes de extracción a temperaturas por encima de su punto de ebullición, reteniéndolos en estado líquido por el aumento de la presión, y así mejorando la solubilidad del analito, reduciendo la tensión superficial de los solventes y la viscosidad que ayudan a alcanzar más fácilmente todas las áreas de las matrices.

Las ventajas de PLE son varias, reducción del volumen de disolvente, uso de más de un disolvente por extracción, programación de temperatura y presión, entre otras, permitiendo una alta automatización del proceso, reduciendo también el tiempo de preparación y obteniendo un cierto grado de selectividad. Por tanto, ha sido aplicada para la determinación de distintos EDCs en muestras sólidas (Bevacqua et al., 2011; Chen et al., 2012; Dorival-García et al., 2012; Fernandez et al., 2009; Molins-Delgado et al., 2017; Nieto et al., 2008), ver Tabla 1.7.a. El principal inconveniente de PLE es que la limpieza de la muestra sigue siendo obligatoria una vez que se realiza la extracción y utiliza costosos equipos especializados. Además, la alta temperatura de extracción puede causar la descomposición de otros analitos térmicamente inestables de interés.

Otras dos técnicas de extracción ampliamente utilizadas son la extracción asistida por microondas (MAE o MASE) y la extracción asistida por ultrasonidos (UAE o USE). Estas técnicas, igual que la PLE, tienen la ventaja de disminuir el tiempo de extracción, el volumen de muestra y solventes de extracción, pero a diferencia de la PLE, no necesitan equipos muy costosos y especializados, pueden prepararse también más de una muestra a la vez, aunque no hay un control de temperatura ni se pueden extraer de forma automática los compuestos de interés con más de un solvente (Azzouz and Ballesteros, 2012; Chokwe et al., 2015; de Sousa et al., 2015; Matějček et al., 2007; Yu and Wu, 2012).

Finalmente, cabe mencionar la (micro) extracción dispersiva en fase sólida (DSPME/DSPE), una forma altamente desarrollada de SPE, donde se mezcla la extracción única de la muestra con un adsorbente

1. Introducción general

sólido, seguido de un proceso de limpieza. Esta técnica ha sido utilizada en los últimos años para el desarrollo de métodos multiresiduos para la determinación de EDCs entre otros contaminantes a través de los llamados, rápidos, fáciles, baratos, efectivos, resistentes y seguros (QuEChERS) (Rejczak and Tuzimski, 2015). Aunque siendo más extensamente aplicada para matrices de biota, como por ejemplo para el análisis de los compuestos de interés de esta tesis (Jakimska et al., 2013), existen algunos ejemplos de determinación de EDCs en lodos de depuradora (Cerqueira et al., 2014; Herrero et al., 2014b; Peysson and Vulliet, 2013), incluso en sedimentos (Berlioz-Barbier et al., 2014; Czech et al., 2016), ver Tabla 1.7.a.

Métodos de purificación y limpieza

Igual que en las técnicas clásicas de extracción, la limpieza de las muestras sigue siendo casi imprescindible en el análisis de EDCs y compuestos relacionados, muchos de ellos encontrados en el medioambiente a niveles de ng/g. Aunque podemos encontrar en la literatura algunos autores que no aplican este paso en sus métodos, obteniendo LOD bastante satisfactorios, como en el caso de la determinación de NP y NPEOs entre otros, en lodos por GC-MS (Aparicio et al., 2007), una técnica instrumental en sí más selectiva, o por ejemplo en el análisis de estrógenos en sedimentos por UPLC-APPI-MS/MS (Snow et al., 2013), incluso en el análisis de estrógenos en lodos (Guedes-Alonso et al., 2016), ver Tabla 1.7.a.

La purificación de extractos de muestras sólida mediante SPE es uno de los procesos más utilizados todavía (Zwir-Ferenc and Biziuk, 2006), los sorbentes HLB (Azzouz and Ballesteros, 2012; de Sousa et al., 2015; Lara-Martín et al., 2012; Samaras et al., 2011; Yu and Wu, 2012), C18 (Gatidou et al., 2007; Vega-Morales et al., 2011). También cabe recordar que son muy empleados para la preconcentración, aislamiento y purificación en muestras de agua. Aunque debido a las características de los extractos de las matrices sólidas, en ocasiones los SPE utilizados tienen características más específicas para mejorar los resultados dependiendo de los compuestos a analizar (Azzouz and Ballesteros, 2016; Cavaliere et al., 2016; Cristale and Lacorte, 2013; Petrie et al., 2016). También es común emplear más de un paso de SPE o eluir los compuestos en distintas fracciones según sus características ver Tabla 1.7.a.

Otro tipo de procedimientos para la limpieza de extractos, como la cromatografía de permeación en gel (GPC), que utiliza los principios de la cromatografía de exclusión molecular, se recomienda para la eliminación de lípidos, proteínas, azufre y compuestos dispersos de alto peso molecular de la muestra y es apropiada para analitos polares y no polares. Una técnica de purificación, sin embargo, que en caso de ser utilizada, en la mayoría de los casos se realiza en combinación con la técnica de SPE (Chiu et al., 2009). En esta línea, existen también otro tipo de limpiezas, muchas de ellas combinadas, añadiendo columnas de sílice o alúmina (Chokwe et al., 2015; Nie et al., 2009), o extracciones líquido-líquido (Chen et al., 2012), a la etapa de purificación por SPE. O por ejemplo en el caso de la extracción por PLE, introduciendo sorbentes en la celda de extracción, pudiendo evitar incluso otro tipo de purificación posterior (Bevacqua et al., 2011; Molins-Delgado et al., 2017; Nieto et al., 2008), ver Tabla 1.7.a.

1.5.2 Análisis instrumental

La determinación del análisis de trazas para EDCs ha estado dominada por dos métodos de instrumentación, la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida (LC), inicialmente con la utilización de detectores no específicos. Pero aportándose un cambio substancial en lo que concierne a la selectividad y sensibilidad, la introducción de los sistemas de detección espectrométricos de masas acoplados a la separación cromatográfica (Buchberger, 2007; Giger, 2008; Omar et al., 2016).

Además de las técnicas instrumentales basadas en LC y GC, existen técnicas bioanalíticas utilizadas para aplicaciones ambientales, que, a pesar de tener algunas limitaciones, están ganando cierta popularidad como un ensayo rápido y rápida detección para EDCs en muestras ambientales (Farré et al., 2012), estas, sin embargo, no serán por eso tratadas en este apartado por alejarse del objetivo de esta tesis.

Análisis por GC-MS

A pesar del creciente número de estudios reportados que utilizan LC-MS-MS como técnica instrumental para detectar EDCs en matrices ambientales, el análisis de contaminantes orgánicos por GC-MS sigue siendo un instrumento de elección que puede proporcionar una sensibilidad y selectividad comparables a los sistemas LC-MS en ciertos compuestos cuyas propiedades se adecuen a este tipo de instrumentación generalmente económicamente más asequible. Además, esta tiene menores problemas de interferencias y efectos matriz que las de LC-MS (Zuloaga et al., 2012).

Concretamente, el análisis por GC-MS ha sido escogida tradicionalmente para los compuestos orgánicos persistentes debido a su gran selectividad y sensibilidad en compuestos no-polares o de polaridades bajas, así como para compuestos orgánicos volátiles, puede aplicarse a el análisis de compuestos más polares aplicando un paso previo de derivatización. Este proceso convierte los compuestos polares en menos polares, con mayor volatilidad y estabilidad térmica, por lo tanto, más adecuados. Existen distintos agentes de derivatización, como los ácidos anhídros, haluros de bencilo, cloroformatos de alquilo, diazometano y reactivos de sililación entre los que se encuentran los más utilizados, el N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) y N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA), que generan la formación de trimetilsilil (TMS) y t-butildimetilsilil (TBS) derivados, respectivamente.

Aunque, este proceso requiriere una optimización laboriosa, mayor tiempo en la preparación de muestra, y mayor toxicidad y peligrosidad (Omar et al., 2016). Debido a las ventajas expuestas, esta determinación instrumental se sigue aplicando en el análisis de los estrógenos, PCPs, compuestos alquilfenólicos y organofosforados estudiados en esta tesis, sobretodo cuando además el análisis de estos presentan dificultades utilizando LC-MS/MS, como por ejemplo en el caso de algunos APEOs (Lara-Martín et al., 2012), ver también apartado 3.1, pág. 75. Algunos ejemplos de aplicación de esta técnica han sido descritos y citados en las Tablas 1.6.a y 1.7.a.

1. Introducción general

Análisis por LC-MS/MS

La determinación por LC-MS-MS debido a su versatilidad, tiempo de análisis y sobre todo a la amplia gama de compuestos analizables entre otras ventajas, es una de las aproximaciones más utilizadas para la determinación de contaminantes orgánicos en matrices ambientales, entre ellos los EDCs (Giger, 2008). Para una satisfactoria separación cromatográfica de los compuestos de interés por LC-MS/MS existen una serie de parámetros a tener en cuenta, volúmenes de inyección, columnas cromatográficas, fases móviles, entre otros, varios ejemplos de ello se pueden encontrar brevemente descritos y citados en las tablas resumen 1.6 y 1.7.

La detección por triple cuadruplo (QqQ) de los compuestos de interés y su subsiguiente cuantificación utilizando el modo SRM (Selected Reaction Monitoring) y la corrección por patrones internos marcados, generalmente deuterados, es la estrategia generalmente aplicada, ya que incrementa la sensibilidad y selectividad en matrices complejas. Este punto será tratado con más profundidad en el apartado 3.1, pág. 75, al ser también parte importante en la optimización y validación de los métodos analíticos presentados en esta tesis.

Recordando, que el objetivo principal de esta tesis es el análisis multicompuestos, por tanto la determinación del mayor número de analitos posibles, aplicando la aproximación por LC-MS/MS, existen métodos, que no tan solo analizan un grupo de EDCs, que per se ya tienen características muy distintas, sino que estos métodos llegan a determinar por ejemplo PPCs, drogas ilícitas, hormonas, entre otros (Kasprzyk-Hordern et al., 2008; Petrie et al., 2016; Peysson and Vulliet, 2013), ver Tabla 1.6.a y 1.7.a.

Además, teniendo en cuenta que este tipo de instrumentación permite un acoplamiento relativamente sencillo y asequible con metodologías de tratamiento de muestra online, reduciendo así todavía más el tiempo de análisis, una menor manipulación de las muestras, logrando un “screening” cuantitativo eficiente de una gran variedad de compuestos en un número importante de muestras de matrices distintas, enfoque muy útil para el monitoreo ambiental (Fernández-Ramos et al., 2014; Fumes et al., 2017; Valsecchi et al., 2015). Uno de los inconvenientes, eso sí, es que, utilizando este tipo de estrategias, evidentemente es difícil obtener recuperaciones y LODs especialmente buenos, además de un mayor empleo de tiempo y tediosa tarea de optimización.

Análisis multiresiduos automatizado por LC-LC-MS/MS

Profundizando más en el objeto de estudio analítico de esta tesis, los sistemas automatizados descritos a continuación, se basan en la preconcentración o purificación online por SPE-LC-MS/MS. La descripción detallada del funcionamiento de estos sistemas será descrita en el Capítulo 3, con 2 ejemplos concretos usando la tecnología EQuan™ para la preconcentración de aguas y la utilización del sistema de columnas de purificación TurboFlow™ para la limpieza de extractos de sedimentos y lodos. Este tipo de metodologías online SPE-LC-MS/MS, son una de las aproximaciones más utilizadas para la determinación de EDCs en muestras ambientales, concretamente en muestra de agua, y ha sido aplicada desde hace ya casi dos décadas dando buenos LODs por ejemplo en la determinación

de estrógenos ya en 2004 (Rodríguez-Mozaz et al., 2004). Aunque las primeras aproximaciones, todavía en uso, de este tipo de metodologías, usaban cartuchos desechables, tenemos ejemplos recientes para la determinación de estrógenos (Ciofi et al., 2013; Snow et al., 2013) y benzotriazoles (Molins-Delgado et al., 2017), el uso de columnas online-SPE para la preconcentración/extracción de los compuestos de interés es a día de hoy lo más extendido.

Las columnas SPE permiten su reutilización inmediata después de su lavado y acondicionado entre muestra y muestra, normalmente realizado durante el periodo de detección de los compuestos. El tipo de columnas utilizadas tienen características parecidas a los cartuchos SPE, con tamaños de partícula de entre 8 y 12 μm , esto permite inyecciones de volúmenes altos, entre 1 y 5 mL, e incluso superiores si la muestra se inyecta en repetidas veces antes de la elución (Guo et al., 2013). El tipo de sorbentes utilizados también tienen características parecidas a la de los cartuchos SPE, por tanto, las funciones principales de estas columnas serán las mismas, preconcentrar las muestras de agua y extraer los compuestos de interés, siendo posible una etapa de lavado de la matriz más o menos efectivo previo a la elución de los compuestos y subsiguiente retención a la columna cromatografía para su separación y detección. Dependiendo de la casa comercial el sistema online y las columnas usadas pueden variar, pero no significativamente.

Estas columnas se han utilizado por ejemplo en el análisis multiresiduos de EDCs, y fármacos (Camilleri et al., 2015; Vega-Morales et al., 2012), confirmando por tanto ser una buena estrategia para determinar compuestos de grupos y características muy distintas. Algunos ejemplos concretos que usen columnas EQuan™ los podemos encontrar en el análisis de estrógenos (Fayad et al., 2013; Viglino et al., 2008), ver Tabla 1.6.b.

La determinación de los compuestos de interés en muestras sólidas como sedimentos y lodos, no permiten un sistema de automatización 100% online, en realidad estos sistemas están solo diseñados para la purificación de los extractos de las muestras, ver Tabla 1.7.b. Existen principalmente 2 estrategias para abordar la limpieza de los extractos, la primera, tratar los extractos como si fueran “muestras de agua”, diluyéndolos y por tanto aplicando después las metodologías para el análisis de aguas, que utilizan en realidad, una purificación de extractos acuosos de muestras sólidas offline, ver apartado 1.5.1, pág. 47. Siendo las ventajas adicionales de este enfoque, una menor manipulación de muestra y tiempo de análisis.

Este tipo de aproximación ha sido aplicada por ejemplo en la determinación de estrógenos, APs y BPA en lodos, previa extracción por MAE (Vega-Morales et al., 2011). El segundo enfoque en cambio utiliza un tipo de columnas más específicas enfocadas a la purificación de extractos directamente, minimizando así al máximo los efectos matriz. Además, los equipos provistos con este tipo de sistemas online cuentan también con una serie de mecanismos, “loops” de inyección, válvulas y bombas que facilitan al máximo el lavado de los compuestos retenidos en la columna de purificación. Un ejemplo de la versatilidad de estos sistemas lo encontramos, por ejemplo, en el uso de 2 columnas de purificación TurboFlow™ para una mayor limpieza de los extractos en la determinación de OPFRs en sedimentos (Giulivo et al., 2016).

Tablas resumen

Tabla 1.6.a Metodologías offline para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en matrices de agua

Compuestos/Matrices	Tratamiento de muestra	Análisis Instrumental	Analitos	LODs	Referencia
5 EDCs (NP, NPEOs, TCS y BPA) Aguas residuales y lodos ^a	<u>Preconcentración/Extracción con SPE:</u> SPE: C18, 100mL de muestra Acondicionamiento con 2x3.5mL de MeOH y 2x3mL de agua, carga y lavado con 4x2.5mL de agua, elución con 4x2mL de mezcla de DCM:Hx (4:1) Evaporación con N ₂	<u>GC-MS</u> Derivatización: 50µL piridina + 50µL BSTFA Vol. Inyección: 1µL Columna: DB5MS (60m×0.32mm, 0.25µm) Gas portador: He Fuente de ionización: EI (70eV) Adquisición: SIM	TCS BPA NP NP1EO NP2EO	130 ng/L 40 ng/L 30 ng/L 340 ng/L 410 ng/L	(Gatidou et al., 2007)
13 EDCs (parabenos, TCS, BPA, fenilfenoles y APs) Aguas superficiales y residuales entre otras	<u>Preconcentración/Extracción con SPE:</u> sistema de flujo continuo para la preconcentración 100mL de agua pH~4.0 (ajustado con HCl diluido) SPE: LiChrolut EN, elución 400µL de ACN, evaporación hasta un volumen de ~25µL bajo una corriente suave de N ₂	<u>GC-MS</u> Derivatización: BSTFA + 1%TMCS Vol. Inyección: 20µL Columna: DB-5MS (30m×0.25 mm i.d.×0.25µm) Gas portador: He Fuente de ionización: EI (70 eV) Adquisición: SIM	MeP EtP PrP BeP TCS BPA OP NP	0.08 ng/L 0.08 ng/L 0.07 ng/L 0.07 ng/L 0.01 ng/L 0.01 ng/L 0.02 ng/L 0.01 ng/L	(Azzouz and Ballesteros, 2014)
48 contaminantes emergentes y prioritarios polares y no polares (parabenos, tensioactivos, plastificantes, retardantes de llama, fármacos, hormonas, filtros UV y pesticidas) Aguas superficiales y del grifo	<u>Extracción mediante SBSE:</u> 100mL de agua, adición de 38 g de NaCl, colocación de la barra de agitación, agitación durante 24h, lavado de la barra. Desorción con 0.5mL de MeOH mediante ultrasonidos 15min. Evaporación con N ₂ , reconstitución con 100µL de MeOH/H ₂ O (50:50) y filtración	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 20µL Columna: HALOC18 Rapid Resolution (50×4.6mm,2.7µm) T ^a del horno de columna: 25°C Fase móvil: Método1, agua con 10mM de acetato de amonio (A), MeOH (B); Método 2 (para compuestos farmacéuticos, filtros UV y pesticidas), agua con 15mM formiato de amonio y 0.1% de ácido fórmico (A), ACN al 0.1% en ácido fórmico (B) Detector: QqQ modo ESI, modo de ionización negativa y positiva	E2 E1 E3 EE2 MeP EtP PrP BPA NP NP1EO NP2EO	16 ng/L 11 ng/L 15 ng/L 9.2 ng/L 6.3 ng/L 3.6 ng/L 4.1 ng/L 6.1 ng/L 45 ng/L 15 ng/L 3.6 ng/L	(Aparicio et al., 2017)
8 hormonas Aguas residuales tratadas	<u>Preconcentración/Extracción con SPE:</u> SPE: SepPak C18, 250mL de agua, carga y lavado con 5mL de agua, elución con 2mL de MeOH	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 5µL T ^a del horno de columna, 30°C Columna: ACQUITY UHPLC BEH C18 (1.7µm) Fase móvil: 0.3 mL/min, agua (A) y MeOH (B), ambas con 0.1% de amoniaco y 15 mM de acetato de amonio Detector: (QqQ) modo ESI, ionización negativa	E2 E1 E3 EE2 DES	2.53 ng/L 2.60 ng/L 9.35 ng/L 0.51 ng/L 0.64 ng/L	(Guedes-Alonso et al., 2013)

Continuación Tabla 1.6.a

Compuestos/Matrices	Tratamiento de muestra	Análisis Instrumental	Analitos	LODs	Referencia
22 PPCs (parabenos, desinfectantes y fármacos) Agua pura, potables, de mar, de río y aguas residuales	<u>Preconcentración/Extracción con SPE</u> 500mL de agua de río y 250 mL de agua residual, pH2 con HCL 1N SPE: Oasis HLB, acondicionamiento con 5mL de MeOH y 5mL de agua, carga y lavado con 10mL de MeOH/H ₂ O (1: 9), elución con 5mL de MeOH/ACN/DCM (3:3:4) <u>Extracción con DLLME</u> Inyección de 2mL de eluato (mezcla de extractante/dispersor DLLME) en 10mL de fase acuosa (NaCl al 5%, 10mg/L de TBAB), agitación, centrifugación, secado de la fase orgánica con N ₂ y reconstitución con 200µL de ACN/H ₂ O (1:1)	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 10µL Columna: Kinetex C18 (100x2.1mm, 2.6µm), precolumna C18 Guard Cartridge (4x3 mm) T ^a del horno de columna, 30°C Fase móvil: 0.3 mL/min, agua (A) y ACN (B), ambos conteniendo acetato de amonio 1.5mM Detector: QqQ modo ESI, ionización negativa	TCC TCS MeP EtP PrP BeP	0.4/0.5 ng/L río/residual 0.1/1.8 ng/L río/residual 0.4/1.2 ng/L río/residual 0.2/0.4 ng/L río/residual 0.1/0.3 ng/L río/residual 0.1/1.0 ng/L río/residual	(Celano et al., 2014)
10 estrógenos libres y conjugados Aguas de río y residuales	<u>Preconcentración/Extracción con SPE</u> SPE: Oasis HLB, 500-800mL para afluentes, 100mL para efluentes y aguas de río. Acondicionamiento con 6mL de MeOH y H ₂ O, carga de las muestras acidificadas pH3 (ácido acético 20%), lavado con 5mL agua. <u>Purificación con SPE</u> SPE: Sep-Pak plus NH ₂ , colocado debajo del primer cartucho, elución con 8mL de MeOH (estrógenos libres), seguido de 6mL de NH ₄ OH al 0.5% en MeOH (estrógenos conjugados) en una fracción separada. Evaporación con N ₂ y reconstitución con 1 mL de ACN/H ₂ O (1:9)	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 10µL Columna: ACQUITY UPLC 1.7µm Bridged Ethyl Hybrid (BEH), C8 (100mmx2.1mm) para estrógenos libres, C18 (50mmx2.1mm) para estrógenos conjugados Fase móvil: 0.2 mL/min, agua (A), ACN (B) Detector: Micromass Quattro Premier (QqQ) modo ESI, ionización negativa	E2 E1 E3 E1-3S E3-3S E1-3G EE2	0.5 ng/L río 0.3 ng/L río 0.5 ng/L río 0.5 ng/L río 0.2 ng/L río 0.6 ng/L río 0.5 ng/L río	(Kumar et al., 2009)
12 EDCs (APs, BPA, parabenos, perfluoroalquilados, retardantes de llama bromados) Agua superficial y de efluente de agua residual	<u>Preconcentración/Extracción con SPE</u> SPE: Oasis HLB, 250mL de muestra acidificada con H ₂ SO ₄ (40%), acondicionamiento con 3mL de MeOH, 3mL de HCl 0.5N y 3mL de agua, carga y lavado con 5mL de agua, elución con 4mL de MeOH, evaporación y reconstitución con 1mL de MeOH y filtración.	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 20µL T ^a del horno de columna, 25°C Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 Rapid Resolution HT (50mmx4.6mm; 1.8µm) Fase móvil: 0.6 mL/min, MeOH (A), solución acuosa de acetato de amonio 5mM (B) Detector: (QqQ) modo ESI, ionización negativa	MeP EtP PrP BPA NP	3.80/3.95 ng/L río/efl 3.94/3.70 ng/L río/efl 1.98/1.81 ng/L río/efl 21.7/24.1 ng/L río/efl 2.74/3.33 ng/L río/efl	(Martín et al., 2014)
13 compuestos organofosforados tri- y di-substituidos Agua pura, de río y residuales	<u>Preconcentración/Extracción con SPE</u> SPE: Oasis MAX, 500mL de agua de río, 100mL aguas residuales. Acondicionamiento con 5mL de MeOH 20mM de TBAHS, MeOH y agua, carga y lavado con 10mL de agua, elución en dos fracciones 2mL de MeOH (triésteres y TPPO), 3mL de MeOH 20mM TBAHS (diésteres). Evaporación y reconstitución con 1mL de MeOH o MeOH 20 mM de TBAHS.	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 20µL T ^a del horno de columna, 30°C Columna: Luna C18 (100mmx2mm; 3µm), precolumna C18 (4 mmx2 mm) Fase móvil: 0.2 mL/min, agua (A) y MeOH (B), ambas con 5 mM de acetato de amonio Detector: (QqQ) modo ESI, ionización positiva	TCEP TCPP TBEP	0.8/7 ng/L río/residual (LOQ) 1/5 ng/L río/residual (LOQ) 10/10 ng/L río/residual(LOQ)	(García-López et al., 2010)

Continuación Tabla 1.6.a

Compuestos/Matrices	Tratamiento de muestra	Análisis Instrumental	Analitos	LODs	Referencia
24 APEOs, OP, NP, BPA y 4 estrógenos Aguas residuales	<u>Preconcentración/Extracción con SPE</u> SPE: Sep-Pak Vac C18, 250 mL de muestra, acondicionamiento con 3x5 mL de MeOH y 3x5mL de agua, carga y lavado con 2x5mL de agua, elución con 2 ml de MeOH. Evaporación con N2 y reconstitución con 100µL de MeOH.	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 10 µL Tª del horno de columna, 40°C Columna: Pursuit XRs Ultra-C18 (50mm×2mm, 2.8µm) Fase móvil: 200 µL/min, agua (A) y MeOH (B) con 0.1% ácido acético y 15mM de acetato de amonio Detector: 320-MS TQ Mass Spectrometer (QqQ) modo ESI, ionización negativa y positiva	E2 E1 E3 EE BPA OP OP1EO OP2EO NP NP1EO NP2EO	3.3 ng/L 4 ng/L 3.7 ng/L 2.8 ng/L 5.7 ng/L 5.7 ng/L 7.2 ng/L 3.7 ng/L 2.7 ng/L 3.5 ng/L 1.5 ng/L	(Vega-Morales et al., 2010)
90 contaminantes emergentes (Filtros UV, PPCPs, estrógenos y BPA) Aguas de río, residuales y lodos ^a	<u>Preconcentración/Extracción con SPE</u> SPE: Oasis HLB, 50mL de agua residual y 100mL de agua de río, acondicionamiento con 2mL de MeOH y 2mL de agua, carga, elución con 4mL de MeOH. Evaporación con N ₂ , reconstitución con 500µL H ₂ O/MeOH (80:20)	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 15µL Columna: BEH C18 (150×1.0mm, 1.7µm) Tª del horno de columna, 25°C Fase móvil: 0.4 mL/min, ESI(-), H ₂ O:MeOH (80:20) 1mM NH ₄ F (A), H ₂ O:MeOH (5:95) 1mM NH ₄ F (B); ESI(+), H ₂ O:MeOH (80:20) 5mM acetato de amonio y 3mM ácido acético (A), MeOH (B) Detector: QqQ con ESI, modo de ionización negativa y positiva	E2 E1 EE2 TCS MeP EtP PrP BPA Caff	0.9/1.8/1.4 ng/L río/af/efl. 0.78/1.9/1.54 ng/L río/af/efl. 0.98/1.83/1.5 ng/L río/af/efl. 2.93/4.93/4.55 ng/L río/af/efl 0.08/0.28/0.19 ng/L río/af/efl 0.24/0.49/0.46 ng/L río/af/efl 0.25/0.63/0.47 ng/L río/af/efl 0.26/0.85/0.56 ng/L río/af/efl 0.37/1.11 ng/L río/efl	(Petrie et al., 2016)

Notas generales: ver apartado abreviaturas y acrónimos para conocer las abreviaciones de la tabla. Todas las proporciones de solventes expuestas son en v/v. El resumen analítico presentado en la tabla se focaliza en los compuestos y matrices de interés de esta tesis.

^a Ver Tabla 1.7.a para consultar la metodología para las matrices sólidas de interés no expuestas en esta tabla.

Tabla 1.6. b Metodologías online para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en matrices de agua

Compuestos/Matrices	Preconcentración online-SPE	Análisis Instrumental	Analitos	LODs	Referencia
5 estrógenos Aguas superficiales y residuales	<u>Cartuchos SPE</u> Vol. Inyección: 2.5mL SPE: Strata C18 Fase móvil: agua/metanol 70/30 (carga), elución con H ₂ O/MeOH/ACN en distintas proporciones durante el gradiente	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Columna: Kinetex XB-C18 (100mm×4.6mm, 2.6µm) T ^a del horno de columna, 45°C Fase móvil: 0.8 mL/min, Agua (A), MeOH (B) y ACN (C) Detector: QTrap 3200 (QqQ) modo ESI, ionización negativa	E2 E1 E3 EE2	0.31 ng/L 0.15 ng/L 0.95 ng/L 0.52 ng/L	(Ciofi et al., 2013)
20 esteroides naturales y sintéticos Aguas subterráneas, de escorrentía, residuales, sedimentos y suelos ^a	<u>Cartuchos SPE</u> 30 ml de muestra preconcentrada a una velocidad de 2mL/min a través de un cartucho de 10×2mm Oasis HLB. Preacondicionamiento con 2mL de MeOH y 2mL de agua, seguido de 2 ml de agua. Fase móvil elución: MeOH	<u>HPLC-APPI-MS/MS</u> Columna: HyPurity C18 (250×2.1mm, 5µm) T ^a del horno de columna, 50°C Fase móvil: 300µL/min, 0.1% ácido fórmico en H ₂ O/MeOH (97/3) (A), MeOH/H ₂ O 0.1 % ácido fórmico (97/3) (B) Detector: QqQ con APPI, modo de ionización positiva	E2 E1 E3 EE2	4.2 ng/L 4.9 ng/L 7.5 ng/L 4.7 ng/L	(Snow et al., 2013)
8 filtros UV y benzotriazoles Aguas de río y residuales	<u>Cartuchos SPE</u> Vol. Inyección: 5mL SPE: cartuchos PLRP (PS/DVB) Fase móvil: 1 mL/min, acondicionamiento con 1mL de MeOH, 1 ml de ACN y 1mL de agua, carga y lavado con agua, elución con fase móvil de separación cromatográfica	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> T ^a del horno de columna, 55°C Columna: LiChorCART Purospher STAR RP-18 ec (125mm×2.0mm, 5µm), precolumna LiChorCART 4-4 Purospher STAR RP-18 ec (5µm). Fase móvil: 0.3mL/min, agua y ACN, ambos con 0.1% ácido fórmico Detector: 4000 QTRAP (QqQ) modo ESI, ionización positiva	BT TT	0.3/ 1.1/0.3 ng/L río/efl/af 0.1/0.3/1.1 ng/L río/efl/af	(Molins-Delgado et al., 2017)
5 estrógenos y 4 andrógenos Aguas de río y residuales	<u>Columna SPE</u> Vol. Inyección: 50mL, en diferentes ciclos de inyección Columna: IonPac NG1 (4mm×35mm, 10µm) Fase móvil: 100% de H ₂ O para carga, ACN/H ₂ O (30:70) lavado muestra, lavados y acondicionamiento de columna distintas proporciones de H ₂ O y ACN, elución 90% H ₂ O, 10% de ACN	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Columna: Acclaim PA2 (3mm×150mm, 3µm) Fase móvil: 0.3 mL/min, agua con 1% de amoníaco (A) y ACN (B) Detector: Quattro Ultima (QqQ) modo ESI, ionización negativa	E2 E1 E3 EE2 DES	1/0.5/1 ng/L río/efl/af 0.5/0.5/0.5 ng/L río/efl/af 2/1/2 ng/L río/efl/af 0.5/0.5/0.5 ng/L río/efl/af 0.5/0.5/0.5 ng/L río/efl/af	(Guo et al., 2013)
23 compuestos alquilfenólicos (APEOs, APECs y APs) Aguas residuales	<u>Columna SPE</u> Vol. Inyección: 2mL SPE: C18 Fase móvil: H ₂ O /MeOH (80:20) carga, elución con agua modificada con 1.10 ⁻⁴ M de ácido fórmico (A), 2.5% de ACN/THF (10:90) (B) en distintas proporciones durante el gradiente	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Columna: no especificada Fase móvil: 0.35mL/min, agua modificada con 1.10-4 M de ácido fórmico (A), 2.5% de ACN/THF 10/90 (B) Postcolumna: adición de amoníaco 300 mM en metanol (para ionización positiva) Detector: 5500 QTrap (QqQ) modo ESI, ionización negativa y positiva	OP OP1EC OP2EO OP1EO NP NP1EC NP2EO NP1EO	0.850 ng/L 0.130 ng/L 0.072 ng/L 55 ng/L 0.092 ng/L 0.051 ng/L 0.049 ng/L 50 ng/L	(Ciofi et al., 2016)

Continuación Tabla 1.6.b

Compuestos/Matrices	Preconcentración online-SPE	Análisis Instrumental	Analitos	LODs	Referencia
16 APEOs, OP, NP, BPA y 8 hormonas esteroideas Aguas residuales	<u>Columna SPE</u> Vol. Inyección: 4mL Dos columnas de extracción en línea (para trabajo en paralelo) Oasis HLB (2.1 mm×30 mm; 20 µm) Fase móvil: 2mL/min, agua con 0.5% de ácido acético (A2), MeOH (B2) y agua (C) ambas con 0.1% de amoníaco y 15 mM de acetato de amonio, MeOH:acetona:hexano (1:1:1) (D). Carga de muestra con (A2), limpieza de muestra con 90:10 de (B2) y (C) para el paso de limpieza de muestra, y la fase móvil (D) para limpieza de columna SPE.	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> T ^a del horno de columna, 40°C Columna: ACQUITY BEH C18 (2.1mm×50mm, 1.7µm,) Fase móvil: 300 µL/min, agua (A) y MeOH (B) con 0.1% ácido acético y 15mM de acetato de amonio Detector: TQD (QqQ) modo ESI, ionización negativa y positiva	E2 E1 E3 BPA EE2 DES OP OP1EO OP2EO NP NP1EO NP2EO	1.2 ng/L 1.3 ng/L 1.3 ng/L 1.9 ng/L 0.9 ng/L 0.6 ng/L 1.8 ng/L 2.1 ng/L 1.2 ng/L 1.3 ng/L 1.2 ng/L 0.5 ng/L	(Vega-Morales et al., 2012) ^b
33 EDCs y fármacos Aguas superficiales	<u>Columna SPE</u> Carga de muestra: 1.5-5 mL, muestras acidificadas con 15 µL de ácido fórmico Fases móviles: agua con 2.5% de ácido fórmico (A, equilibrado y limpieza), ACN:MeOH (50:50) (B, elución y limpieza), agua con 0.2% NH ₄ OH (C, limpieza columna SPE)	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Columna: Kinetex XB C18 (100x2,1 mm, 1.7 µm) T ^a del horno de columna, 25°C Fase móvil: 0.4-0.5 mL/min, ESI(-), agua 0.1 % acetato de amonio (A); ESI(+), agua 2.5% ácido fórmico (A), ACN:MeOH 50:50 (B) Detector: QTrap 3200 (QqQ) modo ESI, ionización negativa y positiva	BPA OP NP	0.2 ng/L 0.5 ng/L 1.2 ng/L	(Camilleri et al., 2015)
8 hormonas esteroideas Aguas residuales	<u>Columna SPE (EQuan™)</u> Vol. de inyección: 1-10 mL Columnas: 2 Hypersil Gold aQ (20 mm×2 mm, 12µm) en tándem Fase móvil: 1.5 mL/min, agua con ácido fórmico al 0.1% (carga). Elución, lavado, acondicionamiento con distintas proporciones de agua (A) y MeOH (B) con la adición de 0.1% de ácido fórmico	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> T ^a del horno de columna, 55°C Columna: Hypersil Gold (100mm×2.1mm, 1.9µm) Fase móvil: 550 µL/min, agua (A) y MeOH (B) con la adición de 0.1% de ácido fórmico Detector: Quantum Ultra AM (QqQ) modo APCI, ionización positiva	E2 E1 E3 EE2	21/24 ng/L efl/afl 16/23 ng/L efl/afl 30/60 ng/L efl/afl 18/21 ng/L efl/afl	(Fayad et al., 2013)
8 estrógenos y progestágenos naturales y sintéticos Aguas superficiales y residuales	<u>Columna SPE (EQuan™)</u> Vol. de inyección: 3mL de muestra acidificada con 1% de ácido fórmico a pH 2.4 Columna: Hypersil GOLD C18(20 mm×2.1 mm, 12µm) Fase móvil: agua acidificada con ácido fórmico al 0.1% (A) y MeOH (B). Acondicionamiento, carga e inyección con 60:40 de A/B, lavado con 100% de B	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> T ^a del horno de columna: 40°C Columna: Hypersil GOLD (50mm×2.1 mm, de 3µm) con precolumna (2mm×2mm, 5 µm) Fase móvil: 200 µL/min, 0.1% de ácido fórmico (v / v) en agua (A) y 100% de metanol (B) Detector: TSQ Quantum Ultra AM (QqQ) modo APPI, ionización positiva	E2 E1 E3 EE2	3 ng/L río 10 ng/L río 50 ng/L río 7 ng/L río	(Viglino et al., 2008)

Notas generales: ver apartado abreviaturas y acrónimos para conocer las abreviaciones plasmadas en la tabla. Todas las proporciones de solventes expuestas son en v/v. El resumen analítico presentado en la tabla se focaliza en los compuestos y matrices de interés de esta tesis.

^a Ver Tabla 1.7.a para consultar la metodología para las matrices sólidas de interés no expuestas en esta tabla.

^b Ver Tabla 1.6.a para consultar la metodología offline propuesta por el mismo autor.

Tabla 1.7.a Metodologías offline para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en matrices de sedimentos y lodos

Compuestos/Matrices	Tratamiento de muestra	Análisis Instrumental	Analitos	LODs (Sed./Lodo)	Referencia
13 EDCs (parabenos, TCS, BPA, fenilfenoles y APs) Sedimentos, lodos y suelos	<u>Extracción por MAE</u> 0.5-2g de muestra+10mL MeOH 350W, redisolución 10mL agua pH4 <u>Purificación SPE</u> Mediante sistema de flujo continuo para la preconcentración/purificación SPE: LiChrolut EN, acondicionamiento con 1mL ACN y 1mL de agua, elución con ACN	<u>GC-MS</u> Derivatización: BSTFA+1% TMCS Vol. Inyección: 1µL Columna: DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25µm) Gas portador: He Fuente de ionización: EI (70 eV) Adquisición: SIM	TCS MeP EtP PrP BeP BPA OP NP	0.5/2.0 ng/g 4.3/15 ng/g 4.4/15 ng/g 4.4/15 ng/g 4.5/15 ng/g 0.5/2.0 ng/g 1.0/3.5 ng/g 0.5/2.0 ng/g	(Azzouz and Ballesteros, 2016)
6 EDCs (estrógenos, NP y BPA) Lodos, fase líquida y sólida	<u>Extracción por USE</u> 1 g de muestra, extracción con 3x5mL MeOH/Acet. (1:1). Dilución con 300mL agua acidificada con H ₂ SO ₄ (40%) pH3 y filtración <u>Purificación con SPE+ Columna gel</u> SPE: Oasis HLB, elución con 10mL DCM/Acet. (7:3) Columna de gel: Al ₂ O ₃ /sílice, 3 pasos de elución con 10mL hexano, 10mL Hx:Acet. (2:1) y 20mL MeOH/Acet. 1:1. Evaporación final N ₂ a 1mL	<u>GC-MS</u> Derivatización: 50 µL piridina+50µL BSTFA (1% TMCS) Vol. Inyección: 1µL Columna: HP-5MS (30m×0.25mm, 0.25 µm) Gas portador: He Fuente de ionización: EI (70 eV) Adquisición: SIM	NP BPA E1 E2 EE2 E3	30/189 ng/g 0.2/1.3 ng/g 1.2/1.5 ng/g 0.8/1.2 ng/g 4/10 ng/g 2.3/7.1 ng/g	(Nie et al., 2009)
5 EDCs (NP, NPEOs, TCS y BPA) Aguas residuales y lodos ^a	<u>Extracción por USE</u> Extracción del lodo con 5mL de MeOH+3mL H ₂ O, a 50°C, 30 min. Centrifugación y dilución hasta 100mL de agua <u>Purificación con SPE</u> SPE: C18, 100mL de muestra, acondicionamiento con 2x3.5 ml de metanol y 2x3 mL, carga y lavado con 4x2.5 ml de agua, elución con 4x2mL de mezcla de DCM:Hx (4: 1). Evaporación con N ₂	<u>GC-MS</u> Derivatización: 50 µL piridina+50µL BSTFA Vol. de inyección: 1µL Columna: DB5MS (60m×0.32mm, 0.25 µm) Gas portador: He Fuente de ionización: EI (70 eV) Adquisición: SIM	TCS BPA NP NP1EO NP2EO	0.15/0.49 µg/g 0.56/1.84 µg/g 0.04/0.13 µg/g 0.49/1.61 µg/g 0.96/3.17 µg/g	(Gatidou et al., 2007)
22 etoxilados de alquilfenol y retardantes de llama bromados Lodos	<u>Extracción por USE</u> 5 g de lodo húmedo mezclado con 20 g de sulfato de sodio anhidro. Extracción con 2x30mL de mezcla de Hx/Acet (4:1) a 55 ° C durante 45 min. <u>Purificación con Sílice/SPE</u> Previo SPE: limpieza de extractos mediante columna de 3 g de sílice ácida, elución con 40 ml de DCM, eliminación de azufre con 2 g de polvo de Cu, evaporación y reconstitución con 250 mL de agua+2.5mL MeOH, acidificación a pH 3 con ácido acético SPE: Strata-X, acondicionamiento con 6mL de MeOH al 30% en DCM+6mL de MeOH, carga y elución con 3x2 mL de mezcla de DCM/Hx (4:1), evaporación y reconstitución con 0.1mL hexano	<u>GC-MS</u> Derivatización: 70µL TMA 0.1M y 7µL de HFBA Vol. de inyección: 1µL Columna: Restek RTX-1614 (15 m×0.25 mm de I.D, 0.10µm) Gas portador: He Fuente de ionización: EI (70 eV) Adquisición: SIM	OP NP NP1EO NP2EO	0.4/1.34 ng/g 0.4/1.4 ng/g 3.5/11.6 ng/g 5/16.4 ng/g	(Chokwe et al., 2015)

Continuación Tabla 1.7.a

Compuestos/Matrices	Tratamiento de muestra	Análisis Instrumental	Analitos	LODs (Sed./Lodo)	Referencia
27 éteres de difenilo polibromados, nuevos retardantes de llama bromados y organofosforados Sedimentos, lodos y polvo	<u>Extracción por USE</u> 1.5g de sedimento y 0.1g de lodo extraídos mediante sonicación de 10 min con EtOAc/ciclohexano (5:2), 2 veces, posterior evaporación a 1 mL. <u>Purificación con SPE</u> SPE: Florisil, acondicionamiento y elución con EtOAc/ciclohexano (5:2), evaporación y reconstitución con tolueno, usando una post limpieza con cobre activo ácido para sedimentos	<u>GC-MS/MS</u> Derivatización: 70µL TMA 0.1M y 7µL de HFBA Vol. de inyección: 2µL Columna: DB-5MS (15 mx0.250 mm, 0.10µm) Gas portador: He Fuente de ionización: EI (70 eV) Adquisición: SRM	TBEP TCEP TCPP	60/288 ng/g 2.7/79 ng/g 4.5/31.4 ng/g	(Cristale and Lacorte, 2013)
9 estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados Lodos	<u>Extracción por PLE</u> 1 g de muestra mezclado con óxido de aluminio calentado a 120°C durante 24 h. Extracción con MeOH/Acet (1:1), 2 ciclos de 3 min., y H ₂ O/MeOH (1: 1), 2 ciclos de 3 min., a 75°C; 1500 psi; volumen de extracción final ~25mL; filtración	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 50µL Columna: Kromasil 100 C18 (25× 0.46 cm, 5 µm) Tª del horno de columna, 35°C Fase móvil: 1mL/min, agua con ácido acético pH3(A) y ACN (B) Detector: QqQ (triple cuadrupolo) con ESI, modo de ionización negativo	E2 E1 E3 E1-3S EE2	150/250 ng/g 11/19 ng/g 26/75 ng/g 0.15/0.25 ng/g 150/250 ng/g	(Nieto et al., 2008)
12 filtros UV y benzotriazoles Sedimentos	<u>Extracción por PLE (ASE)+ purificación en celda</u> 1 g de muestra + 1g de alúmina neutra activada, extracción con MeOH y mezcla de MeOH/H ₂ O (1:1), dilución de extractos hasta 25mL con MeOH, filtración, evaporación con N ₂ y redisolución con 1mL de ACN	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. Inyección: 10µL Columna: LiChorCART Purospher STAR RP-18 ec (125mm×2.0mm, 5µm) Fase móvil: 0.3mL/min, agua (A) y ACN (B), ambas fases con ácido fórmico Detector: TDQ (triple cuadrupolo) con ESI, modo de ionización positivo	BT TT	1.4/4.8 ng/g 1.4/4.6 ng/g	(Molins-Delgado et al., 2017)
7 EDCs (estrógenos, APs y BPA) Sedimentos y lodos	<u>Extracción por PLE (ASE)+ purificación en celda</u> 0.5g/5g de lodo/sedimento + 5g de Florisil, Extracción con una mezcla de Acet/MeOH (1:1), 80 °C, presión de 1500 psi, 2 ciclos de 8 min. Evaporación con N ₂ , redisolución con 5mL de ACN+10mL Hx <u>Purificación por LLE + 2 SPEs</u> LLE: etapa sólo para lodos, 2x10mL de Hx, evaporación y redisolución con 5 mL Hx/DCM (3:1). SPE: Florisil, acondicionamiento con 5mL Hx+5mL de Hx/DCM (3:1), elución con 6 mL de Acet/Hx (1:4), evaporación y redisolución con 5 mL de 0.1 mol/L de NaOH en ultrasonidos, filtración i dilución con 100 mL de agua y 6 mL de MeOH, pH 3. SPE: HLB, acondicionando con 5 mL EtOAc, MeOH y agua, limpieza con 10mL de agua y elución con 3×2mL de EtOAc, evaporación y reconstitución con 0.2mL de ACN/H ₂ O (1:1)	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 20µL Columna: Nova-Pak C18 (150 mm×3,9 mm, 4 µm) Fase móvil: 0.65 mL/min, agua 1% NH ₃ (A), MeOH (B) y ACN (C) Detector: QTRAP (triple cuadrupolo) con ESI, modo de ionización negativo		Lods no facilitados	(Chen et al., 2012)

Continuación Tabla 1.7.a

Compuestos/Matrices	Tratamiento de muestra	Análisis Instrumental	Analitos	LODs (Sed./Lodo)	Referencia
15 hormonas y corticoides Lodos	<u>Extracción MAE sin etapa de purificación:</u> 100 mg de lodo + 10mL de MeOH, total procedimiento aprox. 20 min., Tª máxima 65°C. Filtración, evaporación y reconstitución 1mL MeOH,	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 20µL Columna: ACQUITY UPLC BEH C18 (50mm×2,1mm, 1.7µm). Tª del horno de columna, 30°C Fase móvil: 300 µL/min, agua con 0.1 % NH ₃ (A) y MeOH (B). Detector: TQD (triple cuadrupolo) con ESI, modo de ionización negativo	E2 E1 E3 EE	2.30/7.67 ng/g 5.57/18.6 ng/g 1.11/3.69 ng/g 1.48/4.92 ng/g	(Guedes-Alonso et al., 2016)
20 esteroides naturales y sintéticos Aguas subterráneas, de escorrentía, residuales, sedimentos y suelos	<u>Extracción MAE sin etapa de purificación:</u> 3 g de muestra, extracción con 50µL de 20 µg BHT/µL en metanol (antioxidante) y 5 mL de MeOH. Tª máx. 90°C, total 30 min. Adición de 5mL MeOH para repetición de la extracción. Evaporación con N ₂ hasta 200µL	<u>HPLC-APPI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 50µL Columna: HyPurity C18 (250×2.1mm, 5µm) Tª del horno de columna, 50°C Fase móvil: 300 µL/min, 0.1% ácido fórmico en H ₂ O/MeOH (97/3) (A), MeOH/H ₂ O 0.1 % ácido fórmico (97/3) (B). Detector: QqQ con APPI, modo de ionización positiva	E2 E1 E3 EE2	0.52 ng/g 0.6 ng/g 1.87 ng/g 0.49 ng/g	(Snow et al., 2013)
20 compuestos que imitan el E2 (BPA, E2, E3, EE2, OP, OPEOs, NP y NPEOs) Lodos	<u>Extracción por MAE</u> 1 g de muestra, extracción con 5mL MeOH, temperatura cercana punto ebullición del disolvente, tiempo total aprox. 30 min. Filtración, dilución en agua. <u>Purificación con SPE:</u> SPE: Sep-Pak C18 activación con 3x5mL de metanol y 3x5mL de agua, carga, lavado con 2x5mL de una solución de H ₂ O/MeOH (9/1, v/v), elución con 2x1mL de MeOH	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 10µL Columna: Pursuit XR Ultra C18 (50 mm×2 mm, 2.8µm). Tª del horno de columna, 40°C Fase móvil: 300 µL/min, agua (A) y MeOH (B), ambos con ácido acético glacial al 0.1% (v/v) y acetato de amonio 15 mM. Detector: QqQ con ESI, modo de ionización negativo y positivo	E2 E3 EE BPA OP OP1EO OP2EO NP NP1EO NP2EO	1.5/5 ng/g 1.2/4 ng/g 0.9/3 ng/g 0.7/2.3 ng/g 2.2/7.3 ng/g 2.3/7.6 ng/g 2.4/7.9 ng/g 3.5/11.6 ng/g 3.3/10.9 ng/g 0.8/2.6 ng/g	(Vega-Morales et al., 2011)
5 estrógenos Lodos	<u>Extracción por agitación:</u> 0.5g de muestra + 3x10 ml de EtOAc con agitación durante 1 h seguido de centrifugación, evaporación y redisolución con 2 ml de Hx <u>Purificación con SPE + GPC + SPE</u> SPE: Sílice, acondicionamiento con 6mL de Hx, elución con 3 mL de EtOAc y luego con 2 mL de MeOH, evaporación y reconstitución en 2 mL de DCM/MeOH (90:10). GPC DCM/MeOH (9:1), evaporación fracción y reconstitución con 2mLHx SPE: de intercambio aniónico, acondicionado con 4mL de EtOAc al 10% con Hx y luego 2mL de Hx, elución con 6 ml de EtOAc+6 mL NH ₄ OH al 3% en MeOH, evaporación y reconstitución con 0.2 mL de MeOH/H ₂ O (10:90)	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 20µL Columna: Gemini C18 (100 mm×2 mm., 3µm) Tª del horno de columna, 40°C Fase móvil: agua 0.1% de NH ₄ OH (A) y MeOH 0.1% de NH ₄ OH (B). Detector: Quattro Premier XE (triple cuadrupolo) con ESI, modo de ionización negativo	E2 E1 E3 E1-3S EE2	4.9 ng/g 2.1 ng/g 4.5 ng/g 2.6 ng/g 5.3 ng/g	(Chiu et al., 2009)

Continuación Tabla 1.7.a

Compuestos/Matrices	Tratamiento de muestra	Análisis Instrumental	Analitos	LODs (Sed./Lodo)	Referencia
90 contaminantes emergentes (Filtros UV, PPCPs, drogas ilícitas, estrógenos y BPA) Aguas de río, residuales y lodos ^a	<u>Extracción por MAE</u> 0.5 g de muestra+25mL H ₂ O/MeOH (50:50) pH2, T ^a 110°C, tiempo 30 min. Filtración y dilución <5% MeOH con H ₂ O pH2 <u>Purificación con SPE</u> SPE: Oasis MCX, acondicionamiento con 2mL de MeOH y 2mL de H ₂ O pH2, carga, elución de los analitos ácidos con 2mL de MeOH 0.6% en ácido acético, elución de los analitos básicos con 3mL de MeOH 7% en NH ₄ OH. Evaporación con N ₂ , reconstitución con 500µL H ₂ O/MeOH (80:20)	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 15µL Columna: BEH C18 (150×1.0mm, 1.7µm) T ^a del horno de columna, 25°C Fase móvil: 0.4 mL/min, ESI (-), 80:20 H ₂ O:MeOH 1mM NH ₄ F (A), 5:95 H ₂ O:MeOH 1mM NH ₄ F (B); ESI (+), 80:20 H ₂ O:MeOH 5mM acetato de amonio y 3mM ácido acético (A), MeOH (B) Detector: QqQ con ESI, modo de ionización negativo y positivo	E2 E1 EE2 TCS MeP EtP PrP BPA Caff	1.48/7.41 ng/g 1.68/8.38 ng/g -/- ng/g -/- ng/ng 0.06/0.31 ng/g 0.17/0.57 ng/g 0.22/0.72 ng/g 0.27/0.88 ng/g -/- ng/g	(Petrie et al., 2016)
32 EDCs y sulfatos y ácidos carboxílicos perfluorados Sedimentos	<u>Extracción por USE</u> 2 g de muestra+15mL de mezcla de H ₂ O/MeOH/Acet (1:2:1), sonicación 1h a T ^a ambiente, centrifugación y dilución con agua hasta 250mL y acidificación a pH2 con 1mol/L HCl <u>Purificación con SPE</u> SPE: Carbohydr-4, acondicionamiento con 10mL de DCM/MeOH (80:20) 10mmol/L de formiato de amonio, 5 mL de MeOH, 20mL de solución 10mmol/L de HCl y 10 mL de agua. Lavado con 50mL de agua acidificada a pH2, pasando posteriormente y lentamente 200 µL. Carga, elución con 15 ml de DCM MeOH (80:20) 10mmol/L de formiato de amonio. Evaporación N ₂ y reconstitución con 1mL de agua/MeOH (50:50), centrifugación	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 5µL Columna: Hypersil Gold (50×2.1mm., 1.9µm) con precolumna Hypersil Gold (4×2.1mm, 5µm) T ^a del horno de columna, 40°C Fase móvil: 300 µL/min, agua (A) y MeOH (B) con solución de amoníaco, 80 mmol/L en agua/MeOH (50:50) Detector: TSQ Vantage (triple cuadrupolo) con ESI, modo de ionización negativo y positivo	E2 E1 E3 E1-3S E1-3G E2-17G E3-3S EE2 TCS BPA OP NP TCEP TCPP	0.38/1.28 ng/g 0.64/2.14 ng/g 1.1/3.8 ng/g 0.84/2.82 ng/g 1.48/4.92 ng/g 1.5/5.02 ng/g 1.02/3.42 ng/g 2.1/7 ng/g 1.4/4.6 ng/g 0.18/0.6 ng/g 1.5/5.1 ng/g 0.28/0.94 ng/g 0.04/0.14 ng/g 0.04/0.14 ng/g	(Cavaliere et al., 2016)
26 NPEOs y etoxilados de alcohol Sedimentos	<u>Extracción por USE</u> 0.5 g de muestra, 3x10mL MeOH, 30 min, 50°C, centrifugación y evaporación a 2mL con N ₂ , reconstitución con 100mL de agua <u>Purificación con SPE</u> SPE: Oasis HLB, acondicionamiento con 8mL de MeOH y 5mL de agua, limpieza con 5mL de agua, carga y elución con 8 mL de MeOH y 4mL de DCM, evaporación y reconstitución en 1mL MeOH/H ₂ O (50:50)	<u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 10µL Columna: Purospher STAR RP-18 (50×2 mm, 1.8µm) Fase móvil: 400 µL/min, agua con ácido fórmico 10mM/10mM tampón de formiato de amonio (A) y ACN (B) Detector: TQD (triple cuadrupolo) con ESI, modo de ionización negativo y positivo	NP NP1EC NP1EO NP2EO	2.2 ng/g 1.3 ng/g 27.3 ng/g 2.6 ng/g	(Lara-Martín et al., 2012)

Continuación Tabla 1.7.a

Compuestos/Matrices	Tratamiento de muestra	Análisis Instrumental	Analitos	LODs (Sed./Lodo)	Referencia
15 contaminantes emergentes (PPCPs, pesticidas, hormonas y BPA) Sedimentos	<u>Extracción y purificación con QuEChERS</u> 2g sedimento + 10mL agua + 10mL de tampón de acetato de ACN, agitación y c3centrifugación, transferencia de 6mL de la fase ACN a un tubo de 15 mL de PSA/GCB. Evaporación de 5 mL del extracto centrifugado, evaporación con N2 y reconstitución con 500µL de la solución de ACN. Dilución de una alícuota de 100µL diez veces usando una solución 89:11 de agua/ACN	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 10µL Columna: Kinetex XDB C18 (50mm×2.1mm, 1.7µm) Tª del horno de columna, 60°C Fase móvil: 350 µl/min; acetato de amonio 0.1mM en agua (A); ácido fórmico al 0.1% en agua (B); MeOH (C) Detector: QTRAP MS de triple cuadrupolo con ESI/Modo de ionización negativo y positivo	E1 TCS BPA	1.5 ng/g 5.5 ng/g 8.5 ng/g	(Berlioz-Barbier et al., 2014)
12 PPCPs, NSAIDs, Parabenos, TCC, BPA, herbicidas, antidepresivos y un fungicida Lodos	<u>Extracción y purificación con QuEChERS</u> 10 g de muestra + 10 mL de ACN, acidificado con 100µL de ácido acético, agitación y centrifugación, reparto de los analitos en la fase orgánica con 4g de MgSO4 y 1g de NaCl. Limpieza de 2mL de extracto con 150 mg de MgSO4 y 50 mg (PSA + C18), agitación y centrifugación	<u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Vol. de inyección: 10µL Columna: XTerra C18 (3.5µm, 50×3mm) Fase móvil: 0.22 mL/min, ACN (B) y agua (A), ambos acidificados con ácido acético al 0.1% Detector: Micromass Quattro micro API (triple cuadrupolo) con ESI, modo de ionización negativo	TCC MeP PrP BPA Caff	0.8/2.5 µg/g 2/7.5 µg/g 2/7.5 µg/g 15/50 µg/g 8/25 µg/g	(Cerqueira et al., 2014)

Notas generales: ver apartado abreviaturas y acrónimos para conocer las abreviaciones plasmadas en la tabla. Todas las proporciones de solventes expuestas son en v/v. El resumen analítico presentado en la tabla se focaliza en los compuestos y matrices de interés de esta tesis.

^a Ver Tablas 1.6.a/b para consultar la metodología para las matrices líquidas de interés no expuestas en esta tabla.

Tabla 1.7.b Metodologías online para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en matrices de sedimentos y lodos

Compuestos/Matrices	Extracción	Purificación online-SPE/Análisis Instrumental	Analitos	LOD/LOQ	Referencia
12 EDCs (estrógenos, NP, OP, BPA) Lodos	<u>Extracción por MAE</u> 1 g de muestra, extracción con 5mL MeOH, temperatura cercana punto ebullición del disolvente, tiempo total aprox. 15 min. Filtración, dilución en agua 1/10 acidificada	<u>Purificación online con columnas SPE</u> Carga de muestra: 20mL Columnas de extracción: 2 Oasis HLB online trabajando en paralelo. Fase móvil: 2mL/min, agua 0.5% en ácido acético para la carga, H ₂ O/MeOH con 0.1% amoníaco (90:10) para limpieza suave, MeOH/Acet/Hx (1:1:1), para limpieza de columna. <u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Columna: Pursuit XRs Ultra-C18 (50 mm×2mm, 2.8µm) Fase móvil: 300 µL/min, agua (A), MeOH (B), las dos con 0.1% de NH ₃ Detector: QqQ con ESI, modo de ionización negativo	E2 E1 E3 EE2 DES BPA NP OP	0.6/2.0 ng/g 0.5/1.7 ng/g 0.1/0.2 ng/g 0.3/1.0 ng/g 0.1/0.3 ng/g 0.4/1.3 ng/g 0.1/0.3 ng/g 0.1/0.3 ng/g	(Vega-Morales et al., 2013) ^a
14 OPFRs Sedimentos y biota	<u>Extracción por PLE (ASE)+purificación en celda</u> 1g de muestra+0.5g de cobre, extracción con Hx/Acet (1:1) a 50 ° C y 1600 psi, evaporación con N ₂ y redisolución con 500 µL de MeOH	<u>Purificación "online" TFC</u> Carga de muestra: 20mL Columnas de purificación: TurboFlow™ Cyclone™-P (0.5×50mm) y C18-XL (0.5×50mm), Fase móvil, con modificadores para la activación de las columnas: 0.75 mL/min, agua, ácido fórmico al 0.1% (A) y MeOH, ácido fórmico al 0.1% (B). <u>HPLC-ESI-MS/MS</u> Columna: Purosphere Star RP-18 (125mm×0.2mm) T ^a del horno de columna, 40°C Fase móvil: 250 µL/min, agua, ácido fórmico al 0.1% (A) y MeOH, acetato de amonio 0.1% (B). ácido fórmico al 0,1% en agua (A) y acetato de amonio en metanol (B) Detector: TSQ Vantage™ (triple cuadrupolo) con ESI, modo de ionización positivo	TCEP TCEP TBEP	0.07/0.13 ng/g 0.09/0.26 ng/g 0.03/0.05 ng/g	(Giulivo et al., 2016)

Notas generales: ver apartado abreviaturas y acrónimos para conocer las abreviaciones plasmadas en la tabla. Todas las proporciones de solventes expuestas son en v/v. El resumen analítico presentado en la tabla se focaliza en los compuestos y matrices de interés de esta tesis

^a Ver Tabla 1.7.a para consultar la metodología offline propuesta por el mismo autor.

Capítulo 2

Objetivos

Objetivos

En este contexto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue evaluar la ocurrencia de una serie de compuestos pertenecientes a grupos muy distintos y con aplicaciones muy variadas con una característica en común, ser disruptores endocrinos, en muestras ambientales, mediante el análisis online por cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-LC-MS/MS).

Por tanto, los objetivos específicos fueron:

1. Desarrollar, optimizar y validar métodos analíticos robustos, rápidos, de alto rendimientos y con LODs aceptables comparándolos con los métodos más convencionales, para la determinación de EDCs en diferentes tipos de matrices, incluyendo:

- Distintos tipos de aguas, especialmente centrando los métodos en aguas superficiales y residuales

Para ello, se utilizó la tecnología de inyección directa EQuan™, donde el agua a analizar entra directamente en el sistema online y los analitos se preconcentran en una columna específica para su posterior lavado, elución, separación y detección mediante LC-MS/MS.

- Distintos tipos de matrices sólidas, concretamente sedimentos de río y lodos de depuradora

Para ese fin, se aplicó la tecnología online basada en cromatografía de flujo turbulento: TFC (TurboFlow™), un sistema automatizado que utiliza columnas TFC para separar los analitos de interés de sus matrices complejas, combinando principios de difusión, química y exclusión de tamaño y mediante la utilización de un "loop" los compuestos se eluyen para su posterior separación cromatográfica y detección por LC-MS/MS, logrando una limpieza online, minimizando la preparación de la muestra y reduciendo la supresión de iones debido a una mayor especificidad.

2. Estudiar la presencia y distribución de EDCs en aguas de río y residuales, sedimentos y lodos de depuradora. En todas estas matrices el objetivo era analizar, 30 analitos, EDCs y compuestos relacionados (EDCs sospechosos), pertenecientes a diferentes grupos de sustancias químicas (10 estrógenos, naturales y sintéticos, en forma libre y conjugada, 8 compuestos alquilfenólicos y sus metabolitos, 4 conservantes, 2 antimicrobianos, 3 compuestos organofosforados retardantes de llama o plastificantes, 2 anticorrosivos, bisfenol A (BPA) y el biomarcador químico, cafeína (Caff).

Recogiendo el mayor número posible de aguas de ríos y sedimentos de las cuatro cuencas más relevantes de la Península Ibérica, (Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir). Así como el muestreo de aguas residuales y lodos de las EDARs más representativas de estos ríos.

3. Comparar los niveles de EDCs en distintos tipos de aguas, de distintas regiones y características, como por ejemplo aguas superficiales, de consumo o de regiones remotas. Estos estudios en concreto se realizaron mediante la colaboración con otras instituciones y/o universidades.

4. Aplicar las metodologías analíticas validadas en esta tesis para la evaluación de la eliminación de EDCs en aguas de hospital, caso práctico que en realidad fue realizado en el (ICTA-UAB), donde la aportación a sus estudios fue el análisis de EDCs de los ensayos que realizaron mediante tratamiento fúngico.

Capítulo 3

Desarrollo de métodos analíticos

3.1 Introducción

La determinación multiresiduo de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en esta tesis se realizó mediante el análisis por LC-MS/MS, focalizando el estudio en la incorporación de 2 tipos de metodologías de tratamiento de muestra online, una para las matrices líquidas y la segunda para las matrices sólidas. En ambos casos se pretendía analizar el máximo de compuestos con el mínimo de preparativa de muestra, incorporando para ello la aproximación online con columnas “tipo” para la preconcentración y limpieza de las muestras analizadas.

Tratamiento de muestra

Aguas superficiales y residuales

Para la preconcentración de las muestras de agua de río y residuales analizadas se aplicó la tecnología online EQuan™, desarrollada por Thermo Fisher Scientific, seguido de la separación y detección por LC-MS/MS. Esta tecnología consiste principalmente en la incorporación al sistema de análisis de una bomba cuaternaria y una válvula de 6 puertos para el control de la preconcentración de muestra en la columna SPE-EQuan y la posterior elución, retención y separación de los compuestos de interés en la columna analítica. El sistema online de preconcentración (a) y elución (b), se muestra en la **Figura 3.1**.

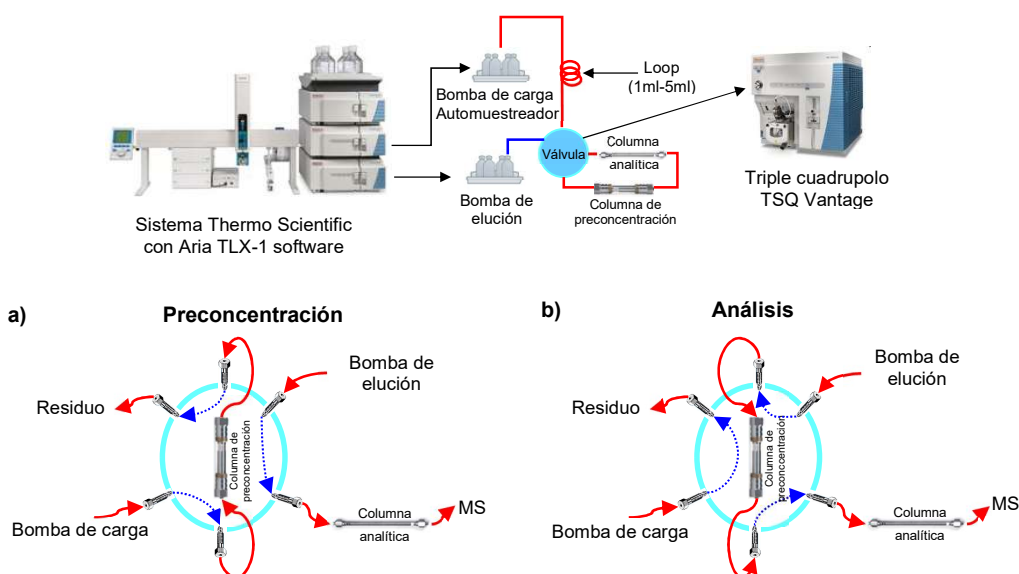


Figura 3.1 Tecnología EQuan™ acoplada al sistema instrumental de análisis LC-MS/MS. (a) posición de carga, (b) posición de elución y análisis

Durante la preconcentración de las muestras de agua, mediante la bomba de carga, la columna EQuan™ se condiciona con la proporción de solventes adecuada, para la posterior inyección de volúmenes altos de muestra, normalmente entre 1 y 5 mL. Mientras los compuestos quedan retenidos en esta columna, la matriz de agua es descartada como residuo. Durante esta etapa se pueden añadir pasos de limpieza de columna, aunque se debe de tener en cuenta, que la aplicación de este procedimiento de limpieza solo descarte matriz y no eluya los compuestos de interés.

3. Desarrollo de métodos analíticos

Durante el análisis de los compuestos de interés por el sistema LC-LC-MS/MS, la válvula de seis puertos debe cambiarse a la posición de análisis, dónde se conectan en línea la columna de preconcentración EQuan™ y la columna analítica, mediante la bomba de elución los compuestos son transferidos a esta última, quedando retenidos en ella. En este punto la válvula vuelve a la posición de carga, y mientras la columna EQuan™ se somete a un proceso de limpieza para evitar posibles interferencias entre muestras mediante las fases móviles de la bomba de carga, la separación y análisis por LC-MS/MS transcurre es regulada por las fases móviles de la bomba de elución.

Para la optimización de este sistema online se deben tener en cuenta principalmente por los siguientes parámetros:

- Flujos de carga; estos normalmente comprendidos entre 1 y 3 mL/min, para un buen desalojo del "loop" de inyección cargado con volúmenes de entre 1 y 5 mL.
- Tiempo de carga; debe ser suficiente para el desalojo del "loop" de inyección y viene determinado por la cantidad de muestra inyectada y el flujo de carga.
- Flujo de transferencia; durante la etapa dónde están conectadas en línea las columnas de preconcentración y analítica el flujo de las fases móviles de las bombas de carga y elución deben ser los adecuado teniendo en cuenta la menor tolerancia de flujos elevados de las columnas analíticas, aunque suficiente para una correcta transferencia de los analitos a esta desde la columna de preconcentración.
- Tiempo de transferencia; durante el cual las dos columnas están conectadas, debe ser el suficiente para la correcta transferencia de los analitos de la columna de preconcentración a la analítica evitando en la medida de los posible la matriz de la muestra.

En todos estos procesos además se debe tener en cuenta la proporción de fases móviles a utilizar tanto en la bomba de carga como en la de elución para una óptima limpieza y separación.

Las características de las columnas EQuan™ de Thermo Fisher Scientific que utiliza este sistema se tiene características parecidas a las columnas analíticas pero un tamaño de partícula superior. Existen distintas columnas en el mercado a escoger dependiendo de los compuestos y tipo de muestra a analizar, por ejemplo:

- Hypersil GOLD C18 (20×2.1mm,12µm), adecuada para la retención de una gran variedad de compuestos.
- Hypersil GOLD aQ (20×2.1mm,12µm), específica para la máxima retención de compuestos en muestras acuosas
- Hypersil GOLD PFP (20×2.1mm,12µm), columna tractada con perfluoratos, puede ofrecer selectividad alternativa en aplicaciones en fase reversa.
- Hypersil GOLD PEP (20×2.1mm, 12µm), retiene compuestos polares y no polares.

Sedimentos de río y lodos de depuradora

La extracción de los compuestos a analizar en muestras sólidas se realizó mediante la aplicación de un sistema automatizado de extracción de líquidos a presión, ASE, descrito en el apartado 1.5.1, pág. 49, que reduce el volumen de solventes, tiempo de preparación/extracción, entre otros, mediante programación de temperatura y presión, obteniendo además un cierto grado de selectividad.

Aunque este procedimiento de extracción se comparó a priori con un sistema de extracción USE, más suave, antes de su elección, y tuvo que ser optimizado, mediante la elección de los solventes, así como de la presión y temperatura adecuadas entre otras, el punto u objetivo más importante fue la utilización de una purificación de los extractos obtenidos mediante un sistema online con columnas tipo SPE, en vez de la clásica purificación con cartuchos.

Para ello se usó un sistema más complejo que el aplicado para el análisis online de aguas presentado anteriormente, la tecnología online TurboFlow™ desarrollada por Thermo Fisher Scientific, seguido de la separación y detección por LC-MS/MS. En este caso, las columnas TurboFlow™ de purificación, empaquetadas de partículas grandes, utilizan los principios de turbulencia, difusión e interacción química, para separar los compuestos de interés de la matriz de la muestra. Todo ello es posible mediante la incorporación principalmente de un módulo de bombas cuaternarias y 2 válvulas adicionales, así como un “loop” cargado con un solvente de extracción que permite la elución de los compuestos de la columna de purificación a la columna analítica de separación. Los pasos a seguir para la correcta purificación de las muestras inyectadas en el sistema para su posterior determinación online por LC-MS/MS, se muestran en la **Figura 3.2** y que se resume a continuación.

Durante la etapa de carga y purificación (a), el extracto es inyectado en la columna de purificación y los analitos quedan retenidos en ella, mediante la bomba de carga con la proporción de fases móviles adecuada, los compuestos permanecen retenidos mientras que la matriz fluye a través de la columna y es descartada. En la siguiente etapa (b), la válvula 1 conecta la fase móvil de la bomba de carga con el “loop” cargado generalmente con fase orgánica que permitirá en el siguiente paso (c) la elución de los analitos de la columna de purificación a la analítica, en este paso, además, el flujo de fase móvil se conecta a la columna en dirección opuesta. Durante la etapa de transferencia de los analitos de la columna de preconcentración a la analítica (c), y con la ayuda de las fases móviles de las 2 bombas, la de carga y elución, el solvente orgánico del “loop” interacciona con estas y los analitos se focalizan en la columna analítica. En la etapa de separación analítica (d), las fases móviles de la bomba de carga son utilizadas para la limpieza de la columna de purificación, mientras las fases móviles de la bomba de elución separan los analitos en la columna de análisis para su posterior detección por espectrometría de masas en tándem. En las siguientes etapas (e) y (f), son de llenado del “loop” y acondicionamiento de columnas para la siguiente inyección.

3. Desarrollo de métodos analíticos

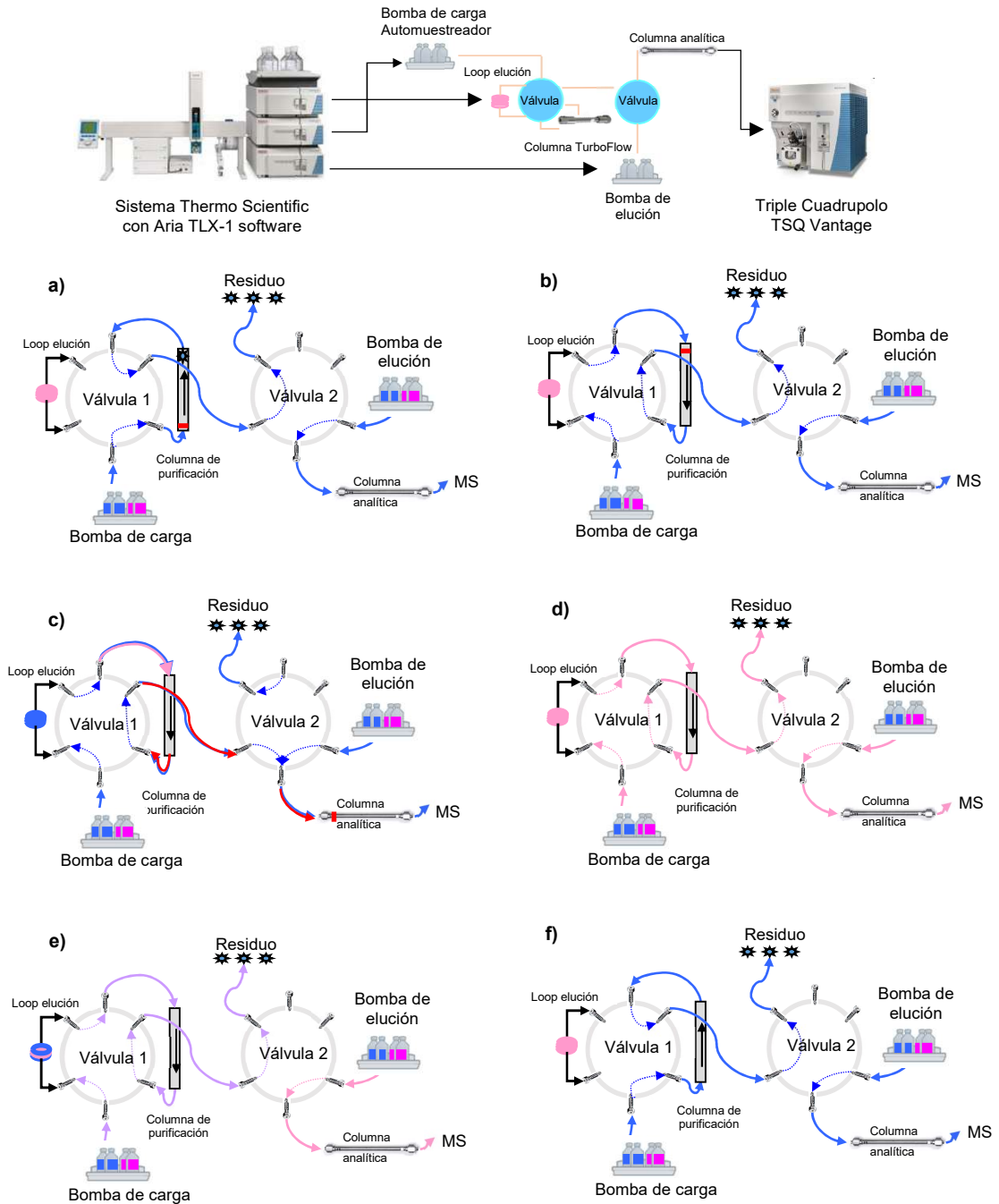


Figura 3.2 Tecnología TurboFlow™ acoplada al sistema instrumental de análisis LC-MS/MS. (a) carga y purificación (b) elución y vaciado del "loop", (c) transferencia, (d) separación analítica y limpieza de columna de purificación, (e) llenado del "loop" y limpieza de columna analítica, (f) equilibrado de la columna de preconcentración

Debido a la mayor complejidad de este sistema los parámetros a optimizar, aun siendo parecidos a los del sistema online para aguas EQuan™, requieren una mayor atención, por ejemplo, uno de los puntos a tener en cuenta es la activación de las columnas de limpieza, normalmente con fases móviles acidificadas. Durante todo este proceso, la correcta proporción de fases móviles será un punto crítico para unas recuperaciones satisfactorias. Los otros parámetros por combinar con este, se resumen a continuación:

- Flujos de carga; estos deben ser suficientemente altos para crear un correcto flujo turbulento para una mayor eficiencia en la limpieza de extractos de la columna de purificación. El tiempo de carga, en este caso no es un parámetro tan importante en el caso de inyectar volúmenes pequeños de muestra.

- Flujo y tiempo de acondicionamiento de la TFC, para conexión con columna analítica; durante la etapa b, en caso de haber activado la columna de purificación con fases móviles no compatibles con la detección posterior por MS, deben ser retiradas antes de la transferencia, teniendo en cuenta la no elución de los analitos en esta etapa.

- Flujo y tiempo de transferencia, durante la etapa donde están conectadas en línea las 2 columnas, el flujo de las fases móviles de las bombas de carga y elución deben ser los adecuados teniendo en cuenta la menor tolerancia de flujos elevados de las columnas analíticas, aunque suficiente para una correcta transferencia para el desalojo del solvente del "loop" que permite la elución y transferencia de los analitos a la columna de separación.

- Limpieza columna de purificación y análisis; en este punto, al estar las 2 columnas no conectadas, se puede realizar una limpieza exhaustiva de la TFC.

- Carga del "loop" de elución; la proporción de solventes debe ser suficiente para la correcta transferencia de los analitos de una columna a otra, evitando la no retención de estos en la analítica por una excesiva carga de solvente orgánico.

- Acondicionamiento de columnas; es en la etapa f donde se pueden acondicionar las 2 columnas adecuadamente, al no estar conectadas entre ellas ni con el "loop" de elución.

Para una rápida optimización, este sistema disponía además de un módulo donde conectar distintas columnas TurboFlow a la vez, permitiendo escoger de manera rápida la más adecuada para el análisis. Las principales columnas existentes en el mercado se presentan a continuación.

En orden de fase inversa/fase normal: XL C18 (0.5×50 mm, tipo sílice), XL C18-P (0.5×50 mm, tipo sílice), Cyclone (0.5×50 mm, polimérica).

En orden de carga más positiva a carga más negativa: Cyclone-MAX (0,5x50 mm, polimérica), Cyclone-P (0.5×50 mm, polimérica), Cyclone-MCX (0.5×50 mm, polimérica).

Análisis instrumental

Para la determinación instrumental de los EDCs y compuestos relacionados en esta tesis se aplicó la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem mediante un sistema de triple cuadrupolo (LC-MS/MS), la cuantificación de los compuestos de interés se realizó mediante SRM, monitorización de las masas de los fragmentos principales del compuesto a analizar.

3. Desarrollo de métodos analíticos

La optimización de los parámetros LC y MS/MS es una parte importante en el desarrollo de un método exitoso para el análisis de trazas, sobre todo para los compuestos a detectar a niveles bajos, como las hormonas, o para los compuestos difícilmente ionizables en iones fácilmente fragmentables como los APEOs.

Por tanto, antes de la optimización de los parámetros de separación cromatográficos, es importante establecer las condiciones de detección espectrométricas. Para ello, los compuestos a analizar son infundidos directamente al detector de masas, en nuestro caso un QqQ (ESI), aunque cabe mencionar que existen otro tipo de fuentes como la fotoionización de presión atmosférica (APPI) (Snow et al., 2013) o la ionización química de presión atmosférica (APCI) (Fayad et al., 2013), especialmente indicada para compuestos poco polares como los estrógenos, que se pueden aplicar, ver tablas 1.6 y 1.7, pág. 54 para ver una breve descripción de los métodos citados con este tipo de fuentes,.

Durante la infusión y mediante un sistema más o menos automatizado, según las necesidades de análisis, se deben fijar los parámetros de MS, como la temperatura de la fuente de iones, la energía de colisión, la temperatura de desolvatación y la temperatura de la fuente, entre otras. El objetivo principal de esta etapa es obtener 2 fragmentos principales del compuesto de interés, para ello este tipo de detectores necesitan 2 condiciones principales: i) los compuestos y los fragmentos deben estar en forma de iones para la detección masa/carga, m/z , ii) el ion precursor (compuesto cargado), debe ser fácilmente fragmentarle en 2 fragmentos principales.

Para la ionización de los compuestos, la fase móvil escogida será clave, y como la optimización de los parámetros de masas se realiza mediante infusión, los compuestos infundidos en principio han de estar en una solución lo más parecida posible a la fase móvil que llegara al detector durante el análisis de LC-MS/MS.

En el caso de la ionización por electrospray, ESI, la detección de masas del compuesto puede darse en modo de ionización negativa o positiva, en principio la elección del modo de ionización viene condicionada por las propiedades físico-químicas del compuesto a analizar, siendo algunos compuestos relativamente ionizables negativamente, como los estrógenos, los desinfectantes y parabenos, el BPA, los APs y APECs, y otros más fácilmente ionizables en modo positivo, como los APEOs, los compuestos organofosforados y anticorrosivos

Para mejorar esta ionización tanto en modo positivo como negativo, existen una serie de aditivos químicos (modificadores) que potencian la formación de compuestos cargados, estos aditivos, además, pueden mejorar la separación cromatográfica, teniendo la opción de añadirlos tanto en las fases móviles acuosas como en las orgánicas. Los aditivos más utilizados para ionizaciones positivas son el ácido fórmico, ácido acético y/o en combinación con sus sales de amonio (Omar et al., 2016).

En el caso de los compuestos ionizables en modo negativo se pueden utilizar aditivos como el hidróxido de amonio, aunque generalmente la utilización de estos está menos extendida, dejando la ionización de los compuestos a analizar en modo negativo a la optimización de los parámetros de la interfase ESI del detector QqQ utilizado. Otro factor a tener en cuenta es la influencia negativa en el caso de la

detección en modo negativo de los modificadores usados para el modo positivo, siendo recomendable por tanto optimizar y utilizar distintas fases móviles para la detección en los dos modos (Berlioz-Barbier et al., 2014).

Además de la elección de las fases móviles más adecuadas para la determinación de los compuestos estudiados en esta tesis en modo negativo y positivo, en el caso de los compuestos APEOs, se debieron tener en cuenta las características de ionización particulares del ion precursor de estos compuestos. En condiciones de fase móvil generales, estos compuestos tienden a ionizarse formando aductos de sodio ya que tienen una alta afinidad por los iones de metales alcalinos, incluso en el ausencia de electrolito añadido a la fase móvil, como resultado de la ubicuidad de este metal en disolventes y muestras (Loyo-Rosales et al., 2003).

La adición por ejemplo de formiato de amonio en la fase móvil para formar el aducto de $[M+NH_4]^+$, más lábiles y, por tanto, más susceptibles a la fragmentación que los aductos $[M+Na]^+$, así como la optimización de los parámetros de detección, voltaje del cono y energías de colisión principalmente, ayudan a maximizar la abundancia de los fragmentos. Aunque, la falta de estabilidad de los aductos de amonio, en APEOs de cadena corta dan como resultado una ionización reducida, aumentando por tanto los LODs de estos compuestos (Lara-Martín et al., 2012).

Parámetros de cuantificación y validación

Existen una serie de parámetros a tener en cuenta para una correcta interpretación de los resultados obtenidos que determinaran su robustez y calidad. Para ello, y según el método de análisis aplicado, se deberán fijar una serie de condiciones y controles (Decisión de la Comisión 2002/657/CE).

La determinación y cuantificación por SRM que permiten los triples cuadrupolos dónde las masas monitorizadas y cuantificadas provienen de una fragmentación del ion precursor, permiten una buena sensibilidad y selectividad, aunque al estar trabajando con detectores de masa no exacta, pueden ocurrir falsos positivos, sobretodo en matrices complejas. Por ello, y para evitar estos falsos positivos, existen ciertas normas para interpretar y mejorar los resultados obtenidos, en el caso de esta tesis se fijaron las siguientes:

- 1) El tiempo de retención del compuesto en la matriz analizada debían encontrarse entre el 2.5% del tiempo correspondiente a un patrón analítico y del patrón marcado isotópicamente
- 2) Determinación de 2 transiciones por SRM de los compuestos de interés, para la cuantificación y confirmación. Generalmente la transición más abundante se usó para la cuantificación y la segunda transición para la confirmación. Para una confirmación positiva, la ratio de abundancias de las dos transiciones en las muestras analizadas debía ser equivalente a la proporción de áreas encontradas entre las mismas transiciones en una muestra patrón. Dependiendo de la relación de intensidad de las dos transiciones existen distintos grados de tolerancia permitidas para su aceptación siendo en general de entre el 20-30%, en nuestro caso se fijó al 20%.

3. Desarrollo de métodos analíticos

En condiciones ideales, mediante el pretratamiento de muestra y su posterior cuantificación por SRM, los efectos matriz deberían estar reducidos al máximo, pero a la práctica y a medida que las muestras a analizar son más complejas, añadiendo además la determinación de varios compuestos de características distintas como en el análisis multiresiduo, donde las condiciones de optimización deben llegar a un compromiso para los distintos grupos de compuestos, estos efectos pueden llegar a ser significativos (Benijts et al., 2004).

Existen ciertos mecanismos de corrección cuando los estos efectos no pueden ser del todo eliminados del método a optimizar, la adición estándar, la calibración con muestra externa, o bien la corrección con patrones internos, siendo este último el procedimiento seguido en nuestro caso. Al tratar-se de una detección por espectrometría de masas, los patrones internos más usados son los compuestos marcados isotópicamente (Stüber and Reemtsma, 2004).

Por último, hay que mencionar que los distintos parámetros optimizados durante la elaboración de estas metodologías que se presentaran a continuación fueron evaluados mediante el seguimiento de las señales proporcionadas por los distintos patrones comerciales de los compuestos analizados, así como con estudios de recuperación (muestras fortificadas), tanto para la comparativa de métodos, elección de las condiciones de análisis y para la validación de estos. Todos los resultados de los estudios de recuperaciones, efectos matriz evaluados y los parámetros/criterios de validación de los métodos se describen ampliamente en los artículos que se presentarán a continuación.

3.2 Determinación de EDCs en aguas mediante análisis online LC-MS/MS

Basado en la publicación científica 1:

Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry

Gorga M., Petrovic M., Barceló D.

Journal of Chromatography A (2013); 1295: 57-66

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.028>

Resumen

El presente estudio describe un método novedoso y totalmente automatizado, basado en la conmutación de columnas EQuan™, para una preconcentración de muestra integrada a una cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-LC-MS/MS). El método permite la identificación y cuantificación inequívoca de los compuestos disruptores endocrinos ambientales (EDCs) más relevantes y los compuestos sospechosos de ser EDCs, como los estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados, antimicrobianos, parabenos, bisfenol A, compuestos alquilfenólicos, benzotriazoles y organofosforados. retardantes de llama, en muestras de aguas superficiales de ríos y aguas residuales.

En la aplicación de esta técnica, se inyectaron las muestras de agua directamente en el sistema cromatográfico y los compuestos de interés se concentraron en la columna de carga. Posteriormente, los analitos se transfirieron a la columna analítica para su posterior detección por MS-MS (QqQ). También se realizó un estudio comparativo que empleó tres tipos de columnas, con diferentes modificaciones químicas, para determinar la columna óptima que permitiera la retención máxima y la elución posterior de los analitos.

Utilizando esta nueva tecnología, se obtuvo una metodología online rápida y fácil para el análisis de EDC en aguas de ríos superficiales y aguas residuales con bajos límites de cuantificación (LOQ). Los LOQ variaron de 0.008 a 1.54 ng/L para aguas de río superficial y de 0.178/0.364 a 12.5/25.0 ng/L para aguas residuales efluentes/afluentes (excepto para los monoetoxilados de alquilfenol). Además, empleando aproximadamente 1 h, se realizó un análisis completo que fue una mejora significativa en comparación con otros métodos reportados previamente. Este método se utilizó para estudiar la presencia y el destino de los compuestos de interés en el río Ebro, que es el río más importante de España, y cuyas actividades agrícolas e industriales intensivas, concentradas cerca de las principales ciudades de la cuenca, deterioran la calidad del suelo y el agua.

Introducción

Los EDCs son un grupo de sustancias exógenas que interfieren con el sistema endocrino e interrumpen la función fisiológica de las hormonas [1]. Estos compuestos pueden actuar en una dosis baja en una amplia variedad de organismos y producen trastornos del desarrollo, como problemas sexuales, feminización de los machos o efectos masculinos en las hembras e infertilidad [2]. Algunos de estos contaminantes, con diferentes estructuras y propiedades, se encuentran en una gran variedad de productos comúnmente utilizados en la vida diaria (detergentes, productos de cuidado personal como cosméticos, productos farmacéuticos y en diferentes formulaciones industriales). En consecuencia, se detectan en el medio ambiente acuático, siendo los efluentes de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y la escorrentía de las tierras agrícolas las fuentes principales para su introducción en el medio ambiente acuático [3-7]. La importancia de estos contaminantes radica en su estrogenicidad, especialmente los estrógenos naturales que han demostrado ejercer efectos estrogénicos en los peces a muy baja concentración en el agua (por debajo de ng/L) [8,9], convirtiéndose en los principales contribuyentes a la actividad endocrina disruptiva en aguas residuales y aguas superficiales [10] y, en consecuencia, con efectos dramáticos en los organismos acuáticos [11-15].

Los estrógenos naturales, como el estradiol (E2) y sus metabolitos principales, el estriol (E3) y la estrona (E1), se excretan del cuerpo humano a través de la orina como conjugados (básicamente sulfatos y glucoronidos), que son en gran medida biológicamente inactivos. Sin embargo, también se han detectado esteroides en el estado libre y desconjugado en los efluentes de aguas residuales [16], lo que implica que la desconjugación se produce antes y/o durante el tratamiento de aguas residuales [17-19].

Otro grupo importante de EDCs son los etoxilados de alquilfenol (APEOs) que se usan ampliamente en diversas aplicaciones industriales y de limpieza [20, 21]. Los etoxilados de nonilfenol (NPEOs) representan aproximadamente el 80% del total de APEOs que llegan las EDARs, donde se forman los productos de biotransformación, incluidos mono y di-etoxilados y carboxilados formados en entornos aeróbicos y alquilfenoles (APs), como el nonilfenol (NP) y el octilfenol (OP) formado en condiciones anaeróbicas [22]. Consecuentemente, resultando estos productos de transformación muy extendidos en el medio ambiente acuático [23,24], especialmente en aguas afectadas por las EDARs [25].

Debido a su actividad estrogénica, tanto los compuestos alquilfenólicos como los estrógenos se han incluido en diversas listas de observación de EDCs. Además, el NP y OP han sido enumerados como sustancias peligrosas prioritarias en el campo de la política del agua por la Directiva Marco del Agua de la Comunidad Europea 2000/60/CE y la decisión final de la Unión Europea No. 2455/2001/CE, mientras que se ha propuesto incluir el E2 y el etinilestradiol (EE2). sobre una lista revisada de sustancias prioritarias (propuesta COM (2011) 876).

Este estudio también incluye algunos EDCs bien conocidos como el bisfenol A (BPA), que se usa principalmente en la producción de plásticos de policarbonato y resinas epoxídicas, y otros productos

químicos con posibles propiedades disruptoras endocrinas, como parabenos, retardantes de llama organofosforados, los desinfectantes triclorocarbán (TCC) y triclosán (TCS), y agentes anticorrosivos como los benzotriazoles. Los parabenos se aplican ampliamente como conservantes (generalmente como mezclas) en una gran cantidad de productos, incluidos cosméticos y artículos de tocador como champús, productos para el cuidado de la piel y pastas dentales [26,27]. Los parabenos más comúnmente presentes en los productos de consumo son el metilparabeno (MeP) y propilparabeno (PrP). Aunque estos productos son fácilmente biodegradables en condiciones aeróbicas, sus altas cantidades de consumo y su introducción continua en el medio ambiente pueden conducir a una situación pseudopersistencia [28]. Compuestos organofosforados, tales como el tris(butoxietil) fosfato (TBEP), el tris(cloroisopropil) fosfato (TCCP) y el tris(2-cloroetil) fosfato (TCEP) que se usan en una gran variedad de productos de consumo como retardantes de llama y plastificantes, agentes antiespumantes y aditivos. Los anticorrosivos 1H-benzotriazol (BT), tóxico para los organismos acuáticos [21,29-31], y toliltriazol (TT), ampliamente utilizados en fluidos refrigerantes e hidráulicos, en productos anticongelantes, o en detergentes para lavavajillas. Finalmente, la lista de compuestos objeto incluye la cafeína como marcador de aguas residuales urbanas [32].

Existen varias metodologías analíticas ya disponibles en la literatura para la determinación de EDCs en aguas superficiales y aguas residuales [33-38]. La mayoría de estos métodos cubren solo uno o dos grupos de compuestos que contienen polaridades similares [39-42], estructuras similares [43-47], o actividades similares [48-50], [49]. Varios estudios proponen métodos multiresiduos para la determinación de una amplia gama de EDCs [51,24], sin embargo, generalmente utilizan múltiples métodos de extracción y/o sistemas de elución LC [52], lo que da como resultado métodos tediosos y que consumen mucho tiempo.

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un método robusto, rápido y de alto rendimiento para la determinación simultánea de todos los EDCs mencionados anteriormente y compuestos relacionados en ríos y aguas residuales utilizando la tecnología de inyección directa EQuan™. Específicamente, el objetivo ha sido optimizar los parámetros LC-LC-MS/MS, incluyendo la selección de la columna de preconcentración EQuan™, los tiempos de cambio de columna para la elución de la matriz, el tiempo de preconcentración de los analitos, entre otros.

Experimental

Materiales y patrones

Los patrones puros de E2, E1, E3, EE2, dietilestilbestrol (DES), estriol 3-sulfato (E3-3S), estradiol 17-glucurónido (E2-17G), estrona 3-glucurónido (E1-3G), estriol 16-glucurónido (E3-16G), TCS, MeP, etilparabeno (EtP), PrP, bencilparabeno (BeP), BPA-d₁₆, 4-tert-octilfenol (OP), OP-d₂, 4-tert-octilfenol-3,5 d₂-dietoxilado (OP₂EO-d₂), trifetil-d₁₅-fosfato, cafeína y cafeína C₁₃ se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). TCC, BeP, BPA y TT, TBEP, TCEP fueron suministrados por Aldrich (Milwaukee, WI, EE. UU.). 4-nonilfenol (NP), NP-d₈, octilfenol mono- y dicarboxilado (OP1EC y NP1EC), octilfenol mono- y dietoxilado (OP1EO y NP1EO), octil- y nonilfenol dietoxilado (OP2EO y NP2EO), NP1EO d₂ fueron adquiridos del Dr. Ehrenstorfer (Alemania). E2-d₅, E1-d₄, EE2-d₄, E1-3S-d₄, se

3. Desarrollo de métodos analíticos

obtuvieron de CDN Isotopes Pointe-Claire, Quebec, Canadá. BT, TCCP, etinylhdroxibenzoate C₁₃, BT en anillo d₄ se compraron enFluka (Buchs, Suiza).

Las soluciones madre individuales de los analitos se prepararon inicialmente a 1 mg/mL en metanol y posteriormente se diluyeron para obtener una concentración adecuada de analito. Se prepararon mezclas de patrones con las diversas clases de compuestos en metanol a diferentes concentraciones mediante la dilución apropiada de la solución madre individual.

Los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) (3 ml, 3 mg, HLB) se obtuvieron de Waters Corp. (Millford, MA). Todos los solventes (agua y metanol) fueron de calidad HPLC y se compraron en Merck (Darmstadt, Alemania), y el formiato de amonio y el ácido acético en Panreac (Barcelona, España). El nitrógeno para el secado del 99,995% de pureza fue de Air Liquide (España).

Muestras colectadas

Para aplicar nuestra nueva metodología analítica, tres matrices diferentes de muestras de agua, agua superficial y agua afluyente y efluente, fueron analizadas.

Se recolectaron un total de 22 muestras de agua de la cuenca del río Ebro (NE España) durante una campaña de muestreo en 2010. Las aguas superficiales correspondieron a puntos de muestreo con actividades agrícolas o industriales o cerca de grandes ciudades. También se analizaron los afluentes y efluentes de seis Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) principales de la cuenca.

Se tomaron las siguientes muestras: ARG, aguas abajo de la EDAR de Pamplona (WWTP1); NAJ, una importante área agrícola del vino, aguas arriba de la EDAR Logroño (WWTP2); EBR4, aguas abajo de WWTP2; EBR 5, aguas abajo de la EDAR de Tudela (WWTP3); GAL2 en el área agrícola y HUE, dentro de la ciudad de Zaragoza, que recibe los efluentes de varias áreas industriales, ambos puntos de muestreo aguas arriba de la EDAR de Zaragoza (WWTP4); EBR6 aguas debajo de WWTP4; SEG, aguas debajo de la EDAR de Lleida (WWTP5); EBR8 y EBR9, los últimos puntos antes de que el Ebro llegue al mar con arrozales, ambos aguas abajo de la EDAR de Tortosa (WWTP6), ver también **información adicional, anexo BI Figura BI.1, pág. 267**.

Se recogieron muestras de agua en botellas de vidrio ámbar y se transportaron al laboratorio en condiciones de frío (4°C). Tras la recepción, las muestras se filtraron a través de nylon de 0.45 µm y se almacenaron a 4°C.

Método analítico

El sistema Thermo Scientific EQuan™ para la preconcentración y análisis de muestras online se compuso de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (QqQ) con una fuente de ionización por “electrospray” (ESI), dos bombas cuaternarias LC (bomba L de Finnigan Surveyor) y dos columnas LC, la primera para la preconcentración de la muestra y la segunda para la separación analítica. Una válvula de 6 puertos fue programada por el sistema software para controlar la carga y elución de las 2 columnas

LC. El sistema esquemático EQuan™ se ha mostrado en el apartado 3.1, Figura 3.1, pág.71. Una columna Hypersil GOLD™ Aqua (20×2.1 mm, 12 μm) de Thermo Scientific, y una columna de fase inversa C₁₈ Purospher STAR RP-18 (125×2 mm, 5 μm) de Merck, fueron utilizadas como columnas de preconcentración y analítica, respectivamente.

Condiciones LC-LC

Las condiciones LC–LC, en muestras de agua, para la preconcentración y posterior separación de los compuestos de interés en la columna analítica se muestran en la **Tabla 3.1**. El volumen de inyección se ajustó a 5 mL en el caso del agua de río superficial y 2 mL para aguas residuales. La velocidad de flujo a través de la columna de carga fue de 1.75 mL/min durante la etapa de carga. En la etapa de transferencia, su velocidad de flujo bajó a 0.2 mL/min, la columna de preconcentración se limpió y acondicionó a una velocidad de flujo comprendida entre 0.5 y 1.0 mL/min, mientras que durante todo el tiempo de análisis la velocidad de flujo de la columna de elución fue de 0.3 mL/min.

Muestras de 100 mL fueron fortificadas con 100 μl de una solución de patrones internos de 250 μg/L y las muestras de agua se inyectaron directamente en el sistema cromatográfico y los compuestos de interés se concentraron en la columna de carga mediante una corriente de fase móvil (acuosa: solvente orgánico (98:2, v/v)). Posteriormente, la válvula de conmutación de seis puertos se activó y los analitos se transfirieron de la columna de preconcentración a la columna analítica utilizando las mismas fases móviles que el paso anterior a través de ambas columnas. Al finalizar la transferencia, la válvula de conmutación fue activada y los analitos se separaron de manera convencional. Simultáneamente, la columna de preconcentración se enjuagó y acondicionó. Todos los pasos se realizaron automáticamente.

La separación cromatográfica de los compuestos detectados en condiciones de NI se realizó en condiciones de elución en gradiente usando agua (A) y metanol (B). Las condiciones iniciales fueron 50% de B, luego el gradiente se incrementó linealmente a 70% de B en 2 minutos, aumentó a 100% de B en 6 minutos y se mantuvo isocrático durante 6 minutos. Los compuestos detectados en condiciones de PI se separaron usando el mismo programa de gradiente usando un sistema disolvente que contenía agua-metanol en ambas fases con 20 mM de formiato de amonio y 0.1% de ácido acético.

Detección por espectrometría de masas

La detección se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas TSQ Vantatge, equipado con una interfaz ESI turbo “spray”. Los parámetros operativos fueron los siguientes para ionización negativa y positiva (NI/PI) respectivamente: voltaje de “spray” 2500/3000 V, presión del “sheath gas” 40/40 (N₂), presión de gas auxiliar 20/20 (N₂), presión del gas “ion sweep” 0.5/0.5 (N₂) y temperatura del “transfer tube” 270/300 °C. Los iones precursores y iones producto de los compuestos de interés individuales se obtuvieron mediante ajuste después de la inyección directa de 1 ppm. Los parámetros MS/MS optimizados para el análisis SRM de los analitos se detallan en la **Tabla 3.2**, ver también **información adicional, anexo BI Tabla BI.1, pág. 267**.

3. Desarrollo de métodos analíticos

Los estrógenos y conjugados naturales y sintéticos, desinfectantes/antimicrobianos, conservantes, BPA y los compuestos alquilfenólicos (OP, NP, OP1EC y NP1EC) se detectaron en condiciones de NI como $[M-H]^-$. Los iones utilizados para el análisis de anticorrosivos, compuestos organofosforados y cafeína, en modo PI fueron los correspondientes a $[M+H]^+$, mientras que para los compuestos alquilfenólicos (OP1EO, OP2EO, NP1EO y NP2EO) se analizó el ion precursor del aducto $[M+NH_3]^+$.

Preparación y detección de muestras offline

Para comparar los rendimientos del método LC-LC y la metodología convencional de preconcentración SPE, utilizada ampliamente para el análisis de compuestos estudiados en muestras de agua, se aplicó una preparación de muestra offline [53].

La preconcentración de la muestra de agua se realizó mediante SPE utilizando cartuchos HLB (3 mL, 3 mg). Se tomaron diferentes volúmenes según el tipo de muestra: 500 ml para agua de río superficial, 200 mL y 100 mL para aguas residuales efluentes y afluentes, respectivamente. Las muestras fueron enriquecidas con 100 μ L de una solución de 250 μ g/L de patrones internos.

Los cartuchos SPE se acondicionaron posteriormente (a un caudal de 1 mL/min) con 5 mL de metanol seguido de 5 mL de agua. Los cartuchos se eluyeron, al mismo caudal, con 2x5 ml de metanol y los eluyentes se evaporaron con una corriente suave de nitrógeno y se reconstituyeron a un volumen final de 1 mL con metanol. Se aplicó el mismo análisis LC-MS/MS descrito anteriormente, el volumen inyectado fue de 10 μ L. Ver **Tabla 3.2**, ver también **información adicional, anexo BI Tabla BI.2, pág. 268**.

Tabla 3.1 Condiciones LC-LC

Bomba 1: Bomba de carga						Bomba 2: Bomba de elución					
Volumen inyección: Agua superficial de río: 5 mL											
Agua de efluente 2 mL											
Agua de afluente: 2 mL											
Columna de preconcentración: Hypersil GOLD aQ (20x2.1mm, 12µm)						Columna Analítica: Purospher STAR RP-18 (125x2 mm, 5µm)					
Solvente A: NI: Agua						Solvente A: NI: Agua					
PI: Agua (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)						PI: Agua (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)					
Solvente B: NI: Metanol						Solvente B: NI: Metanol					
PI: Metanol (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)						PI: Metanol (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)					
Posición válvula	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Gradiente	A%	B%	Descripción	Flujo (mL/min)	Gradiente	A%	B%	Descripción
Carga	0:00	1.75	Isocrático	98	2	Carga de muestra columna EQuan™	0.3	Isocrático	50	50	Acondicionamiento columna analítica
Carga	3:25 ^a	1.75	Rampa	98	2	Carga de muestra columna EQuan™	0.3	Isocrático	50	50	Acondicionamiento columna analítica
Inyección	3:50	0.2	Rampa	50	50	Transferencia de analitos columna analítica	0.3	Rampa	50	50	Transferencia de analitos columna analítica
Carga	5:50	1	Rampa	50	50	Lavado columna EQuan™	0.3	Rampa	30	70	Separación LC
Carga	11:50	1	Rampa	-	100	Lavado columna EQuan™	0.3	Rampa	-	100	Separación LC
Carga	17:50	0.5	Rampa	50	50	Lavado columna EQuan™	0.3	Rampa	-	100	Lavado columna analítica
Carga	22:50	0.5	Rampa	98	2	Lavado columna EQuan™	0.3	Rampa	50	50	Acondicionamiento columna analítica
Carga	24:50	1	Isocrático	98	2	Lavado columna EQuan™	0.3	Rampa	50	50	Acondicionamiento columna analítica

PI, Ionización Positiva; NI, Ionización Negativa

^aPara el agua de afluente y efluente, este tiempo se redujo a 1:25 (para adaptar-lo con el circuito de carga de la muestra porque el volumen de inyección fue de 2 ml), en consecuencia, el tiempo total también se redujo

3. Desarrollo de métodos analíticos

Tabla 3.2 Parámetros optimizados MS/MS para el análisis SRM

Abreviación	Nombre	Patrón interno ^a	Ion precursor (m/z)	SLens (Hz)	SRM1(m/z)	Energía colisión (eV)	SRM2 (m/z)	Energía colisión (eV)
Ionización negativa								
<u>Estrógenos naturales y sintéticos y conjugados</u>								
E2	Estradiol	Estradiol d ₅	271	148	145	43	183	42
E1	Estrona	Estrona d ₄	269	120	145	38	143	54
E3	Estriol	Estrona d ₄	287	144	171	41	145	40
EE2	Etinilestradiol	Etinilestradiol d ₄	295	126	145	41	159	33
DES	Dietilestilbestrol	Estrona d ₄	267	108	237	26	251	29
E1-3S	Estrona 3-sulfato	Estrona d ₄ sulfato	349	132	269	32	145	58
E3-3S	Estriol 3-sulfato	Estrona d ₄ sulfato	367	138	287	33	171	53
E2-17G	Estradiol 17-glucurónido	Estrona d ₄ sulfato	447	129	271	32	325	27
E1-3G	Estrona 3-glucurónido	Estrona d ₄ sulfato	445	137	113	21	269	39
E3-16G	Estriol 16-glucurónido	Estrona d ₄ sulfato	463	179	287	32	113	30
<u>Desinfectantes/Antimicrobianos</u>								
TCC	Triclocarbán	EtinilhidroxibenzoatoC ₁₃	313	88	160	17	126	26
TCS	Triclosán	EtinilhidroxibenzoatoC ₁₃	287	73	35	34	37	34
<u>Conservantes</u>								
MeP	Metilparabeno	EtinilhidroxibenzoatoC ₁₃	151	70	92	23	136	16
EtP	Etilparabeno	EtinilhidroxibenzoatoC ₁₃	165	78	92	24	137	16
PrP	Propilparabeno	EtinilhidroxibenzoatoC ₁₃	179	87	92	24	136	17
BeP	Bencilparabeno	EtinilhidroxibenzoatoC ₁₃	227	88	92	25	136	16
<u>Plastificante</u>								
BPA	Bisfenol A	Bisfenol A d ₁₆	227	125	212	21	133	27
<u>Compuestos alquilfenólicos</u>								
OP	Octilfenol	Octilfenol d ₂	205	109	133	30	134	20
NP	Nonilfenol	Nonilfenol d ₈	219	105	133	28	147	29
OP1EC	Monocarboxilado de octilfenol	Monocarboxilado de nonilfenol d ₂	263	82	205	20	106	31
NP1EC	Monocarboxilado de nonilfenol	Monocarboxilado de nonilfenol d ₂	277	72	133	45	219	21
Ionización positiva								
OP1EO	Monoetoxilado de octilfenol	Monoetoxilado de nonilfenol d ₂	268	52	113	10	57	7
NP1EO	Monoetoxilado de nonilfenol	Monoetoxilado de nonilfenol d ₂	282	56	127	10	71	12
OP2EO	Dietoxilado de octilfenol	Dietoxilado de octilfenol d ₂	312	68	183	6	121	20
NP2EO	Dietoxilado de nonilfenol	Dietoxilado de octilfenol d ₂	326	81	183	6	121	16
<u>Anticorrosivos</u>								
BT	1H-Benzotriazol	1H-Benzotriazole d ₄	120	76	65	21	92	15
TT	Toliltriazol	1H-Benzotriazole d ₄	134	78	77	24	79	17
<u>Compuestos organofosforados</u>								
TBEP	Tris(butoxietil) fosfato	Trifenil-d ₁₅ -fosfato	399	121	299	10	199	13
TCCP	Tris(cloroisopropil) fosfato	Trifenil-d ₁₅ -fosfato	327	87	99	26	81	55
TCEP	Tris(2-cloroetil) fosfato	Trifenil-d ₁₅ -fosfato	287	89	99	23	225	12
<u>Biomarcador químico</u>								
Caff	Cafeína	Cafeína C ₁₃	195	73	138	17	110	20

SRM: "Selected Reaction Monitoring"

^a Patrón interno aplicado para la identificación y cuantificación de cada analito

Resultados y discusión

Optimización de las condiciones LC-LC. Separación LC y detección MS

Como primer paso de este estudio, se optimizó el flujo de carga, probando flujos entre 1 y 3 mL/min y calculando el tiempo requerido para evacuar el "loop" de inyección de muestra (2-5 mL). También se probó el tiempo de carga, considerando el flujo de carga y el volumen de muestra inyectada. Un punto crítico fue el tiempo de transferencia, cuando ambas columnas estaban conectadas. El tiempo de transferencia tuvo que reducirse al máximo para obtener las condiciones óptimas donde los compuestos ya habían sido transferidos a la columna analítica y la matriz de muestra permanecía en la columna de preconcentración. El porcentaje de solvente orgánico soportado por la columna EQuan™ sin la elución de los compuestos de interés fue muy bajo, del 5%, lo que impidió un posible paso de limpieza con un mayor porcentaje de fases móviles orgánicas que proporcionara mayores concentraciones de impurezas eliminadas.

Como último paso de la optimización, se realizó un estudio comparativo donde se emplearon tres tipos de columnas Hypersil GOLD™ 20×2.1 mm, tamaño de partícula de 12 µm, de Thermo Scientific, con diferentes modificaciones químicas, con el objetivo de seleccionar la columna óptima que permitiera la máxima retención y posterior elución de los analitos: una Hypersil GOLD™ Aqua, especialmente indicada para retener analitos inyectados con un alto porcentaje de solución acuosa; una PEP Hypersil GOLD™, para la retención de analitos polares y no polares; y una Hypersil GOLD™ PFP, con una modificación que resuelve mezclas de compuestos halogenados y compuestos aromáticos polares no halogenados. La **Tabla 3.3** muestra una comparación de las recuperaciones (%) obtenidas con estos tres tipos de columnas.

La separación cromatográfica y la forma del pico obtenida usando el sistema LC-LC fueron comparables a las obtenidas por análisis LC directo, con una elución de gradiente de 25 minutos, confirmando la eficiencia de la transferencia de analito.

Los compuestos detectados en condiciones de PI exhibieron una respuesta de MS reducida cuando se usó una mezcla de agua y metanol como disolventes de elución. Se obtuvo una intensidad de señal significativamente mayor usando ácido fórmico como modificador. Además, para los APEOs, era necesario un segundo modificador en los sistemas cromatográficos, bomba de carga y elución, para la formación de un aducto de amonio requerido para la detección por MS-MS.

3. Desarrollo de métodos analíticos

Tabla 3.3 Estudio comparativo empleando tres tipos de columnas EQuan™ correspondiente a la Tabla 3 de la publicación científica 188

Compuesto	Hypersil GOLD™ Aqua		Hypersil GOLD™ PFP		Hypersil GOLD™ PEP	
	Recuperación (%)	% RSD n=3	Recuperación (%)	% RSD n=3	Recuperación (%)	% RSD n=3
E2	61	11	66	11	41	14
E1	71	4	64	7	43	9
E3	101	5	102	4	62	3
EE2	73	15	57	11	51	3
DES	59	9	59	9	39	5
E1-3S	95	4	85	5	73	8
E3-3S	25	6	39	10	105	7
E2-17G	74	12	71	12	60	8
E1-3G	62	8	85	4	76	7
E3-16G	55	16	80	11	110	9
TCS	80	5	46	1	14	8
TCC	54	8	53	4	19	4
MeP	67	10	24	9	65	27
EtP	84	5	60	2	56	9
PrP	78	1	56	4	44	1
BeP	57	4	45	4	23	13
BPA	99	7	75	6	65	7
OP	88	2	83	7	50	3
NP	73	12	57	8	49	6
OP1EC	54	5	51	3	40	2
NP1EC	79	1	59	3	46	1
OP1EO ^a	28	6	9	7	4	7
NP1EO ^a	58	8	23	6	64	8
OP2EO	47	5	62	7	44	4
NP2EO	32	6	63	12	38	1
BT	89	10	54	11	102	9
TT	65	8	47	8	95	7
TBEP	62	7	32	7	32	7
TCPP	54	5	36	12	39	3
TCEP	47	5	40	7	45	8
Caff	80	10	60	10	10	9

RSD: Desviación Estándar Relativa

Validación del método analítico

Para evaluar esta nueva metodología, se realizó un estudio de validación. Se añadieron 100 mL de diferentes matrices de agua: aguas superficiales de ríos y aguas residuales con una mezcla de los compuestos de interés a concentraciones finales de 2.5, 25 y 250 ng/L, a excepción de los compuestos alquilfenólicos OP1EO y NP1EO donde la concentración final fue de 1 µg/L debido a su mayor LOD/LOQ. Se evaluaron las recuperaciones, LOD y LOQ utilizando las muestras enriquecidas.

Los LOD y LOQ de los compuestos de interés en el agua superficial y el agua afluyente y efluente se calcularon mediante una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente (la relación entre la intensidad de la señal de cada compuesto obtenida en condiciones SRM y la intensidad del ruido en una muestra enriquecida). El nivel de la muestra enriquecida seleccionada para la determinación de LODs y LOQs se eligió en función de la concentración de la muestra enriquecida más cercana a estos límites.

Las recuperaciones relativas se calcularon comparando las áreas de pico obtenidas por LC-MS/MS y LC-LC-MS/MS respectivamente. Para todas las matrices, se analizaron blancos por triplicado. En la **Tabla 3.4** se muestra un resumen de la garantía de calidad y los datos de control de calidad, donde se calcularon las recuperaciones relativas para diferentes matrices de agua con las muestras fortificadas a 250 ng/L, excepto los compuestos alquilfenólicos OP1EO y NP1EO donde la concentración final fue de 1 µg/L, mientras que los datos para otros dos niveles de concentración (2.5 y 25 ng/L) se muestran en la **información adicional, anexo BI Tabla BI.3, pág. 268**.

Los criterios de identificación y confirmación de los analitos seleccionados se basaron en las siguientes restricciones: (1) el tiempo de retención para todas las transiciones monitoreadas para un analito dado debía ser de $\pm 1s$, con una relación señal-ruido ≥ 3 para cada uno; y (2) la relación entre las dos transiciones monitoreadas debía estar dentro del 15% del valor teórico (calcula sobre patrones). La cuantificación se realizó agregando compuestos isotópicos de las diferentes familias analizadas como patrones internos.

Los parámetros instrumentales presentaron buena linealidad en el rango de concentración estudiado (2.5–3000 ng/L) para todos los compuestos, con coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0.990 en todos los casos. El estudio “intraday” mostró valores inferiores al 6.00%, excepto para E3-3S (12.3%), E1-3G (10.9%), OP1EO (9.06%) y NP1EO (9.06%). El estudio “interday” también mostró resultados aceptables (por debajo del 14.0%, excepto para los mismos compuestos mencionados anteriormente). Además, se obtuvieron límites de detección y cuantificación (LODs y LOQs) instrumentales sensibles, entre (0.0111–2.01 pg y 0.0369–6.68 pg), a excepción de los compuestos alquilfenólicos OP1EO y NP1EO. Los valores más altos para los compuestos alquilfenólicos con LOQ de 267 y 990 pg respectivamente, se debieron a la detección MS, porque estas moléculas tienen una menor afinidad para formar aducto de amonio, que proporcionaba una buena fragmentación en el sistema de MS, en lugar de aductos de sodio apenas fragmentables.

Los LODs obtenidos para estrógenos y conjugados naturales y sintéticos variaron entre 0.0038–0.46 ng/L, 0.14–3.8 ng/L y 0.14–7.5 ng/L para aguas de ríos superficiales, aguas residuales de efluentes y afluentes, respectivamente. En el caso de los desinfectantes y conservantes, se obtuvieron LODs de 0.021–0.27 ng/L, 0.12–2.0 ng/L y 0.18–7.5 ng / L, respectivamente. El BPA mostró límites de 0.11, 0.69 y 1.4 ng/L. Para los compuestos alquilfenólicos (con excepción de OP1EO y NP1EO) se calcularon LODs de 0.011–0.14 ng/L, 0.078–1.6 ng/L y 0.11–2.9 ng/L, respectivamente. Los compuestos pertenecientes a las familias de anticorrosivos y compuestos organofosforados, los LODs oscilaron entre 0.0024–0.072 ng/L, 0.053–0.16 ng/L y 0.082–0.55 ng/L, respectivamente para aguas superficiales de río, aguas residuales de efluentes y afluentes. Para el biomarcador químico, Caff, se obtuvieron LODs de 0.021 ng/L, 0.18 ng/L y 0.23 ng/L en las mismas matrices.

Tabla 3.4 Parámetros de validación del método integrado LC-LC-MS/MS usando una columna EQuan™ Hypersil GOLDTM 20×2.1 mm, 12µm

Compuestos	Parámetros instrumentales					Agua superficial de río		Agua de efluente		Agua de afluente	
	r ²	LOD (pg)	LOQ (pg)	Repetitividad (% RSD, n=6)	Reproducibilidad (% RSD, n=6)	Recuperación relativa (% RSD n=6)	LOD/LOQ (ng/L)	Recuperación relativa (% RSD n=6)	LOD/LOQ (ng/L)	Recuperación relativa (% RSD n=6)	LOD/LOQ (ng/L)
E2	0.995	0.17	0.56	5.5	8.9	94 (5.2)	0.037/0.12	75 (7.2)	0.59/1.9	58 (15)	5.4/18
E1	0.998	0.23	0.77	3.3	8.5	98 (3.1)	0.050/0.17	110 (2.8)	0.14/0.45	100 (2.8)	0.14/0.47
E3	0.992	0.78	2.6	3.6	8.1	65 (13)	0.17/0.56	51 (4.5)	2.3/7.8	58 (3.7)	3.1/10
EE2	0.996	0.06	2.1	7.3	14	104 (5.0)	0.14/0.47	85 (2.2)	3.8/12	99 (12)	4.2/14
DES	0.991	0.21	0.68	5.5	12	54 (5.6)	0.043/0.14	56 (2.4)	1.2/4.0	100 (7.1)	2.7/8.9
E1-3S	0.996	0.017	0.058	5.1	9.1	103 (9.4)	0.0038/0.013	79 (11)	0.21/0.71	59 (9.9)	0.35/1.2
E3-3S	0.997	0.14	0.45	12	21	96 (19)	0.030/0.010	53 (20)	0.75/2.5	57 (13)	0.99/3.3
E2-17G	0.991	2.0	6.7	4.0	14	128 (15)	0.46/1.5	52 (14)	2.9/9.6	52 (19)	4.2/14
E1-3G	0.991	0.24	0.80	11	14	111 (16)	0.056/0.18	81 (11)	0.96/3.2	49 (9.5)	3.1/10
E3-16G	0.996	0.29	0.97	4.0	6.7	100 (13)	0.059/0.19	73 (10)	2.0/6.6	66 (16)	7.5/25
TCS	0.993	0.73	2.5	4.8	11	62 (11)	0.17/0.58	105 (6.1)	1.5/5.0	88 (17)	2.1/6.9
TCC	0.992	0.16	0.52	4.6	10	74 (7.8)	0.036/0.12	82 (6.5)	0.14/0.47	59 (4.0)	0.18/0.61
MeP	0.993	0.86	2.9	5.2	7.7	72 (5.6)	0.20/0.68	59 (7.2)	0.59/1.9	77 (10)	1.5/5.0
EtP	0.994	1.3	4.4	1.9	8.1	116 (1.8)	0.27/0.89	112 (9.0)	1.2/4.0	92 (5.2)	1.4/4.8
PrP	0.998	0.10	0.34	2.4	4.5	100 (2.2)	0.021/0.069	126 (3.9)	0.35/1.2	125 (5.5)	0.94/3.1
BeP	0.994	0.14	0.48	1.8	7.3	95 (3.5)	0.031/0.10	103 (6.5)	0.12/1.1	119 (4.7)	1.0/3.5
BPA	0.991	0.50	1.7	8.3	10	95 (3.8)	0.11/0.39	110 (19)	0.69/2.3	112 (7.6)	1.4/4.6
OP	0.995	0.63	2.1	4.9	9.2	93 (8.6)	0.14/0.46	104 (2.6)	1.6/5.4	96.1 (7.9)	2.9/9.6
NP	0.991	0.06	0.21	5.1	8.8	70 (5.2)	0.013/0.043	64 (6.4)	0.30/1.0	74 (14)	0.71/2.4
OP1EC	0.990	0.31	1.1	5.1	9.9	101 (8.3)	0.065/0.22	52 (1.6)	0.64/2.1	68 (5.2)	0.87/2.9
NP1EC	0.994	0.17	0.56	4.1	7.5	103 (5.5)	0.034/0.12	110 (6.7)	0.078/0.26	64 (3.5)	0.11/0.36
OP1EO ^a	0.990	80	267	9.1	14	82 (8.7)	17/56	65 (7.5)	20/68	44 (10)	33/109
NP1EO ^a	0.993	297	990	8.5	12	75 (16)	62/208	76 (8.5)	125/417	67 (12)	187/625
OP2EO	0.998	0.049	0.16	2.3	5.3	106 (2.5)	0.011/0.035	83 (15)	0.092/0.30	83 (16)	0.20/0.67
NP2EO	0.998	0.062	0.21	2.0	4.4	107 (23)	0.013/0.044	105 (13)	0.11/0.37	95 (14)	0.12/0.42
BT	0.991	0.34	1.1	5.5	9.6	86 (5.3)	0.072/0.24	76 (6.7)	0.16/0.52	82 (7.6)	0.54/1.8
TT	0.998	0.062	0.21	4.4	7.9	78 (9.8)	0.013/0.044	85 (3.6)	0.10/0.34	67 (11)	0.21/0.69
TBEP	0.998	0.011	0.037	2.4	6.5	87 (3.4)	0.0024/0.0079	101 (5.1)	0.053/0.18	99 (5.2)	0.082/0.28
TCPP	0.993	0.013	0.044	3.9	7.4	95 (5.3)	0.0025/0.0084	106 (12)	0.063/0.21	137 (11)	0.55/1.8
TCEP	0.994	0.15	0.51	2.0	6.7	90 (12)	0.034/0.11	65 (4.8)	0.098/0.33	65 (8.9)	0.36/1.2
Caff	0.991	0.10	0.34	4.3	8.3	115 (4.9)	0.021/0.071	76 (7.3)	0.18/0.50	135 (12)	0.23/0.78

RSD: Desviación Estándar Relativa

^a La concentración de muestra fortificada fue de 1µg/L

Comparación de métodos online/offline

Comparación de las recuperaciones online/offline

Se desarrolló una nueva metodología online para la determinación de EDCs en muestras de agua con el fin de mejorar la metodología clásica offline de SPE, minimizando los efectos de la matriz y, en consecuencia, reduciendo los LODs, el tiempo total de análisis también se redujo. Al aplicar esta metodología de preconcentración online, no se requirió una manipulación significativa de la muestra y el tiempo de análisis fue de 25 min en lugar de 6 h como es el caso de la metodología offline SPE convencional seguida del análisis LC-MS-MS.

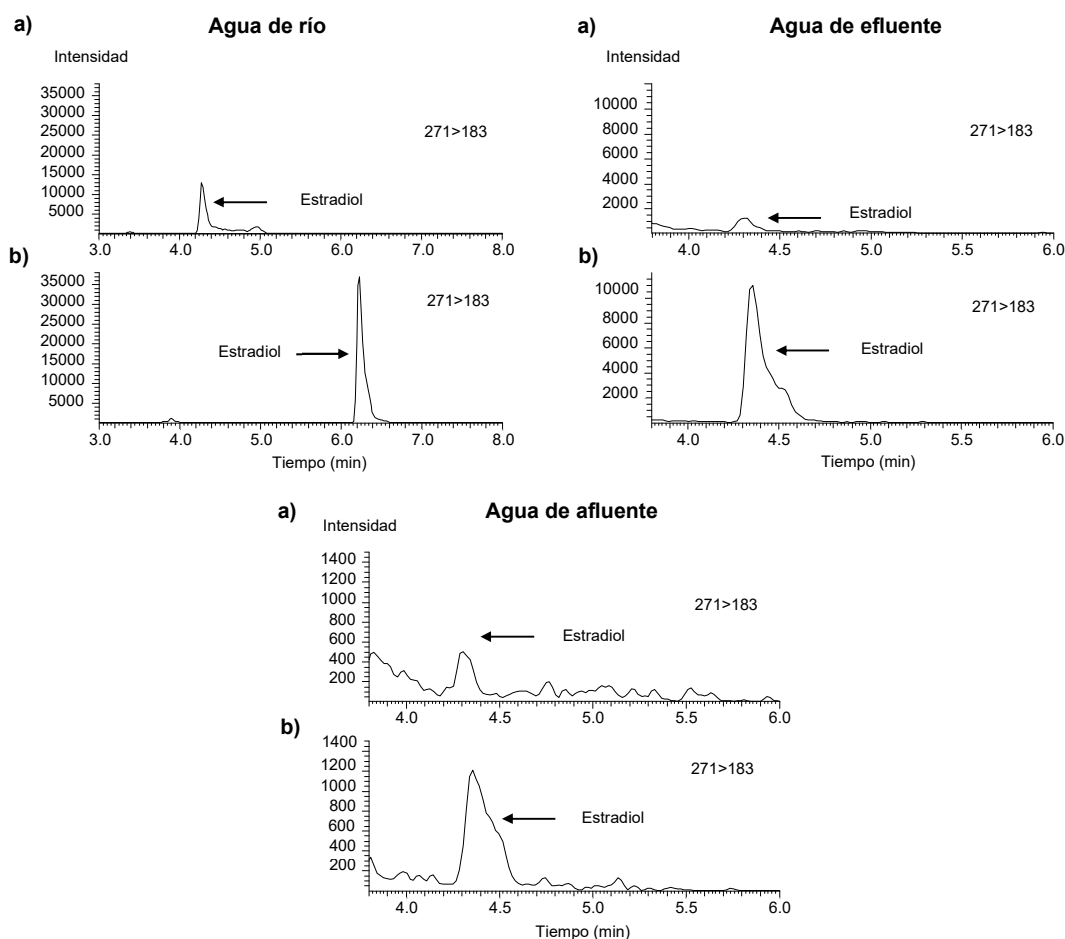
Las recuperaciones offline se evaluaron con muestras de agua fortificadas (500 mL para aguas superficiales de río, 200 mL y 100 mL para aguas residuales de efluentes y afluentes, respectivamente) con una mezcla de compuestos a concentraciones finales de 250 ng/L, a excepción de compuestos alquilfenólicos OP1EO y NP1EO donde la concentración final fue de 1 µg/L. Estas recuperaciones se compararon con las obtenidas por análisis online de las muestras enriquecidas al mismo nivel de concentración de 250 ng/L. Los resultados mostraron que, en general, la metodología online era capaz de mejorar las recuperaciones de todos los compuestos de interés analizados ver **información adicional, anexo BI Tabla BI.4, pág.269**, para ver los resultados obtenidos con el método offline. Por ejemplo, en el caso de los estrógenos y conjugados naturales y sintéticos, las recuperaciones online oscilaron entre el 54-104%, 51-110% y 49-100% para aguas de ríos superficiales, aguas residuales de efluentes y afluentes, respectivamente, siendo generalmente más altas que aplicando la metodología "offline". En el caso de los compuestos alquilfenólicos, la tecnología EQuan™ obtuvo una mejora significativa en las recuperaciones. Por ejemplo, para el OP se obtuvieron recuperaciones aproximadamente del 90–100% con el método online frente al 20–40% con obtenido con el SPE offline.

Comparación de efectos de matriz online/offline

La supresión de la señal del analito, causada por una alta concentración de componentes de la matriz, es uno de los problemas a resolver al analizar los EDCs por MS/MS. Solutos no volátiles, sales inorgánicas como sulfatos y fosfatos causan la mayor supresión por ionización [54], pero el efecto también es aplicable a cualquier compuesto volátil, incluido el analito coeluyente.

Los resultados mostraron que la metodología de preconcentración online permitió mejorar la eficiencia en términos de minimizar los efectos de la matriz, en comparación con la técnica offline. Los cromatogramas iónicos reconstruidos de detección MS/MS correspondientes a [M-H]⁻ de estradiol en condiciones offline SPE-LC-MS/MS, online LC-LC-MS/MS se muestran en la **Figura 3.3**. La intensidad de la señal del estradiol se redujo en un 66%, 89% y 60% para aguas superficiales de ríos, aguas residuales de efluentes afluentes, respectivamente, aplicando la metodología convencional offline de preconcentración SPE. Particularmente en las aguas residuales de afluentes, la aplicación de la preconcentración SPE offline evidenció la aparición de interferencias importantes, coeluciones y supresión.

3. Desarrollo de métodos analíticos



Las diferencias en los tiempos de retención entre cromatogramas pueden explicarse debido a las diferentes metodologías de LC aplicadas

Figura 3.3 Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS (271>183) correspondientes a $[M-H]^-$ de estradiol obtenido en condiciones de NI de muestras enriquecidas a una concentración de nivel de 250 ng/L. (a) offline SPE-LC-MS/MS; (b) online LC-LC-MS/MS

Análisis de muestras de río y de aguas residuales

Como parte del procedimiento de validación, el método desarrollado se aplicó al análisis de los compuestos de interés en 22 muestras de agua (10 aguas de ríos superficiales y 12 aguas residuales de 6 EDARs (afluentes/efluentes) recolectadas en la cuenca del río Ebro durante una campaña de muestreo. en 2010, como se muestra en la **Tabla 3.5**, ver también **información adicional, anexo B1 Figura B.1, pág. 267**. La mayoría de los compuestos se detectaron tanto en las aguas residuales como en las aguas de los ríos, a concentraciones que variaron entre pocos ng/L en el caso de hormonas, triclosán y parabenos, hasta los varios cientos de ng/L en agua de río llegando a niveles de $\mu\text{g/L}$ en afluentes de EDARs en el caso de compuestos alquilfenólicos, compuestos organofosforados y benzotrizoles. En general, se observó una eliminación satisfactoria en la EDARs con la excepción de algunos compuestos, como NP₁EC, que se encuentra en concentraciones más altas en las aguas efluentes que en los afluentes debido a su formación como producto intermedio en la transformación de los NPEOs de cadena larga durante los tratamientos de las EDARs. En general, el desarrollo de la metodología se aplicó con éxito y, por lo tanto, confirmó la importancia de desarrollar metodologías rápidas y eficientes para detectar EDCs y compuestos relacionados a niveles bajos en matrices de ríos y aguas residuales.

3. Desarrollo de métodos analíticos

Tabla 3.5 Concentraciones encontradas en ng/L de los compuestos analizados en agua superficial de río (A) y en aguas residuales (B) en la cuenca del Ebro durante la campaña de 2010

A)	E2	E1	E3	E1-3S	E3-3S	E1-3G	E3-16G	TCS	MeP	EtP	PrP	BeP
ARG	1.9	4.6	nd	1.0	nd	nd	nd	0.4	12	13	15	0.31
NAJ	nd	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	2.0	4.0	2.6	7.8	1.1
EBR4	1.7	1.4	nd	nd	nd	nd	nd	0.3	3.0	nd	0.5	0.16
EBR5	1.1	0.6	nd	nd	nd	nd	2.04	nd	9.7	3.7	0.8	0.33
GAL2	1.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	27	4.9	1.7	nd
HUE	nd	4.9	4.81	nd	nd	nd	nd	nd	1.4	1.7	1.0	0.61
EBR6	1.4	0.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.7	nd	2.0	nd
SEG	1.4	0.8	nd	nd	nd	nd	3.08	nd	6.1	2.1	0.68	nd
EBR8	1.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.4	nd	1.4	nd
EBR9	0.9	0.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4.8	nd	1.3	nd

B)	E2	E1	E3	E1-3S	E3-3S	E1-3G	E3-16G	TCS	MeP	EtP	PrP	BeP
WWTP1 In	23	24	nd	18	nd	nd	nd	22	25	204	19	nd
WWTP1 Out	5.0	15	nd	2.6	nd	nd	nd	5.9	nd	6.0	24	1.4
WWTP2 In	nd	8.4	nd	26	nd	19	nd	72	157	814	913	nd
WWTP2 Out	2.9	0.5	nd	3.5	nd	nd	nd	15	40	4.5	15	1.3
WWTP3 In	nd	nd	nd	12	7.8	nd	nd	nd	34	160	16	nd
WWTP3 Out	6.6	20	nd	8.5	5.8	nd	nd	nd	13	nd	nd	nd
WWTP4 In	nd	14	nd	8.6	17	nd	nd	26	93	51	41	nd
WWTP4 Out	4.5	1.3	nd	1.5	8.5	nd	nd	nd	13	6.8	10	1.7
WWTP5 In	nd	11.4	nd	nd	nd	nd	nd	10	9.0	14	20	nd
WWTP5 Out	5.1	4.2	nd	1.0	nd	nd	nd	16	26	nd	2.7	nd
WWTP6 In	24	39	nd	15	nd	nd	nd	8.4	40	70	54	nd
WWTP6 Out	4.3	1.2	nd	0.8	6.3	nd	nd	9.8	17	nd	5.4	nd

A)	BPA	OP	NP	NP1EC	OP2EO	NP2EO	BT	TT	TBEP	TCCP	TCEP	Caff
ARG	61	4.4	nd	575	1.7	17	275	568	54	210	44	151
NAJ	28	2.9	2.1	86	2.2	13	18	49	21	27	3.5	54
EBR4	12	5.3	6.5	105	2.6	12	121	182	49	229	12	60
EBR5	10	4.1	3.2	54	2.7	13	76	346	37	56	10	95
GAL2	28	4.4	21	16	8.3	275	38	29	146	255	39	43
HUE	29	3.4	12	420	4.0	55	126	308	95	122	58	419
EBR6	19	4.1	nd	66	2.5	12	55	146	100	74	9.4	152
SEG	5.7	3.1	15	72	2.4	13	63	132	80	43	10	357
EBR8	nd	3.7	5.4	32	2.4	11	43	59	53	55	9.3	139
EBR9	nd	3.4	4.2	32	2.4	9.4	32	44	63	75	19	75

B)	BPA	OP	NP	NP1EC	OP2EO	NP2EO	BT	TT	TBEP	TCCP	TCEP	Caff
WWTP1 In	13063	60	651	2595	75	288	1954	4901	4414	1635	588	48563
WWTP1 Out	608	26	nd	2419	55	180	1115	2388	367	4868	757	172
WWTP2 In	592	57	83	1096	581	2819	25418	37760	2657	12307	146	82559
WWTP2 Out	109	56	32	1817	36	67	3303	1169	276	36594	243	108
WWTP3 In	164	178	755	1513	74	350	720	8500	2150	69	21	2100
WWTP3 Out	50	21	85	3257	44	182	695	7588	2033	356	165	477
WWTP4 In	220	28	94	503	68	124	741	1286	2218	494	45	29424
WWTP4 Out	236	64	nd	2263	38	65	644	3311	2950	1599	246	399
WWTP5 In	159	351	707	445	148	1995	425	3242	853	941	275	32571
WWTP5 Out	67	21	nd	622	54	168	446	2105	561	5021	954	176
WWTP6 In	202	24	56	601	75	697	483	2944	308	2906	581	29071
WWTP6 Out	57	10	nd	1778	nd	130	877	1853	814	5244	634	109

EE2, DES, E2-17G, TCC, OP1EC, OP1EO y NP1EO no se detectaron en ninguna muestra

Conclusiones

El procedimiento LC-LC-MS/MS recientemente desarrollado permitió una preconcentración eficiente de los EDCs en las muestras de agua de río superficial y aguas residuales y proporcionó una alta sensibilidad para su detección debido a la reducción del ruido de fondo MS/MS. El método permite el análisis de trazas simultáneas de EDCs pertenecientes a diferentes familias y con diferentes estructuras y propiedades en menos de 1 h (mediante dos inyecciones, en modo NI y PI, respectivamente), con un mínimo de pretratamiento de la muestra (filtración), que fue una mejora significativa en comparación con los métodos informados anteriormente. El uso de un sistema LC de columna doble con una válvula de seis puertos redujo las interferencias y mejoró los parámetros de análisis obteniendo una optimización mejorada. Los mejores resultados en términos de selectividad y sensibilidad se obtuvieron utilizando una columna EQuan, Hypersil GOLD™ Aqua, especialmente indicada para retener analitos inyectados con un alto porcentaje de solución acuosa.

Aplicando esta nueva metodología, se alcanzaron LODs bajos (pg/L a bajo ng/L) para todos los compuestos y matrices, obteniendo recuperaciones aceptables y con una reducción importante en los efectos de matriz con respecto a la metodología de preconcentración SPE convencional.

3.3 Determinación de EDCs en sedimentos y lodos mediante TurboFlow-LC-MS/MS

Basado en la publicación científica 2:

Analysis of endocrine disruptors and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Gorga M., Insa S., Petrovic M., Barceló D.

Journal of Chromatography A (2014); 1352: 29-37

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.028>

Resumen

Para la determinación de los disruptores endocrinos (EDCs) y los compuestos relacionados en sedimentos y muestras de lodos se aplicó un novedoso método totalmente automatizado basado en la cromatografía de flujo turbulento seguido de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (TFC-LC-MS/MS). Este método permite la identificación y cuantificación inequívoca de los EDCs ambientales más relevantes, como los estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados, antimicrobianos o desinfectantes, parabenos, bisfenol A (BPA), compuestos alquilfenólicos, benzotriazoles y retardantes de llama y plastificantes organofosforados, minimizando el tiempo de análisis y efectos matriz. Aplicando esta técnica, después de la extracción de los compuestos de interés por extracción líquida a presión (PLE), los extractos de sedimentos y lodos de depuradora se inyectaron directamente en el sistema cromatográfico y los analitos se concentraron en la columna de carga y/o limpieza. Utilizando el sistema de conmutación de seis puertos, los analitos se transfirieron a la columna analítica para su posterior detección por MS-MS (QqQ). Para optimizar este sistema, se realizó un estudio comparativo donde se empleó seis tipos de columnas de carga TurboFlow™, con diferentes modificaciones químicas, para lograr la máxima retención de analitos y la mejor eliminación de los componentes de la matriz. Usando el protocolo optimizado, se obtuvieron límites bajos de cuantificación (LOQs) que fueron desde 0.0083 a 1.6 ng/g para muestras de sedimento y de 0.10 a 125 ng/g para muestras de lodos de depuradora (excepto para los monoetoxilados de alquilfenol). El método se utilizó para evaluar la presencia y el destino de los EDCs estudiados en el río Ebro, que es el río más importante de España con actividades agrícolas e industriales intensivas en la cuenca que contribuyen al deterioro de la calidad del suelo y el agua.

Introducción

Los compuestos disruptores endocrinos (EDCs) interfieren con el sistema endocrino e interrumpen la función fisiológica de las hormonas [1]. Estos compuestos pueden actuar en dosis bajas en una variedad de organismos produciendo trastornos tales como problemas de desarrollo sexual, feminización de los machos o efectos masculinos en las hembras e infertilidad [2].

Algunos EDCs, con diferentes estructuras y propiedades, se encuentran en una gran variedad de productos comúnmente utilizados en la vida diaria (detergentes, productos de cuidado personal como cosméticos, productos farmacéuticos y en diferentes formulaciones industriales). En consecuencia, se detectan en el medio ambiente acuático, siendo los efluentes de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y las escorrentías de las tierras agrícolas las principales fuentes para su introducción en el medio ambiente acuático [3-7]. Debido a que los efectos potenciales en el medio ambiente pueden ocurrir a concentraciones muy bajas, su análisis debe alcanzar límites de detección muy bajos, especialmente difíciles de lograr en matrices complejas como en muestras ambientales sólidas (sedimentos y lodos de depuradora).

En la literatura, existen varias metodologías analíticas ya disponibles para la determinación de EDCs en sedimentos y muestras de lodos de depuradora con límites aceptables de detección (LOD) [8-13]. Los procedimientos más utilizados para la extracción de los compuestos de interés en muestras sólidas se basan en la extracción líquida a presión (PLE), la extracción por ultrasonidos (USE) o la extracción líquido-líquido (LLE). La limpieza de las muestras generalmente se realiza utilizando enfoques clásicos como la extracción en fase sólida (SPE) o utilizando técnicas semiautomáticas como la cromatografía de permeación en gel (GPC). Otra metodología reportada en la literatura es la técnica QuEChERS (rápida, fácil, barata, efectiva, resistente y segura) [14]. Sin embargo, la mayoría de los protocolos informados anteriormente implican una limpieza de varios pasos que consume tiempo y trabajo, que a menudo constituyen el cuello de botella del método analítico. Hoy en día, se reconoce que el número creciente de muestras que se analizan en los laboratorios que realizan estudios de monitoreo requiere el empleo de técnicas automatizadas y de alto rendimiento. Por ese motivo, diferentes técnicas online y automatizadas han sido desarrolladas durante los últimos años, acoplando unidades de preparación de muestras a los sistemas de separación y detección [15].

En este trabajo, 30 analitos, EDCs y compuestos relacionados (EDCs sospechosos), pertenecientes a diferentes grupos de sustancias químicas (10 estrógenos, naturales y sintéticos, en forma libre y conjugada, 8 compuestos alquilfenólicos y sus metabolitos, 4 conservantes, 2 antimicrobianos, 3 compuestos organofosforados retardantes de llama o plastificantes, 2 anticorrosivos, bisfenol A (BPA) y el biomarcador químico, cafeína (Caff), se determinaron en muestras de sedimentos y lodos de depuradora.

Para este fin, se aplicó la tecnología online basada en cromatografía de flujo turbulento: TFC (TurboFlow™), un método robusto, rápido y de alto rendimiento [16]. Este sistema automatizado utiliza la columna TFC para separar los analitos de interés de sus matrices complejas, combinando principios

de difusión, química y exclusión de tamaño. La separación cromatográfica se logra posteriormente en la segunda columna, la analítica. Por lo tanto, se logra una limpieza online, minimizando la preparación de la muestra y reduciendo la supresión de iones debido a una mayor especificidad. Esta tecnología de doble columna se ha optimizado y aplicado previamente para la determinación de BPA, pesticidas, perfluoroalquilos, sustancias farmacológicas y otros contaminantes ambientales en muestras biológicas y alimentarias [17-21], pero no hay métodos desarrollados para matrices ambientales como sedimentos y lodos de depuradora. Por tanto, el objetivo de este estudio ha sido optimizar los parámetros de TFC y también la separación por LC, incluida la selección de la columna de purificación TurboFlow™, los tiempos de intercambio definidos por el perfil de elución de la matriz, el tiempo de transferencia de los analitos y su perfil de elución.

Experimental

Materiales y patrones

Los patrones puros de los estrógenos: estradiol (E2), estrona (E1), estriol (E3), etinilestradiol (EE2), dietilestilbestrol (DES), estriol 3-sulfato (E3-3S), estradiol 17-glucurónido (E2-17G), estrona 3-glucurónido (E1-3G), estriol 16-glucurónido (E3-16G), triclosán (TCS), metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), bencilparabeno (BeP), (BPA)-d₁₆, 4-tert-octilfenol (OP), OP-d₂, 4-tert-octilfenol-3,5 d₂-dietoxilado (OP₂EO-d₂), trifenil-d₁₅-fosfato, Caff, Caff-C₁₃ se compraron en Sigma–Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.). Triclorocarabán (TCC), bencilparabeno (BeP), BPA, toliltriazol (TT), tris(butoxietil) fosfato (TBEP), tris (2-cloroetil) fosfato (TCEP) fueron suministrados por Aldrich (Milwaukee, WI, EE. UU.). Nonilfenol (NP), NP-d₈, octilfenol mono- y dicarboxilado (OP₁EC y NP₁EC), octilfenol mono- y dietoxilado (OP₁EO y NP₁EO), octil- y nonilfenol dietoxilado (OP₂EO y NP₂EO), NP₁EO d₂ fueron adquiridos del Dr. Eh (Alemania). E2-d₅, E1-d₄, EE2-d₄, E1-3S-d₄, se obtuvieron de Isótopos CDN (Pointe-Claire, Quebec, Canadá). Se adquirió 1H-benzotriazol (BT), tris(cloroisopropil) fosfato (TCPP), hidroxibenzoato de etilo C₁₃, BT en anillo d₄ de Fluka (Buchs, Suiza).

Las soluciones madre individuales de los analitos se prepararon inicialmente a 1 mg/mL en metanol y posteriormente se diluyeron para obtener una concentración adecuada para cada analito. Las mezclas de patrones, una para los compuestos analizados en modo de ionización negativa (NI) y la otra para los compuestos analizados en modo de ionización positiva (PI), se prepararon en metanol a diferentes concentraciones mediante la dilución apropiada de soluciones madre individuales.

Los cartuchos SPE (3 ml, 3 mg, de equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB)) se obtuvieron de Waters Corp. (Millford, MA). Todos los solventes (agua y metanol) fueron de grado HPLC y se compraron de Merck (Darmstadt, Alemania), y formiato de amonio (95% de pureza), ácido fórmico (98%), ácido acético (99.5%) y amoníaco (30%) fueron de Panreac (Barcelona, España). El nitrógeno para el secado del 99.995% de pureza fue de Air Liquide (España).

3. Desarrollo de métodos analíticos

Muestras colectadas

Se recogieron muestras de sedimento de la cuenca del río Ebro (NE España) durante una campaña de muestreo en 2010. Se tomaron las siguientes muestras: ARG, aguas abajo de la EDAR de Pamplona (WWTP1); NAJ, una importante área agrícola del vino, aguas arriba de la EDAR Logroño (WWTP2); EBR4, aguas abajo de WWTP2; GAL2 en el área agrícola y HUE, dentro de la ciudad de Zaragoza, que recibe los efluentes de varias áreas industriales, ambos puntos de muestreo aguas arriba de la EDAR de Zaragoza (WWTP3); EDAR aguas abajo EBR6 Lleida (WWTP4); SEG aguas abajo de WWTP4; EBR9 en el delta del Ebro con arrozales, aguas abajo de la EDAR Tortosa (WWTP5).

También se recogieron lodos de depuradora en cinco EDARs principales de la cuenca. Las muestras fueron envueltas en papel de aluminio, congeladas y transportadas a -20°C al laboratorio, y finalmente liofilizadas. Las muestras liofilizadas se molieron, se homogeneizaron usando un mortero y se almacenaron a -20°C. En el caso de las muestras de sedimentos antes de congelar fueron tamizadas a través de un tamiz de 125 µm.

Método analítico

Condiciones de extracción

Se añadieron 2 g de peso seco (dw) de muestra de sedimento y 1 g de muestra de lodo de depuradora con 100 µL de una solución de patrones internos a una concentración de 250 µg/L y 2500 µg/L, respectivamente. Antes de la extracción, las muestras enriquecidas se mantuvieron durante la noche para equilibrar y luego se realizó una PLE utilizando un sistema ASE 200 totalmente automatizado (Dionex, Sunnyvale, CA, EE. UU.).

Las muestras se colocaron en la celda de extracción, provista de dos filtros de celulosa en el fondo y cualquier espacio vacío se llenó con Hydromatrix (Varian Inc., Palo Alto, EE. UU.) y la celda se selló con la tapa superior. La celda se calentó hasta 50°C. El disolvente de extracción empleado fue agua: metanol: acetona (1:2:1, v/v) y la presión alcanzó 1500 psi. Después de un tiempo de calentamiento del horno de 5 minutos en estas condiciones, se aplicaron tres extracciones estáticas de 5 minutos a presión y temperatura constantes. El volumen de extracto resultante fue de aproximadamente 20 mL y el tiempo requerido para la extracción fue de 25 min.

El extracto se redujo bajo una corriente suave de nitrógeno y se redisolvió en 1 mL y 10 mL de metanol para muestras de sedimentos y lodos de depuradora, respectivamente. El tiempo aproximado requerido en este paso fue de aproximadamente 20 min. Esta solución se centrifugó, recogiendo 0.5 mL de la parte superior del vial de centrifuga para el análisis LC-LC-MS/MS.

Condiciones TFC-LC

El sistema Thermo Scientific TurboFlow™ para la purificación y análisis de muestras “online” consistió en un MS de triple cuadrupolo (QqQ) con una fuente de ionización por “electrospray” (ESI), dos bombas cuaternarias LC (bomba L de Finnigan Surveyor) y dos columnas LC, una para la purificación de la muestra y la segunda para la separación analítica.

El sistema Aria™ TLX se programó para controlar la carga y elución de las dos columnas LC. Ver apartado 3.1, Figura 3.2, pág. 74, donde se ilustra el diagrama de la válvula de cambio de columna durante la limpieza, la transferencia y la elución de la muestra y el equilibrado de la columna, respectivamente. Las columnas TurboFlow™ empleadas fueron una Ciclón (0.5×50mm, tipo sílice) y una Ciclón-MCX (0.5×50mm) para el modo ESI negativo y positivo respectivamente. Se eligió una Hypersil GOLD de 3µm, 75×2.1mm y una Purospher STAR RP-18 (125×2mm, 5µm., fase inversa C18) para el modo ESI negativo y positivo respectivamente como columnas analíticas.

Las condiciones de TFC-LC para la purificación de la muestra y la posterior separación de los compuestos de interés en la columna analítica se muestran en la **Tabla 3.6**. Para los compuestos analizados en modo NI, se inyectaron directamente 20 µL de muestra en la columna TurboFlow™ (Ciclón) a 1 mL/min, con ácido fórmico a pH=3.5 en agua como fase móvil, los analitos se retuvieron, y la matriz de muestra se eluyó al compartimento de residuos. La columna TurboFlow™ se limpió durante 90 s, con una solución acuosa de amoníaco a pH=8.5 y agua para eliminar la solución ácida. Para los compuestos que se detectaron en el modo PI, la etapa de carga se llevó a cabo con formiato de amonio 20mM, ácido acético al 0.1% en agua y las etapas 2 y 3 no fueron necesarias. Posteriormente, la bomba de carga empujó el contenido orgánico del “loop” a través de la columna TurboFlow™ y el flujo se desaceleró a 0.2 mL/min para transferir los compuestos a la columna analítica. Finalmente, la separación cromatográfica se inició a un caudal de 0.3 mL/min mientras se limpiaba la columna TurboFlow™. Durante los últimos pasos, el “loop” se volvió a llenar y las dos columnas se equilibraron para la siguiente inyección.

La separación cromatográfica de los compuestos detectados en condiciones de NI se realizó en condiciones de elución en gradiente usando agua (A) y metanol (B), sin ningún modificador. Las condiciones iniciales fueron 15% de B, luego el gradiente se incrementó linealmente a 70% de B en 30s, hasta 100% de B en 60s y se mantuvo isocrático durante 7 min. Los compuestos detectados en condiciones de PI se separaron usando el mismo programa de gradiente, pero con un sistema de disolvente diferente que contenía agua-metanol, ambas fases con 20 mM de formiato de amonio y 0.1% de ácido acético.

Tabla 3.6 Condiciones TFC-LC

Bomba 1: Bomba de carga											Bomba 2: Bomba de elución					
Volumen de inyección: Muestras de sedimento y lodos: 20 µL																
Columna de purificación: NI: Cyclone (0.5x50mm), Thermo Scientific PI: Cyclone-MCX (0.5x50mm), Thermo Scientific											Columna analítica: NI: Hypersil GOLD (75x2.1mm, 3µm), Thermo Scientific PI: Purospher STAR RP-18 (125x2mm, 5µm), Merck					
Solvente A:		NI: Agua PI: Agua (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)									Solvente A:		NI: Agua: PI: Agua (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)			
Solvente B:		NI: Metanol PI: Metanol (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)									Solvente B:		NI: Metanol PI: Metanol (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)			
Solvente C:		NI: Agua (ácido fórmico pH= 3.4)														
Solvente D:		NI: Agua (amoníaco pH= 8.5)														
Paso	T	Loop	Tiempo	Flujo (mL/min)	Gradiente	A%	B%	C%	D%	Descripción	Flujo (mL/min)	Gradiente	A%	B%	Descripción	
1	-	out	0:00	1.0	Isocrático	-	-	100	-	Carga de muestra en la columna TFC	0.3	Isocrático	100	-	Acondicionamiento col. analítica	
2	-	out	0:05	1.0	Isocrático	-	-	-	100	Fase móvil elimina fase solvente de fórmico	0.3	Rampa	100	-	Acondicionamiento col. analítica	
3	-	out	1:05	1.0	Isocrático	100	-	-	-	Fase móvil elimina fase solvente de amoníaco	0.3	Rampa	100	-	Acondicionamiento col. analítica	
4	T	in	1:35	0.2	Isocrático	100	-	-	-	Transferencia analito col. analítica	0.2	Rampa	100	-	Transferencia analito col. analítica	
5	-	in	3:35	1.0	Rampa	70	30	-	-	Lavado columna TFC	0.3	Rampa	85	15	Separación LC	
6	-	in	4:05	1.0	Rampa	-	100	-	-	Lavado columna TFC	0.3	Rampa	30	70	Separación LC	
7	-	in	5:05	0.5	Rampa	-	100	-	-	Lavado columna TFC	0.3	Rampa	-	100	Separación LC	
8	-	in	9:05	0.5	Rampa	15	85	-	-	Llenado "loop" para siguiente muestra	0.3	Rampa	-	100	Separación LC	
9	-	in	10:05	1.0	Isocrático	15	85	-	-	Llenado "loop" para siguiente muestra	0.3	Rampa	-	100	Lavado col. analítica	
10	-	out	12:00	0.5	Rampa	-	100	-	-	Acondicionamiento columna TFC	0.3	Rampa	-	100	Lavado col. analítica	
11	-	out	13:00	0.5	Isocrático	-	100	-	-	Acondicionamiento columna TFC	0.3	Rampa	100		Acondicionamiento col. analítica	

PI, Ionización Positiva; NI, Ionización Negativa

Detección por espectrometría de masas

La detección se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas TSQ Vantatge, equipado con una interfaz ESI turbo "spray". Los parámetros operativos fueron los siguientes para NI/PI, respectivamente: voltaje de "spray" 2500/3000 V, presión del "sheath gas" 40/40 (N₂), presión del gas auxiliar 20/20 (N₂), presión del gas "ion sweep" 0.5/0.5 (N₂) y temperatura del "transfer tube" 270/300 °C. Los parámetros optimizados de MS/MS para el análisis SRM de los analitos se han mostrado en el apartado 3.2, Tabla 3.2, pág. 86, ver también anexo BI, Tabla BI.1, pág. 267.

Se detectaron estrógenos y conjugados naturales y sintéticos, antimicrobianos/desinfectantes, conservantes, BPA y los compuestos alquilfenólicos (OP, NP, OP1EC y NP1EC) en condiciones de NI como [M-H]⁻. Los iones utilizados para el análisis de anticorrosivos, compuestos organofosforados y el biomarcador químico Caff, en modo PI, fueron los correspondientes a [M+H]⁺, mientras que para los compuestos alquilfenólicos (OP1EO, OP2EO, NP1EO y NP2EO) el ion aducto [M+NH₃]⁺ fue el analizado.

Preparación de muestras offline

Con el fin de comparar los rendimientos del método TFC-LC y la metodología convencional de limpieza SPE, que se ha utilizado ampliamente para el análisis de los compuestos de interés en muestras de sedimentos y lodos de depuradora, también se realizó una preparación de muestras offline [22]. Se extrajeron 2 g dw de muestra de sedimento y 1 g dw de muestra de lodos de depuradora en las mismas condiciones descritas anteriormente (Sección 2.3.1). Los extractos finales de PLE se redisolviéron en 1 mL de metanol y se diluyeron adicionalmente con 100 mL de agua de HPLC. La posterior limpieza de extractos se realizó mediante SPE utilizando cartuchos Oasis HLB (3 mL, 3 mg) acondicionados con 5 mL de metanol seguido de 5 mL de agua. Los cartuchos se eluyeron con 2×5 mL de metanol y los eluyentes se evaporaron con una corriente suave de nitrógeno y se reconstituyeron a un volumen final de 1 mL con metanol. Se aplicó la misma separación y detección cromatográfica descrita anteriormente y resumida en **la información adicional, anexo BI Tabla BI.5, pág.270**. El volumen de inyección fue de 20 µL y el tiempo requerido para este enfoque fue de 2 h.

Resultados y discusión

Optimización de las condiciones de extracción

Muestras de sedimentos

Se compararon diferentes estrategias y condiciones de extracción para seleccionar el método de extracción que permitiera la extracción simultánea de todos los compuestos de interés con recuperaciones aceptables. En el primer enfoque, se utilizó un método selectivo de extracción de líquido a presión (SPLE) que logra de forma automática y rápida la extracción cuantitativa y selectiva de EDCs [23-26], comparando dos temperaturas de 50°C y 70°C respectivamente. El aumento de la temperatura

3. Desarrollo de métodos analíticos

de extracción puede conducir a una mayor eficiencia de extracción de los compuestos, pero también puede dar como resultado un efecto matriz más alto debido a una extracción más eficiente de los componentes que interfieren. La degradación de algunos de los compuestos de interés, en principio, ocurre a temperaturas más altas. En el segundo enfoque, la extracción de los compuestos de interés se realizó por sonicación, USE. El disolvente de extracción empleado fue el mismo que en PLE (metanol: acetona (1:1, v/v) y el volumen del extracto 10 mL. Se sonicaron 2 g dw de muestra de sedimento enriquecido, con un contenido orgánico total (TOC) de 0.68%, durante 30 minutos y luego se agitó 3 h, se centrifugó la muestra y el sobrenadante se evaporó bajo una suave corriente de nitrógeno y se redisolvió con 1 mL de metanol.

Las recuperaciones obtenidas se muestran en **la información adicional, anexo BI Tabla BI.6, pág. 270**. Aplicando estos enfoques, los compuestos glucurónidos de estrógenos no se detectaron debido a los solventes extractantes utilizados. Además, para los otros compuestos, las recuperaciones de PLE a 50°C oscilaron entre 54 y 134%, con una mediana de 84%. El aumento de la temperatura de extracción a 70°C no dio lugar a ningún aumento significativo en la eficiencia de extracción y las recuperaciones oscilaron entre 45 y 125% con una mediana del 79%. La sonicación dio como resultado recuperaciones que oscilaron entre 47 y 117% (mediana 84%). En general, la extracción usando SPLE a 50°C arrojó recuperaciones aceptables con buena repetibilidad (desviación estándar relativa (RSD) entre 1.0 y 16%) y debido a la mínima manipulación de la muestra y tiempos de análisis, LODs y efectos matriz, respecto a la metodología de sonicación, esta fue la elegida.

Para mejorar la extracción de los estrógenos glucurónidos que no se extrajeron satisfactoriamente de las muestras de sedimento, se añadió agua al disolvente de extracción y se probaron diferentes mezclas de disolventes. Se usaron diferentes proporciones de agua: metanol: acetona 1:2:1, v/v y 1:2:2, v/v, aplicando SPLE a 50°C, demostrando que la primera proporción presentó mejores recuperaciones y RSD entre 65-114% (una mediana del 91%) y 1.9-15%, respectivamente (ver información adicional, anexo BI Tabla BI.6, pág. 270).

Como último paso, se probaron diferentes porcentajes de metanol y de agua para la redisolución de los extractos antes de su inyección en el sistema LC-LC-MS/MS. Típicamente, los extractos obtenidos por PLE se redisuelven en un disolvente que tiene la misma proporción que las fases móviles iniciales usadas durante la separación cromatográfica, sin embargo, se encontró que un mayor porcentaje de disolvente orgánico, en este caso 100% de metanol, mejoraba la detección, **ver información adicional, anexo BI Figura BI.2, pág. 271**.

Muestras de lodos de depuradora

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las muestras de sedimentos y debido a la mayor complejidad de la matriz de lodos de depuradora por su alto contenido de lípidos, se probó un método de extracción modificado. Utilizando muestras de lodo de aguas residuales correspondientes a un lodo deshidratado digerido anaeróbicamente con un TOC del 52%, se llevó a cabo una extracción PLE utilizando las mismas condiciones optimizadas en la sección anterior, en resumen, se aplicó el mismo tipo de extracción que para las muestras de sedimentos.

Aunque en este caso, 20 mL del extracto obtenido aplicando la extracción PLE se trató de cuatro maneras diferentes. En el caso A, se inyectaron 20 µL del extracto de PLE directamente en el TFC-LC-MS/MS, sin embargo, se observó que el extracto estaba demasiado diluido y los LODs obtenidos no eran aceptables. Por esa razón, en el caso B, el extracto se concentró hasta un volumen final de 10 mL, luego se inyectaron 20 µL de este extracto de PLE reducido. En estas condiciones, los efectos de la matriz fueron mayores que en el caso A, por tanto, la mejora debido a la concentración del extracto fue limitada. En los casos C y D, el volumen del extracto de PLE se redujo a 500 µL bajo una corriente de nitrógeno suave y se redisolvió con 10 mL o 20 mL de metanol, respectivamente. En general, este enfoque (evaporación del extracto y redisolución con 10 mL de metanol) produjo las mejores recuperaciones y los efectos de matriz más bajos. Un ejemplo de estos efectos matriz aplicando estas 4 aproximaciones se muestra en la **información adicional, anexo BI Figura BI.3, pág.271**. Las recuperaciones se muestran en la **información adicional, anexo BI Figura BI.4, pág. 272**.

Optimización de las condiciones TFC-LC

Como primer paso de la optimización TFC-LC, se probaron diferentes tipos de fases móviles. En el caso de los compuestos analizados en modo NI, las fases móviles para la elución de los compuestos de interés a través de la columna analítica fueron agua y metanol, ya que el uso de modificadores (ácidos o sales) dio como resultado una señal baja para la familia de los estrógenos. Sin embargo, la columna TurboFlow™ requiere activación usando modificadores como ácido fórmico o formiato o acetato de amonio. Por lo tanto, para activar las columnas TurboFlow™ y retener los analitos, se probaron diferentes tiempos de carga, fases móviles acuosas y varios pH. Posteriormente, se aplicaron diferentes tipos de pasos de limpieza y se optimizaron para la eliminación del ácido fórmico. Con respecto a los compuestos detectados en modo PI, la etapa de carga se realizó con formiato de amonio 20 mM y 0.1% de ácido acético y agua, y en este modo las etapas de limpieza no fueron necesarias.

Otro punto crítico fue el tiempo de transferencia, cuando ambas columnas estaban conectadas. Este tiempo tuvo que reducirse al máximo, 120 s, para obtener las condiciones óptimas donde los compuestos ya habían sido transferidos a la columna analítica y la matriz de muestra permanecía en la columna de purificación TurboFlow™. Se encontró que el llenado del "loop" con 85% de metanol y 15% de agua extraía el máximo de compuestos con la mínima matriz.

Como último paso de la optimización, se realizó un estudio comparativo que empleó seis tipos de columnas TurboFlow™ con diferentes modificaciones químicas para seleccionar la columna óptima que permitiera la máxima retención, la elución satisfactoria de los analitos y evitara la transferencia entre muestras. Para este propósito, se aplicó un sistema integrado llamado tecnología "multiplexing", incorporada en el instrumento TFC-LC-MS/MS. Este sistema podía funcionar con seis columnas TurboFlow™ en paralelo acopladas a un solo espectrómetro de masas. Con el software operativo Aria, cada canal podía funcionar de forma independiente, utilizando un método único o múltiples métodos simultáneamente. Las columnas TurboFlow™ modificadas probadas (de columnas de fase inversa a normal) fueron: un XL C18 (0.5×50 mm, tipo sílice), XL C-18P (0.5×50 mm, tipo sílice) y Cyclone (0.5×50 mm, tipo sílice). Luego, se probaron columnas de modo mixto (desde la más cargada positivamente hasta la más cargada negativamente): una Cyclone-MAX (0.5×50 mm, tipo de polímero), Cyclone-P

3. Desarrollo de métodos analíticos

(0.5×50 mm, tipo de polímero) y una Cyclone-MCX (0.5×50 mm, tipo polímero). Para los compuestos de interés detectados en modo NI, la columna polar no modificada, Cyclone, proporcionó en general la mejor retención para los analitos. Para los compuestos objetivo detectados en modo PI, se eligió la columna de modo mixto con carga negativa, Cyclone-MCX, con propiedades de columna de intercambio catiónico.

Validación del método analítico

Las recuperaciones, los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) se evaluaron utilizando las muestras enriquecidas. Para ambas matrices, las muestras del blanco se analizaron por triplicado. Los LODs y LOQs de los compuestos estudiados en muestras de sedimentos de río y lodos de depuradora se calcularon mediante una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente (la relación entre la intensidad de la señal de cada compuesto obtenida en condiciones SRM y la intensidad del ruido en una muestra enriquecida) El nivel de la muestra enriquecida seleccionada para la determinación de LODs y LOQs se eligió en función de la concentración de la muestra enriquecida más cercana a estos límites.

En la **Tabla 3.7** se muestra un resumen de los datos de garantía de calidad y control de calidad. Las recuperaciones para las diferentes matrices se calcularon usando muestras enriquecidas a 12.5 y 250 ng/g para muestras de sedimentos y lodos de depuradora, respectivamente; a excepción de OP1EO y NP1EO donde las concentraciones finales fueron 125 y 2500 ng/g, respectivamente. Los datos para otros dos niveles de concentración se muestran en la **información adicional, anexo BI Tabla BI.7, pág. 272**. Los criterios de identificación y confirmación de los analitos seleccionados se basaron en las siguientes restricciones: (1) el tiempo de retención para todas las transiciones monitoreadas para un analito dado debía estar dentro de ± 1 s, con una relación señal-ruido ≥ 3 para cada uno; y (2) la relación entre las dos transiciones monitoreadas debía estar dentro del 15% del valor teórico (calculado según los patrones). La cuantificación se realizó agregando compuestos isotópicos de las diferentes familias analizadas como patrones internos.

El método presentó buena linealidad en el rango de concentración estudiado (2.5–3000 ng/L) para todos los compuestos, con coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0.990 en todos los casos. La variación “intraday” mostró valores inferiores al 6.00%, excepto para E2-17G (8.0%), E1-3G (9.5%), TCS (6.7%), BPA (7.3%), OP1EO (8.7%) y NP1EO (9.5%). El estudio “interday” también mostró resultados aceptables (por debajo del 14.0%, excepto para E1-3G (17%) y NP1EO (16%). Además, se obtuvieron límites instrumentales sensibles de detección y cuantificación (ILODs y ILOQs), entre (0.00028-0.97 pg y 0.00093-3.2 pg), a excepción de OP1EO y NP1EO. Los valores más altos para OP1EO y NP1EO con valores ILOQ de 24 y 107 pg respectivamente, se debieron a la detección de masa, porque estas moléculas tenían una menor afinidad para formar aducto de amonio, que proporciona una buena fragmentación en el sistema de MS, en lugar de aductos de sodio apenas fragmentables. Los LODs de método obtenidos para estrógenos y conjugados naturales y sintéticos variaron entre 0.0062–0.21 ng/g y 0.095–38 ng/g para muestras de sedimentos y lodos de depuradora, respectivamente. Estos límites para las muestras de lodos de depuradora fueron mayores debido a la complejidad de la matriz y la sensibilidad de este tipo de compuestos a los efectos de la matriz.

Tabla 3.7 Parámetros de validación del método integrado TFC-LC-MS/MS

Compuestos	Parámetros instrumentales					Sedimento de río		Lodo de depuradora	
	r ²	ILOD (pg)	ILOQ (pg)	Repetitividad (%)	Reproducibilidad	Recuperación	LOD/LOQ (ng/g)	Recuperación	LOD/LOQ (ng/g)
				RSD, n=6)	(% RSD, n=6)				
E2	0.998	0.37	1.25	4.6	6.3	88 (2.6)	0.069/0.23	95 (7.1)	38/125
E1	0.999	0.19	0.62	3.2	4.8	83 (13)	0.031/0.10	103 (9.0)	2.2/7.4
E3	0.999	0.97	3.2	5.5	9.5	108 (6.1)	0.21/0.69	101 (9.7)	9.6/32
EE2	0.999	0.15	0.5	4.4	4.6	114 (12)	0.099/0.33	101 (10)	19/62
DES	0.999	0.088	0.29	5.8	9.4	93 (6.8)	0.071/0.24	95(11)	0.50/1.7
E1-3S	0.997	0.092	0.31	5.4	9.5	91 (6.0)	0.011/0.036	83 (6.6)	0.095/0.31
E3-3S	0.997	0.045	0.15	5.7	8.5	75 (11)	0.0062/0.021	76 (9.3)	0.19/0.63
E2-17G	0.993	0.29	0.98	8.0	14	92 (1.9)	0.021/0.071	76 (9.1)	0.58/1.95
E1-3G	0.992	0.056	0.019	9.5	17	91 (6.8)	0.017/0.057	40 (6.6)	0.86/2.9
E3-16G	0.999	0.10	0.34	2.7	7.8	65 (10)	0.025/0.084	70 (11)	0.74/2.4
TCC	0.998	0.086	0.29	3.7	5.1	98 (10)	0.088/0.29	93 (8.7)	0.13/0.44
TCS	0.990	0.29	0.98	6.7	8.4	99 (2.9)	0.21/0.71	98 (3.7)	1.1/3.8
MeP	0.991	0.93	3.1	4.6	4.9	97 (14)	0.22/0.74	87 (14)	1.9/6.2
EtP	0.998	0.085	0.28	1.0	5.4	90 (6.1)	0.015/0.060	92 (9.0)	0.13/0.45
PrP	0.999	0.025	0.76	2.2	9.1	91 (2.2)	0.043/0.14	84 (4.5)	0.23/0.76
BeP	0.998	0.041	0.14	4.5	9.5	108 (11)	0.018/0.060	64 (15)	0.78/2.6
BPA	0.992	0.095	0.32	7.3	12	87 (3.9)	0.24/0.82	95 (8.5)	2.0/6.8
OP	0.997	0.017	0.058	5.5	9.4	79 (10)	0.059/0.20	99 (7.2)	0.20/0.69
NP	0.991	0.16	0.52	6.4	11	89 (12)	0.47/1.6	92 (9.5)	0.99/3.29
OP1EC	0.993	0.0044	0.015	3.1	5.6	83 (8.6)	0.0094/0.031	89 (6.0)	0.043/0.14
NP1EC	0.999	0.0053	0.018	2.0	3.4	105 (12)	0.014/0.048	86 (14)	0.051/0.17
OP1EO ^a	0.990	7.1	24	8.7	12	73 (15)	1.7/5.6	64 (16)	321/1071
NP1EO ^a	0.989	32	107	9.5	16	71 (13)	3.2/11	53 (19)	125/417
OP2EO	1.00	0.00028	0.00093	1.6	3.2	109 (7.0)	0.0042/0.014	103 (14)	0.52/1.7
NP2EO	0.999	0.00086	0.0029	2.7	3.7	111 (12)	0.029/0.099	107 (11)	0.074/0.25
BT	0.991	0.010	0.33	2.3	6.7	79 (7.8)	0.010/0.033	84 (7.2)	1.4/4.6
TT	0.997	0.0030	0.010	1.8	4.5	95 (11)	0.0049/0.016	98 (7.0)	0.31/1.0
TBEP	0.999	0.00081	0.0027	1.1	5	104 (7.6)	0.0025/0.0083	115 (14)	0.031/0.10
TCPP	0.995	0.0063	0.021	3.1	5.1	91 (5.7)	0.0094/0.031	99 (6.1)	0.085/0.28
TCEP	0.999	0.0032	0.011	2.5	4.1	98 (3.2)	0.0087/0.029	96 (6.5)	0.28/0.92
Caff	0.992	0.0015	0.0052	1.2	5.2	104 (9.1)	0.0089/0.030	97 (8.0)	0.070/0.23

3. Desarrollo de métodos analíticos

En el caso de los antimicrobianos y conservantes, se obtuvieron LODs de 0.015–0.21 ng/g y 0.13–1.9 ng/g, respectivamente. El BPA mostró límites de 0.24 ng/g y 2.0 ng/g. Para los compuestos alquilfenólicos (con excepción de OP1EO y NP1EO), se calcularon LODs de 0.042-0.47 ng/g y 0.043-0.99 ng/g, respectivamente. Los LODs de los compuestos de las familias de anticorrosivos y compuestos organofosforados oscilaron entre 0.0025-0.010 ng/g y 0.031-1.4 ng/g, respectivamente para muestras de sedimentos y lodos de depuradora. Para el biomarcador químico, Caff, se obtuvieron LODs de 0.0089 ng/g y 0.070 ng/g en las mismas matrices.

Comparación de métodos online/offline

Comparación de las recuperaciones online/offline

Las recuperaciones obtenidas con la metodología online se compararon con las obtenidas utilizando el enfoque clásico de limpieza offline (ver sección experimental, método analítico de esta publicación, pág. 98). Los resultados se muestran en la **Figura 3.4**. En general, la metodología online fue capaz de mejorar las recuperaciones para la mayoría de los compuestos analizados, produciendo recuperaciones entre 65-114% y 40-115% para muestras de sedimentos y lodos, respectivamente. Mientras que, aplicando la metodología offline, las recuperaciones oscilaron entre 51–119% y 33–127% para muestras de sedimentos y lodos de depuradora, respectivamente. Con respecto a RSD para muestras de sedimentos y lodos de depuradora, utilizando la metodología online, sus valores oscilaron entre 1.9–15% y 3.7–19% en lugar de 4.0–24% y 2.9–23% obtenidos aplicando el análisis offline, **ver información adicional, anexo BI Tabla BI.8, pág. 273**.

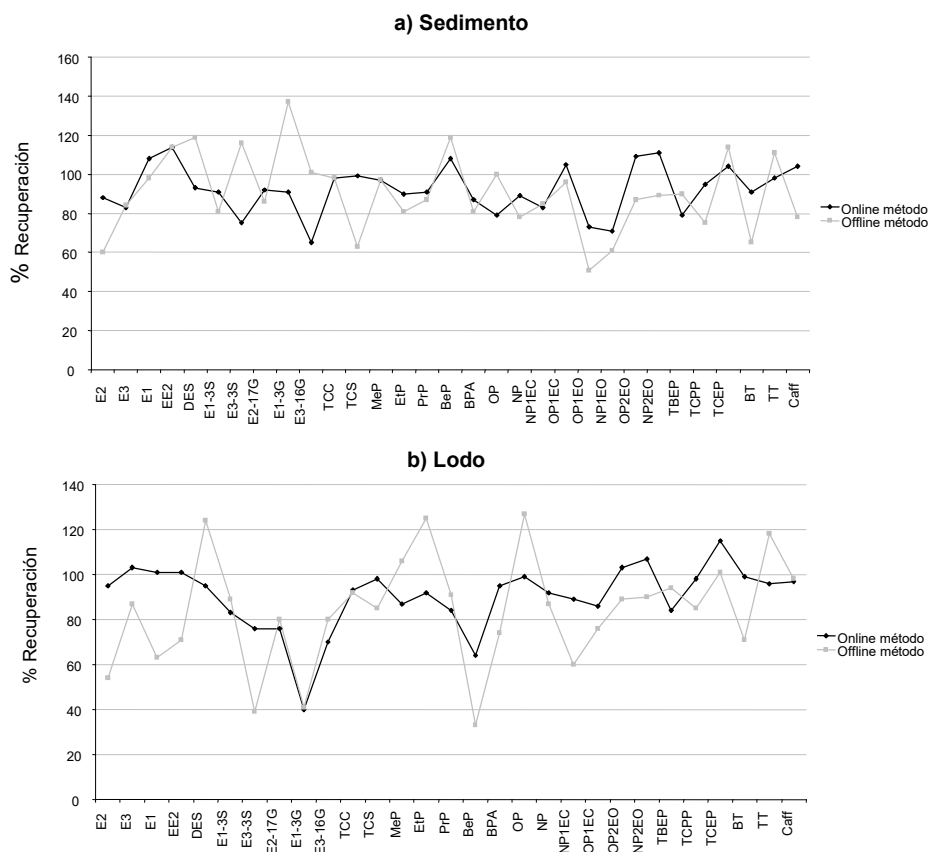


Figura 3.4 Recuperaciones (%) de los EDCs y compuestos relacionados en (a) sedimentos y (b) lodos de depuradora usando la metodología online y offline

Comparación de efectos de matriz online/offline

La supresión de la señal del analito, causada por la alta concentración de componentes de la matriz, es uno de los problemas a resolver al analizar los EDCs por MS/MS. Los solutos no volátiles, las sales inorgánicas como los sulfatos y fosfatos causan la mayor supresión de ionización [27], pero el efecto también es aplicable a cualquier compuesto volátil, incluidos los analitos coeluyentes. Los resultados mostraron que la metodología de purificación online resultó tener una mejor eficiencia en de extracción selectiva minimizando los efectos de la matriz, en comparación con la offline. Los cromatogramas iónicos reconstruidos de detección MS/MS correspondientes a $[M-H]^-$ de estradiol, estrona y estriol en condiciones offline SPE-LC-MS/MS, y online TFC-LC-MS/MS se muestran en la **Figura 3.5 a y b**.

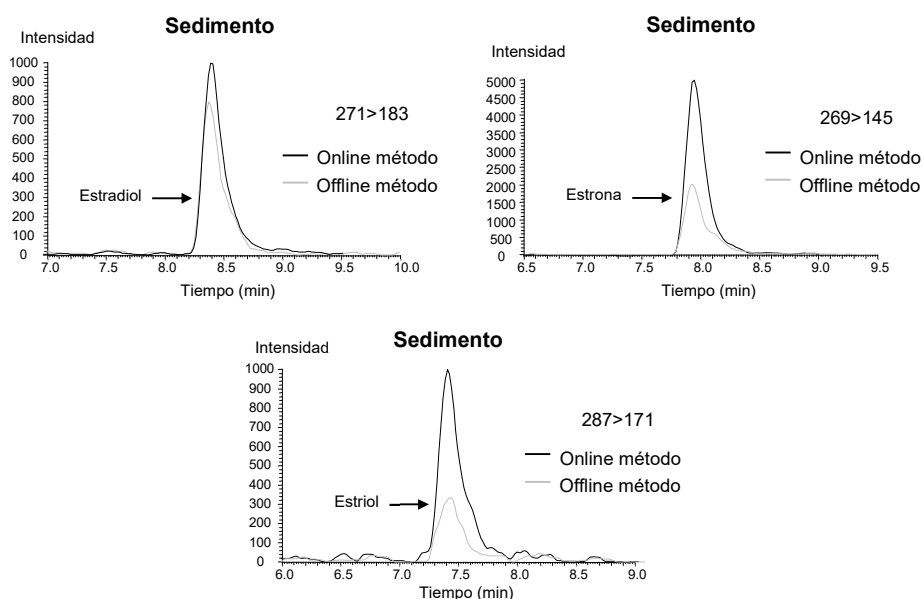


Figura 3.5.a Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS correspondientes a $[M-H]^-$ de estradiol, estrona y estriol obtenidos en condiciones de NI de muestras de sedimentos fortificados aplicando la metodología online y offline

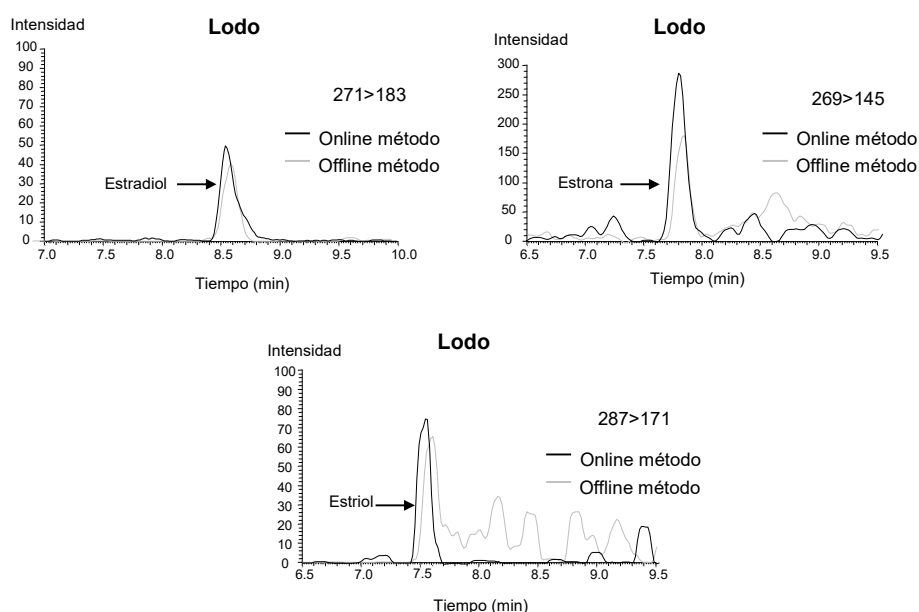


Figura 3.5.b Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS correspondientes a $[M-H]^-$ de estradiol, estrona y estriol obtenidos en condiciones de NI de muestras de lodos fortificados aplicando la metodología online y offline

3. Desarrollo de métodos analíticos

Las cifras muestran una mayor intensidad de señal para estradiol, estrona y estriol en caso de purificación “online”. Además, los cromatogramas obtenidos después de la limpieza clásica de SPE offline muestran un ruido de fondo significativamente mayor, lo que aumenta los LODs y LOQs.

Análisis de muestras de sedimentos y lodos de depuradora

Los métodos desarrollados se aplicaron al análisis de los compuestos de interés en ocho muestras de sedimentos y cinco muestras de lodos de depuradora recolectadas en la cuenca del río Ebro durante una campaña de muestreo en 2010, los resultados se muestran en la **Tabla 3.8**. También se proporciona información sobre los puntos de muestreo en la **información adicional, anexo BI Tabla BI.9, pág. 4**, para ver el mapa de los puntos de muestreo **ver información adicional, anexo BI Figura BI.1, pág. 267**.

En las muestras de sedimentos, las concentraciones más altas fueron encontradas para el TCS, MeP, BPA y NP en el punto ARG históricamente contaminado que se encuentra en el pequeño río tributario Arga aguas abajo de la EDAR en Pamplona. Para muestras de lodos de depuradora, los niveles fueron aproximadamente 50 veces más altos, el análisis reveló la presencia de TCS en todas las muestras analizadas a niveles altos, que iban de 1.6 a 9.1 µg/g, para el NP iban de 4.2 a 29 µg/g. También se encontraron niveles de NP2EO en todas las muestras a concentraciones entre 0.62 y 3.4 µg/g.

Tabla 3.8 Valores de concentración (ng/g) de los compuestos estudiados en sedimentos de ríos y lodos de depuradora en la cuenca del Ebro durante una campaña en 2010

Compuesto	Sitio de muestreo – Muestras de sedimentos de río								Sitio de muestreo – Muestras lodo de depuradora				
	ARG	NAJ	EBR4	GAL2	HUE	EBR6	SEG	EBR9	WWTP1	WWTP2	WWTP3	WWTP4	WWTP5
E1	0.61	nd	nd	nd	0.38	0.45	nq	0.97	56	73	nd	nd	nd
E1-3S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.6	nd	nd	nd	nd
E3-3S	nd	nd	nd	nd	nd	0.26	0.064	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E2-17G	nd	1.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	40	42	29	nd	nd
E1-3G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.73	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TCC	1.6	nd	nd	nd	10	2.7	nd	nd	47	103	nd	63	151
TCS	58	8.7	nd	2.4	28	38	nd	14	2842	3374	9093	1612	2754
MeP	76	71	5.3	4.7	49	42	30	30	360	384	751	nd	527
EtP	0.22	0.79	nd	nd	nd	nd	0.074	nd	8.9	nd	nd	nd	nd
PrP	0.24	0.98	3.9	1.5	5.2	1.3	0.5	0.9	77	39	173	39	174
BPA	100	5.8	5.6	4.5	61	11	nd	nd	3590	262	nd	nd	nd
OP	nd	10	nd	nd	nd	9.4	45	nd	nd	nd	234	nd	nd
NP	414	36	89	89	538	80	60	108	4183	29416	6452	17460	8451
NP1EC	11	nd	nd	0.18	45	4.1	nd	1.1	359	nd	457	655	745
OP2EO	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28	nd	nd	nd	37
NP2EO	19	2.4	2.1	1.4	72	7.3	5.4	3.8	662	2365	3386	819	1135
BT	13	nd	160	1.7	11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TT	14	2.7	0.58	0.52	6.8	2.9	2.8	0.84	349	183	286	799	143
TBEP	9.1	10	6.8	4.2	17	20	9.0	5.0	651	1825	2191	879	301
TCPP	12	36	4.6	9.1	459	80	197	4.2	429	711	912	909	452
TCEP	1.3	1.4	0.65	2.1	35	2.9	8.9	8.4	nd	nd	nd	nd	nd
Caff	7.3	5.3	5.0	8.6	18	20	4.9	7.0	352	nd	nd	nd	87

Conclusiones

Se ha desarrollado y optimizado un nuevo método basado en PLE seguido de limpieza online utilizando columnas TFC para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en muestras de sedimentos de río y lodos de depuradora. La técnica proporcionó una alta sensibilidad para la detección de EDCs debido al reducido ruido de fondo MS/MS. El método de purificación permite el análisis de trazas simultáneas de EDCs pertenecientes a diferentes familias y con diferentes estructuras y propiedades sin la necesidad de realizar laboriosos pasos de limpieza utilizando SPE offline, lo que resulta en un tiempo de análisis total de aprox. 50 min en lugar de 3 h.

El uso de un sistema LC de doble columna con un sistema de "multiplexing", permitió una efectiva optimización que resultó en una reducción de las interferencias de matriz y un análisis mejorado, obteniendo LODs más bajos, alcanzando 2.5 pg/g y 31 pg/g para muestras de sedimentos y lodos residuales, respectivamente. Además, se obtuvieron recuperaciones aceptables y una reducción importante en los efectos de la matriz con respecto a la metodología de purificación SPE convencional, para todos los compuestos y matrices estudiadas, utilizando estas nuevas técnicas.

3.4 Discusión/Estado actual

Niveles de detección en las matrices analizadas, PNECs y estado legislativo actual

Analizando los resultados obtenidos desde un punto de vista de las necesidades medioambientales en cuanto a los niveles a detectar en las matrices analizadas, se han comprado los LODs obtenidos en las distintas metodologías optimizadas con los valores de PNECs expuestas en el apartado 1.2.3 pág. 26 Así como con los LODs exigidos actualmente por la legislación europea. Esta información se presenta de manera resumida en la **Tabla 3.9**.

Tabla 3.9. Valores de PNEC en agua dulce y sedimentos, LODs en agua de río y sedimentos (EQuan-L.C-MS/MS y TurboFlow-L.C-MS/MS, respectivamente) y valores legislados por la EC en aguas superficiales¹¹¹

Compuesto	PNEC en agua dulce (ng/L)	LODs en agua de río (ng/L)	Legislación EC en aguas superficiales (ng/L)	PNEC en sedimento (ng/g)	LODs en sedimentos (ng/g)
E2	0.4	0.037	0.4 ^a	0.016	0.069
E1	3.6	0.050	0.4 ^a	38.4	0.031
E3	60	0.17	-	547	0.21
EE2	0.035	0.14	0.035 ^a	-	0.099
DES	440	0.043	-	-	0.071
E1-3S	20500	0.0038	-	4190	0.011
E3-3S	21200	0.030	-	-	0.0062
E2-17G	6580	0.46	-	1043	0.021
E1-3G	8380	0.056	-	1348	0.017
E3-16G	-	0.059	-	-	0.025
TCC	1.1	0.036	-	0.23	0.088
TCS	20	0.17	-	8.34	0.21
MeP	5000	0.20	-	21.9	0.22
EtP	13300	0.27	-	128	0.015
PrP	12300	0.021	-	116	0.043
BeP	2950	0.031	-	23.1	0.018
BPA	240	0.11	-	15.1	0.24
OP	100	0.14	100 ^b	8.26	0.059
NP	300	0.013	300 ^b	0.48	0.47
OP1EC	580	0.065	-	65.6	0.0094
NP1EC	2000	0.034	-	3.2	0.014
OP1EO	790	17	-	1.27	1.7
NP1EO	640	62	-	62.3	3.2
OP2EO	-	0.011	-	-	0.0042
NP2EO	370	0.013	-	47.5	0.029
BT	7770	0.072	-	31.2	0.010
TT	8000	0.013	-	12.8	0.0049
TBEP	140	0.0024	-	0.23	0.0025
TCEP	4000	0.034	-	9.27	0.0087
Caff	1200	0.021	-	5.61	0.0089

^a(Decisión de Ejecución (UE) 2015/495; Decisión de Ejecución (UE) 2018/840)

^b(Directiva 2013/39/UE)

¹Los LODs marcados en rojo exceden los valores de PNEC establecidos

3. Desarrollo de métodos analíticos

En lo que se refiere a valores de PNEC, los métodos desarrollados presentan LODs, tanto para aguas superficiales como para sedimentos, por debajo de las concentraciones precedidas sin efecto, excepto para algunos de los compuestos que a lo largo del desarrollo experimental de esta tesis y discutido en este capítulo presentan mayores dificultades de análisis, como son los APEOs y los estrógenos. En el caso de los APEOs, por las dificultades de ionización/fragmentación de estos compuestos APEOs, y para los estrógenos, por su gran poder disruptor a concentraciones muy bajas.

Debido a la vinculación de estos valores de PNEC con la regulación de ciertos compuestos analizados, y centrando la discusión en este punto, en el momento del desarrollo experimental presentado en este capítulo la legislación europea en cuanto a niveles medioambientales permitidos resumida en la Directiva Marco del Agua (DMA), ver apartado 1.1, pág. 3, tan solo se incluían restricciones para los compuestos alquilfenólicos NP y OP, llegando los métodos presentados a lograr LODs por debajo de los exigidos.

Fue en 2015 cuando la Comisión Europea incluyó el 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) y 17 α -etinilestradiol (EE2) en la lista de vigilancia de sustancias para el seguimiento y se declaró en la Decisión 2015/495/UE que los límites máximos aceptables de detección del método fueran de 0.4 ng/L para el E2 y E1 y 0.035 ng/L para el EE2, para este último compuesto, y al ser las metodologías desarrolladas en esta tesis anteriores a esta exigencias, igualmente remarcando como se verá a continuación que la tarea para alcanzar estos límites sigue siendo hoy en día una meta costosa.

Determinación de EDCs en las matrices estudiadas, metodologías actuales

Teniendo en cuenta que las metodologías desarrolladas en esta tesis fueron publicadas entre 2013 y 2014, es importante en este apartado de discusión intentar resumir el estado actual de las estrategias metodológicas similares a las presentadas para conocer las posibles diferencias y mejoras que se han desarrollado en los últimos años.

Existen algunos artículos “reviews” actuales que resumen nuevas estrategias y LODs obtenidos para los compuestos de interés, concretamente se han buscado referencias enfocadas a los compuestos más vigilados a día de hoy (Dimpe and Nomngongo, 2016; Martín-Pozo et al., 2019; Omar et al., 2016). En el apartado de la introducción 1.5.2, pág. 51, concretamente en las tablas resumen pág. 54, ya se resumió las técnicas más interesantes publicadas por otros autores, ya sea desde el punto de vista de innovadoras o bien también los artículos posteriores a esta tesis que se consideraron más relevantes en principio y sobre todo por alcanzar LODs bajos, su rapidez, robustez, exactitud y precisión principalmente.

Revisado este apartado de la introducción, ya se puede empezar a intuir que los límites que demanda la legislación sobre todo para el estrógeno sintético EE2, no es fácil de alcanzar. Igualmente, en este apartado y a continuación se ampliará la información facilitada en la introducción focalizándose en los estrógenos y su demanda legislativa (Directiva 2000/60/CE, <https://ec.europa.eu/environment/water/>; Decisión de Ejecución (UE) 2015/495; Watch List Development, 2015).

El método online EQuan-LC-MS/MS desarrollado, presenta para aguas de río LODs de 0.04 ng/L para E2 y 0.050 ng/L para E1, llegando por tanto, a los límites establecidos por la legislación, en el caso del estrógeno sintético EE2, esta metodología sólo alcanza un LOD de 0.14 ng/L. Siendo, sin embargo, límites aceptables ya que no existen demasiados métodos publicados, sobre todo anteriores a esta tesis, tanto con aproximaciones online, como mediante técnicas offline preconcentrando grandes volúmenes de muestra, que alcancen estos límites legislativos, más asequibles para el E2 y E1 (Kumar et al., 2009; Kuster et al., 2008), no obteniéndolos no obstante para el EE2.

Por tanto, lograr estos límites en muestras ambientales reales (es decir, agua superficial) es un logro extremadamente difícil que requiere grandes volúmenes de extracción en fase sólida (SPE), o enfoques ya sean offline o online específicos, combinados con la espectrometría de masas de alta sensibilidad de última generación (Guedes-Alonso et al., 2014), que normalmente además requieren metodologías muy específicas focalizadas exclusivamente al estudio de estos compuestos (Barreca et al., 2019; Glineur et al., 2020; Lardy-Fontan et al., 2018).

Volviendo a las metodologías desarrolladas en esta tesis, aunque las metodologías online propuestas, concretamente para aguas superficiales, no alcanza los límites establecidos hoy en día por la DMA, este estudio, es un punto de partida para el desarrollo de métodos más específicos centrados en un menor número de compuestos, pero de gran importancia y que han estado nombrados y/o legislados por la DMA o con PNECs bajas y por tanto de gran impacto en el medioambiente. Con este enfoque por ejemplo Čelić et al., desarrollaron en 2017, un método más específico para el análisis de estos compuestos en aguas de río y residuales. Mediante la optimización caudal de carga de la muestra, tiempo de elución, porcentaje de disolvente orgánico en la mezcla de eluyente acuoso-orgánico, y añadiendo un estudio de la influencia del pH de la muestra en la eficiencia de adsorción en las columnas de SPE, lograron alcanzar estos nuevos objetivos (Čelić et al., 2017).

Por último, cabe mencionar, que en los últimos años la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) para la determinación de contaminantes orgánicos, entre ellos los EDCs en matrices ambientales ha mostrado avances significativos y por tanto ha empezado a tener relevancia (Aceña et al., 2015; Leendert et al., 2015). Aunque, incluso aplicando estas nuevas aproximaciones, la obtención de los límites establecidos por la legislación a corto plazo, siguen siendo un reto.

Las ventajas de la LC-HRMS son principalmente la combinación del análisis cualitativo y cuantitativo simultáneamente, permitiendo el estudio por ejemplo de los EDCs desde dos aproximaciones, por una parte, los equipos de alta resolución nos permiten la cuantificación de los compuestos de interés combinado con la elucidación de posibles metabolitos de interés no conocidos. Además, la alta resolución puede mejorar la cuantificación inequívoca de los compuestos objeto de estudio en matrices complejas discriminando posibles interferencias.

Los primeros estudios de EDCs en matrices ambientales aplicando la alta resolución utilizaban espectrómetros de masas cuadrupolos híbridos con detección de masa exacta por tiempo de vuelo (QqTOF). Este tipo de instrumentación ha mejorado su sensibilidad en los últimos años, y teniendo en

3. Desarrollo de métodos analíticos

cuenta su selectividad ha sido aplicado para la determinación de estrógenos en aguas (Farre et al., 2007) y sedimentos (Labadie and Hill, 2007) y para el análisis de distintos grupos de compuestos como los PPCPs y hormonas en lodos (Peysson and Vulliet, 2013; Wang et al., 2012).

La más reciente tecnología híbrida de espectrómetro de masas de Trampa Iónica-Orbitrap (LTQ-Orbitrap), que utiliza las ventajas en rapidez y monitorización de MSⁿ de la trampa iónica convencional con la alta resolución, también ha sido utilizada para la determinación de alguno de los compuestos estudiados como por ejemplo los estrógenos, PCPs, BPA y compuestos alquilfenólicos (Chen et al., 2016) o para la determinación de benzotriazoles (Loi et al., 2013) en aguas. Aunque tanto la determinación cuantitativa y cualitativa con este tipo de tecnología requiere una optimización exhaustiva o un nivel avanzado de análisis de datos, respectivamente.

Capítulo 4

Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

4.1 Introducción

Una vez desarrollados los métodos analíticos presentados en el capítulo anterior, estos fueron aplicados para la determinación de EDCs y compuestos relacionados en distintos ríos de la Península Ibérica dentro del marco del proyecto SCARCE. Este proyecto tenía como objetivo principal evaluar el estado de los ríos de nuestro país, analizando por tanto la ocurrencia y niveles de un gran número de contaminantes orgánicos en un gran número de puntos de muestreo. Una introducción resumida y objetivos del proyecto se exponen a continuación (Petrovic et al., 2011).

Programa de vigilancia ambiental. Proyecto SCARCE

La preservación de los recursos acuáticos debe considerarse una preocupación importante tanto para la integridad del ecosistema como para la salud y el bienestar humanos. Garantizar la sostenibilidad ambiental, reducir la pérdida de biodiversidad y reducir la proporción de personas sin acceso a agua potable se citan explícitamente como parte de los Objetivos de Desarrollo del Milenio fundamentales establecidos por la Asamblea General de las Naciones Unidas en su reunión del Milenio en 2000 (Walter V. Reid and et al., 2005). Los recursos hídricos se ven afectados directa e indirectamente por actividades antropogénicas (por ejemplo, cambios en el uso de la tierra) y factores naturales (por ejemplo, cambio climático), es decir, el cambio global. Dos de los resultados más evidentes del cambio global son las pérdidas de cantidad y calidad del agua, ambos esenciales para la preservación de los ecosistemas y la seguridad del agua para uso humano (bebida, agricultura e industria) (Vörösmarty et al., 2010).

El agua ha sido un motor importante del desarrollo socioeconómico en toda la cuenca mediterránea, a pesar de su variabilidad temporal típica. La creciente manipulación antropogénica de la hidrología y la exacerbación del cambio climático han dado lugar a una variabilidad temporal aún mayor. En particular, los arroyos mediterráneos están sufriendo graves alteraciones en el régimen de caudales debido a la disminución del número de días de precipitación y al aumento de los días con lluvias intensas. El desequilibrio entre los recursos hídricos disponibles durante las sequías prolongadas y la creciente demanda de agua antropogénica da lugar a importantes problemas ecológicos y económicos. En consecuencia, la disponibilidad de agua se ha convertido en un problema importante para todos los gobiernos de las regiones mediterráneas. Sin embargo, las consecuencias del cambio global no solo afectarán la disponibilidad de agua, sino también la calidad del agua y los servicios de los ecosistemas.

El proyecto polivalente SCARCE, tuvo como objetivo describir y predecir la relevancia de los impactos del cambio global en la disponibilidad de agua, la calidad del agua y los servicios ecosistémicos en las cuencas hidrográficas del Mediterráneo de la Península Ibérica, así como sus impactos en la sociedad y la economía humanas. Reuniendo un equipo multidisciplinar de científicos destacados en los campos de la hidrología, geomorfología, química, ecología, ecotoxicología, economía, ingeniería y modelización, en un esfuerzo desconocido en el marco CONSOLIDER. El proyecto también contó con la participación activa de las Autoridades del Agua y otros agentes relevantes como partes interesadas. El proyecto se inició el 17 de diciembre de 2009 y tuvo una duración de 5 años.

4. Estudio de los resultados obtenidos en los ríos Ibéricos

Los objetivos secundarios del proyecto fueron: i) abordar cuestiones de investigación básica que definirían los patrones a largo plazo y los mecanismos reales que operan en la hidrología, la calidad del agua, la dinámica del hábitat y la estructura y función del ecosistema de las cuencas hidrográficas del Mediterráneo; ii) evaluar los efectos del clima y la huella humana (tomados ambos como elementos clave del cambio global) en los servicios de los ecosistemas de agua dulce, así como con la urgente necesidad de finalizar, implementar, y, finalmente, perfeccionar los planes hidrológicos de cuenca exigidos por la Directiva marco del agua de la UE.

Expuesto el alcance del proyecto, los métodos multiresiduos online para una rápida determinación de los compuestos de interés eran necesarios. Además, y de forma paralela al proyecto, para algunos de los grupos de contaminantes evaluados, incluidos los EDCs, este estudio se quiso complementar con la evaluación de distintas EDARs a lo largo de las cuencas monitoreadas, evaluando de manera general su eficacia, a través del monitoreo de sus aguas de afluente y efluente, así como los lodos de depuradora generados. Los resultados del estudio de EDCs y compuestos relacionados se presentan a continuación, divididos en dos apartados, en el primero se exponen los de niveles de estos en los ríos estudiados, publicación 3. Para a continuación, en el apartado 4.3, centrarse en los niveles determinados en las EDARs estudiadas, los datos de este último apartado no fueron publicados, aunque para seguir la misma estructura, han sido expuestos con el mismo formato presentado en las publicaciones científicas publicadas incluidas en esta tesis.

4.2 Niveles determinados en aguas y sedimentos de río

Basado en la publicación científica 3:

Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers

Gorga M., Insa S., Petrovic M., Barceló D.

Science of the Total Environment (2015); 503-504: 69-86

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.037>

Resumen

La presencia ambiental de productos químicos capaces de afectar el sistema endocrino se ha convertido en un asunto de preocupación científica y pública después de que ciertos compuestos disruptores endocrinos (EDCs) se hayan detectado en el medio ambiente acuático.

En este trabajo, se estudiaron 31 EDCs diferentes, compuestos relacionados y EDCs sospechosos pertenecientes a diferentes clases de contaminantes: 10 estrógenos, naturales y sintéticos, 8 compuestos alquilfenólicos, bisfenol A, triclosán y triclocarbán, 4 parabenos, 2 benzotriazoles, 3 compuestos organofosforados retardantes de llama y plastificantes, y el marcador químico cafeína, en aguas de ríos y sedimentos de cuatro ríos ibéricos (Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir). Se realizó un muestreo exhaustivo en dos campañas de monitoreo (2010 y 2011). Se recogieron un total de 77 muestras de agua y 75 sedimentos.

Para esta propuesta, se aplicaron dos métodos analíticos multiresiduos diferentes, utilizando la cromatografía líquida online automatizada EQuan™/TurboFlow™ junto con la detección por espectrometría de masas en tándem.

En términos de concentraciones, los compuestos determinados en las concentraciones promedio más altas fueron: monocarboxilado de nonilfenol (NP1EC), tolitriazol (TT), tris(cloroisopropil) fosfato (TCPP) llegando a concentraciones promedio superiores a 100 ng/L, seguido de 1H-benzotriazol (BT) y tris(butoxietil) fosfato (TBEP) encontrados a una concentración promedio superior a 50 ng/L. Se detectaron hormonas naturales y sintéticas en niveles bajos que no excedían los 16 ng/L y 7 ng/g para agua y sedimento, respectivamente, sin embargo, contribuyeron a más del 80% de la estrogenicidad total de las muestras (expresadas como equivalentes de estradiol EEQ, ng/L o ng/g). Con respecto a la distribución espacial de estos contaminantes, se descubrió que el río Llobregat era la cuenca fluvial más contaminada, con sitios cerca de la desembocadura del río con la mayor carga contaminante. En la cuenca del río Ebro se identificaron varios puntos calientes y Júcar mostró ser el menos contaminado. En general, el estudio confirmó la presencia de mezclas complejas de contaminantes no regulados, lo que genera preocupación por sus potenciales efectos interactivos.

Introducción

Ciertos compuestos disruptores endocrinos (EDCs) se han encontrado omnipresentes en el medio ambiente acuático (Barceló y Petrovic, 2007, Jonkers, 2010, Kuster et al., 2008, Snyder et al., 2001). Algunos de estos contaminantes se encuentran en una gran variedad de productos, con diferentes estructuras y propiedades, comúnmente utilizados en la vida diaria (detergentes, productos de cuidado personal como cosméticos, productos farmacéuticos y en diferentes formulaciones industriales). A dosis bajas pueden afectar a organismos acuáticos produciendo trastornos tales como problemas de desarrollo sexual, feminización de los machos o efectos masculinos en las hembras e infertilidad (Brian et al., 2005). Se ha demostrado que la exposición continua a largo plazo a una mezcla de sustancias a bajas concentraciones puede causar un efecto, aunque las concentraciones individuales estén por debajo de los niveles de efecto (Sumpter y Johnson, 2005). Por lo tanto, es importante que, en los estudios de campo, la aparición de estas sustancias en el medio ambiente se enfoque simultáneamente en el análisis multicompuesto de EDCs.

En los últimos 10 años, se han desarrollado diferentes herramientas, modelos y datos innovadores para mejorar la comprensión de los riesgos potenciales de los EDCs para la salud humana y la vida salvaje. Estos estudios han aplicado diferentes enfoques químicos o biológicos y han proporcionado un amplio conjunto de resultados que se utilizan como base para mejorar la comprensión y regular los diferentes tipos de EDCs. A pesar de eso, aún para muchos compuestos, la distribución geográfica, las entradas y la ocurrencia o distribución en diferentes compartimentos ambientales no están completamente documentados y entendidos.

Centrando nuestra atención en el territorio español, la cuenca mediterránea es una de las regiones más vulnerables del mundo al cambio global debido a las condiciones climáticas caracterizadas por sequías frecuentes y otras presiones sobre los recursos hídricos. Los ríos ibéricos se caracterizan por importantes fluctuaciones en los caudales y fuertes presiones de contaminación por extensas actividades urbanas, industriales y agrícolas. Esto se traduce en niveles de contaminación mayores que los encontrados en otras cuencas europeas (Petrovic et al., 2011). Sin embargo, solo existen varios estudios publicados sobre la detección de EDCs y la evaluación de la estrogenicidad en el agua y los sedimentos de los ríos ibéricos (Brix et al., 2010, Céspedes et al., 2005, Petrovic et al., 2002a).

Los EDCs pueden ingresar a las aguas superficiales mediante una variedad de mecanismos que incluyen la descarga directa de aguas residuales industriales y domésticas, la descarga de efluentes de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), las aguas agrícolas que van a parar a los ríos y el flujo por tierra después de las lluvias.

En este trabajo se han analizado y estudiado exhaustivamente varios grupos de EDCs y compuestos relacionados en cuatro cuencas Ibéricas (Llobregat, Ebro, Júcar y Guadalquivir). Los compuestos analizados incluyeron la familia de estrógenos, como el estradiol (E2), una hormona sexual natural, sus principales metabolitos, estriol (E3) y estrona (E1) y sus conjugados, sulfatos y glucurónidos. También se estudió el estrógeno sintético etinilestradiol (EE2), entre otros.

Otros grupos importantes de EDCs, estudiados en este trabajo, fueron los etoxilados de alquilfenol (APEOs), tensioactivos no iónicos ampliamente utilizados en diversas formulaciones industriales y de limpieza (Talmage, 1994). Con respecto a sus productos de biotransformación, estos incluyeron los mono-, dietoxilados y carboxilados y alquilfenoles (AP), como el nonilfenol (NP) y el octilfenol (OP), todos ellos contaminantes acuáticos generalizados (Bennie, 1999).

Debido a su actividad estrogénica, varios compuestos pertenecientes a estos dos grupos de EDCs (hormonas y alquilfenoles) se han incluido en una lista de contaminantes prioritarios y, como tales, están regulados. Más específicamente, el NP y OP han sido incluidos como sustancias peligrosas prioritarias en el campo de la política del agua por la Directiva Marco del Agua de la Comunidad Europea, 2000/60/CE y la decisión final de la Unión Europea N ° 2455/2001/CE, mientras que E2 y EE2 se han incluido recientemente en la lista de vigilancia de sustancias, candidatas para su inclusión en la lista de sustancias prioritarias (Directiva, 2013/39/UE, 2013).

Este estudio también incluye algunos EDCs bien conocidos, como el bisfenol A (BPA) que se utiliza principalmente en la producción de plásticos de policarbonato y resinas epoxídicas. Además, otros productos químicos antropogénicos con potenciales propiedades disruptivas endocrinas, como los antimicrobianos triclocarbán (TCC) y triclosán (TCS), parabenos, compuestos organofosforados retardantes de llama y plastificantes y triazoles anticorrosivos también se han incluido en la lista de compuestos objeto de estudio.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la ocurrencia y distribución espacial de varios EDCs en muestras de agua de río y sedimentos en cuatro cuencas hidrográficas representativas en España (Llobregat, Ebro, Júcar y Guadalquivir). Para ello, se realizó un amplio muestreo de agua y sedimentos de río en dos campañas de monitoreo (2010 y 2011). Se recogieron un total de 77 muestras de agua y 75 sedimentos para la caracterización química. Con el fin de estimar la estrogénicidad de las muestras, los equivalentes de estradiol (EEQ) se calcularon utilizando la potencia estrogénica relativa (en relación con 17 β -estradiol).

Experimental

Sitios de muestreo

Se recogieron muestras de agua de ríos y sedimentos durante dos campañas de muestreo (2010 y 2011) en 77 sitios de ríos ibéricos: 24, 14, 15 y 24 puntos de muestreo en los ríos Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir, respectivamente. El mapa de las cuencas de los ríos con los puntos de muestreo se muestra en la **Figura 4.1** y los detalles sobre los sitios de muestreo se proporcionan en la **información adicional, anexo BII Tabla BII.1.a-c, pág. 275**.

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

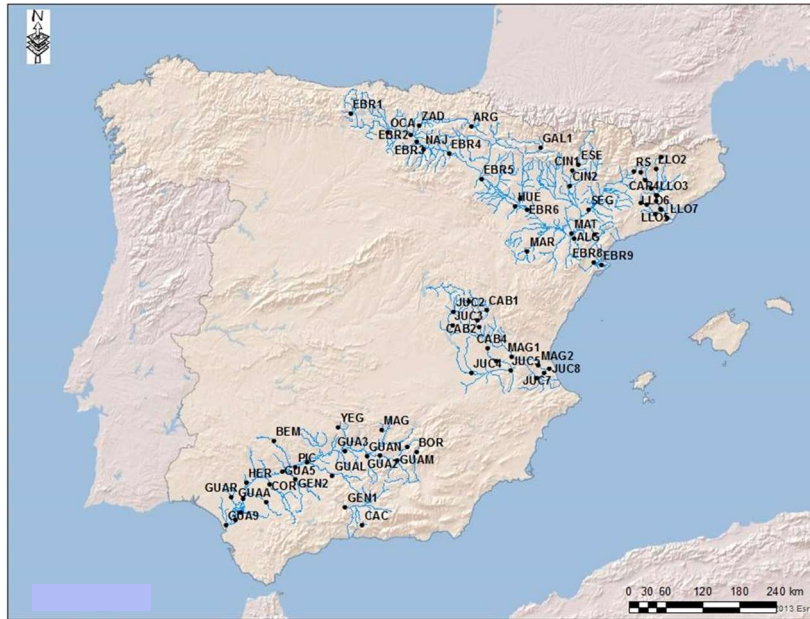


Figura 4.1 Sitios de muestreo. Mapa de los Ríos Ibéricos muestreados

El río Ebro es el río más importante de España, con una longitud de 928 km y una cuenca de drenaje de 85.550 km². También genera el Delta del Ebro, una de las zonas de humedales más grandes (320 km²) en la región del Mediterráneo occidental, que se considera en gran medida el Parque Natural del Delta del Ebro. Debido a su intensa actividad agrícola e industrial y la sobreexplotación de los recursos hídricos, la calidad del suelo y del agua se ha deteriorado.

El río Llobregat es el segundo río más largo de Cataluña, con una longitud total de más de 170 km. Como un río mediterráneo típico está regularmente sujeto a inundaciones y sequías periódicas que conducen a frecuentes variaciones morfológicas en el lecho del río. Además, este río es uno de los principales recursos de agua potable de Barcelona (Cataluña, NE España) que también recibe sus extensas descargas de aguas residuales urbanas e industriales. En consecuencia, las aguas tienen una alta concentración de pesticidas, surfactantes, productos farmacéuticos y compuestos estrogénicos con importantes efectos en las comunidades biológicas.

La cuenca del río Júcar se encuentra en el este de España. Tiene un área de 21,632 km², una longitud de la corriente principal de aproximadamente 500 km y una precipitación promedio de 510 mm/año. Esta cuenca está sujeta a una fuerte regulación, con una capacidad de depósito total de 2643 hm³ y se caracteriza por actividades agrícolas intensivas.

El río Guadalquivir se encuentra en el sur de España y tiene una longitud de 657 km en una región con más de 7 millones de habitantes, que recibe muchas entradas, tanto de origen natural como antropogénicas, que causan el deterioro de la calidad del agua. El río es navegable hasta Sevilla (unos 90 km río arriba), un importante puerto interior. El estuario tiene un valor ecológico añadido debido a la presencia del Parque Nacional de Doñana. La cuenca baja del río Guadalquivir se ve afectada por embalses y presas y su régimen es bastante artificial. Además, más de 700000 Ha de su cuenca se

dedican a la agricultura, con una producción muy alta de arroz, especialmente en el curso inferior del río que atraviesa extensas marismas, aceitunas o frutas.

Las siguientes muestras se tomaron en sitios específicos de los ríos con diferentes características: (i) sitios de referencia: LLO1 y LLO2 (Llobregat), EBR1, OCA y RS (Ebro) y BOR, GUA1, MAG, BEM y CAC (Guadalquivir) cerca de la fuente del río; CAR1 (Llobregat), GAL1, MAR y ESE (Ebro), JUC1 y MAG1 (Júcar) y GUAM, COR y GUAR (Guadalquivir); (ii) puntos de muestreo que reciben el impacto de la actividad agrícola; LLO3 y ANO1 (Llobregat), EBR3, NAJ, GAL2, MAT y ALG (Ebro), JUC4, CAB1, CAB2, CAB3 y CAB4 (Júcar) y GUA2, GUA3, YEG, GUAL, PIC y HER (Guadalquivir); (iii) sitios de muestreo que reciben el impacto de una gran ciudad y/o actividad industrial: LLO4 y ANO2 (Llobregat), EBR2, ZAD, HUE y CIN2 (Ebro), JUC2, CAB5, JUC6, JUC7 y MAG2 (Júcar) y GUA5 y GUAA (Guadalquivir); (iv) puntos de muestreo situados aguas abajo de una EDAR: CAR2 y LLO5 (Llobregat) y JUC3 y JUC5 (Júcar) se encuentran aguas arriba de una EDAR; CAR3, CAR4, ANO3 y LLO6 (Llobregat), ARG, EBR4, EBR5, EBR6, CIN1, SEG, EBR7 y EBR8 (Ebro) y GUA4, GEN1, GEN2 y GUA6 (Guadalquivir); (v) los últimos puntos de muestreo al final de los ríos: LLO7 (Llobregat), EBR9 (Ebro), JUC8 (Júcar) y GUA7, GUA8 y GUA9 (Guadalquivir)

Recogida y almacenamiento de muestras

Se recogieron muestras de agua en botellas de vidrio ámbar y se transportaron al laboratorio en condiciones enfriadas (4°C). Tras la recepción, las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0.45 µm (Whatman, Reino Unido). Posteriormente, las muestras de agua se congelaron y se mantuvieron en el congelador a -20 °C hasta el análisis (máximo en 1 mes). Está demostrado que la congelación es segura durante al menos 1 mes para la mayoría de los productos farmacéuticos (Vanderford et al., 2011, Petrovic, 2014).

Las muestras de sedimento fueron envueltas en papel de aluminio, congeladas y transportadas a -20°C al laboratorio y finalmente liofilizadas. Las muestras liofilizadas se trituraron, se homogeneizaron usando un mortero, se tamizaron a través de un tamiz de 125 µm y finalmente se almacenaron a -20°C hasta el análisis.

Método analítico

Se aplicaron dos métodos analíticos multiresiduos diferentes para el análisis de agua de río y muestras de sedimentos, respectivamente, utilizando el sistema online automatizado Thermo Scientific EQuan™/TurboFlow™ seguido de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de triple cuadrupolo (TSQ Vantage) con una fuente ESI para detección de masas en tándem.

La metodología aplicada en este estudio para la determinación simultánea de EDCs y compuestos relacionados en muestras de agua fue desarrollada por (Gorga et al., 2013), descrita en el apartado 3.2, pág. 79, y consistió en un método completamente automatizado basado en el cambio de columna usando columnas EQuan™ para una preconcentración de muestra integrada y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (EQuan-LC-MS/MS).

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

En esta metodología, a 100 mL de muestra de agua de río se añadieron 100 µL de una solución de patrones internos de 250 µg/L y luego se inyectaron 5 mL de esta solución directamente en el sistema cromatográfico. Los compuestos de interés se concentraron en la columna de carga (Hypersil GOLD™ Aqua 20×2.1mm, 12µm de Thermo Scientific) mediante una corriente de fase móvil (acuoso: disolvente orgánico (98:2, v/v)) a un flujo-velocidad de 1.75 mL/min.

Posteriormente, se activó la válvula de conmutación de seis puertos y los analitos se transfirieron de la columna de preconcentración a la columna analítica (una columna de fase inversa ID C18 de 125×2 mm 5 µm, Purospher STAR RP-18 de Merck) utilizando las mismas fases móviles que las anteriores, el paso a través de ambas columnas se realizó a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min.

Cuando finalizó la transferencia, se giró la válvula de conmutación y los analitos se separaron de manera convencional. Para los compuestos detectados en condiciones de ionización negativa (NI), se usó un gradiente de agua y metanol. Los compuestos detectados en condiciones de ionización positiva (PI) se separaron usando el mismo programa de gradiente, pero las fases móviles se modificaron con 20 mM de formiato de amonio y 0.1% de ácido acético. Las condiciones de EQUAN-LC se muestran en el apartado 3.2, Tabla 3.1, pág. 85.

Para el análisis de EDCs en muestras de sedimento, se pesaron 2 g de peso seco (dw) de muestra de sedimento y se añadieron 100 µL de una solución de patrones internos a una concentración de 250 µg/L. Luego, se realizó una extracción de líquido a presión (PLE); el extracto se redujo bajo una corriente de nitrógeno suave y se redisolvió en 1 mL de metanol. Esta solución se centrifugó y se recogieron 0.5 mL de la parte superior del vial de centrifuga.

La metodología aplicada para la detección de los compuestos objetivo consistió en un método automatizado de cambio con doble columna utilizando cromatografía de flujo turbulento seguido de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (TFC-LC-MS/MS) publicada anteriormente (Gorga et al., 2014a), descrita en el apartado 3.3, pág. 95

Se inyectaron directamente 20 µL de la solución extraída, para los compuestos analizados en modo NI, los compuestos de interés fueron purificados en la columna TurboFlow™ (Cyclone, 0.5×50mm, tipo sílice) a 1 mL/min con ácido fórmico a pH=3.5 en agua como fase móvil, los analitos fueron retenidos, y la matriz de muestra se eluyó al contenedor de residuo. La columna TurboFlow™ se limpió durante 90s, con una solución acuosa a pH=8.5 y agua.

Para los compuestos detectados en modo PI, la columna de purificación utilizada fue una Cyclone-MCX (0.5×50mm) y la etapa de carga se llevó a cabo con formiato de amonio 20 mM, ácido acético al 0.1% en agua y las etapas 2 y 3 no fueron necesarias. Posteriormente, la bomba de carga empujó el contenido orgánico del circuito a través de la columna TurboFlow™ y el flujo se ralentizó a 0.2 mL/min para transferir los compuestos objetivo a la columna analítica. Finalmente, la separación cromatográfica se inició a un caudal de 0.3 mL/min mientras se limpiaba la columna TurboFlow™.

Durante los últimos pasos, el “loop” se volvió a llenar y las dos columnas se equilibraron para la siguiente inyección. La separación cromatográfica utilizada fue similar a la aplicada para el análisis de muestras de agua; las fases móviles fueron las mismas. Las condiciones de TFC-LC se muestran en el apartado 3.3, Tabla 3.6, pág. 100.

La detección se realizó utilizando un espectrómetro de masas TSQ Vantage, para muestras de agua y sedimentos. Los parámetros de MS/MS optimizados para el análisis por SRM de los analitos se proporcionan en el apartado 3.2, Tabla 3.2, pág.86, ver también anexo BI, Tabla BI.1, pág.267. Los parámetros de calidad/validación de los métodos EQuan/TFC-LC-MS/MS se muestran en el apartado 3.2, Tabla 3.4, pág. 90 y el apartado 3.3, Tabla 3.7, pág.105, respectivamente, junto a las otras matrices estudiadas en el capítulo 3 de desarrollo de métodos analíticos.

Estrogenicidad

La actividad estrogénica total en las muestras ambientales se determinó en relación con la actividad del estrógeno natural E2 y se expresó como EEQ (ng/L o ng/g).

Se usaron factores de estrogenicidad relativos a la literatura, determinados para cada EDC a través de un ensayo de levadura recombinante (RYA) para estimar la actividad estrogénica de los compuestos detectados en muestras de agua y sedimentos (Céspedes et al., 2004). Los factores de estrogenicidad relativos se definieron como la EC50 de cada compuesto en relación con la EC50 del 17-β-estradiol.

La EC50 se define como la concentración de contaminante que produce un 50% de respuesta máxima estrogénica de la misma. Usando el factor de estrogénesis relativo (EFFi o E2 equiv.) Y las concentraciones detectadas para cada compuesto (Ci), los equivalentes de estradiol (EEQ) se calcularon usando la siguiente fórmula: $EEQ (ng/L \text{ o } ng/g) = C_i \times E2 \text{ equiv.}$ La actividad estrogénica se evaluó solo para aquellos grupos de EDCs que tenían valores relativos de estrogenicidad en el estudio de (Céspedes et al., 2005), **ver información adicional, anexo BII Tabla BII.2, pág. 277.**

Resultados y discusión

Los niveles de concentración de estrógenos y conjugados naturales y sintéticos, compuestos alquilfenólicos, antimicrobianos/desinfectantes, conservantes, BPA, anticorrosivos y compuestos organofosforados en las cuencas ibéricas tanto en ríos como en sedimentos se presentan en la **Figura 4.2.a-c y Figura 4.3.a-c**, respectivamente. Consultar también la **información adicional, anexo BII Tabla BII.3.a-e, pág. 278.**

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Niveles determinados de EDCs en muestras de agua

Los niveles de concentración de hormonas de estrógenos naturales y sintéticas no superaron los 16 ng/L en ambas campañas realizadas. Específicamente, en las aguas de los ríos, los niveles más altos de hormonas se encontraron en la cuenca del Guadalquivir. Las hormonas naturales detectadas con mayor frecuencia fueron E2 y E1 con concentraciones máximas de 6.6 ng/L y 4.9 ng/L en Ebro, 2.2 ng/L y 6.2 ng/L en Llobregat, 0.8 ng/L y 3.4 ng/L en Júcar y finalmente 7.8 ng/L y 7.3 ng/L en el Guadalquivir, respectivamente.

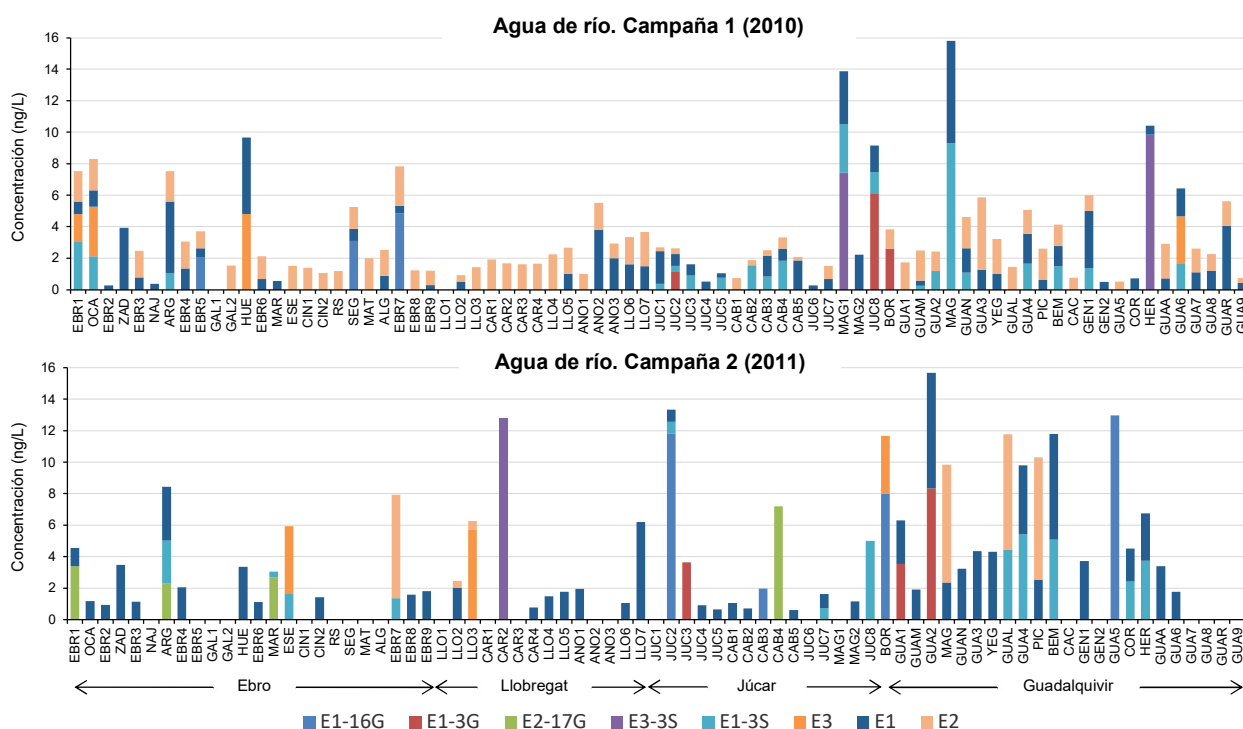


Figura 4.2.a Niveles de concentración de estrógenos y conjugados naturales y sintéticos en las aguas de río (campañas de muestreo 1 y 2)

Además, la hormona conjugada detectada con mayor frecuencia en las diferentes cuencas fue E1-3S, alcanzando 9.3 ng/L en MAG (Guadalquivir) durante la primera campaña. La hormona sintética EE2 solo se detectó durante la segunda campaña en la cuenca del Guadalquivir (GUA8). Estos resultados se compararon con los resultados publicados y que se presentan en la **Tabla 4.1.a-c**. Por ejemplo, los niveles de hormonas detectados en este estudio estuvieron en el mismo rango que en otros estudios, excepto en el caso de los ríos chinos donde se encontraron E2, E1 E3 y EE2 a concentraciones aproximadamente diez veces más altas (hasta 10 ng/L), estando al nivel de efectos endocrinos demostrables en especies de los medios acuáticos (Barel-Cohen et al., 2006, Cargouët et al., 2004, Laganà et al., 2004, Lei et al., 2009, Vethaak et al., 2005).

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Tabla 4.1.a Niveles de concentración de estrógenos naturales, sintéticos y conjugados en muestras de agua de río en diferentes lugares del mundo

Localización	Año	Compuesto	Niveles	Referencia
España. Río Anoia y Cardener	-	E2	nd	(Petrovic et al., 2002)
		E1	8.0 ng/L (media)	
		E3	6.3 ng/L (media)	
		EE2	nd	
España. Cuenca del Llobregat	Octubre 2003	E1	0.75 ng/L(máximo)	(Kuster et al., 2008)
		E3	nd	
	Abril 2004	E1-3S	1.32 ng/L (máximo)	
		E1	1.68 ng/L (máximo)	
		E3	11.6 ng/L (máximo)	
Francia. Paris siete ríos	-	E1-3S	0.79 ng/L (máximo)	
		E1	0.8-3.9 ng/L	(Cargouët et al., 2004)
		E2	0.8-3.6 ng/L	
		E3	0.6-3.1 ng/L	
EE2	0.6-3.5 ng/L			
Alemania	Verano 1999	E2	nd-1.0 ng/L	(Vethaak et al., 2005)
		E1	nd-7.2 ng/L	
		EE2	nd-0.4 ng/L	
Río Jordan	Mayo 2002	E2+E1	1.2-3.4 ng/L	(Barel-Cohen et al., 2006)
		E3	0.9-1.8 ng/L	
		EE2	1.1-1.3 ng/L	
	Octubre 2002	E2+E1	1.2-3.4 ng/L	
		E3	0.9-2.9 ng/L	
		EE2	0.9-3.3 ng/L	
Zona central de Italia	Marzo-Mayo 2002	E2	2-6 ng/L	(Laganà et al., 2004)
		E1	5-12 ng/L	
		E3	2-5 ng/L	
		EE2	nd-1 ng/L	
China. Ríos del área de Tianjin	Junio 2007	E2	nd-32.4 ng/L	(Lei et al., 2009)
		E1	0.64-55.3 ng/L	
		E3	nd-46.4 ng/L	
		EE2	nd-35.6 ng/L	
		DES	nd-8.51 ng/L	
Estudio actual	2010-2011	E2	nd-7.8 ng/L	
		E1	nd-7.3 ng/L	
		E3	nd-5.7 ng/L	
		EE2	nd-2.2 ng/L	
		DES	nd	
		E1-3S	nd-9.3 ng/L	
		E3-3S	nd-13 ng/L	
		E2-17G	nd-7.2 ng/L	
		E1-3G	nd-8.4 ng/L	
E3-16G	nd-13 ng/L			

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Centrando la atención en los compuestos alquilfenólicos, las concentraciones más altas de estos contaminantes se encontraron en sitios contaminados bien conocidos, cerca de grandes ciudades o cerca de áreas industriales en las cuencas de los ríos Llobregat y Ebro. Además de estas dos cuencas, en varios otros sitios se encontraron niveles significativos, como en MAG1 (Júcar), un punto de muestreo cerca de una aldea sin EDAR con concentraciones de 790 ng/L de NP1EC y GUA2 (Guadalquivir) donde las concentraciones de NP2EO, NP1EC y NP alcanzaron 605 ng/L, 340 ng/L y 292 ng/L, respectivamente. Analizando con más detalle los niveles detectados, se observó que, por ejemplo, en la cuenca del Ebro, había una mayor concentración de NP1EC en los puntos de muestreo con alta actividad industrial/agrícola o en puntos de muestreo aguas abajo de las grandes ciudades y su EDAR (ZAD, EBR3, EBR4, ARG, GAL2 y HUE), con una excepción, el punto de muestreo OCA, curso superior del Ebro, que presentó 882 ng/L y 327 ng/L de NP2EO y NP1EC, respectivamente. En la cuenca del Llobregat, se detectaron nuevamente altas concentraciones de NP1EC en puntos de muestreo con alto impacto agrícola/industrial o humano (LLO5, ANO2, ANO3, LLO6 y LLO7).

Otra observación importante se encuentra en la disminución significativa en los niveles de NP y OP desde 2000 que sugiere un retiro gradual y reemplazo de APEOs por la industria textil y de curtiduría española (Petrovic y Barceló, 2001, Céspedes et al., 2004). Comparando estos resultados con los obtenidos en otros países, los niveles de OP y NP en la cuenca del Llobregat han sido más bajos que en campañas anteriores, donde se alcanzaron concentraciones de 21.9 µg/L y 37.3 µg/L en 2001, respectivamente, encontrándose además hoy en día entre los niveles más bajos, siendo sólo inferiores en los ríos de Portugal (Jonkers, 2010). Con respecto al resto de compuestos alquilfenólicos en la cuenca del Llobregat, los niveles más altos se observaron en 2000, siendo nuevamente en estas dos últimas campañas los niveles más bajos detectados.

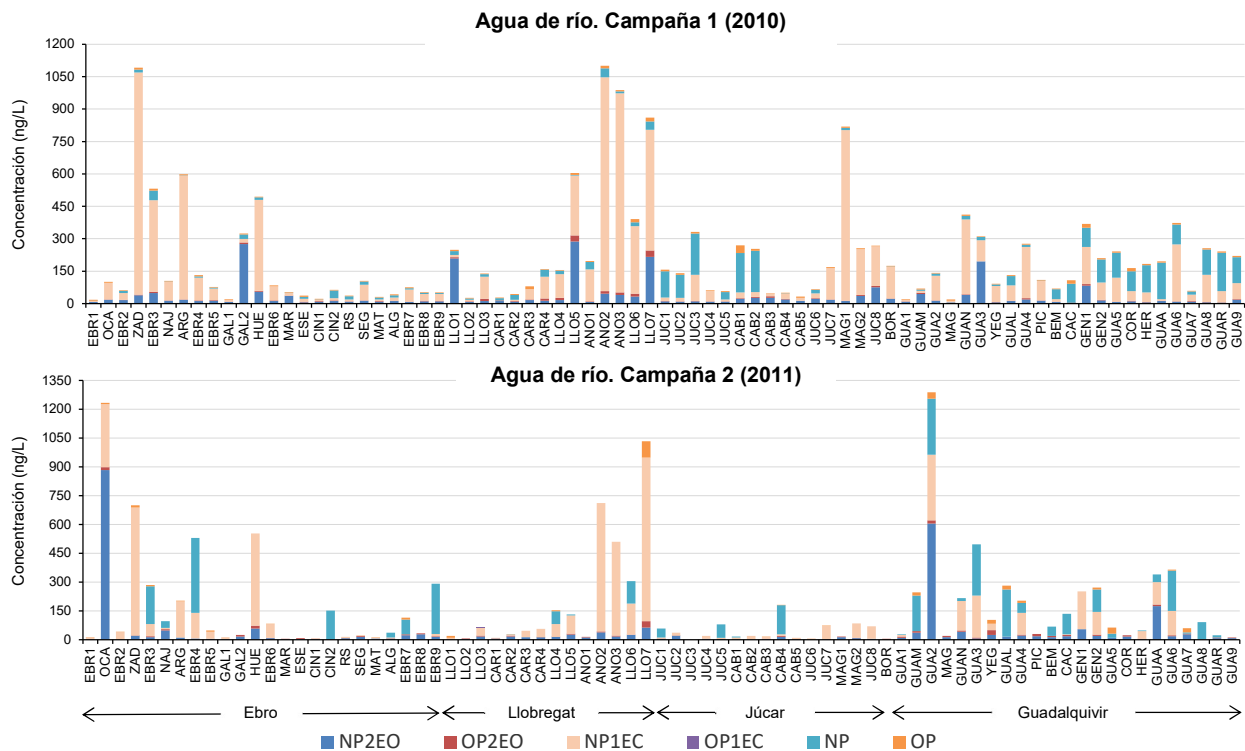


Figura 4.2.b Niveles de concentración de compuestos alquilfenólicos en las aguas de río (campañas de muestreo 1 y 2)

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Tabla 4.1.b Niveles de concentración de los compuestos alquilfenólicos en muestras de agua de río en diferentes lugares del mundo

Localización	Año	Compuesto	Niveles	Referencia
España. Río Anoia y Cardener	-	NP	0.5-15 µg/L	
España. Río Anoia	-	NPEO	11-41 µg/L	(Petrovic et al., 2002)
España. Río Cardener	-	NPEO	2.2-8.4 µg/L	
España. Río Anoia	Enero 2000	OP	nd	(Petrovic and Barceló, 2001)
		NP	2.4-15 µg/L	
		NPEC	0.3-35 µg/L	
		NPEO	11-28 µg/L	
España. Río Cardener	Enero 2000	OP	nd	(Petrovic and Barceló, 2001)
		NP	0.5-5.6 µg/L	
		NPEC	nd-4.6 µg/L	
		NPEO	2.2-7.4 µg/L	
España. Cuenca del Llobregat	2001	OP	nd-21.9 µg/L	(Céspedes et al., 2004)
		NP	nd-37.3 µg/L	
		NP1EO	nd-6.8 µg/L	
		NP2EO	nd-3.17 µg/L	
	Junio 2005	OP	nd-0.23 µg/L	(Brix et al., 2010)
		NP	0.04-0.45 µg/L	
		OP1EC	nd-2.43 µg/L	
		NP1EC	0.06-5.13 µg/L	
	Mayo 2006	NP2EO	nd-0.27 µg/L	(Brix et al., 2010)
		OP	nd-0.88 µg/L	
		NP	0.05-0.53 µg/L	
		OP1EC	nd-1.33 µg/L	
Noviembre 2006	NP1EC	0.08-6.11 µg/L	(Brix et al., 2010)	
	NP2EO	nd		
	OP	nd		
	NP	nd-0.14 µg/L		
Noviembre 2006	OP1EC	nd-2.18 µg/L	(Brix et al., 2010)	
	NP1EC	nd-3.49 µg/L		
	NP2EO	nd		
	NP2EO	nd		
Reino Unido. Río Taff	-	OP	nd-536	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
Reino Unido. Río Ely	-	OP	nd-1293 ng/L	
Alemania	Verano 1999	OP	nd-6300 ng/L	(Vethaak et al., 2005)
		NP	nd-4100 ng/L	
Zona central de Italia	Mazo-Mayo 2002	NP	1289-1466 ng/L	(Laganà et al., 2004)
Estados Unidos. Río de vuelta	2004	NP	0.49 µg/L	(Loyo-Rosales et al., 2007)
		OP	nd	
		NP1EC	0.056 µg/L	
Portugal. Ria de Aveiro. Ríos Águeda y Vouga	Agosto 2006	OP	nd-1.7 ng/L	(Jonkers, 2010)
		NP	nd	
		NP1EC	4.9-44 ng/L	
		NP1EO	nd-19 ng/L	
		NP2EO	nd-145 ng/L	
Portugal. Ria de Aveiro. Ríos Casler y Antua	Agosto 2006	OP	nd-2.3 ng/L	(Jonkers, 2010)
		NP	56-233 ng/L	
		NP1EC	463-6150 ng/L	
		NP1EO	21-156 ng/L	
		NP2EO	9.7-180 ng/L	
Estudio actual	2010-2011	OP	nd-85 ng/L	
		NP	nd-391 ng/L	
		OP1EC	nd-1.25 ng/L	
		NP1EC	nd-1546 ng/L	
		OP1EO	nd	
		NP1EO	nd	
		OP2EO	nd-33 ng/L	
		NP2EO	nd-882 ng/L	

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Otros contaminantes monitoreados fueron los retardantes de llama y plastificantes organofosforados, anticorrosivos, BPA, conservantes y antimicrobianos. Durante las dos campañas, el grupo que se encontró en las concentraciones más altas fueron los anticorrosivos, BT y TT, alcanzando 1623 ng/L de BT en ANO3 (Llobregat) y concentraciones de TT de 1751 ng/L en ZAD (Ebro) durante la campaña de muestreo 1. También se encontraron altos niveles de TCPP (sustituto de TCEP). Los niveles de BT, en comparación con los niveles de los ríos de Suiza (Giger et al., 2006), fueron más altos, solo superados en el río Glatt Valley (Suiza, noviembre de 2003 a abril de 2004), donde los valores de BT alcanzaron 5.44 µg/L. En el caso de TT, en el presente estudio su concentración fue un orden de magnitud mayor que los niveles detectados en los ríos de Suiza (Giger et al., 2006). Igual que en el caso de los alquiflenoles, altas concentraciones de estos contaminantes fueron encontradas en el agua recolectada en MAG1, una aldea sin EDAR, especialmente durante la campaña 1, llegando a concentraciones de BT, TT, TBEP y TCPP de 424 ng/L, 391 ng/L, 118 ng/L y 893 ng/L, respectivamente.

Se detectó BPA en todos los ríos, específicamente, a concentraciones máximas de 229 ng/L, 649 ng/L, 84 ng/L y 281 ng/L, en Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir, respectivamente. En comparación con los datos de otros estudios, las concentraciones detectadas fueron similares a las reportadas en el Reino Unido (río Taff y río Ely) (Kasprzyk-Hordern et al., 2008), Alemania (verano 1999) (Vethaak et al., 2005), zona central de Italia (mayo de 2002) (Laganà et al., 2004) y Portugal (Ria de Aveiro, ríos Águeda y Vouga, Ria, Casler y Antua, agosto de 2006) (Jonkers, 2010) con niveles de BPA de 68 ng/L, 40 ng/L, 1000 ng/L, 29 ng/L, 5.4 ng/L y 683 ng/L, respectivamente. Los antimicrobianos, TCC y TCS se detectaron a niveles inferiores de 3.4 ng/L y 19 ng/L, respectivamente, siendo similares a los niveles informados en el Reino Unido (24 ng/L) (Kasprzyk-Hordern et al., 2008) y un orden de magnitud menor que lo reportado previamente en el río Ebro en 2007 (Kantiani et al., 2008) (concentración máxima de 285 ng/L).

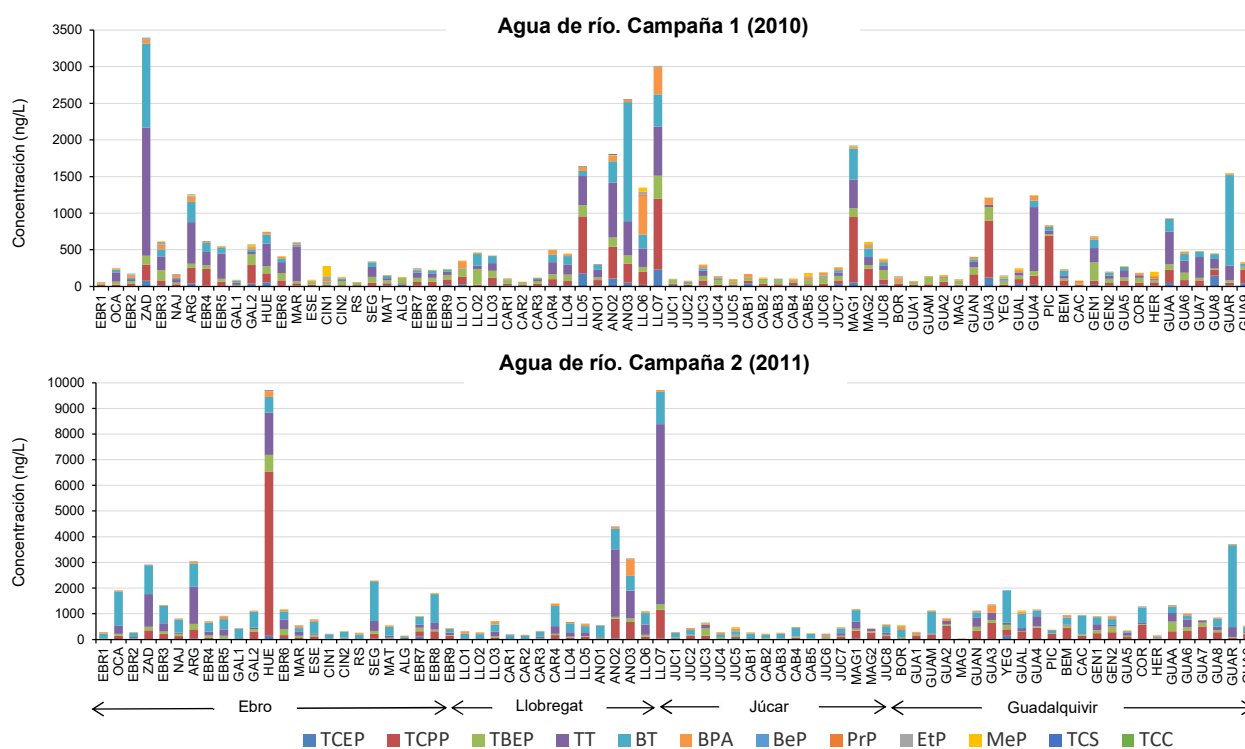


Figura 4.2.c Niveles de concentración de antimicrobianos, conservantes, BPA, anticorrosivos y compuestos organofosforados en las aguas de río

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Tabla 4.1.c Niveles de concentración de compuestos organofosforados, anticorrosivos, BPA, conservantes y desinfectantes en muestras de agua de río en diferentes lugares del mundo

Localización	Año	Compuesto	Niveles	Referencia
España. Río Anoia	Enero 2000	BPA	nd	(Petrovic and Barceló, 2001)
España. Río Cardener		BPA	nd	
España. Cuenca del Llobregat	2001	BPA	nd-2.97 µg/L	(Céspedes et al., 2004)
España. Cuenca del Ebro	2007	TCS	nd-285 ng/L	(Kantiani et al., 2008)
España. Cuenca del Llobregat		TCS	nd-45 ng/L	
Reino Unido. Río Taff	-	TCS	nd-95 ng/L	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
		MeP	nd-144 ng/L	
		EtP	nd-12 ng/L	
		PrP	nd-11 ng/L	
		BPA	nd-68	
Reino Unido. Río Ely	-	TCS	nd-24 ng/L	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
		MeP	nd-400	
		EtP	nd-15 ng/L	
		PrP	nd-24 ng/L	
		BPA	nd-40 ng/L	
Alemania	Verano 1999	BPA	nd-1000 ng/L	(Vethaak et al., 2005)
Zona central de Italia	Marzo-Mayo 2002	BPA	15-29 ng/L	(Laganà et al., 2004)
Suiza. Valle del río Glatt	Noviembre 2003 a Abril 2004	BT	0.16-5.44 µg/L	(Giger et al., 2006)
		TT	0.04-0.91 µg/L	
		BT	0.22-0.40 µg/L	
		TT	0.05-0.15 µg/L	
		BT	0.21-0.45 µg/L	
		TT	0.06-0.15 µg/L	
		BT	0.06-1.38 µg/L	
		TT	0.01-0.09 µg/L	
Italia. Río Tíber	Junio 2006	TBEP	323 ng/L	(Bacaloni, 2007)
		T CPP	117 ng/L	
		T CEP	nd	
	Noviembre 2006	TBEP	87 ng/L	(Bacaloni, 2007)
		T CPP	54 ng/L	
Portugal. Ria de Aveiro. Ríos Águeda y Vouga	Agosto 2006	T CEP	7 ng/L	(Jonkers, 2010)
		MeP	nd-45 ng/L	
		EtP	nd-2.2 ng/L	
		PrP	nd-6.2 ng/L	
		BeP	nd	
Portugal. Ria de Aveiro. Ríos Casler y Antua	Agosto 2006	BPA	nd-5.4 ng/L	(Jonkers, 2010)
		MeP	3.3-16 ng/L	
		EtP	nd-6.4 ng/L	
		PrP	nd-64 ng/L	
		BeP	nd-0.3 ng/L	
Estudio actual	2010-2011	BPA	23-683 ng/L	
		TCC	nd-3.4 ng/L	
		TCS	nd-19 ng/L	
		MeP	nd-142 ng/L	
		EtP	nd-49 ng/L	
		PrP	nd-26 ng/L	
		BeP	nd-7.3 ng/L	
		BPA	nd-649 ng/L	
		BT	nd-3185 ng/L	
		TT	nd-7018 ng/L	
		TBEP	5.3-659 ng/L	
		T CPP	nd-6377 ng/L	
		T CEP	nd-232 ng/L	
Caff	nd-344 ng/L			

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Los conservantes (parabenos) se encontraron en concentraciones máximas de 142 ng/L (CIN1, Ebro), 49 ng/L (CIN1, Ebro), 26 ng/L (HER, Guadalquivir) y 7.28 ng/L (EBR1, Ebro) de MeP, EtP, PrP y BeP, respectivamente, durante la campaña de muestreo 1 (2010). Los niveles de parabenos detectados en este estudio presentaron el mismo perfil y concentraciones que los detectados previamente en el río Taji del Reino Unido (Kasprzyk-Hordern et al., 2008). En los ríos Águeda y Vouga en Portugal (Ria de Aveiro, 2006) (Jonkers, 2010), se habían reportado niveles máximos de 45 ng/L, siguiendo el mismo perfil por tanto que los ríos mencionados anteriormente. Sin embargo, en los ríos Casler y Antua en Portugal (Ria de Aveiro, 2006) este rango había sido de nd–64 ng/L, con la particularidad de que los niveles más altos detectados fueron para PrP en lugar de MeP (Jonkers, 2010).

Niveles determinados de EDCs en muestras de sedimentos

La hormona natural más frecuentemente detectada fue E1 con concentraciones máximas de 3.5 ng/g, 1.6 ng/g, 1.9 ng/g y 1.0 ng/g en Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir, respectivamente. Sin embargo, E2 solo se detectó en varios puntos a una concentración máxima de 1.58 ng/g en ZAD (Ebro) durante la campaña de muestreo 1. En contraste, la hormona conjugada E1-3S no se encontró en ninguna muestra. En cuanto a las otras hormonas conjugadas E3-3S, E2-3G y E1-3G fueron las más frecuentemente detectadas con concentraciones máximas de 1.67 ng/g, 1.85 ng/g y 2.41 ng/g, respectivamente. Estos resultados podrían explicarse debido a la diferencia de propiedades de estos compuestos, como los valores de pKa (Silva et al., 2011). En este caso, la hormona conjugada ácida E1-3S solo se detectó en muestras de agua de río. La hormona sintética EE2 solo se encontró en dos puntos de muestreo EBR3 (Ebro) y LLO2 (Llobregat) a niveles de concentración de 1.4 ng/g y 2.1 ng/g, respectivamente.

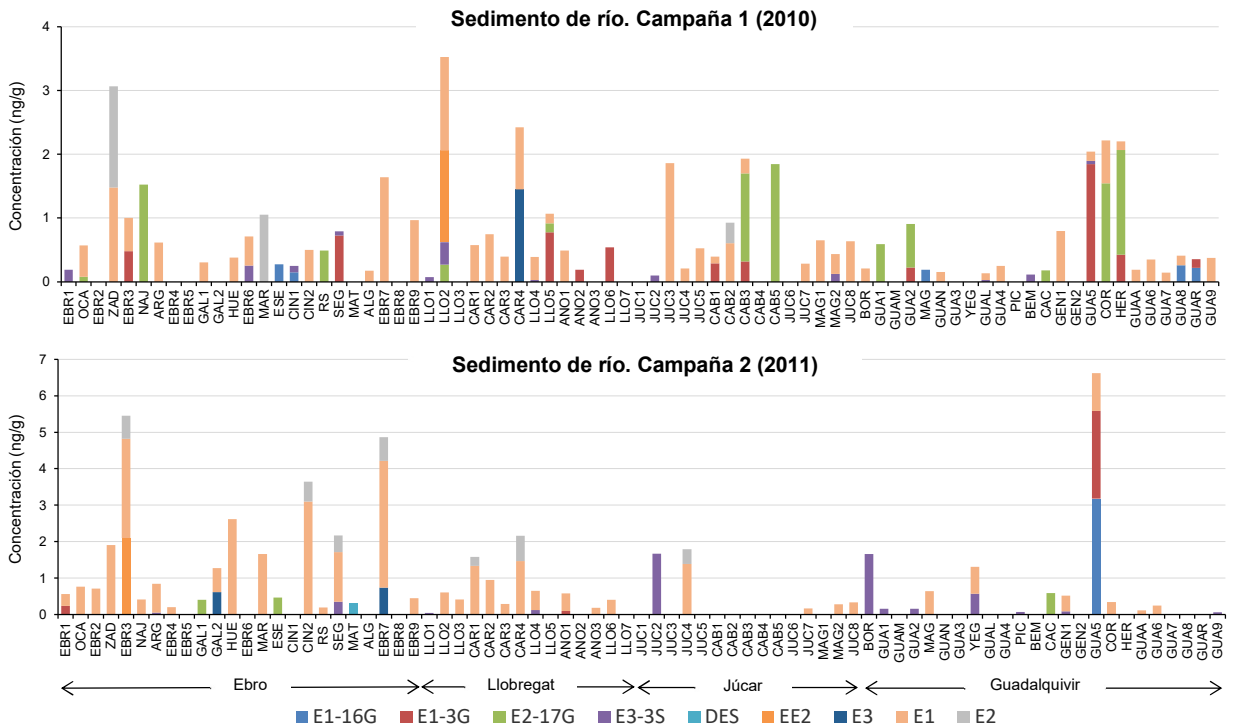


Figura 4.3.a Niveles de concentración de estrógenos y conjugados naturales y sintéticos en los sedimentos de río (campañas de muestreo 1 y 2)

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Estos resultados se compararon con los resultados publicados y se presentan en la **Tabla 4.2.a-c**. Analizando en detalle los datos disponibles, se puede ver que los niveles de E2 detectados en este estudio estuvieron en el mismo orden que en el Reino Unido (East Sussex, río Ouse 2005–2006) (Labadie y Hill, 2007) e inferiores a los niveles informados en China en junio (2007) (Lei et al., 2009). Lo mismo se observó en el caso de E1.

Tabla 4.2.a Niveles de concentración de estrógenos naturales, sintéticos y conjugados en muestras de sedimentos de río en diferentes lugares del mundo

Localización	Año	Compuesto	Niveles	Referencia
España. Río Anoia y río Cardener	-	E2	nd	
		E3	nd-11.8 ng/g	
		EE2	nd-22.8 ng/g	
Ríos del Reino Unido	-	E2	6.3-14.6 ng/Kg	(Peck M et al., 2004)
		E1	24.9-52.4 ng/Kg	
España. Río Anoia	2000	E2	nd	(López de Alda et al., 2002)
		E1	nd-3.55	
		E3	nd-3.37	
		EE2	nd-22.8 ng/g	
		DES	nd-2.01	
España. Río Cardener	2000	E2	nd	
		E1	nd-11.9	
		E3	nd-2.92	
		EE2	nd-4.16	
China, ríos del área de Tianjin	Junio 2007	DES	nd	(Lei et al., 2009)
		E2	nd-9.70 ng/g	
		E1	0.98-21.6 ng/g	
		E3	nd-7.29 ng/g	
		EE2	nd-9.26 ng/g	
Reino Unido (East Sussex). Río Ouse	2005-2006	DES	nd-4.51 ng/g	(Labadie and Hill, 2007)
		E1	0.40-3.30 ng/g	
		E2	nd-1.2 ng/g	
		EE2	nd	
Estudio actual	2010-2011	E2	nd-1.6 ng/g	
		E1	nd-3.5 ng/g	
		E3	nd-1.5 ng/g	
		EE2	nd-2.1 ng/g	
		DES	nd-0.32 ng/g	
		E1-3S	nd-0.018 ng/g	
		E3-3S	nd-1.7 ng/g	
		E2-17G	ng-1.8 ng/g	
		E1-3G	nd-2.4 ng/g	
E3-16G	nd-3.2 ng/g			

Con respecto a los compuestos alquilfenólicos, NP, debido a su característica lipofílica, se encontró en concentraciones máximas de 1693 ng/g (ZAD) y 470 ng/g (CAR4) en las cuencas de los ríos Ebro y Llobregat durante la campaña 1, respectivamente, y 1034 ng/g (JUC5) ng/g y 197.7 ng/g (GUA5) en Júcar y Guadalquivir durante la campaña 2, respectivamente. En general, los niveles de compuestos alquilfenólicos fueron más altos en los sitios de muestreo cerca de las grandes ciudades o cerca de la actividad agrícola o industrial, aunque durante la campaña de muestreo 2 en JUC 5 (Júcar) los niveles

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

de NP, con un alto coeficiente de partición estimado (logP) de 5.74 , alcanzaron valores de 1035 ng/g, probablemente debido al mayor contenido de carbono orgánico (TOC) en el sedimento en este punto (Nguyen y Kai-Uwegoss, 2005). Esta relación de concentraciones más altas de TOC-NP se observó claramente en ZAD (Ebro), un sitio contaminado con los niveles más altos de TOC y niveles correspondientemente altos de NP alcanzando 1693 ng/g y 568 ng/g, respectivamente. En otros puntos de muestreo con altas concentraciones de agua y niveles más bajos de TOC en sedimentos, por ejemplo HUE (Ebro), CAR4 (Llobregat), ANO2 (Llobregat) y LLO7 (Llobregat), se detectaron niveles más bajos de NP, es decir, 538 ng/g , 470 ng/g, 444 ng/g y 393 ng/g, respectivamente. De manera similar, en LLO6 (Llobregat) la concentración de TOC en el sedimento fue extremadamente baja (27% C org) y resultó en una baja concentración de NP (19 ng/g).

Al comparar nuestros resultados con los datos publicados en otros países, se pudo observar que los niveles del OP fueron más altos que en Alemania y Portugal (Petrovic et al., 2002a, Vethaak et al., 2005), pero más bajos que los reportados previamente en la cuenca del Llobregat (España) (Brix et al., 2010, Petrovic y Barceló, 2001, Petrovic et al., 2002b). En el caso de los niveles de NP de este estudio, fueron más altos que en otros estudios en la cuenca del Llobregat, pero más bajos que los niveles reportados en otros países como Alemania (Vethaak et al., 2005).

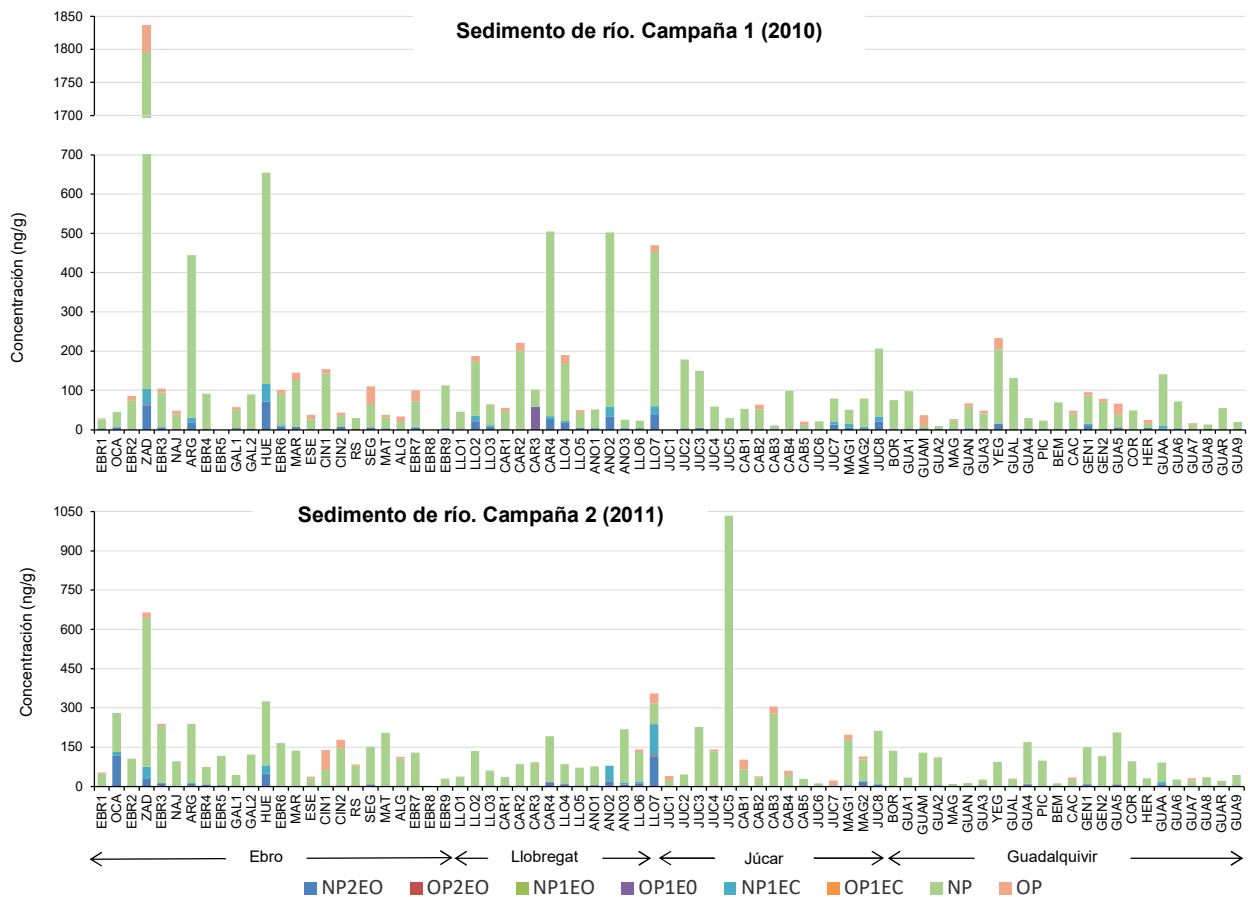


Figura 4.3.b Niveles de concentración de compuestos alquilfenólicos en los sedimentos de río

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Tabla 4.2.b Niveles de concentración de compuestos alquilfenólicos en muestras de sedimento de río en diferentes lugares del mundo

Localización	Año	Compuesto	Niveles	Referencia	
España. Río Anoia	-	OP	40-104 ng/g	(Petrovic et al., 2002a)	
		NP	up to 655 ng/g		
		NPEO	up to 818 ng/g		
		OP	15-80 ng/g		
España. Río Cardener	-	NP	up to 380 ng/g		
		NPEO	up to 150 ng/g		
		OP	nd		
		NP	5-79 ng/g		
España. Cuenca del Llobregat	Junio 2005	OP1EC	nd-9 ng/g	(Brix et al., 2010)	
		NP1EC	nd-77 ng/g		
		NP2EO	nd		
		OP	nd		
		NP	nd-64 ng/g		
		OP1EC	nd		
	Octubre 2005	NP1EC	nd-241 ng/g		
		NP2EO	nd		
		OP	nd		
		NP	3-30 ng/g		
		OP1EC	nd		
		NP1EC	nd		
	Mayo 2006	NP2EO	nd-17.02 ng/g		
		OP	nd-3 ng/g		
NP		nd-35 ng/g			
OP1EC		nd-2 ng/g			
NP1EC		nd-3 ng/g			
NP2EO		nd-31 ng/g			
España. Río Anoia	Enero 2000	OP	nd-204	(Petrovic and Barceló, 2001)	
		NP	138-355		
		NPEC	nd-95		
		NPEO	360-818 ng/g		
		OP	nd-120 ng/g		
España. Río Cardener	Enero2000	NP	22-320 ng/g		
		NPEC	nd		
		NPEO	60-450 ng/g		
Estados Unidos. Puerto de baltimore	1999	NP	7 µg/g		(Loyo-Rosales et al., 2007)
Portugal	-	OP	nd-8.6 ng/g		(Petrovic, et al., 2002b)
		NP	58-1170		
		NP1EC	nd-395		
		NP1EO	nd-78		
		OP1EO	nd		
		NP2EO	13-86		
Alemania	Verano 1999	OP	nd-26 ng/g	(Vethaak et al., 2005)	
		NP	nd-3800 ng/g		
Estudio actual	2010-2011	OP	nd-76 ng/g		
		NP	nd-1693 ng/g		
		OP1EC	nd-0.23 ng/g		
		NP1EC	nd-119 ng/g		
		OP1EO	nd		
		NP1EO	nd		
		OP2EO	nd-5.5 ng/g		
		NP2EO	nd-116 ng/g		

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

También se encontraron otros contaminantes como compuestos organofosforados, anticorrosivos, BPA, conservantes y antimicrobianos en muestras de sedimentos. Las concentraciones más altas se detectaron para MeP, TCP y BPA. Por ejemplo, se encontró BPA a concentraciones máximas de 93 ng/g, 117 ng/g, 24 ng/g y 430 ng/g en sedimentos de Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir, todos ellos durante la campaña de muestreo 2.

Estos niveles fueron similar a los niveles encontrados en la cuenca del Llobregat (2000) (Petrovic y Barceló, 2001) y en Alemania (Vethaak et al., 2005). En el caso de los conservantes (parabenos), las concentraciones máximas de MeP, EtP, PrP y BeP fueron 435 ng/g, 2.68 ng/g, 5.98 ng/g y 0.07 ng/g, respectivamente, durante la campaña 1. Los niveles de TCS alcanzaron un máximo de 388 ng/g, siendo este nivel de concentración, en general diez veces mayor que el de TCC. Ebro y Llobregat fueron las cuencas fluviales más contaminadas que alcanzaron niveles de TCS de 388 ng/g, 129 ng/g y 125 ng/g en ZAD, HUE y SEG en el caso de Ebro y 343 ng/g y 203 ng/g en ANO y LLO7 de la cuenca del río Llobregat.

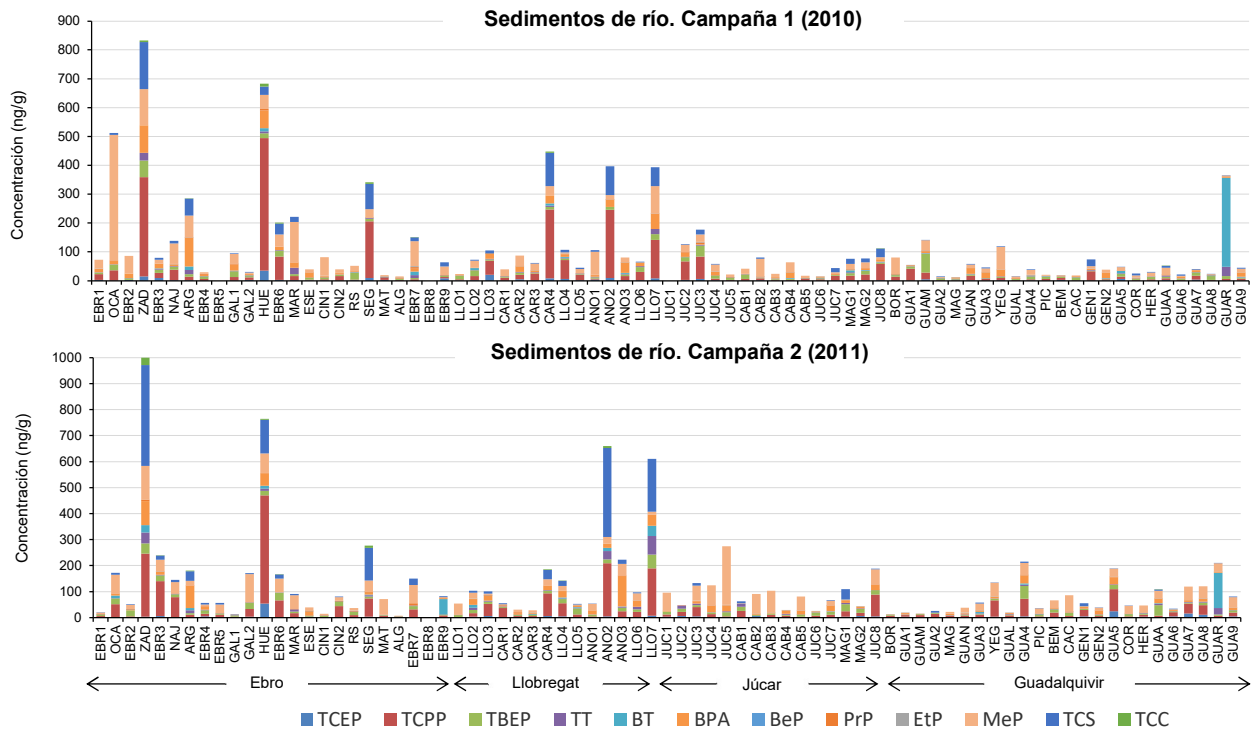


Figura 4.3.c Niveles de concentración de antimicrobianos, conservantes, BPA, anticorrosivos y compuestos organofosforados en los sedimentos de río (campañas de muestreo 1 y 2)

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Tabla 4.2.c Niveles de concentración de compuestos organofosforados, anticorrosivos, BPA, conservantes y desinfectantes en muestras de sedimentos de río en diferentes lugares del mundo

Localización	Año	Compuesto	Niveles	Referencia
España. Río Anoia	Enero 2000	BPA	nd-40	(Petrovic and Barceló, 2001)
España. Río Cardener	Enero 2000	BPA	nd	
Alemania	Verano 1999	BPA	nd-43 ng/g	(Vethaak et al., 2005)
Estudio actual	2010-2011	TCC	nd-29 ng/g	
		TCS	nd-388 ng/g	
		MeP	nd-435 ng/g	
		EtP	nd-2.7 ng/g	
		PrP	nd-51 ng/g	
		BeP	nd-0.13 ng/g	
		BPA	nd-117 ng/g	
		BT	nd-842 ng/g	
		TT	nd-72 ng/g	
		TBEP	nd-66 ng/g	
		TCCP	nd-459 ng/g	
TCEP	nd-54 ng/g			
Caff	nd-344 ng/g			

Estrogenicidad

Debido a las diferentes potencias estrogénicas de los compuestos estudiados, la comparación en términos de concentraciones no da una idea clara de los posibles efectos y riesgos planteados por los EDCs en diferentes sitios de muestreo y ríos. Por esta razón, se calculó la actividad estrogénica total resultante de los contaminantes medidos en cada sitio, y se expresó como EEQ, en ng/L y ng/g para muestras de agua y sedimento, respectivamente. Los niveles acumulados de EEQ se muestran en la **Figura 4.4.a-b**. Consultar también la **información adicional, anexo BII Tablas BII.4.a-c y BII.5.a-c, pág. 283**.

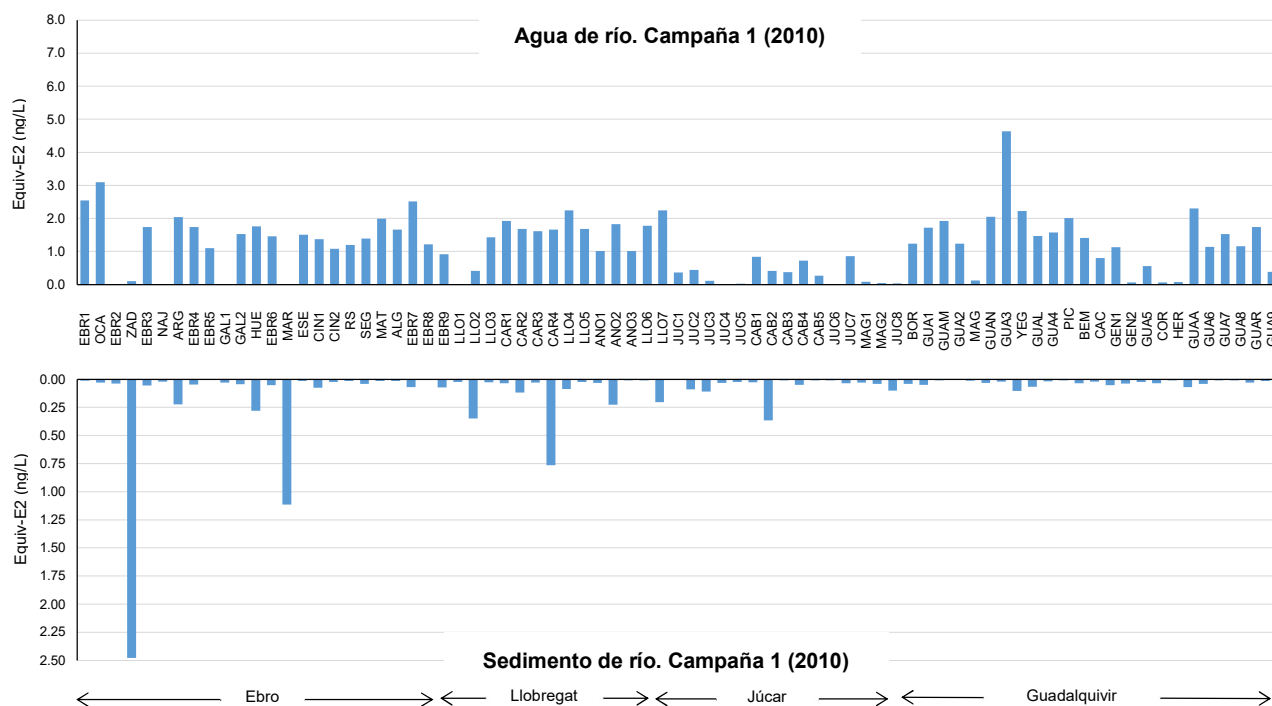


Figura 4.4.a Niveles acumulados de EEQ, actividad estrogénica total, en aguas de ríos y sedimentos durante la campaña de muestreo 1

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

En la campaña de muestreo 1 para muestras de agua, en todos los sitios de muestreo, la estrogenicidad total expresada como EEQ fue inferior a 3 ng/L, con la excepción de los sitios OCA y GUA3 con niveles ligeramente más altos, no excediendo por eso a los 10 ng/L, considerados el límite de concentración para efectos endocrinos en general. En todos los casos, E2 contribuyó con más del 80% de la estrogenicidad total, mientras que todos los demás EDCs tuvieron un impacto relativamente pequeño. Se detectaron resultados más altos durante la campaña de muestreo 2 donde los puntos de muestreo EBR7, MAG, GUAL y PIC alcanzaron casi 8 ng/L, nuevamente por la alta contribución estrogénica de E2. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no todos los EDCs medidos se tuvieron en cuenta al calcular la EEQ. Por ejemplo, no hay información sobre la potencia estrogénica de los parabenos y los compuestos organofosforados, y ambos grupos de contaminantes se detectaron a niveles altos en los ríos ibéricos.

En el caso de las muestras de sedimento, se midió una estrogenicidad total significativamente menor, siendo inferior a 0.6 ng/g en la mayoría de las muestras recolectadas, con la excepción de varios sitios ZAD, MAR y CAR4 (campaña 1) y EBR3, CIN2, EBR7 y CAR4 (campaña 2) que mostraron valores ligeramente superiores, pero en todos los casos inferiores a 2.5 ng/g.

En resumen y con respecto a las muestras analizadas durante las 2 campañas de muestreo, el riesgo estrogénico general para los organismos acuáticos en los ríos ibéricos se consideró bajo.

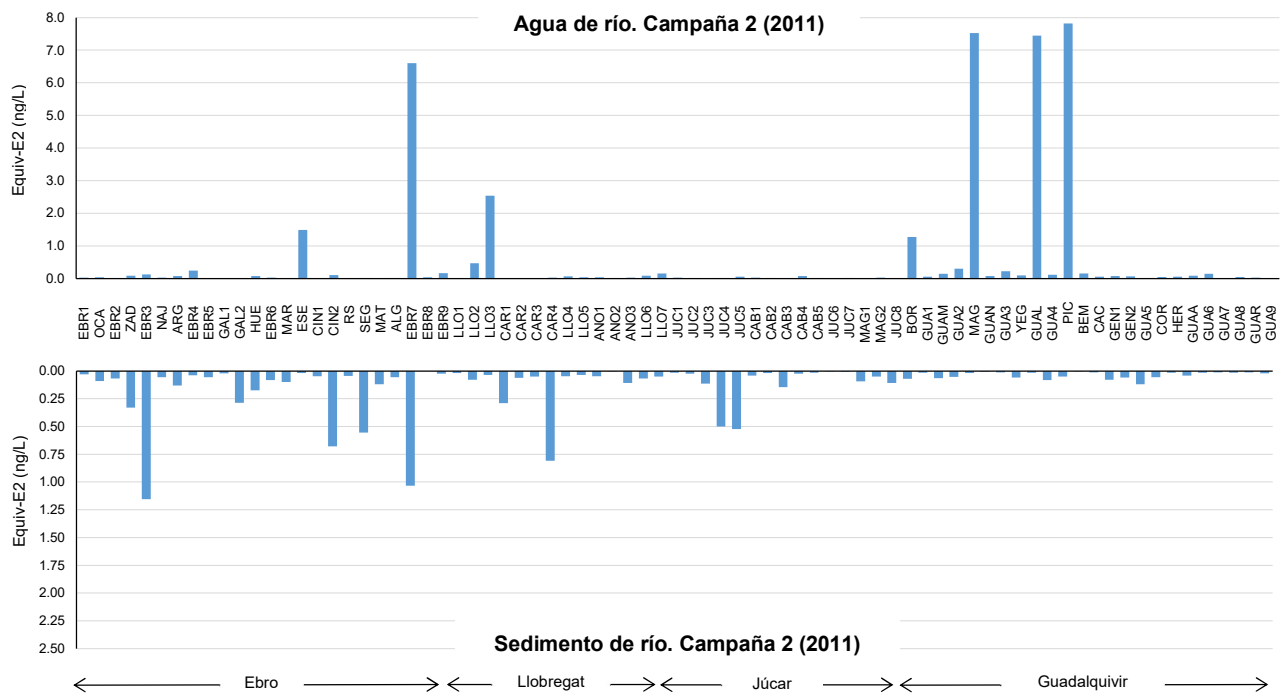


Figura 4.4.b Niveles acumulados de EEQ, actividad estrogénica total, en aguas de ríos y sedimentos durante la campaña de muestreo 2

Conclusiones

El estudio de los niveles determinados y distribución de EDCs en el medio ambiente acuático es un requisito previo para la evaluación del riesgo que estos contaminantes representan para los organismos acuáticos. El estudio confirma la presencia de mezclas complejas de contaminantes no regulados de diversos orígenes en los ríos ibéricos, lo que genera preocupación por sus posibles efectos interactivos.

Los compuestos utilizados en formulaciones industriales para diversos fines, como los compuestos alquilfenólicos, los benzotriazoles, los retardantes de llama y plastificantes organofosforados, son contaminantes importantes que tienen posibles efectos de alteración endocrina en los ríos ibéricos, y fueron todos detectados a concentraciones promedio superiores a 100 ng/L. Se encontraron hormonas naturales y sintéticas en niveles bajos que no excedían los 16 ng/L y 7 ng/g para agua y sedimento, respectivamente (resultado de la concentración total de 8 hormonas y conjugados monitorizados), sin embargo, contribuyeron a más del 80% de la estrogenicidad de las muestras (expresada como EEQ, ng/L o ng/g). La estrogenicidad total fue inferior a 8 ng/L y 2.5 ng/g EEQ en muestras de agua y sedimento, respectivamente, lo que sugiere un bajo riesgo para los organismos acuáticos.

4.3 Niveles determinados en aguas residuales y lodos de depuradora

Propuesta de publicación científica 4:

Occurrence and fate of EDCs and related compounds in wastewaters and sewage sludge in principals WWTPs of Iberian rivers (No publicada)

Resumen

Los EDCs, siguen siendo un grupo de compuestos de preocupación ambiental, convirtiendo por ejemplo las EDARs en un punto clave para su eliminación. Este trabajo, pretende ampliar los datos recogidos en el apartado anterior 4.2, pàg.119, correspondiente a la publicación (Gorga et al., 2014b), dónde se analizaban su presencia en sedimentos y aguas de río de las principales cuencas de la Península Ibérica. En este caso, se estudiaron los mismos 31 EDCs, recogiendo muestras de aguas residuales de afluentes y efluentes, así como lodos de depuradora, durante los años 2010 y 2011 en 16 EDARs de los ríos Ebro (6), Llobregat (3), Júcar (2) y Guadalquivir (5), durante las mismas campañas de muestreo realizadas en la publicación citada en el párrafo anterior. Para esta propuesta, se aplicaron dos métodos analíticos multiresiduos diferentes, utilizando la cromatografía líquida online automatizada EQuan/TurboFlow™ junto con la detección por espectrometría de masas en tándem.

Los niveles de concentración estrógenos naturales y sus conjugados en afluentes no superaron los 233 ng/L en ambas campañas, siendo los estrógenos conjugados y la E1 los más detectados. En efluentes de depuradora E1, alcanzó concentraciones de 23 ng/L en la cuenca del Ebro. Se encontraron niveles más altos de TCS de hasta 135 ng/L, que de TCC, confirmando su mayor uso como desinfectante. El conservante detectado a niveles más altos en afluentes debido a su mayor uso en proporción con los otros parabenos estudiados fue el PrP, seguido del MeP, llegando el primero a concentraciones de 913 ng/L. En efluentes, los niveles de conservantes bajaron considerablemente, confirmando su degradación por las EDARs. encontrándose en proporción, concentraciones ligeramente superiores de MeP versus PrP, seguramente debido a su menor eliminación por parte de estas

Los niveles más altos de NP fueron detectados en la cuenca del Júcar en 2010 llegando a 1632 ng/L en ALZ11, las concentraciones detectadas de NP en efluentes de depuradora con medianas de entre 31 ng/L y 90 ng/L, evidenciaron la disminución de este compuesto en los efluentes de EDARs, aunque observando que este compuesto en realidad queda adsorbido en los lodos. Los otros compuestos alquilfenólicos estudiados, en general, parecieron ser eliminados por las EDARs de forma eficaz. La mediana de BPA más alta encontrada llegó a 1013 ng/L en el Llobregat, y aunque sus concentraciones disminuían de manera significativa en los efluentes de depuradora, se acumulaban en los lodos.

Los niveles encontrados de los anticorrosivos (BTs) en afluentes de depuradora fueron, junto al retardante de llama TCP y el plastificante TBEP, las concentraciones medianas más altas detectadas durante las 2 campañas de entre todos los compuestos estudiados, llegando sin problema a niveles de µg/L y µg/g en aguas residuales y lodos, respectivamente

Introducción

Los compuestos EDCs como ya se ha ido mencionado al largo de toda esta tesis, acaban en el medio acuático a través de aguas residuales industriales; escorrentía de la agricultura, ganadería y acuicultura; lixiviados de vertederos; y de los efluentes domésticos y hospitalarios, (Barbosa et al., 2016; Lapworth et al., 2012; Yang et al., 2017).

Centrándonos en las EDARs, puntos importantes de entrada de estos contaminantes en el medio acuático, el funcionamiento de estas involucra diferentes procesos físicos, químicos y biológicos que mejoran la calidad de las aguas residuales para su reutilización o descarga “segura y saludable” en las aguas receptoras. Aunque estas, en general, fueron y en muchos casos siguen diseñadas principalmente para la eliminación de sustancias orgánicas biodegradables, suelos suspendidos, nutrientes (nitrógeno y fósforo), patógenos, metales pesados, inorgánicos disueltos, contaminantes prioritarios y orgánicos refractarios, en los procesos comúnmente denominados tratamientos convencionales, ver apartado 1.3, pág.29. Por tanto, este tipo de plantas convencionales que constan principalmente de un proceso primario y un secundario biológico, no están diseñadas específicamente para los compuestos emergentes, como los EDCs, por tanto, estos, son eliminados de manera más o menos eficaz según el compuesto (Carballa et al., 2004). Por ese motivo, en los últimos años, se están centrando esfuerzos en la mejora del diseño de las EDARs, para incluir tecnologías de tratamiento avanzadas, a través de los denominados procesos terciarios, con el objetivo de transformar los contaminantes no eliminados en los tratamientos convencionales en compuestos menos dañinos o incluso mineralizarlos (Auriol et al., 2006; Bolong et al., 2009; Cases et al., 2011; Citulski and Farahbakhsh, 2010; Liu et al., 2009; Sudhakaran et al., 2013; Tijani et al., 2013; Yang et al., 2017).

Otro punto a tener en cuenta también es el proceso que sufren los lodos utilizados en las EDARs, una vez quedan descartados del circuito. Estos, deben ser estabilizados, un paso muy importante en todo el tratamiento debido a que los lodos generados contienen una gran cantidad de macrocontaminantes y son utilizados en la agricultura como fertilizante, una práctica común para mejorar la estructura del suelo y proporcionar nutrientes, pero puede representar una fuente de contaminación ambiental (Mohapatra et al., 2016; Stasinakis, 2012; Verlicchi and Zambello, 2015). Aunque hoy en día, estos lodos deben ser tratados mediante digestión anaeróbica, compostaje u otros procesos biológicos y cumplir las normativas de uso (Sewage Sludge, EC website), la eliminación de ciertos contaminantes orgánicos es difícil (Zhang et al. 2014), por tanto, es importante implementar nuevas tecnologías en su tratamiento (Barnabé et al., 2009; Carballa et al., 2006; Dichtl et al., 2007; Johnson and Sumpter, 2001).

Teniendo en cuenta todo lo mencionado y siendo las EDARs un posible e importante punto de entrada de EDCs en el medio acuático, durante la ejecución experimental de esta tesis y dentro del proyecto SCARCE, se realizó un estudio de los niveles de estos contaminantes en varias EDARs de la Península Ibérica, aplicando las metodologías desarrolladas en el capítulo anterior.

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar los niveles, distribución y una pequeña interpretación de la eliminación de estos compuestos EDCs en muestras de agua residuales y lodos de depuradora

en cuatro cuencas hidrográficas representativas en España (Llobregat, Ebro, Júcar y Guadalquivir). Para ello, se realizó un amplio muestreo de aguas residuales y lodos de depuradora en dos campañas de monitoreo (2010 y 2011). Se recogieron muestras de aguas residuales de afluentes y efluentes, así como lodos, durante los años 2010 y 2011 en 16 EDARs de los ríos Ebro (6), Llobregat (3), Júcar (2) y Guadalquivir (5). Con el fin de estimar la estrogénicidad de las muestras, también se hizo un pequeño estudio de esta propiedad, estimando la potencia estrogénica relativa (en relación con 17 β -estradiol).

Experimental

Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) estudiadas

Se recogieron muestras de aguas residuales de afluentes y efluentes, así como lodos, durante los años 2010 y 2011 en 16 EDARs de los ríos Ebro (6), Llobregat (3), Júcar (2) y Guadalquivir (5). El mapa de las cuencas de los ríos con las EDARs estudiadas se muestra en la **Figura 4.5**.

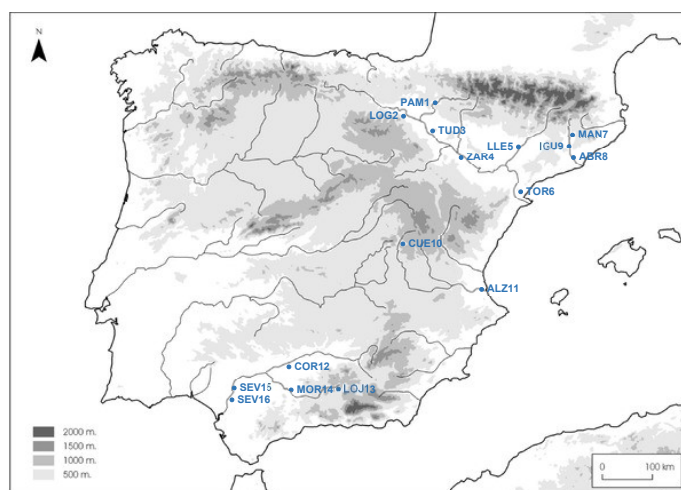


Figura 4.5 Mapa de las cuencas de los ríos y las EDARs estudiadas

Un breve resumen de las características de las EDARs monitorizadas, así como las concentraciones en afluentes obtenidas del indicador antropogénico químico de cafeína (Caff) (Ferreira et al., 2005) analizado en este estudio, se presentan en la **información adicional, anexo BII Tabla BII.6, pág.289**.

Recogida y almacenamiento de muestras

Se recogieron muestras de agua residuales, integradas 24h, en botellas de plástico y se transportaron al laboratorio en condiciones enfriadas (4°C). Tras la recepción, las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0.45 μ m (Whatman, Reino Unido). Posteriormente, las muestras de agua se congelaron y se mantuvieron en el congelador a -20°C hasta el análisis (máximo en 1 mes). Está demostrado que la congelación es segura durante al menos 1 mes para la mayoría de los productos farmacéuticos (Vanderford et al., 2011, Petrovic, 2014). Las muestras de lodo de depuradora fueron envueltas en papel de aluminio, congeladas y transportadas a -20°C al laboratorio y finalmente liofilizadas. Las muestras liofilizadas se trituraron, se homogeneizaron usando un mortero y se almacenaron a -20°C hasta el análisis.

Método analítico

Se aplicaron dos métodos analíticos multiresiduos diferentes para el análisis de las aguas residuales y muestras de lodos estudiadas, utilizando el sistema online automatizado Thermo Scientific EQuan™/TurboFlow™, respectivamente, seguido de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de triple cuadrupolo (TSQ Vantage) con una fuente ESI para detección en tándem.

Para el análisis de aguas residuales, la determinación de los compuestos de interés se llevó a cabo siguiendo la metodología online descrita en el apartado 3.2, pág. 79. Resumidamente, a 100 mL de muestra de agua residual se añadieron 100 µL de una solución de patrones internos de 250 µg/L y luego se inyectaron 2 mL de esta solución directamente en el sistema cromatográfico. Los compuestos se concentraron en la columna de carga (Hypersil GOLD™ Aqua 20×2.1 mm, 12 µm) mediante un flujo de fase móvil (acuoso: disolvente orgánico (98:2, v/v)) a una velocidad de 1.75 mL/min. Posteriormente, se activó la válvula de conmutación de seis puertos y los analitos se transfirieron de la columna de preconcentración a la columna analítica (una columna de fase inversa ID C18 de 125×2 mm, 5 µm Purospher STAR RP-18 de Merck) utilizando las mismas fases móviles, el paso a través de ambas columnas se realizó a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. Cuando finalizó la transferencia, se giró la válvula de conmutación y los analitos se separaron de manera convencional. Para los compuestos detectados en condiciones de ionización negativa (NI), se usó un gradiente de agua y metanol. Los compuestos detectados en condiciones de ionización positiva (PI) se separaron usando el mismo programa de gradiente, pero las fases móviles se modificaron con 20 mM de formiato de amonio y 0.1% de ácido acético. Las condiciones de EQuan-LC se muestran en el apartado 3.2, Tabla 3.1, pág. 85.

Para el análisis de EDCs en muestras de lodos de depuradora, se aplicó la metodología online descrita en el apartado 3.3, pág. 95. Para ello se pesaron 1 g de peso seco (dw) de lodo y se añadieron 100 µL de una solución de patrones internos a una concentración de 2.5 mg/L. Luego, se realizó una extracción de líquido a presión (PLE); el extracto se redujo bajo una corriente de nitrógeno suave y se redisolvió en 10 mL de metanol. Esta solución se centrifugó y se recogieron 0.5 mL de la parte superior del vial de centrifuga. Se inyectaron directamente 20 µL de la solución extraída en el sistema cromatográfico de purificación online TFC-LC-MS/MS, las condiciones de TFC-LC se muestran en la en el apartado 3.3, Tabla 3.6, pág.100.

Para los compuestos analizados en modo NI, estos fueron purificados en la columna TurboFlow™ (Cyclone, 0.5×50 mm, tipo sílice) a 1 mL/min con ácido fórmico a pH=3.5 en agua como fase móvil, los analitos fueron retenidos, y la matriz de muestra se eluyó al contenedor de residuo. La columna TurboFlow™ se limpió durante 90s, con una solución acuosa a pH=8.5 y agua. Para los compuestos detectados en modo PI, la columna de purificación utilizada fue una Cyclone-MCX (0.5×50 mm) y la etapa de carga se llevó a cabo con formiato de amonio 20 mM, ácido acético al 0.1% en agua y las etapas 2 y 3 no fueron necesarias. Posteriormente, la bomba de carga empujó el contenido orgánico del "loop" a través de la columna TurboFlow™ y el flujo se ralentizó a 0.2 mL/min para transferir los compuestos de interés a la columna analítica.

Finalmente, la separación cromatográfica se inició a un caudal de 0.3 mL/min mientras se limpiaba la columna TurboFlow™. Durante los últimos pasos, el “loop” se volvió a llenar y las dos columnas se equilibraron para la siguiente inyección. La separación cromatográfica utilizada fue similar a la aplicada para el análisis de muestras de agua; las fases móviles fueron las mismas.

La detección se realizó utilizando un espectrómetro de masas TSQ Vantage, para muestras de agua y sedimentos. Los parámetros de MS/MS optimizados para el análisis por SRM de los analitos se proporcionan en el apartado 3.2, Tabla 3.2, pág.86, ver también información adicional, anexo BI, Tabla BI.1, pág.267. Los parámetros de calidad/validación de los métodos EQuan/TFC-LC-MS/MS se muestran en el apartado 3.2, Tabla 3.4, pág. 90 y el apartado 3.3, Tabla 3.7, pág.105, respectivamente, junto a las otras matrices estudiadas en el capítulo 3 de desarrollo de métodos analíticos.

Estrogenicidad

La actividad estrogénica total en las muestras ambientales se determinó en relación con la actividad del estrógeno natural E2 y se expresó como EEQ (ng/L). Mediante la siguiente fórmula, $EEQ = \sum C_i \cdot EEF_i$. Donde C_i fue la concentración ambiental medida de cada compuesto, quedando las unidades de EEQ expresadas en ng E2/L para las aguas residuales. Los valores del factor EEF_i (factor de estrogenicidad relativo) de los compuestos estudiados, calculado como la relación entre las concentraciones efectivas medias (EC50) de cada compuesto en relación con la EC50 de E2, donde EC50 es la concentración de contaminante que produce un 50% de respuesta máxima estrogénica, se obtuvo aplicando la mediana de los valores reportados en varios estudios encontrados en la literatura y que se muestran en el apartado 1.2.3, Tabla 1.5, pág.28.

Resultados y discusión

Niveles determinados de EDCs en muestras de aguas residuales y lodos de depuradora

Los resultados de este estudio se resumen en la **Tabla 4.3.a-c** (ver final de este apartado), donde se exponen las frecuencias de detección de cada compuesto analizado, así como sus mínimos y máximos detectados y su mediana, para afluentes, efluentes y lodos de las EDARs de las diferentes cuencas estudiadas, ver también la **información adicional, anexo BII Tablas BII.7-9.a-b, pág.290** (datos crudos de los niveles determinados de cada compuesto en cada punto de muestreo). Para la elaboración de esta Tabla 4.3.a-c, no se ha tenido en cuenta los resultados determinados por debajo del LOD. Los compuestos EE2, DES, OP1EC, OP1EO y NP1EO, no han sido incluidos debido a que todas las muestras analizadas dieron por debajo del LOD. En esta tabla resumen también se reportan las concentraciones medianas mínimas y máximas publicadas de los compuestos más relevantes y expuestas en forma de graficas en el apartado 1.4.2, pág.42 (consultar este apartado para conocer las referencias utilizadas). Estos datos adicionales correspondientes a los niveles encontrados en distintas publicaciones no serán discutidos a continuación, se aportan para dar una información resumida que pueda servir como guía para la interpretación/comparación con de los resultados obtenidos en este estudio. También consultar apartado 4.4, pág.161. dónde se discutirán y aportarán más datos de los principales compuestos estudiados en las matrices más relevantes.

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

En este apartado también se presentan, de forma más visual y detallada, los niveles de concentración de estrógenos y conjugados naturales y sintéticos, los desinfectantes (TCC y TCS), los conservantes parabenos, compuestos alquifenólicos, BPA, benzotriazoles y compuestos organofosforados en las EDARs de las cuencas Ibéricas estudiadas en forma de graficas en las **Figuras 4.6-9.a-b**. Para una mayor comprensión de los resultados expuestos a continuación se describirán brevemente los niveles y compuestos más destacados y/o detectados encontrados.

Debido al tipo de muestreo realizado en el proyecto SCARCE, objeto de esta tesis, los datos de los niveles determinados en las distintas depuradoras analizadas no permitían un estudio exhaustivo de la eficiencia de eliminación de los contaminantes detectados en las distintas EDARS muestreadas, aunque los resultados que se exponen a continuación si pueden dar una idea de la tendencia que tienen estos a ser eliminados por las diferentes tipos de EDARs evaluadas, y por tanto, este tema también será discutido brevemente en este apartado. Consultar apartado 1.3, pág.29, para conocer con más detalle el funcionamiento de forma esquemática de las EDARs, así como la distribución y/o eliminación de los EDCs estudiados, en afluentes, efluentes y lodos de depuradora.

Estrógenos y conjugados

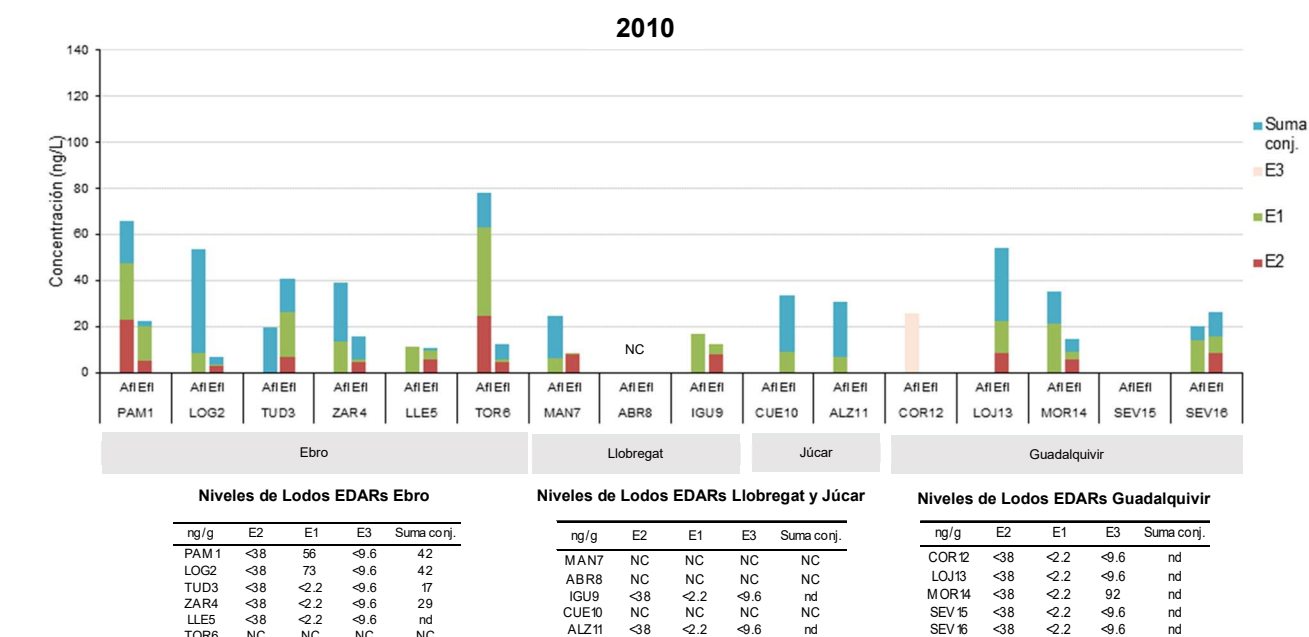
Los niveles de concentración estrógenos naturales y sus conjugados en afluentes no superaron los 233 ng/L en ambas campañas, siendo los más altos los encontrados durante la campaña de 2011 en las cuencas de Júcar y Guadalquivir. Las hormonas detectadas a niveles más altos fueron los estrógenos conjugados y la E1, este perfil se ve claramente reflejado sobretodo en el 2011, donde se detectaron niveles máximos de E1 de 61 ng/L, 68 ng/L, 51 ng/L y 137 ng/L en Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir, respectivamente. Los estrógenos conjugados más detectados en los afluentes fueron E1-3S y E3-3S con niveles máximos de 27 ng/L y 48 ng/L, respectivamente, en la cuenca del Guadalquivir en 2011. El estrógeno natural E2 de gran potencial estrogénico sólo fue detectado en los afluentes de la cuenca del Ebro a niveles máximos de 24 ng/L.

Los niveles máximos de hormonas en efluentes de depuradora se detectaron para E1, alcanzando concentraciones de 23 ng/L, 20 ng/L, 17 ng/L y 35 ng/L en Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir, respectivamente. Los estrógenos conjugados E1-3S y E3-3S fueron nuevamente los más detectados alcanzando los 30 ng/L y 32 ng/L en la cuenca del Guadalquivir, siguiendo por tanto el perfil y la tendencia encontrada en afluentes, estos conjugados también se detectaron a niveles parecidos en la cuenca del Llobregat.

Los estrógenos conjugados E2-17G y E3-16G no fueron detectados en ninguno de los afluentes estudiados, estos sin embargo dieron concentraciones puntuales de 82 ng/L y 100 ng/L en efluentes de Llobregat y Júcar, respectivamente. El metabolito E1-3G fue uno de los glucurónidos detectados con más frecuencia sobretodo en efluentes, llegando a alcanzar niveles de 94 ng/L y 56 ng/L en afluentes y efluentes en la cuenca del Guadalquivir. Las hormonas EE2 y DES no fueron detectadas ni en afluentes ni efluentes durante los 2 muestreos.

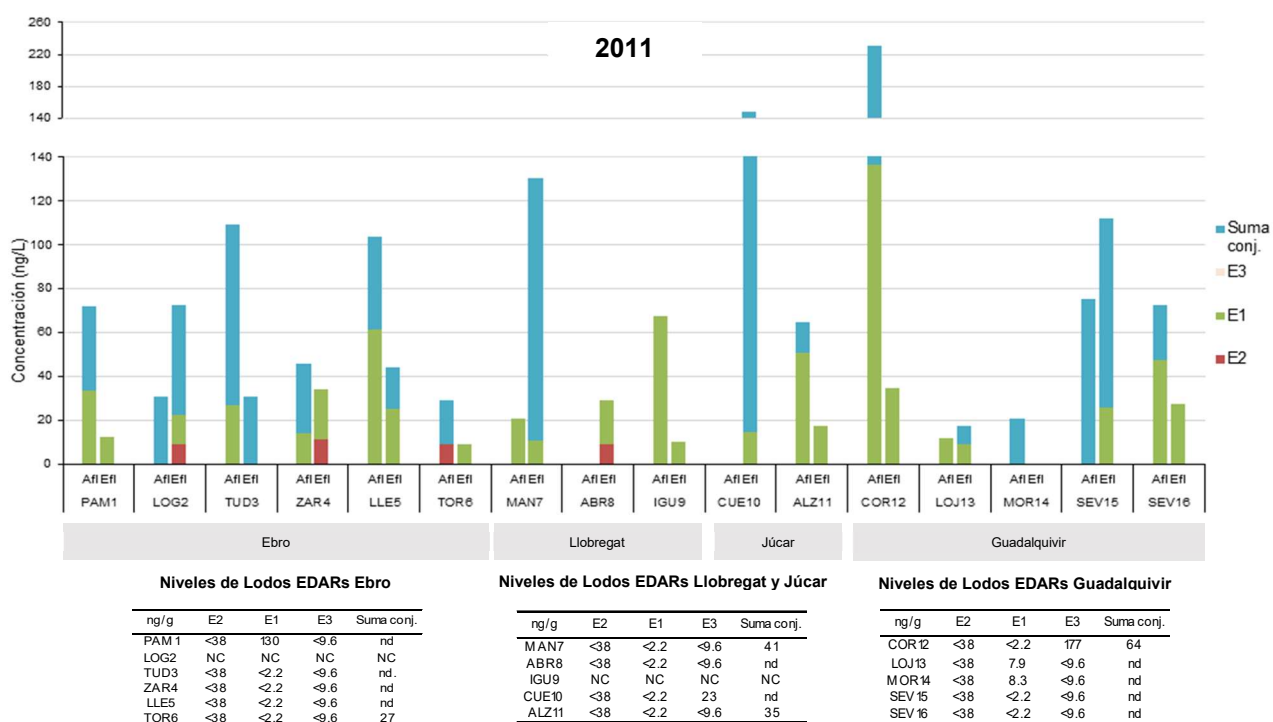
4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

En general, las concentraciones de hormonas en efluentes fueron un poco inferiores respecto a sus afluentes, presentando por eso la misma distribución de estrógenos, estos además no parecieron concentrarse en los lodos de depuradora una vez tratados. Por tanto, mirando las gráficas de los niveles de estrógenos, estos fueron ligeramente eliminados por las EDARs estudiadas, ver apartado 1.3, pág.31. Aunque debido al gran potencial estrogénico de estos compuestos y al hecho que en algunas EDARs se detectaron niveles considerables de E1 y E2 tanto en afluentes como en efluentes, nos indica estas parecen no solventar el problema disruptor de estos compuestos, consultar también apartado de estrogénicidad de este estudio/publicación, pág.157



*Los estrógenos EE2, DES no se detectaron en ninguna de las EDARs analizadas **NC: no colectada; nd: no detectado

Figura 4.6.a Niveles de concentración de los estrógenos y conjugados naturales y sintéticos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2010) en ng/L y ng/g, respectivamente



*Los estrógenos EE2, DES no se detectaron en ninguna de las EDARs analizadas **NC: no colectada; nd: no detectado

Figura 4.6.b Niveles de concentración de los estrógenos y conjugados naturales y sintéticos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2011) en ng/L y ng/g, respectivamente

Desinfectantes y Parabenos

Los niveles de desinfectantes encontrados en afluentes de depuradora confirmaron el mayor uso del TCS versus el TCC, ver apartado 1.2.1, pág.11, encontrando niveles de TCS de hasta 102 ng/L y 135 ng/L en las EDARs de Llobregat y Guadalquivir en 2011, respectivamente. Aunque este tipo de contaminantes son eliminados de manera bastante eficaz por las EDARs, desde el punto de vista de los niveles determinados en efluentes, sus altas concentraciones en los lodos de depuradora, llegando a niveles de $\mu\text{g/g}$ para el TCS, en la mayoría de los lodos estudiados, nos indica que en realidad estos no son eliminados en los procesos de tratamiento de las EDARs sino que se acumulan en ellos debido a su carácter lipofílico, ver apartado 1.3, pág. 33.

El conservante detectado a niveles más altos en afluentes de depuradora debido a su mayor uso en proporción con los otros parabenos estudiados fue el PrP, llegando a concentraciones de 913 ng/L, 263 ng/L, 149 ng/L y 680 ng/L en las cuencas del Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir respectivamente. El MeP, segundo más usado en formulaciones, también se encontró en concentraciones medianas altas de entre 34-137 ng/L en los afluentes de las cuencas estudiadas, ver Tabla 4.3.a. Aunque en el caso de este estudio también es importante destacar los niveles encontrados de EtP, llegando a concentraciones de 814 ng/L en LOG2 en 2010. Por último, los datos verificaron el menor uso del conservante BeP, que fue detectado tan solo en PAM1 y LLE5 a niveles de 11 ng/L y 10 ng/L en 2011 en aguas de afluentes.

En efluentes, los niveles de conservantes detectados fueron claramente inferiores, encontrándose en proporción, concentraciones ligeramente superiores de MeP versus PrP, estos resultados podrían indicar una menor eliminación de este por las EDARs, aunque en general y según los datos de este estudio se corrobora la casi total degradación que sufren estos compuestos en las EDARs, los cuales tampoco presentan concentraciones muy elevadas en los lodos analizados, ver apartado 1.3, pág. 34.

En lo que concierne a los niveles tanto de desinfectantes como de parabenos, en general, en 2011 fueron ligeramente superiores, aunque durante el 2010 se detectaron concentraciones puntuales por ejemplo de EtP y PrP de 814 ng/L y 913 ng/L en LOG2 y 168 ng/L y 680 ng/L en COR12, respectivamente.

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

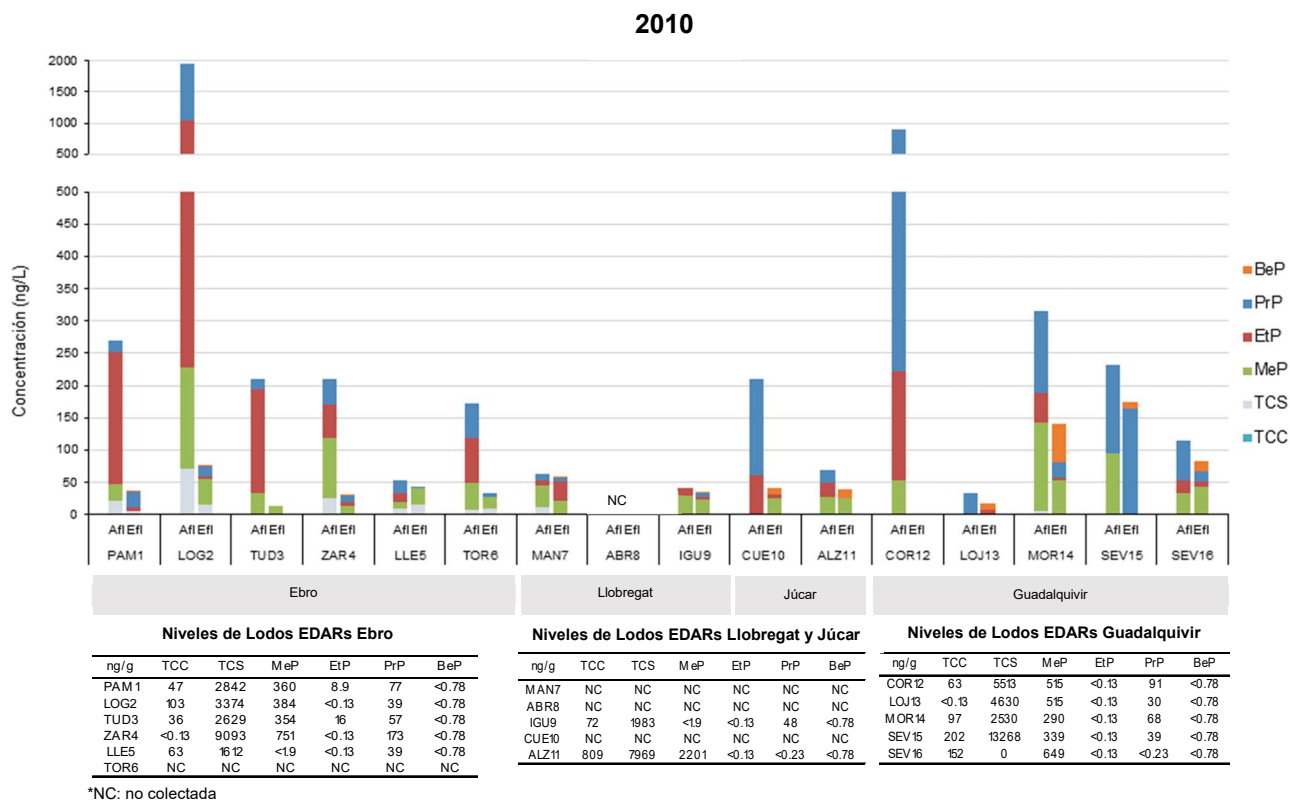


Figura 4.7.a Niveles de concentración de los desinfectantes (TCC y TCS) y parabenos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2010) en ng/L y ng/g, respectivamente

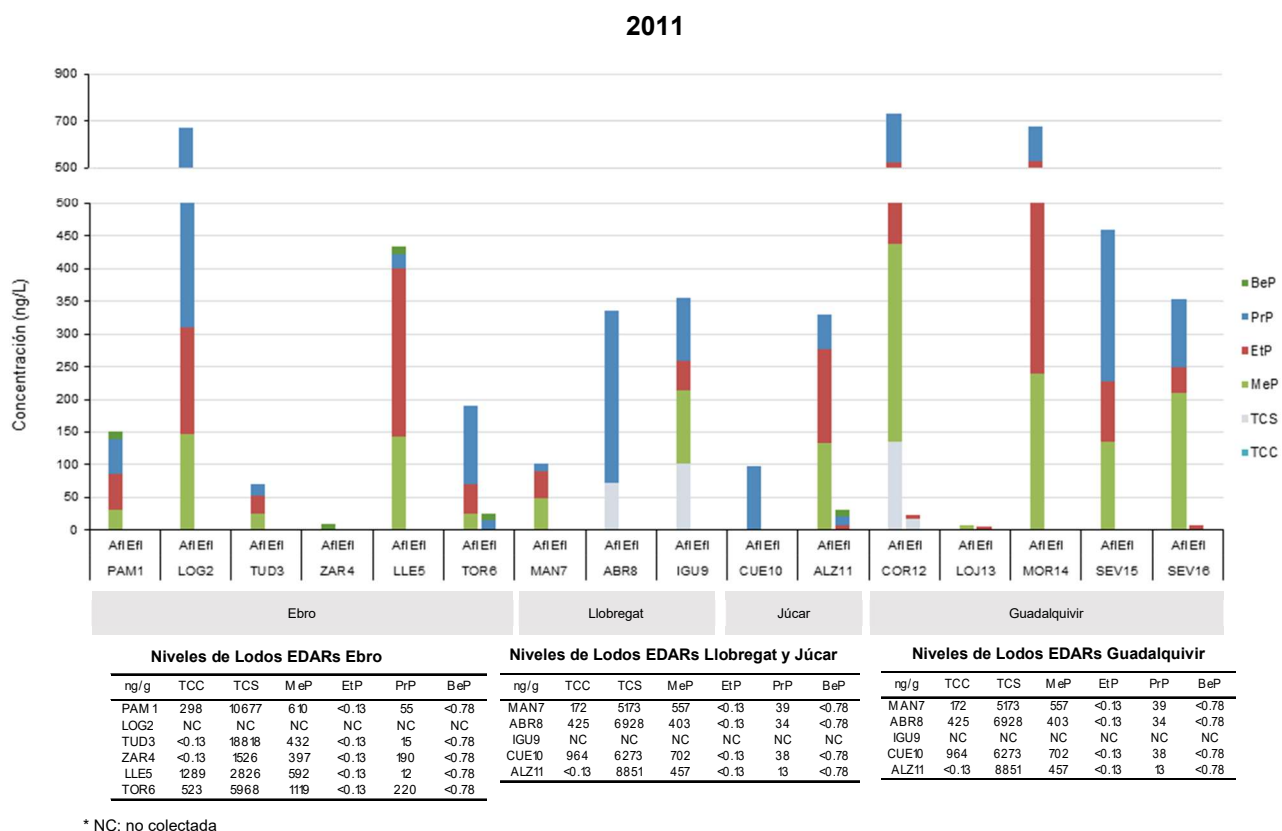


Figura 4.7.b Niveles de concentración de los desinfectantes (TCC y TCS) y parabenos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2011) en ng/L y ng/g, respectivamente

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Compuestos Alquifenólicos

Las concentraciones halladas de OP y NP en los afluentes de las EDARs estudiadas, compuestos sometidos a vigilancia y legislados por la DMA, ver apartado 1.1, pág.3, corroboraron el mayor uso de los tensioactivos de nonilfenol versus los de octilfenol, siendo los niveles de este producto de degradación más frecuentemente detectado y en niveles de mediana aproximadamente 10 veces superior a los niveles detectados de OP.

Centrándonos en las concentraciones máximas encontradas de estos subproductos, los niveles más altos de NP fueron detectados en la cuenca del Júcar en 2010 llegando a 1632 ng/L en ALZ11. Fijando la atención en las concentraciones medianas encontradas en afluentes, estas fueron de 448 ng/L, 406 ng/L y 411 ng/L para las cuencas de Llobregat, Júcar y Guadalquivir, respectivamente, siendo la cuenca del Ebro la que presentó niveles más bajos con una mediana de 163 ng/L. Por otro lado, las concentraciones detectadas de NP en efluentes de depuradora con medianas de entre 31 ng/L y 90 ng/L, evidenciaron la disminución de este compuesto en los efluentes de EDARs, aunque observando los niveles de NP en los lodos de depuradora analizados, este compuesto en realidad queda adsorbido en ellos, creando un problema en la reutilización de estos desechos.

Los porcentajes de eliminación de estos compuestos por parte de las EDARs estudiadas, observando los niveles presentados en las Figuras 4.8.a y b, no parecieron ser muy elevados para estos contaminantes, aunque en realidad las mayores concentraciones encontradas de estos compuestos en los efluentes estudiados fueron debidas al NP1EC, con concentraciones máximas de 2595 ng/L, 1150 ng/L, 1826 ng/L y 1540 ng/L en afluentes versus máximos de 3257 ng/L, 2606 ng/L, 326 ng/L y 2159 ng/L en efluentes en Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir, respectivamente. Además, incluso aun no siendo un compuesto de elevada lipofilidad, los niveles medianos encontrados en los lodos de depuradora fueron de 0.77 µg/g, 2.8 µg/g, 1.4 µg/g y 0.78 µg/g en las cuencas mencionadas estudiadas, evidenciando por tanto su alto poder recalcitrante, ver apartado 1.3, pág.36.

En cambio, observando los niveles de los otros compuestos alquifenólicos estudiados, estos sí parecieron en general ser eliminados por las EDARs de forma eficaz, encontrando niveles medianos máximos de 700 ng/L para el NP2EO en el caso de los afluentes de la cuenca del Ebro (cuenca con los niveles más elevados de este tipo de producto de degradación), bajando estas concentraciones a una mediana de 111 ng/L en efluentes, aunque teniendo en cuenta que las concentraciones halladas de este compuesto en los lodos estudiados, también parece indicar la posible eliminación de NP2EO de los efluentes por adsorción durante el tratamiento de lodos.

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

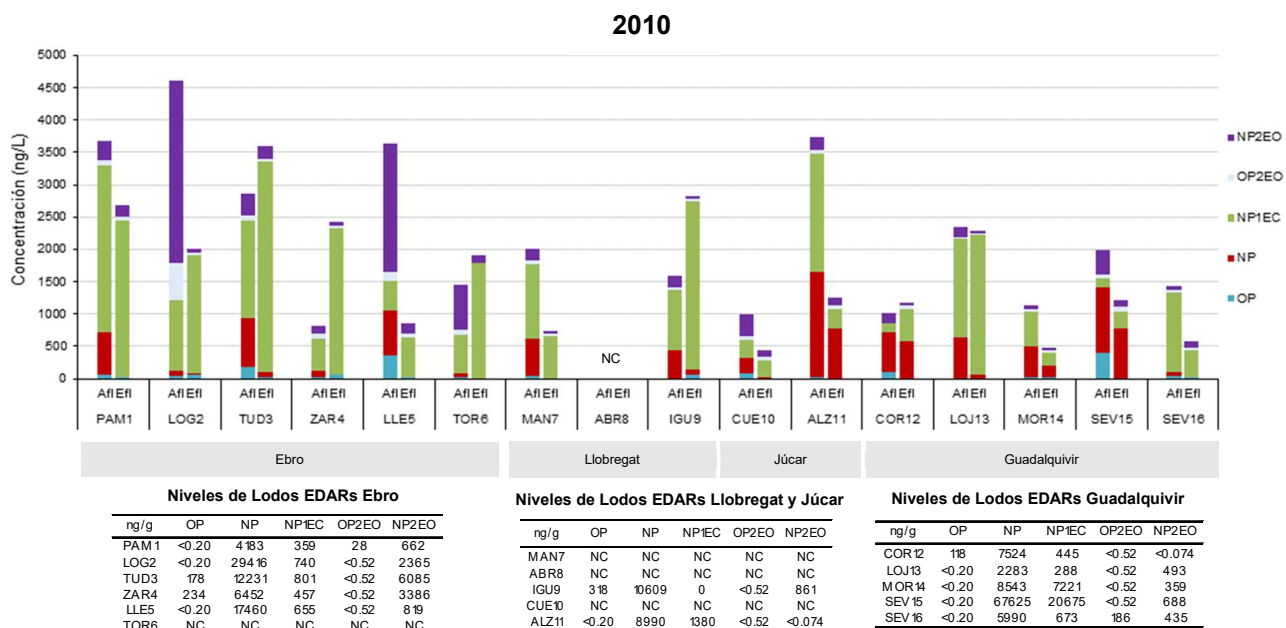


Figura 4.8.a Niveles de concentración de los compuestos alquilfenólicos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2010) en ng/L y ng/g, respectivamente

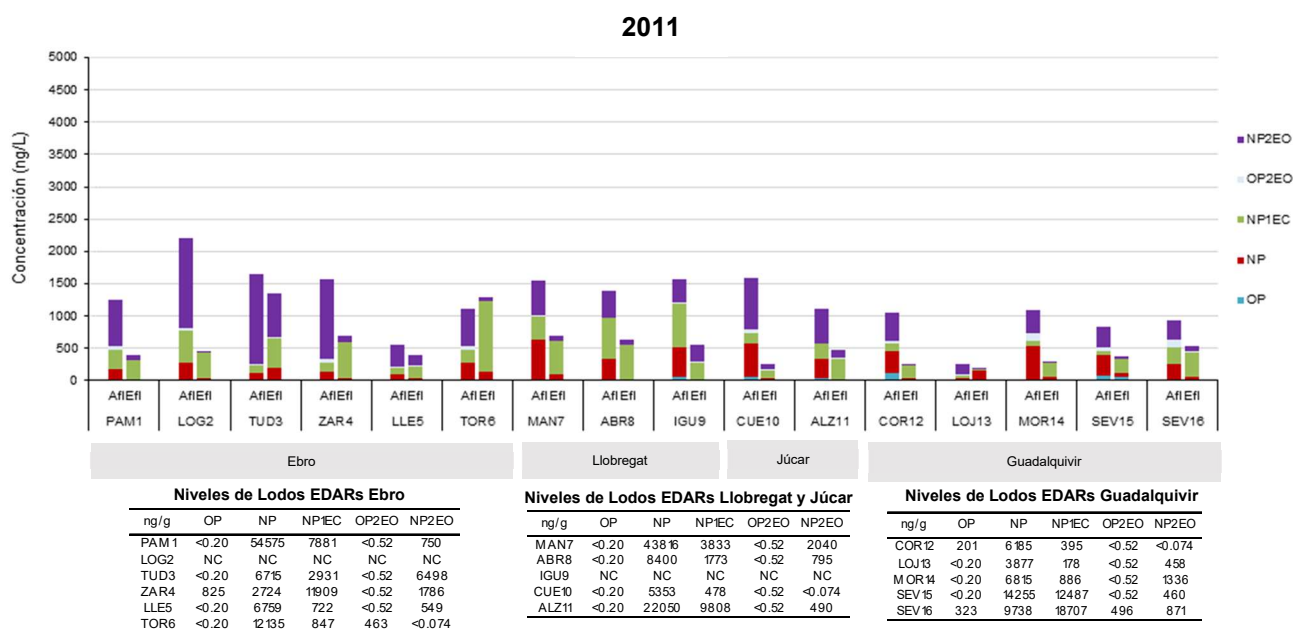


Figura 4.8.b Niveles de concentración de los compuestos alquilfenólicos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2011) en ng/L y ng/g, respectivamente

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

BPA, Benzotriazoles y Compuestos Organofosforados

Las medianas encontradas en los afluentes de depuradora de BPA fueron de 810 ng/L, 1013 ng/L, 350 ng/L, y 467 ng/L en Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir durante las 2 campañas muestreadas, respectivamente, llegando a máximos de 13 µg/L y 28 µg/L, en la EDAR de Pamplona (Ebro) en 2010 y 2011, respectivamente. Debido a la naturaleza de este contaminante los valores detectados en esta misma depuradora a la salida bajaron a concentraciones de 608 ng/L y 728 ng/L, respectivamente, aunque observando los niveles de BPA encontrados en sus lodos, de 3.6 µg/g y 5.1 µg/g en 2010 y 2011, respectivamente, se observa, que mientras este contaminante es eliminado de una manera bastante eficiente por esta depuradora, queda acumulado en sus lodos, tendencia que ya se ha visto en otros de los compuestos lipofílicos estudiados. Este comportamiento del BPA, generalmente, fue el observado en todas las depuradoras estudiadas, viendo por tanto que, aunque las concentraciones de BPA disminuían de manera significativa en los efluentes de depuradora, se acumulaban en los lodos creando una problemática a tener en cuenta en la reutilización de estos.

Los niveles determinados de los anticorrosivos estudiados (BTs) en afluentes de depuradora fueron, junto al retardante de llama TCPP y el plastificante TBEP, las concentraciones medianas más altas detectadas durante las 2 campañas de entre todos los compuestos estudiados. Centrándonos primero en los anticorrosivos, según los niveles medianos encontrados de TT de 4.4 µg/L en la cuenca del Ebro, la más contaminada por este tipo de productos, frente a la concentración mediana de 2.1 µg/L de BT detectada en esta cuenca, mostró el mayor uso de TT como anticorrosivo, viéndose esta tendencia en las demás cuencas. Las concentraciones de estos contaminantes en efluentes parecieron disminuir en general en todas las depuradoras, aunque con eliminaciones en general bastante bajas. Según la literatura, ver apartado 1.3, pág.38, la eliminación de estos compuestos depende mucho del tipo de tratamiento que siguen las EDARs, por tanto, estas eliminaciones en principio deben ser estudiados de forma más exhaustiva, analizando los resultados de manera individual y por EDAR analizada, para poder elucidar que tipo de tratamiento es el más adecuado para la eliminación de estos contaminantes. Por último, debido a su naturaleza bastante hidrofílica, estos no se acumularon demasiado en los lodos de depuradora, aunque debido a sus altos niveles en afluentes, los resultados encontrados en lodos alcanzaron niveles máximos de 3.8 µg/g de TT en la cuenca del Ebro (LLE5, 2011).

La cuenca del Ebro, siguiendo la misma tendencia que para los anticorrosivos, presentó los niveles máximos en afluentes de 18 µg/g y 20 µg/g de TBEP y TCPP, respectivamente, aunque sus niveles medianos fueron parecidos en todas las cuencas, entre 1.8-4.5 µg/g para TBEP y 1.2-1.6 µg/g para TCPP. El retardante TCEP fue encontrado en niveles bastante inferiores, evidenciando su reemplazo como retardante, ver apartado 1.2.1, pág.17.

En general, las tasas de eliminación en las EDARs para el TBEP se encuentran normalmente entre el 50%, esta tendencia fue la detectada en este estudio, acumulándose sin embargo en los lodos de depuradora. Para los compuestos organofosforados clorados TCPP y TCEP, más recalcitrantes, los niveles determinados en los efluentes estudiados fueron parecidos a los de los afluentes con concentraciones medianas que oscilaron entre 1.3-1.5 µg/L en las cuencas analizadas, siendo además los niveles en lodos no despreciables en el caso del TCPP debido a su naturaleza lipofílica.

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

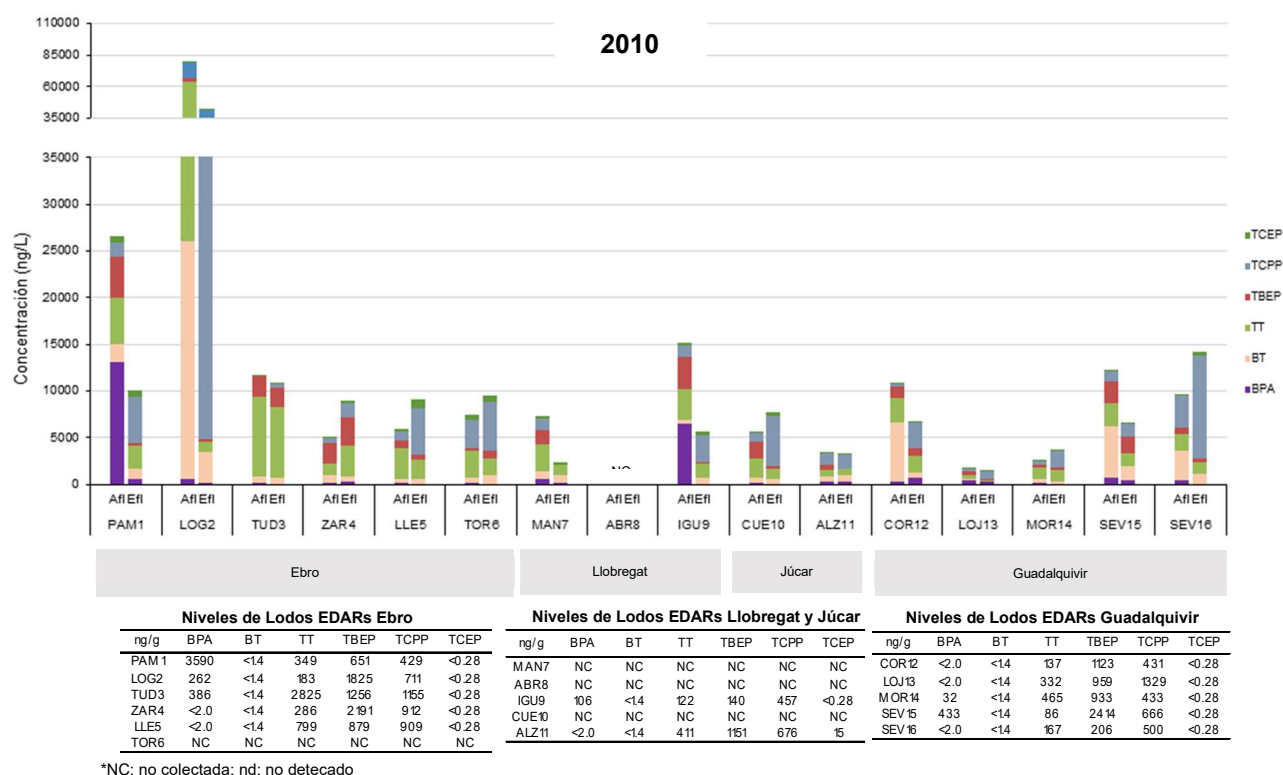


Figura 4.9.a Niveles de concentración del BPA, benzotriazoles y los compuestos organofosforados en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2010) en ng/L y ng/g, respectivamente

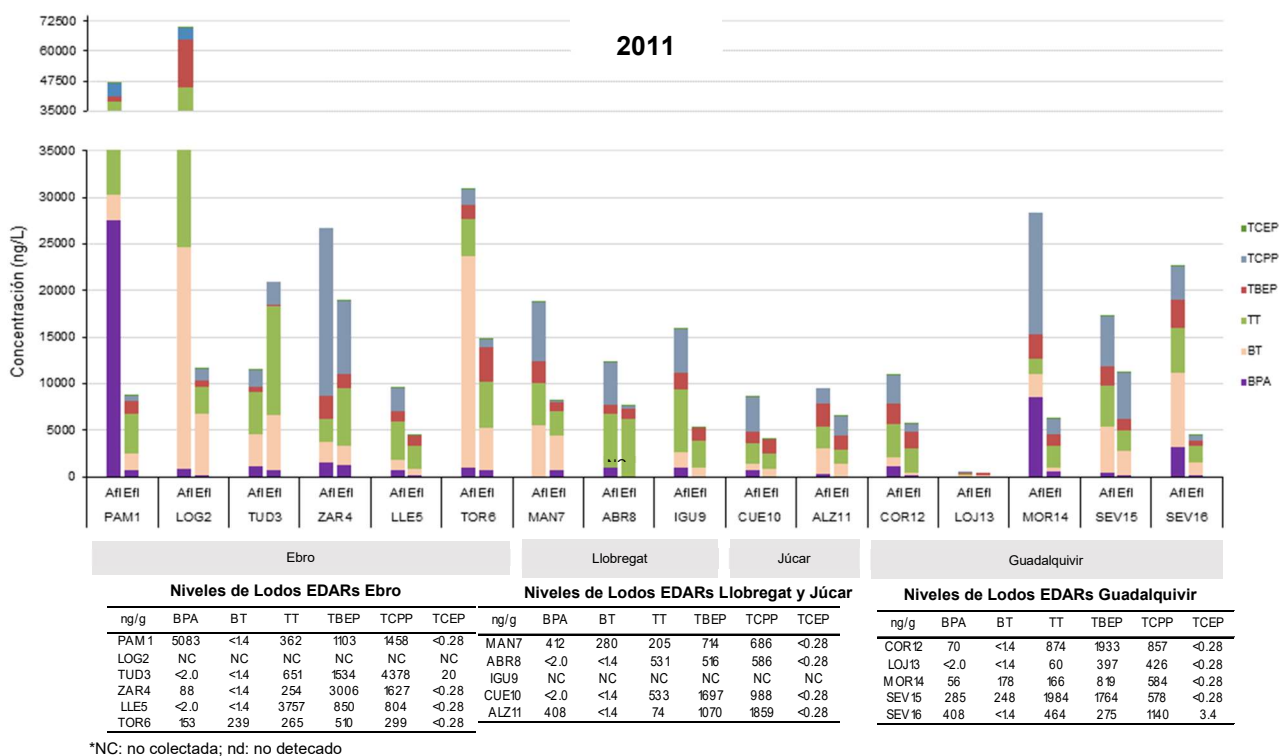


Figura 4.9.b Niveles de concentración del BPA, benzotriazoles y los compuestos organofosforados en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2011) en ng/L y ng/g, respectivamente

Tabla 4.3.a Comparación de los niveles encontrados con los datos publicados en la bibliografía para afluentes de depuradora

Compuesto	Ebro		Llobregat		Júcar		Guadalquivir		Datos publicados	
	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mediana mín.- máx.
E2	25	9-24 (23) ng/L	0	-	75	-	0	-	68	11-26 ng/L
E1	75	8-61 (24) ng/L	80	6-68 (19) ng/L	50	7-51 (29) ng/L	50	12-137 (21) ng/L	87	20-82 ng/L
E3	0	-	0	-	0	-	10	26-26 (26) ng/L	77	50-236 ng/L
E1-3S	50	9-26 (17) ng/L	20	19-19 (19) ng/L	50	5-14 (29) ng/L	50	6-27 (21) ng/L	-	-
E3-3S	50	8-43 (26) ng/L	0	-	25	19-19 (19) ng/L	10	48-48 (48) ng/L	-	-
E2-17G	0	-	0	-	0	-	0	-	-	-
E1-3G	25	19-62 (38) ng/L	0	-	0	-	10	94-94 (94) ng/L	-	-
E3-16G	0	-	0	-	0	-	0	-	-	-
TCC	0	-	0	-	0	-	0	-	89	360-1800 ng/L
TCS	42	8-72 (22) ng/L	60	12-102 (73) ng/L	0	-	20	5-135 (70) ng/L	92	380-1870 ng/L
MeP	92	9-157 (34) ng/L	80	28-111 (41) ng/L	50	27-134 (80) ng/L	80	8-304 (137) ng/L	85	590-3480 ng/L
EiP	92	14-814 (70) ng/L	80	8-46 (27) ng/L	75	23-142 862) ng/L	70	20-292 (83) ng/L	74	190-590 ng/L
PrP	92	16-913 (41) ng/L	80	10-263 (54) ng/L	100	20-149 (76) ng/L	90	33-680 (137) ng/L	83	520-2000 ng/L
BeP	25	10-11 (11) ng/L	0	-	0	-	0	-	-	-
OP	58	12-351 (35) ng/L	40	34-64 (49) ng/L	100	13-77 (47) ng/L	60	16-407 (83) ng/L	71	100-527 ng/L
NP	100	56-755 (163) ng/L	100	328-644 (448) ng/L	100	238-1632 (406) ng/L	100	40-999 (411) ng/L	88	505-2698 ng/L
NP1EC	100	116-2595 (474) ng/L	100	343-1150 (682) ng/L	100	153-1826 (256) ng/L	100	43-1540 (144) ng/L	-	-
OP2EO	100	17-581 (71) ng/L	80	25-58 (39) ng/L	100	13-64 (63) ng/L	100	5-120 (43) ng/L	-	-
NP2EO	100	124-2819 (700) ng/L	100	181-531 (353) ng/L	100	204-204 (434) ng/L	100	60-451 (234) ng/L	-	-
BPA	100	0.16-28 (0.81) µg/L	80	517-6520 (1013) ng/L	100	122-670 (350) ng/L	100	64-8597 (467) ng/L	72	238-529 µg/L
BT	100	0.42-25 (2.1) µg/L	80	442-5529 (1198) ng/L	100	454-2685 (665) ng/L	100	129-8072 (2792) ng/L	100	580-6634 µg/L
TT	100	1.3-38 (4.4) µg/L	100	2937-6717 (4573) ng/L	100	719-2346 (2071) ng/L	100	54-4717 (2140) ng/L	83	925-5950 µg/L
TBEP	100	0.31-18 (2.3) µg/L	100	1516-6340 (4494) ng/L	100	584-3754 (1764) ng/L	100	0.23-13 (1.8) µg/L	90	600-6100 µg/L
TCPP	100	0.069-20 (1.6) µg/L	100	1053-2285 (1310) ng/L	100	1015-2474 (1257) ng/L	100	136-3429 (1543) ng/L	88	616-2369 µg/L
TCEP	92	9-588 (45) ng/L	100	16-244 (45) ng/L	75	19-141 (137) ng/L	80	6-113 (66) ng/L	67	172.5-600 ng/L

Concentración mín.: primer valor por encima del límite de detección

Tabla 4.3.b Comparación de los niveles encontrados con los datos publicados en la bibliografía para efluentes de depuradora

Compuesto	<u>Ebro</u>		<u>Llobregat</u>		<u>Júcar</u>		<u>Guadalquivir</u>		<u>Datos publicados</u>	
	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mediana mín.- máx.
E2	67	3-11 (5) ng/L	60	8-9 (8) ng/L	0	-	30	6-9 (8) ng/L	44	1.4-11 ng/L
E1	92	1-23 (15) ng/L	100	1-20 (10) ng/L	75	9-17 (15) ng/L	70	3-35 (13) ng/L	63	3.0-40 ng/L
E3	0	-	0	-	0	-	0	-	19	8.0-22 ng/L
E1-3S	50	1-9 (2) ng/L	0	-	25	18-18 (18) ng/L	30	5-30 (6) ng/L	-	-
E3-3S	42	6-20 (8) ng/L	0	-	0	-	20	8-32 (20) ng/L	-	-
E2-17G	0	-	20	82-82 (82) ng/L	25	100-100 (100) ng/L	0	-	-	-
E1-3G	17	30-31 (30) ng/L	20	38-38 (38) ng/L	50	16-24 (20) ng/L	10	56-56 (56) ng/L	-	-
E3-16G	0	-	0	-	0	-	10	6-6 (6) ng/L	-	-
TCC	0	-	0	-	0	-	0	-	75	85-144 ng/L
TCS	33	6-16 (12) ng/L	0	-	0	-	10	17-17 (17) ng/L	86	65-149 ng/L
MeP	42	13-40 (17) ng/L	72	21-23 (22) ng/L	50	25-26 (26) ng/L	20	43-53 (48) ng/L	44	6-51 ng/L
EiP	25	5-7 (6) ng/L	40	4-31 (18) ng/L	50	6-7 (7) ng/L	60	5-8 (7) ng/L	20	1.9-17 ng/L
PrP	58	1-24 (10) ng/L	40	6-6 (6) ng/L	25	15-15 (15) ng/L	30	17-164 (22) ng/L	31	7.0-21 ng/L
BeP	33	1-10 (2) ng/L	40	1-1 (1) ng/L	75	10-12 (10) ng/L	40	10-61 (13) ng/L	-	-
OP	58	5-64 (21) ng/L	40	-	0	-	30	23-51 (30) ng/L	73	16-100 ng/L
NP	67	28-207 (41) ng/L	40	79-102 (90) ng/L	100	13-785 (31) ng/L	90	45-774 (62) ng/L	77	293-758 ng/L
NP1EC	100	192-3257 (860) ng/L	100	274-2606 (564) ng/L	100	124-326 (284) ng/L	100	23-2159 (248) ng/L	-	-
OP2EO	75	2-55 (36) ng/L	80	1-43 (29) ng/L	100	3-46 (27) ng/L	80	1-72 (37) ng/L	-	-
NP2EO	100	34-678 (111) ng/L	100	28-255 (65) ng/L	100	80-130 (114) ng/L	100	11-104 (31) ng/L	-	-
BPA	100	50-1238 (190) ng/L	100	60-658 (84) ng/L	75	30-358 (94) ng/L	100	43-720 (179) ng/L	63	24-209 ng/L
BT	100	446-6575 (1440) ng/L	80	565-3821 (883) ng/L	100	522-1326 (679) ng/L	100	39-2598 (546) ng/L	100	840-3453 ng/L
TT	100	1.2-12 (3.1) µg/L	100	1145-6098 (2562) ng/L	100	706-1757 (1308) ng/L	100	11-2641 (1572) ng/L	94	650-4302 µg/L
TBEP	100	40-7803 (830) ng/L	80	51-364 (120) ng/L	100	26-2079 (195) ng/L	90	76-4974 (786) ng/L	88	290-4400 ng/L
TCPP	100	0.12-36 (1.5) µg/L	80	1004-2798 (1275) ng/L	100	1491-5295 (1515) ng/L	100	0.32-11 (1.3) µg/L	100	344-2390 µg/L
TCEP	92	16-954 (165) ng/L	100	9-518 (79) ng/L	100	10-408 (96) ng/L	90	5-384 (111) ng/L	56	140-615 ng/L

Concentración mín.: primer valor por encima del límite de detección

Tabla 4.3.c Comparación de los niveles encontrados con los datos publicados en la bibliografía para lodos de depuradora

Compuesto	<u>Ebro</u>		<u>Llobregat</u>		<u>Júcar</u>		<u>Guadalquivir</u>		<u>Datos publicados</u>	
	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Concentración mediana mín.- máx.
E2	0	-	0	-	0	-	0	-	60	5.9-98 ng/g
E1	30	56-130 (73) ng/g	0	-	0	-	20	8-8 (8) ng/g	87	8.3-18 ng/g
E3	0	-	0	-	67	3-23 (13) ng/g	20	92-177 (135) ng/g	50	47-58 ng/g
E1-3S	10	3-3 (3) ng/g	0	-	33	12-12 (12) ng/g	0	-	-	-
E3-3S	0	-	0	-	0	-	0	-	-	-
E2-17G	50	17-42 (29) ng/g	17	41-41 (41) ng/g	33	23-23 (23) ng/g	10	64-64 (64) ng/L	-	-
E1-3G	0	-	0	-	0	-	0	-	-	-
E3-16G	0	-	0	-	0	-	0	-	-	-
TCC	70	36-1289 (103) ng/g	50	72-425 (172) ng/g	67	809-964 (887) ng/g	60	63-205 (124) ng/g	93	362-2180 ng/g
TCS	100	1.5-19 (3.1) µg/g	50	1983-6928 (5173) ng/g	100	6.3-8.8 (8.0) µg/g	90	435-13268 (3061) ng/g	82	508-3277 ng/g
MeP	90	354-1119 (432) ng/g	33	403-557 (480) ng/g	100	457-2201 (702) ng/g	100	290-696 (439) ng/g	89	16-151 ng/g
EiP	20	9-16 (12) ng/g	0	-	0	-	0	-	90	2.3-6.7 ng/g
PrP	100	12-220 (56) ng/g	50	34-48 (39) ng/g	67	13-38 (25) ng/g	90	29-175 (68) ng/g	88	6.0-18 ng/g
BeP	0	-	0	-	0	-	0	-	-	-
OP	30	178-825 (234) ng/g	17	318-318 (318) ng/g	0	-	30	118-323 (201) ng/g	-	-
NP	100	2.7-54 (9.4) µg/g	50	8.4-44 (11) µg/g	100	5.3-22 (9.0) µg/g	100	2.3-68 (7.2) ng/g	-	-
NP1EC	100	0.36-12 (0.77) µg/g	33	1773-3833 (2803) ng/g	100	478-9808 (1380) ng/g	100	0.18-21 (0.78) ng/g	-	-
OP2EO	20	28-463 (246) ng/g	0	-	0	-	20	186-496 (341) ng/g	-	-
NP2EO	90	549-6498 (1786) ng/g	50	795-2040 (861) ng/g	33	490-490 (490) ng/g	80	359-1336 (477) ng/g	-	-
BPA	60	88-5083 (324) ng/g	33	106-412 (259) ng/g	33	408-408 (408) ng/g	60	32-433 (178) ng/g	80	92-725 ng/g
BT	10	239-239 (239) ng/g	17	280-280 (280) ng/g	0	-	20	178-248 (213) ng/g	92	17-120 ng/g
TT	100	183-3757 (356) ng/g	50	122-531 (205) ng/g	100	74-553 (411) ng/g	100	60-1984 (249) ng/g	100	60-160 ng/g
TBEP	100	510-3006 (1180) ng/g	50	140-714 (516) ng/g	100	1070-1697 (1151) ng/g	100	206-2414 (946) ng/g	80	26-383 ng/g
TCPP	100	299-4378 (910) ng/g	50	457-686 (586) ng/g	100	676-1859 (988) ng/g	100	426-1329 (581) ng/g	86	18-409 ng/g
TCEP	10	20-20 (20) ng/g	0	<0.28-<0.28 (<0.28) ng/g	100	15-15 (15) ng/g	10	3-3 (3) ng/g	67	5.8-122 ng/g

Concentración mín.: primer valor por encima del límite de detección

Estrogenicidad

Debido a las diferentes potencias estrogénicas de los compuestos estudiados, la comparación en términos de concentraciones no da una idea clara de la eliminación en términos de riesgo estrogénico en las EDARs estudiadas.

Por esta razón, a partir de las concentraciones detectadas en los afluentes y efluentes analizados, se calculó la actividad estrogénica total, ver apartado 1.2.3, pág.26. Los niveles acumulados de EEQs se muestran en la **Figura 4.10.a-d**, y en la **información adicional, anexo BII Tabla BII.10.a-b, pág.296**. Teniendo en cuenta que los valores más elevados del factor EEFi, los encontramos en el grupo de estrógenos analizados, y que el objetivo de este apartado era estudiar de manera global el comportamiento estrogénico de los compuestos analizados en aguas de afluentes y efluentes de las depuradoras analizadas, la Figura 4.10 muestra el aporte estrogénico total en Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir de los estrógenos y sus conjugados, así como el aportado por los otros compuestos analizados y el total encontrado, representando los niveles mínimos, máximos y mediana (para estas representaciones no se han tenido en cuenta los niveles encontrados por debajo del LOD).

Observando de manera general los resultados obtenidos, aunque los niveles máximos en los afluentes de depuradora para todas las cuencas fueron superiores que los calculados en los efluentes, las medianas de estrogenicidad mostraron niveles de potencial superior en las salidas de las EDARs estudiadas. Esto fue debido al gran aporte disruptor de las hormonas estudiadas, las cuales no son eliminadas eficientemente en las EDARs, que además fomentan la interconversión entre ellas durante los procesos de tratamiento, ver apartado 1.3, pág.31, llegando incluso, como se puede ver en las gráficas representadas, a aumentar el riesgo disruptor una vez tratadas las aguas residuales. Siendo los valores de los potenciales estrogénicos medianos totales en los efluentes de las distintas cuencas estudiadas de 5.75 ngE2/L, 7.76 ngE2/L, 3.45 ngE2/L y 6.78 ngE2/L, en Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir, respectivamente.

También se pudo ver como el mayor aporte estrogénico en todas las cuencas estudiadas fue debido a la hormona E1, el estrógeno detectado a niveles más altos y con un potencial estrogénico elevado, exceptuando la cuenca del Ebro, que presentó niveles de concentración no muy elevados de E2, pero que aportaron gran estrogenicidad.

Por último, si se analiza el aporte estrogénico de los otros compuestos representados y teniendo en cuenta los niveles de concentración presentados en el apartado anterior que en ocasiones llegaron al orden de $\mu\text{g/L}$, se esperaría un mayor aporte a los niveles de EEQs totales, sin embargo, debido a sus bajos valores de EFFis, su contribución no fue muy significativa.

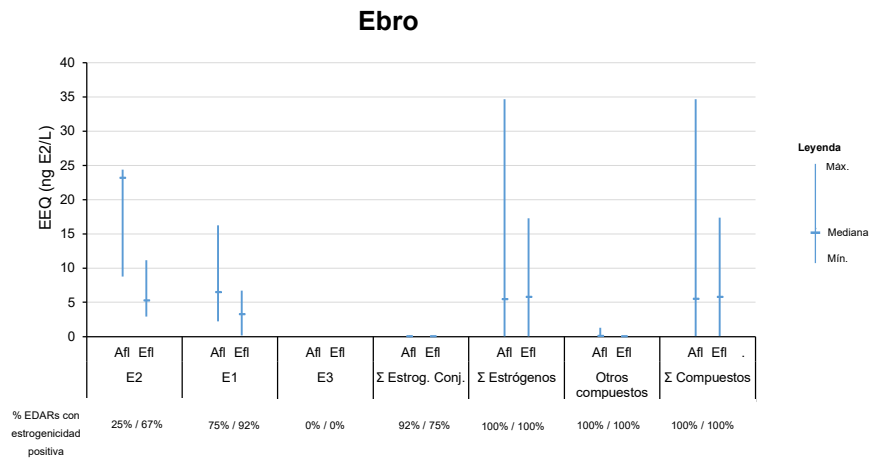


Figura 4.10.a Estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en la cuenca del Ebro durante 2010 y 2011

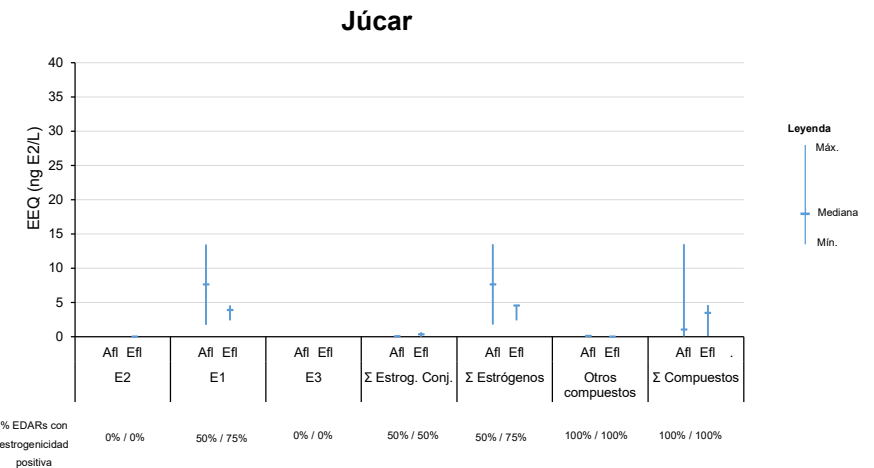


Figura 4.10.c Estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en la cuenca del Júcar durante 2010 y 2011

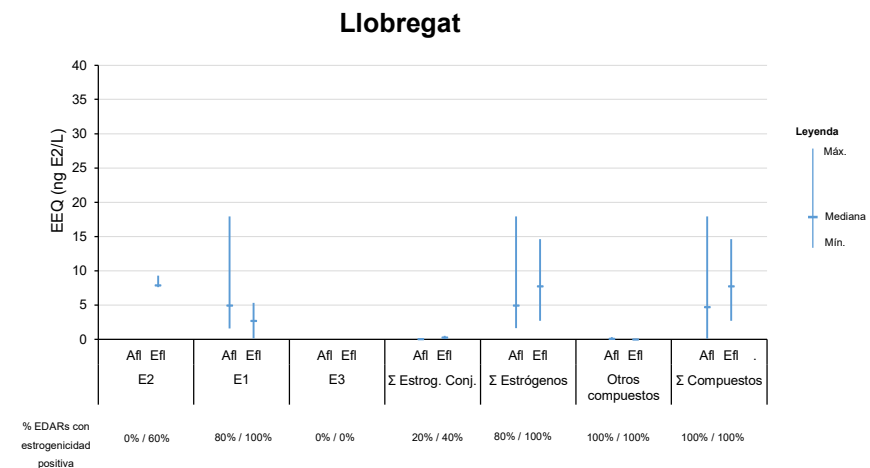


Figura 4.10.b Estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en la cuenca del Llobregat durante 2010 y 2011

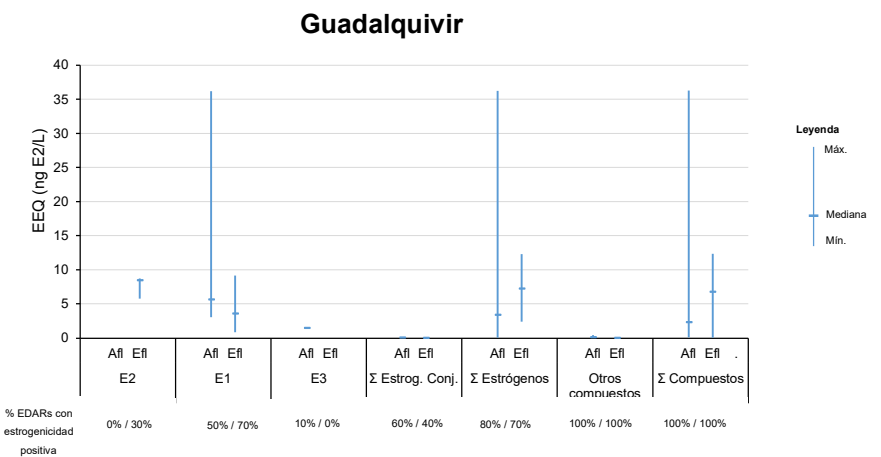


Figura 4.10.d Estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en la cuenca del Guadalquivir durante 2010 y 2011

Conclusiones

El estudio de los niveles determinados, distribución e eliminación de EDCs por parte de las EDARs, es un requisito previo para la evaluación del riesgo que estos contaminantes representan para los organismos acuáticos. Este, confirma la presencia de mezclas complejas de contaminantes regulados, en vigilancia o no regulados de diversos orígenes en las aguas de salida de las EDARs estudiadas, lo que genera preocupación por sus posibles efectos interactivos y confirmando que las tecnologías aplicadas en las estaciones de depuración de la Península, no són, en la mayoría de los casos eficientes a la eliminación de este tipo de contaminantes.

Los compuestos utilizados en formulaciones industriales para diversos fines, como los compuestos alquilfenólicos, los benzotriazoles, los retardantes de llama y plastificantes organofosforados, son contaminantes importantes que tienen posibles efectos de alteración endocrina, fueron todos detectados a concentraciones de hasta varios $\mu\text{g/L}$ en efluentes. Sin embargo, si se analiza el aporte estrogénico de estos, teniendo en cuenta sus niveles de concentración, se esperaría un mayor aporte a los niveles de EEQs totales, pero debido a sus bajos valores de EFFis, su contribución al potencial estrogénico en las aguas residuales no fue muy significativa. Siendo la suma de los estrógenos estudiados encontrados en máximos no superiores a unos 250 ng/L, concretamente 233 ng/L, los que aportaron la mayor estrogenicidad detectada tanto en aguas de afluentes como de efluentes.

Además, observando de manera general los resultados obtenidos para los estrógenos, aunque los niveles máximos en los afluentes de depuradora para todas las cuencas fueron superiores que los calculados en los efluentes, las medianas de estrogenicidad mostraron niveles de potencial superior en las salidas de las EDARs estudiadas. Esto es debido al gran aporte disruptor de las hormonas estudiadas, las cuales no son eliminadas eficientemente en las EDARs, que además fomentan la interconversión entre ellas durante los procesos de tratamiento, llegando incluso, a aumentar el riesgo disruptor una vez tratadas las aguas residuales.

4.4 Discusión

Los niveles de EDCs detectados en el estudio de monitorización de las cuencas de la Península Ibérica dentro del marco del proyecto SCARCE, objeto de esta tesis, ya ha sido discutido a lo largo de los distintos apartados de este Capítulo 4, estos niveles también pueden ser comparados con los publicados en la literatura y presentados en el apartado 1.4, pág.39.

Sin embargo, para acabar de completar este capítulo, a continuación, se presentan una serie de figuras resumiendo los datos/niveles determinados de EDCs durante el proyecto SCARCE, así como su comparativa con los niveles encontrados en las referencias bibliográficas reportadas en la introducción, apartado 1.4, pág. 39, sobretodo para actualizar la comparativa de niveles presentada en el apartado 4.2, pág. 119, que están basados en una publicación del 2014. Estas figuras se han centrado en los niveles encontrados en aguas de río y residuales de EDARs.

Los datos, han sido tratados aplicando una estadística descriptiva de diagrama de cajas y bigotes, y se han centrado en los compuestos más relevantes y que por tanto existen más estudios de niveles medioambientales, como en el caso de los estrógenos naturales, el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas superficiales y residuales (la hormona sintética EE2 no ha sido incluida al ser detectada solamente en un punto en el caso de las aguas de río analizadas y en no ser encontrada en ninguna de las EDARs estudiadas).

4.4.1 Niveles determinados en aguas y sedimentos de río

En la **Figura 4.11.a-b** expuesta a continuación, se ha representado la distribución de las concentraciones detectadas en aguas de río de las cuencas de la Península Ibérica estudiadas, estas se han comparado con los niveles mínimos y máximos encontrados en la literatura, para los compuestos más relevantes estudiados, como se ha mencionado anteriormente, actualizando así los niveles determinados en el estudio presentado en esta tesis.

Por último y al existir bastantes datos reportados publicados para los contaminantes mencionados, en esta figura también se ha representado los niveles máximos encontrados anteriores y posteriores a 2010, año donde se empezó el estudio experimental de esta tesis, principalmente para visualizar la evolución de estos contaminantes a lo largo de los años, teniendo en cuenta además que los compuestos representados se encuentran a día de hoy legislados y/o han estado o están en vigilancia, ver apartado 1.1, pág.3.

La hormona más frecuentemente detectada en nuestro estudio fue la E1, la distribución de esta en las cuencas analizadas, así como para la hormona de alto poder disruptor E2 fue parecida en todos los ríos, ambas encontrándose además en el rango de concentración de los mínimos detectados publicados en la bibliografía. La hormona E3, fue detectada en muy pocos puntos de los estudiados, siendo además los niveles máximos encontrados no muy elevados según otros datos publicados.

4. Estudio de EDCs en ríos y EDARs de la Península Ibérica

Igualmente, la distribución en los niveles de BPA, OP y NP en las cuatro cuencas fue parecida, con medianas inferiores a las mínimas publicadas excepto para el BPA, no llegando por eso los niveles medianos de este contaminante en ninguna de las cuencas a superar las medianas máximas publicadas.

Por último, fijándonos en la distribución de los máximos publicados para los EDCs representados, no existen muchas diferencias entre los niveles anteriores a 2010 y los posteriores, seguramente en el caso de los compuestos alquilfenólicos por llevar más de 2 décadas sometidos a restricción, y en el caso de las hormonas y el BPA, por estar en listas de vigilancia.

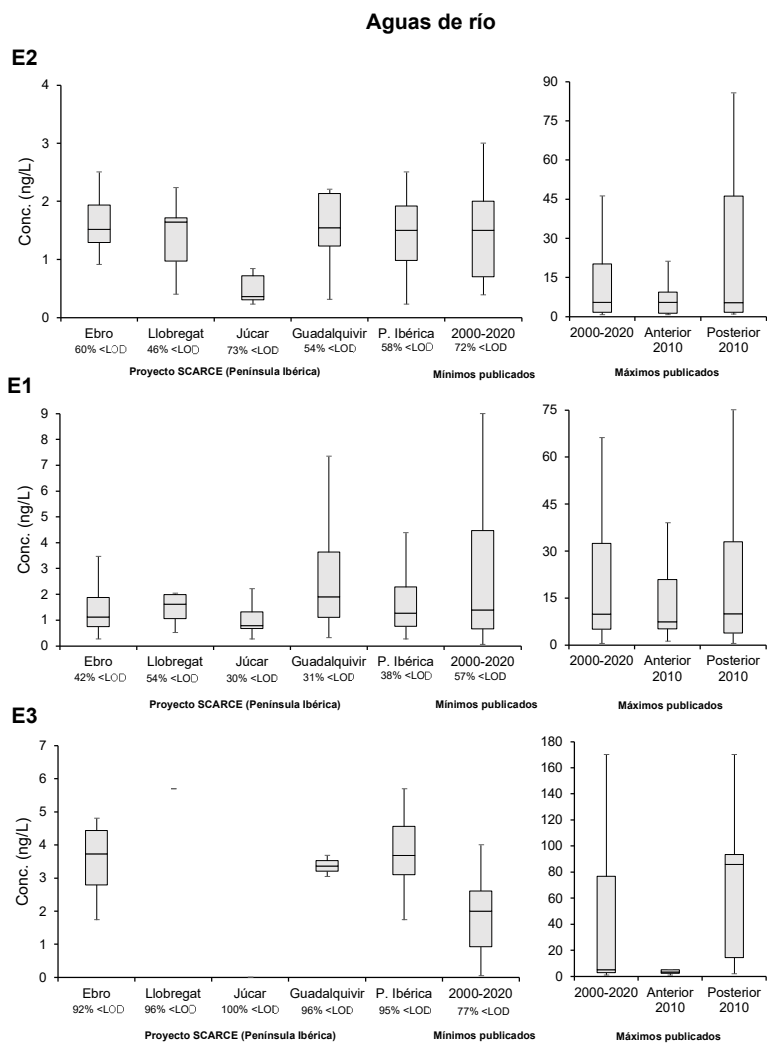


Figura 4.11.a Distribución de las concentraciones detectadas para los estrógenos en aguas de río de las cuencas de la Península Ibérica estudiadas, y comparación con los niveles publicados

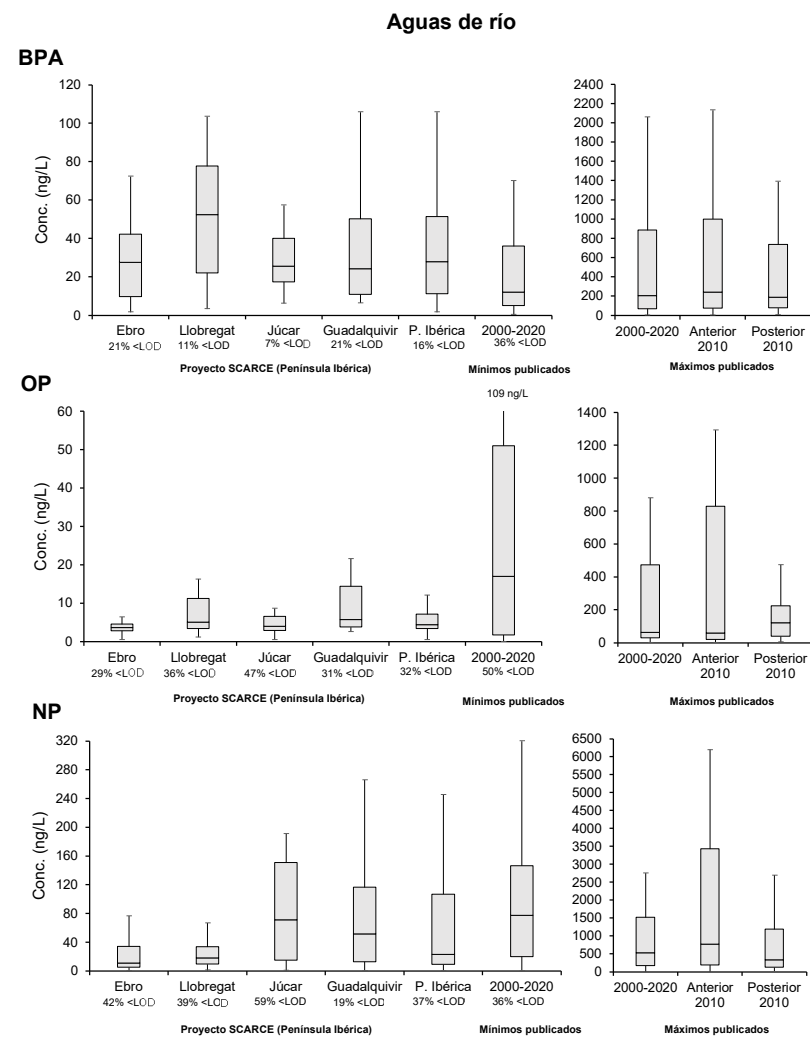


Figura 4.11.b Distribución de las concentraciones detectadas para el BPA, OP y NP en aguas de río de las cuencas de la Península Ibérica estudiadas, y comparación con los niveles publicados

4.4.2 Niveles en aguas residuales y lodos de depuradora

En la **Figura 4.12.a-b** expuesta a continuación, se ha representado la distribución de las concentraciones detectadas en aguas residuales de EDARs de las cuencas de la Península Ibérica estudiadas, estas se han comparado con los niveles mínimos y máximos encontrados en la literatura (igual que en apartada anterior de los compuestos más relevantes estudiados en esta tesis). Otra vez, al existir bastantes datos reportados publicados para los contaminantes mencionados, en estas figuras también se ha representado los niveles máximos encontrados anteriores y posteriores a 2010, esto se ha realizado por las mismas razones expuestas en el apartado anterior

Las hormonas E1 y E3 encontradas en las EDARs estudiadas se detectaron a niveles de los mínimos publicados, siendo incluso en el caso de la E3 solamente encontrada en una de las EDARs monitoreadas. Sin embargo, la hormona E2, aunque presentó en gran parte de los afluentes estudiados niveles inferiores al LOD, los valores positivos dieron una mediana parecida a las medianas máximas publicadas. Además, la frecuencia de detección en efluentes de depuradora fue más elevada y los niveles detectados, aunque inferiores a los detectados en afluentes también se encontraron en el rango de niveles máximos publicados en la bibliografía. Fijándonos en los niveles publicados antes de la realización de nuestro estudio, 2010 y posterior, igual que pasaba en las aguas de río, se puede observar cómo los niveles de hormonas en general tanto en afluentes como efluentes de depuradora no han disminuido.

Los niveles medianos encontrados de BPA en las EDARs de nuestro estudio, fueron parecidos a los niveles medianos publicados, no llegando por eso a niveles máximos tan altos. En el caso de este contaminante, sí que parece haber disminuido sus concentraciones sobretodo en las entradas de EDARs según los datos publicados antes y después de 2010, sin embargo, los niveles en efluentes siguen siendo parecidos hoy en día, evidenciando la problemática que sigue habiendo sobre la eliminación de este tipo de contaminantes orgánicos en las EDARs en general.

Para los compuestos alquilfenolicos OP y NP representados, parece haber una tendencia más clara en su menor uso fijándonos en los niveles anteriores y posteriores a 2010 que la que se refleja en las gráficas de río. En la Figura 4.11.b, también se puede ver como estos son bastante eficientemente eliminados de las EDARs, aunque como ya se ha discutido anteriormente en este capítulo estos se bioacumulan en los lodos generados. Por último, se puede observar cómo los niveles encontrados de estos contaminantes regulados en las EDARs estudiadas de la Península Ibérica fueron bastante bajos en comparación a los publicados en la bibliografía.

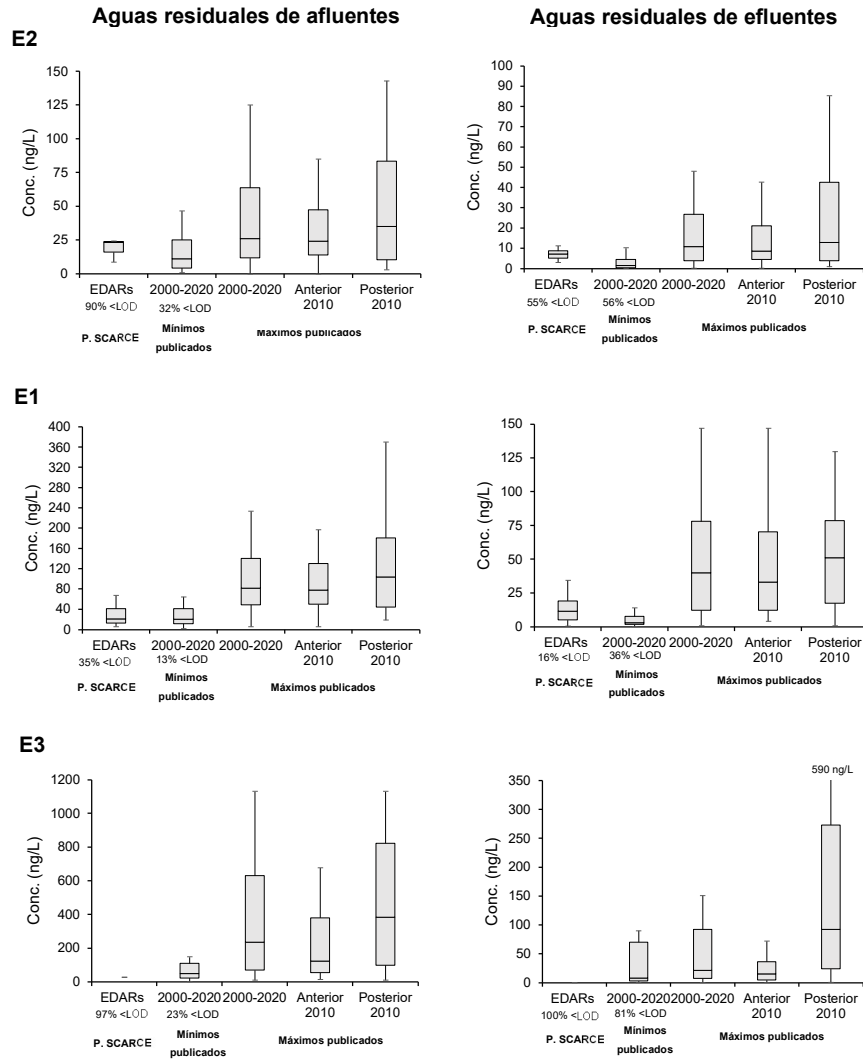


Figura 4.12.a Distribución de las concentraciones detectadas para los estrógenos en aguas de EDARs de la Península Ibérica, y comparación con los niveles publicados

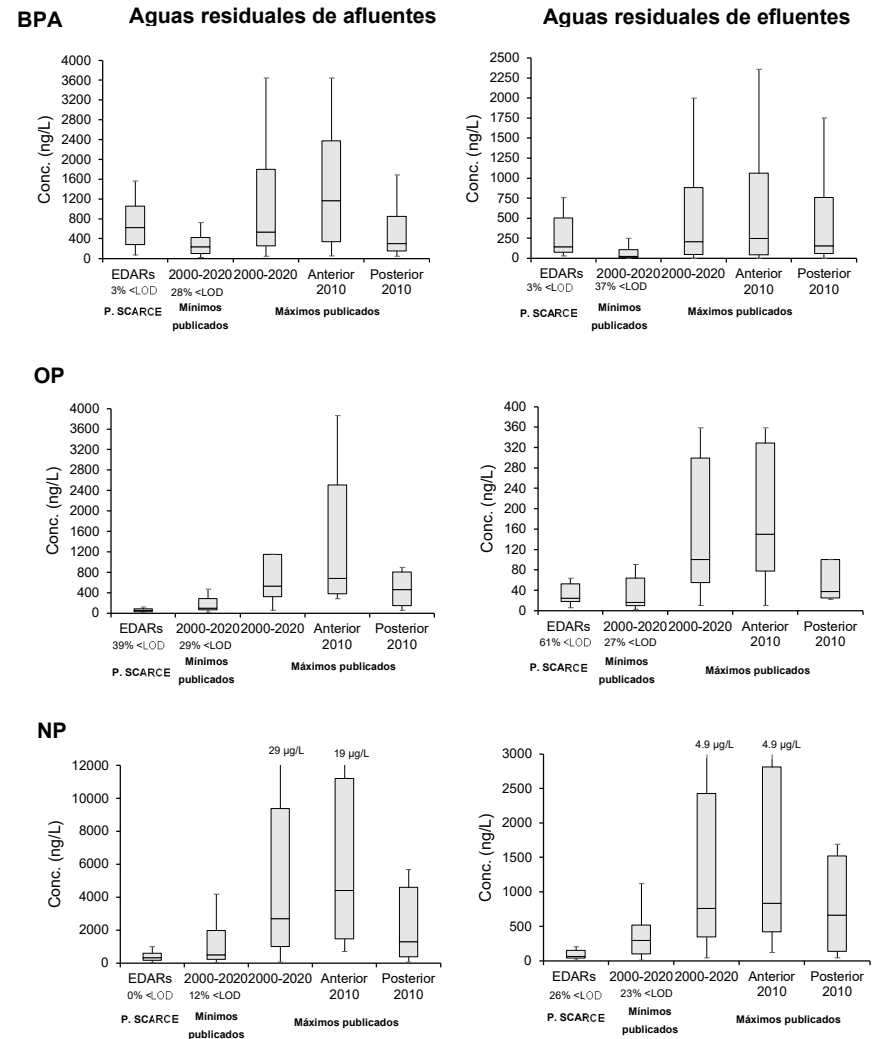


Figura 4.12.b Distribución de las concentraciones detectadas para el BPA, OP y NP en aguas de EDARs de la Península Ibérica, y comparación con los niveles publicados

Capítulo 5

Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

5.1 Introducción

Durante la elaboración experimental de esta tesis, una vez finalizados y validados los métodos analíticos para la determinación de EDCs en aguas de río y depuradoras, se realizaron una serie de colaboraciones con otras instituciones y/o universidades con el fin de aplicar las metodologías desarrolladas a otros estudios donde estos compuestos fueran de interés.

De estas colaboraciones surgieron 5 publicaciones, las 4 primeras relacionadas con la determinación de EDCs en distintos tipos de aguas, mientras que la última se centró en un estudio de eliminación de EDCs, esta publicación también estudió la degradación de fármacos, pero al no ser compuestos objetos de esta tesis, no serán referenciados en el resumen de esta publicación que, junto a las otras, se resumirán a continuación.

Al tratarse de colaboraciones, en los apartados siguientes solo se expondrá la parte en que se colaboró activamente, en concreto se describirán las muestras analizadas y los niveles encontrados para EDCs. La discusión de los resultados obtenidos en cada estudio se puede consultar en las publicaciones referenciadas a continuación. Aunque, para completar el siguiente apartado 5.2 de este capítulo, se presentará una tabla resumen con los niveles determinados en las distintas aguas analizadas, con los mismos métodos, comparándolas también con los niveles presentados en el proyecto SCARCE, objeto principal en la parte de monitoreo de esta tesis, para de tener una idea global de los niveles que se pueden encontrar en los distintos tipos de aguas, así como en distintas áreas del mundo.

El estudio de eliminación de EDCs que se presentará en el apartado 5.3 de este capítulo, no será discutido, ya que es una aplicación tecnológica de biorreactores que se desvía bastante de los temas tratados en esta tesis. Aunque se ha querido presentar por eso un pequeño resumen para poder visualizar que existen otras posibles aplicaciones de los métodos desarrollados que no tenga que ver solamente con un estudio de niveles medioambientales.

Determinación de EDCs en aguas superficiales, de consumo y en regiones remotas

Publicación científica 5:

Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain

Esteban S., Gorga M., Petrovic M., González-Alonso S., Barceló D., Valcárcel Y.

Science of The Total Environment (2014); 466–467: 939–951

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.101>

Publicación científica 6:

Monitoring endocrine disrupting compounds and estrogenic activity in tap water from Central Spain

Esteban S., Gorga M., González-Alonso S., Petrovic M., Barceló D., Valcárcel Y.

Environmental Science and Pollution Research (2014); 21: 9297-9310

<https://doi.org/10.1007/s11356-014-2847-2>

5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

Publicación científica 7:

Determining the presence of chemicals with suspected endocrine activity in drinking water from the Madrid region (Spain) and assessment of their estrogenic, androgenic and thyroidal activities

Valcárcel Y., Valdehíta A., Becerra E., López de Alda M., Gil A., Gorga M., Petrovic M., Barceló D., Navas JM.

Chemosphere (2018); 201: 388-398

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.099>

Publicación científica 8:

Presence of endocrine disruptors in freshwater in the northern Antarctic Peninsula region

Esteban S., Moreno-Merino L., Matellanes R., Catalá M., Gorga M., Petrovic M., López de Alda M., Barceló D., Durán J., López-Martínez J., Valcárcel Y.

Environmental Research (2016); 147: 179–92

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.034>

Estudio de eliminación de EDCs

Publicación científica 9:

Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds

Cruz-Morató C., Lucas D., Llorca M., Rodríguez-Mozaz S., Gorga M., Petrovic M., Barceló D., Vicent T., Sarrà M., Marco-Urrea E.

Science of The Total Environment (2014); 493: 365-376

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.117>

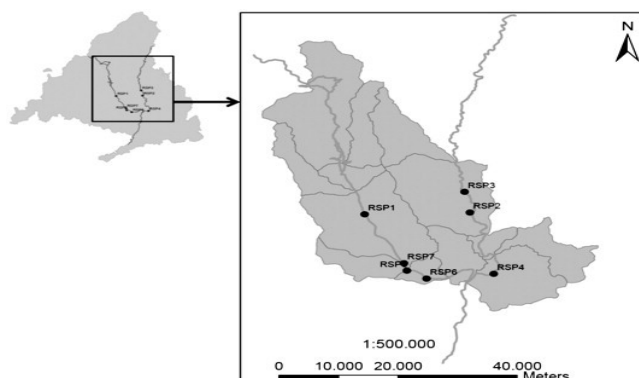
5.2 Comparación de los niveles de EDCs en distintos tipos de aguas estudiadas

5.2.1 Niveles determinados en aguas superficiales del centro de España (Publicación 5, 2014)

En este estudio se analizaron los EDCs y compuestos relacionados de esta tesis en los ríos Jarama y Manzanares, los principales ríos de la región de Madrid (centro de España).

La Región de Madrid (RM) es una de las regiones más densamente pobladas de España y de Europa, con una densidad de población de 808.41 habitantes por km². Esta región, con una superficie de 8028 km² (1.6% del total de España), está ocupada por una población estimada de 6,489,680 habitantes. Alrededor del 81.64% de la población se concentra en una conurbación que comprende la ciudad de Madrid (50.31%) y los municipios de su área metropolitana (31.34%; INEbase, 2011). La principal actividad industrial se concentra en el sur y este de esta región.

Se seleccionaron siete plantas EDARs de la RM en función de la población atendida. Las características de los puntos de muestra se muestran en la **Figura 5.1**.



Punto de muestreo (Río)	EDAR	Población equivalente	Localización del punto de muestreo	Río	Tratamiento	
					Agua	Lodo
RSP-1	Vivero	550, 000	M-30 Carretera Castilla	Manzanares	BAS+BB	NIA
RSP-2	Rejas	500,000	Torrejón Ardoz, A2	Jarama	BAS	NIA
RSP-3	Valdebebas	200,000	Paracuellos del Jarama	Jarama	BAS	NIA
RSP-4	La Poveda (Sur Oriental)	200,000	Arganda del Rey	Jarama	PQ+BAS PQ+BAS	a+bf d+bf
RSP-5	Butarque	1,100,000	Avd. Rosales, M-301	Manzanares	BAS	NIA
RSP-6	Depuradora Sur	2,000,000	Getafe	Manzanares	BAS BAS	d+bf d+bf
RSP-7	La Gavia	1,000,000	Avd. Rosales, M-301	Manzanares	BAS	NIA

*Fuente: Plan Regional de Lodos de depuradora (2006-2016). Región de Madrid. <http://www.madrid.org/cs>

NIA: "not information available"; PQ: "Physical-chemical processes"; BAS: "Biologic-activated sludge"; TF: "Tertiary filtration"; BL: "bacterial bed"; a: "aerobic stabilization"; d: anaerobic digestion"; bf: "Belt filter-drying; s:"spin-drying"

Figura 5.1 Mapa que muestra los puntos de muestreo del río (RSP) utilizados en este estudio

5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

Las muestras de agua superficial se recolectaron aproximadamente 100 m aguas abajo de las salidas de efluentes de las EDARs, que desembocan directamente en los ríos más importantes de esta región. El río Jarama es el segundo río más largo del RM, cruzando su parte oriental. Los puntos de muestreo seleccionados en este río fueron RSP-1, RSP-5, RSP-6 y RSP-7. El río Manzanares cruza la ciudad de Madrid (3,233,527 habitantes) y desemboca en el río Jarama. Los puntos de muestreo seleccionados en este río fueron RSP-2, RSP-3 y RSP-4. Los puntos de muestreo RSP-2, RSP-3, RSP-4 y RSP-6 se encuentran en algunas de las áreas más industrializadas.

Se recogieron un total de 14 muestras de agua superficial integradas en cada uno de los siete puntos de muestreo durante ambas campañas: domingo y jueves (febrero de 2012). Los días para estas campañas se eligieron para poder comparar un día laborable y no laborable para determinar si la actividad industrial podría estar relacionada con la ocurrencia de EDCs en aguas superficiales.

Por último, la **Tabla 5.1** resume las concentraciones de EDCs para cada uno de los ríos estudiados, junto con su mediana, mínimo y máximo.

Tabla 5.1 Concentraciones (ng/L) de EDCs para cada uno de los ríos estudiados en ambas campañas de muestreo

	Río Manzanares										Río Jarama							
	Domingo					Jueves					Domingo				Jueves			
	RSP-1	RSP-5	RSP-6	RSP-7	Mediana (min-máx) ^a	RSP-1	RSP-5	RSP-6	RSP-7	Mediana (min-máx) ^a	RSP-2	RSP-3	RSP-4	Mediana (min-máx) ^a	RSP-2	RSP-3	RSP-4	Mediana (min-máx) ^a
E2	< 0.037	< 0.037	< 0.037	< 0.037	–	< 0.037	< 0.037	< 0.037	< 0.037	–	< 0.037	< 0.037	< 0.037	–	< 0.037	< 0.037	< 0.037	–
E1	17	< 0.050	< 0.050	< 0.050	17	10	< 0.050	4.5	< 0.050	7.5 (4.5–10)	< 0.050	< 0.050	< 0.050	–	< 0.050	< 0.050	< 0.050	–
E3	< 0.17	< 0.17	< 0.17	< 0.17	–	< 0.17	< 0.17	< 0.17	< 0.17	–	< 0.17	< 0.17	< 0.17	–	< 0.17	< 0.17	< 0.17	–
EE2	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	–	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	–	< 0.14	< 0.14	< 0.14	–	< 0.14	< 0.14	< 0.14	–
DES	< 0.043	< 0.043	< 0.043	< 0.043	–	< 0.043	< 0.043	< 0.043	< 0.043	–	< 0.043	< 0.043	< 0.043	–	< 0.043	< 0.043	< 0.043	–
E1-3S	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	–	10	< 0.003	< 0.003	10	10	< 0.003	< 0.003	8.1	8.1	< 0.003	< 0.003	< 0.003	–
E3-3S	< 0.030	< 0.030	< 0.030	< 0.030	–	< 0.030	8.9	< 0.030	1.2	5 (1–9)	< 0.030	< 0.030	1.7	1.7	< 0.030	< 0.030	< 0.030	–
E2-17G	< 0.46	< 0.46	< 0.46	< 0.46	–	< 0.46	< 0.46	< 0.46	< 0.46	–	< 0.46	< 0.46	< 0.46	–	< 0.46	< 0.46	< 0.46	–
E1-3G	< 0.056	< 0.056	< 0.056	< 0.056	–	< 0.056	< 0.056	< 0.056	< 0.056	–	< 0.056	< 0.056	< 0.056	–	< 0.056	< 0.056	< 0.056	–
E3-16G	< 0.059	< 0.059	< 0.059	< 0.059	–	< 0.059	< 0.059	< 0.059	< 0.059	–	< 0.059	< 0.059	< 0.059	–	< 0.059	< 0.059	< 0.059	–
TCS	184	< 0.17	66	< 0.17	125 (66–184)	57	172	59	< 0.17	59 (57–172)	223	< 0.17	< 0.17	223	166	46	< 0.17	106 (46–166)
TCC	< 0.036	< 0.036	< 0.036	< 0.036	–	< 0.036	< 0.036	11	< 0.036	11	10	< 0.036	< 0.036	10	< 0.036	< 0.036	< 0.036	–
MeP	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	–	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	–	< 0.20	< 0.20	< 0.20	–	< 0.20	< 0.20	< 0.20	–
EiP	< 0.27	16	11	< 0.27	13.5 (11–16)	< 0.27	< 0.27	< 0.27	< 0.27	–	< 0.27	< 0.27	< 0.27	–	< 0.27	< 0.27	< 0.27	–
PrP	< 0.021	< 0.021	32	< 0.021	32	6.1	< 0.021	6.8	< 0.021	6.5 (6–7)	< 0.021	< 0.021	4.2	4.2	22	38	< 0.021	30 (22–38)
BeP	< 0.031	< 0.031	< 0.031	< 0.031	–	< 0.031	< 0.031	< 0.031	< 0.031	–	< 0.031	< 0.031	< 0.031	–	< 0.031	< 0.031	< 0.031	–
BPA	56	< 0.11	17	< 0.11	36.5 (17–56)	71	12	< 0.11	37	37 (12–71)	126	106	87	106 (87–126)	6.5	< 0.11	89	47.5 (6–89)
OP	118	< 0.14	101	< 0.14	109.5 (101–118)	42	342	114	136	125 (42–342)	70	< 0.14	50	60 (50–70)	474	50	96	96 (50–474)
NP	217	185	1637	1483	850 (185–1483)	267	1180	436	809	622.5 (267–1180)	344	96	123	123 (96–344)	869	405	813	813 (405–869)
OP1EC	< 0.065	< 0.065	< 0.065	< 0.065	–	< 0.065	< 0.065	< 0.065	< 0.065	–	< 0.065	< 0.065	< 0.065	–	< 0.065	< 0.065	< 0.065	–
NP1EC	691	1484	1666	1201	1342.5 (691–1666)	444	2013	1037	839	938 (839–2013)	1551	596	734	734 (596–1551)	3374	369	926	926 (369–3374)
OP1EO	< 17	< 17	< 17	< 17	–	< 17	< 17	< 17	< 17	–	< 17	< 17	< 17	–	< 17	< 17	< 17	–
NP1EO	< 62	< 62	< 62	< 62	–	< 62	< 62	< 62	< 62	–	< 62	< 62	< 62	–	< 62	< 62	< 62	–
OP2EO	40	234	31	53	46.5 (31–234)	19	45	12	9	15.5 (9–45)	68	97	19	68 (19–97)	27	96	49	49 (27–96)
NP2EO	272	312	211	287	279.5 (211–312)	173	255	163	156	168 (156–255)	345	616	298	345 (298–616)	260	721	637	637 (260–721)
BT	506	469	370	263	419.5 (263–506)	1184	749	569	427	659 (427–1184)	185	205	97	185 (97–205)	345	261	164	261 (164–345)
TT	1052	840	477	445	658.5 (445–1052)	930	454	299	848	651 (299–930)	805	718	272	718 (272–805)	753	597	418	597 (418–753)
TBEP	2028	1931	619	372	1275 (372–2028)	1289	2308	1206	1991	1640 (1206–2308)	2563	5288	712	2563 (712–5288)	1986	2599	1048	1986 (1048–2599)
TCPP	909	795	700	867	831 (700–909)	1260	784	809	768	796.5 (768–1260)	793	637	441	637 (441–793)	893	389	414	414 (389–893)
TCEP	37	43	32	40	38.5 (32–43)	52	33	35	41	38 (33–52)	57	38	24	38 (24–57)	64	29	22	29 (22–64)

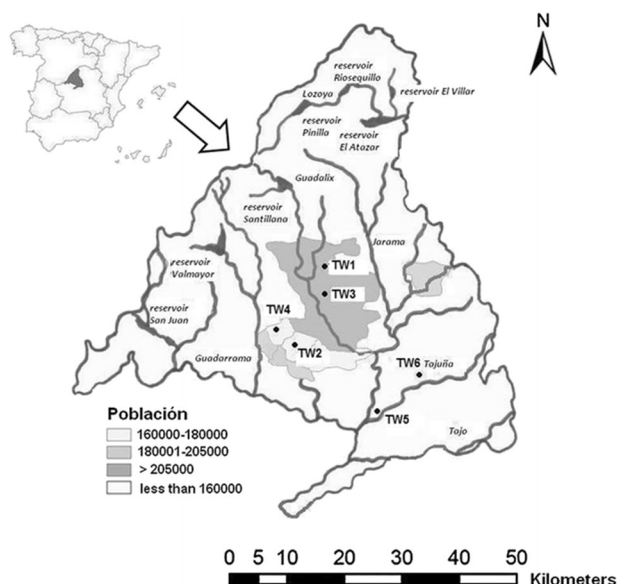
^a Mínimo-Máximo: primer valor por encima del límite de detección

5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

5.2.2 Niveles en aguas de grifo del centro de España (Publicación 6, 2014)

En este estudio se analizaron los EDCs y compuestos relacionados de esta tesis en el agua del grifo de las principales áreas de abastecimiento de agua para la Región de Madrid (RM).

Se realizó un muestreo compuesto único en agosto de 2012 en el que se recogieron seis muestras de agua del grifo (TW1, TW2, TW3, TW4, TW5 y TW6) de las principales áreas de suministro de agua potable para la RM, **Figura 5.2**. Todas las muestras fueron recolectadas del agua del grifo de residencias privadas. El agua del grifo de las muestras TW1, TW2, TW3 y TW4 provinieron de los depósitos principales de la RM, mientras que el agua del grifo en las muestras TW5 y TW6 provinieron del agua del río tratada en la planta de tratamiento de agua potable (DWTP) en Colmenar de Oreja. En este último caso, la DWTP recoge agua del río Tajuña (un afluente del río Tajo) y proporciona agua potable a más de 1 millón de personas en el sureste del RM. Su capacidad de tratamiento es de 63,000,000 m³/año y sus tecnologías de tratamiento incluyen prezonización, precloración, decantación lamelar, ultrafiltración, ósmosis inversa y desinfección.



Características del agua del grifo

Código de muestra	Área de suministro de agua	Población servida	Ciudad/Pueblo	Distrito	Punto de muestreo
TW1	Colmenar Viejo	1,724,029	Madrid	Tetuán	Residencia privada
TW2	retamares	433,627	Leganés	-	Residencia privada
TW3	Islas Filipinas	739,708	Madrid	Chamberí	Residencia privada
TW4	Valmayor	846,406	Alcorcón	-	Residencia privada
TW5	DWTP Colmenar Oreja	594,744	Titulicia	-	Residencia privada
TW6	DWTP Colmenar Oreja	594,744	Morata de Tajuña	-	Residencia privada

Figura 5.2 Mapa del área de estudio y de las ubicaciones de los sitios de muestreo

5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

Las concentraciones detectadas, la concentración mediana y el rango para cada EDC en los diferentes puntos de muestreo de agua del grifo se pueden encontrar en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2 Concentraciones de EDCs para cada una de las muestras de agua de grifo, mediana y rango de concentración (ng/L)

Familia	Compuesto	TW1	TW2	TW3	TW4	TW5	TW6	Mediana (ng/L)	Rango (ng/L)
Estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados	E2	<0.037	<0.037	<0.037	<0.037	<0.037	<0.037	–	–
	E1	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	–	–
	E3-3S	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	–	–
	E3-16G	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	–	–
	E1-3G	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	–	–
	E2-17G	<0.46	<0.46	<0.46	<0.46	<0.46	<0.46	–	–
	E1-3S	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	–	–
	E3	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	–	–
	EE2	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14	–	–
Alquilfenoles	DES	<0.043	<0.043	<0.043	<0.043	<0.043	<0.043	–	–
	OP	4	5.6	3	2.6	4.6	9.7	4.3	2.6–9.7
	NP	11.7	4.3	2.5	10.2	7.3	5	7.3	2.5–20.5
	OP1EO	<17	<17	<17	<17	<17	<17	–	–
	OP2EO	3.9	3.1	0.4	<0.01	0.3	0.8	1.9	0.3–3.9
	NP2EO	6.3	15	3.8	2.1	2.4	2.6	2.6	2.1–15
	NP1EO	<62	<62	<62	<62	<62	<62	–	–
	NP1EC	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	–	–
	OP1EC	<0.065	<0.065	<0.065	<0.065	<0.065	<0.065	–	–
Conservantes	MeP	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	8.9	13.2	8.9–17.5
	EtP	<0.27	<0.27	<0.27	<0.27	<0.27	0.97	0.97	0.97
	BeP	<0.031	<0.031	<0.031	<0.031	<0.031	<0.031	–	–
	PrP	10.3	12.4	9.9	7.1	11.9	13.5	11.9	7.12–17.2
Desinfectantes	TCS	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	–	–
	TCC	<0.036	<0.036	<0.036	<0.036	<0.036	<0.036	–	–
Organofosforados	TCPP	<0.002	8.8	<0.002	3.8	<0.002	37.1	8.8	3.8–37.1
	TCEP	6.1	<0.034	48	3.6	<0.034	165.4	6.1	2–165.4
	TBEP	2.6	33.5	2	<0.002	<0.002	<0.002	7.3	2–33.5
Anticorrosivos	BT	<0.072	20	<0.072	14.8	0.4	<0.072	14.8	0.4–20
	TT	12.5	12.5	6.9	11	4.1	3.7	6.9	3.7–12.5
Bisfenol A	BPA	3.7	<0.11	22.6	6.6	50.3	6.9	14.8	3.7–50.3

5.2.3 Niveles en aguas de bebida del centro de España (Publicación 7, 2018)

Siguiendo los pasos del estudio anterior, en este se analizaron los EDCs y compuestos relacionados en el agua de bebida, concretamente de grifo, de las principales áreas de abastecimiento de agua para la Región de Madrid (RM), las zonas analizadas en este segundo muestreo, se analizaron aguas de grifo de zonas similares a las analizadas en el apartado anterior. La Ubicación concreta de los puntos de muestreo de agua potable y las características principales de las DWTPs se describen a continuación y se presentan en la **Figura 5.3**.

Los puntos DW1 (Titulcia) y DW4 (Aranjuez) reciben agua del Tajo DWTP (ubicado en Colmenar de Oreja) y abastecen a alrededor de 500,000 personas de 15 municipios del sur de Madrid. Tiene una capacidad de tratamiento de $173,000\text{m}^3\text{ día}^{-1}$. El agua se extrae del río Tajuña, un afluente del río Tajo, y la planta utiliza ósmosis inversa de membrana (similar a la técnica utilizada para desalinizar el agua de mar) debido al alto contenido de sulfato de la fuente de agua, así como a la prezonización, precloración, decantación lamelar, ultrafiltración, ósmosis inversa y desinfección (www.madrid.org).

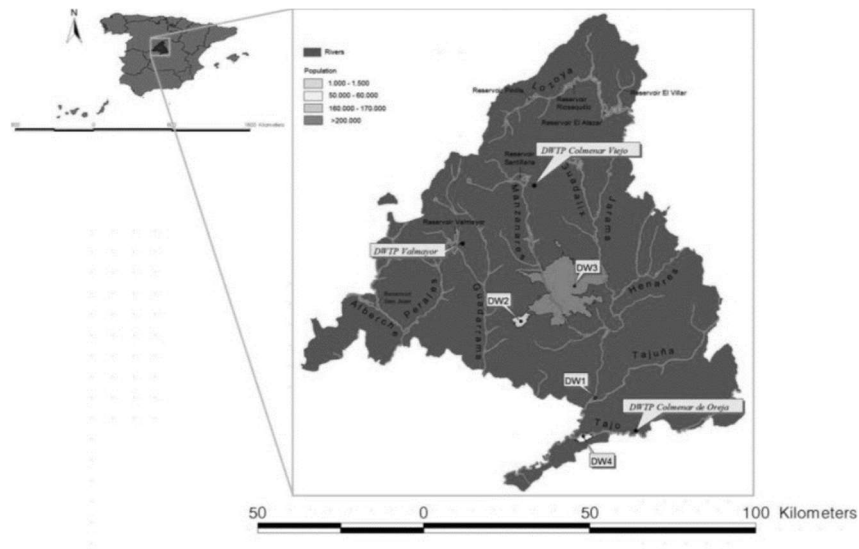
El punto DW2 (Alcorcón) recibe agua del DWTP Valmayor (que trata el agua de las cuencas de captación del río Aulencia y Guadarrama) y abastece a más de 3,000,000 de personas, con una capacidad de tratamiento de $1,036,000\text{m}^3\text{ día}^{-1}$. Este DWTP utiliza diferentes tratamientos, incluida la decantación laminar con clarificación por micro arena, filtración, desinfección, ozonización, filtración con carbón activado y decantación (www.madrid.org).

El punto DW3 (Madrid) recibe agua del Colmenar Viejo DWTP (cuenca de captación de los ríos Lozoya, Guadalix y Jarama). Tiene una capacidad de tratamiento de $1,382,000\text{m}^3\text{ día}^{-1}$ y también utiliza diferentes procesos de tratamiento, como pre-oxidación/pre-cloración, coagulación, floculación, sedimentación, filtración rápida en un lecho de arena, neutralización y desinfección (www.madrid.org).

El consumo medio de agua del grifo por residencias privadas en la región de Madrid ($131\text{ L persona}^{-1}\text{ día}^{-1}$) es similar al promedio de España en su conjunto ($132\text{ L persona}^{-1}\text{ día}^{-1}$) aunque es la tercera región más alta en términos del consumo total de volumen (12.7%) (INE, 2016).

Los muestreos se realizaron durante un período de 7 días en la segunda semana de noviembre de 2013. Se recogieron muestras de agua en los cuatro puntos seleccionados (DW1, DW2, DW3, DW4) en paralelo en botellas de vidrio opacas de 1 L (una por cada día de la semana y para cada punto de muestreo). Se recogieron muestras a intervalos de 8 h durante 24 h en volúmenes de un tercio de litro. Las muestras se mezclaron al final del día para garantizar una mayor homogeneidad de la muestra.

5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios



Código de muestra	Área de suministro de agua	Población servida	Ciudad/Pueblo	Distrito	Punto de muestreo
DW1	DWTP Colmenar de Oreja	708384	Madrid	Tetuán	Residencia privada
DW2	Valmayor	914674	Leganés	-	Residencia privada
DW3	Colmenar Viejo	2121292	Madrid	Chamberí	Residencia privada
DW4	DWTP Colmenar de Oreja	708384	Alcorcón	-	Residencia privada

Fuente de datos demográficos: censo municipal de población, comunidad de Madrid 2013

Figura 5.3 Ubicación de los puntos de muestreo de agua potable y las características principales de las DWTPs

Las concentraciones detectadas en cada punto cada día de la semana, la concentración total, la concentración mediana, el rango y frecuencia para cada punto de los distintos EDCs estudiados en agua del grifo se pueden encontrar en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.3 Detección de compuestos disruptores endocrinos (EDC) en cada uno de los puntos de muestreo

Sitio	Fecha	MeP	EtP	BPA	NP	NP1EC	NP2EO	BT	TT	TBEP	TCPP	TCEP	TOTAL (ng/L)	
DW1	Lunes	86	12	51	21	<LOD	189	<LOD	2.1	<LOD	1.6	<LOD	362	
	Martes	17	<LOD	<LOD	52	2.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	72	
	Miércoles	22	<LOD	<LOD	31	2.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.7	58	
	Jueves	17	<LOD	<LOD	48	2.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	38.5	267	373	
	Viernes	18	<LOD	<LOD	27	4.0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	42	91	
	Sábado	12	<LOD	<LOD	24	3.3	<LOD	<LOD	<LOD	9.0	0.14	<LOD	52	102
	Domingo	9.9	<LOD	<LOD	93	4.9	<LOD	<LOD	<LOD	1.9	<LOD	1.5	35	146
Total (ng/L)		183	12	51	296	20	189	0	13	0.14	42	398	1203	
Mediana (ng/L)		17	12	51	31	3.1	189	-	2.1	0.14	1.6	42		
Rango (ng/L)		9.9 - 86	12	51	21 - 92	2.3 - 4.8	189	0	1.9 - 9.0	0.14	1.5 - 38	1.7 - 267		
Frecuencia (%)		100	14	14	100	86	14	0	43	14	43	71		
DW2	Lunes	23	<LOD	<LOD	15	2.5	<LOD	15.03	54.58	<LOD	<LOD	<LOD	110	
	Martes	27	<LOD	<LOD	45	2.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	24.54	199.6	299	
	Miércoles	23	<LOD	<LOD	74	2.7	<LOD	6.83	8.57	17.1	<LOD	8.3	140	
	Jueves	21	<LOD	<LOD	58	2.8	<LOD	<LOD	4.28	<LOD	<LOD	1.58	87	
	Viernes	26	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.18	2.92	<LOD	10.22	64.29	108	
	Sábado	17	<LOD	<LOD	30	2.9	<LOD	<LOD	14.53	7.93	<LOD	24.32	96	
	Domingo	16	<LOD	<LOD	50	2.9	<LOD	<LOD	1.36	<LOD	5.36	106.15	181	
Total (ng/L)		151	0	0	272	16	0	26	86	25	40	404	1021	
Mediana (ng/L)		23	-	-	47	2.7	-	6.8	6425.0	13	10	44		
Rango (ng/L)		15 - 27	-	-	15 - 74	2.5 - 2.9	-	4.2 - 15	1.4 - 54	7.9 - 17	5.4 - 24	1.6 - 200		
Frecuencia (%)		100	0	0	86	86	0	43	86	29	43	86		
DW3	Lunes	29	4.2	<LOD	26	2.8	<LOD	<LOD	7.14	<LOD	<LOD	<LOD	70	
	Martes	23	<LOD	<LOD	25	3.7	<LOD	<LOD	1.87	<LOD	<LOD	17.17	71	
	Miércoles	19	<LOD	<LOD	42	3.2	<LOD	7.37	2.71	10.19	<LOD	2.47	87	
	Jueves	24	<LOD	<LOD	72	3.5	<LOD	<LOD	4.44	2.29	<LOD	13.11	120	
	Viernes	31	<LOD	<LOD	36	3.0	<LOD	<LOQ	4.45	<LOD	<LOD	5.64	79	
	Sábado	28	<LOD	<LOD	40	3.3	<LOD	<LOD	3.35	<LOD	<LOD	16.6	92	
	Domingo	28	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.47	3	<LOD	<LOD	<LOD	33	
Total (ng/L)		182	4.2	0	242	19.5	0	9.9	27	12	0	55	552	
Mediana (ng/L)		28	4.2	-	38	3.3	-	4.9	3.35	6.24	-	13		
Rango (ng/L)		19 - 31	4.2	-	25 - 72	2.8 - 3.7	-	2.5 - 7.4	1.9 - 7.1	2.3 - 10	-	2.5 - 17		
Frecuencia (%)		100	14	0	86	86	0	29	100	29	0	71		
DW4	Lunes	10	<LOD	<LOD	18	2.0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	30	
	Martes	21	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	8.43	29	
	Miércoles	11	<LOD	<LOD	53	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6.23	107.39	177	
	Jueves	17	<LOD	<LOD	40	2.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.88	6.29	67	
	Viernes	25	<LOD	<LOD	126	2.6	<LOD	2.58	15.16	<LOD	4.54	11.91	188	
	Sábado	14	<LOD	<LOD	87	2.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	103	
	Domingo	24	<LOD	<LOD	32	2.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6.79	65	
Total (ng/L)		121	0	0	356	11	0	2.6	15	0	13	141	659	
Mediana (ng/L)		17	-	-	46	2.2	-	2.6	15	-	4.5	8.4		
Rango (ng/L)		9.9 - 25	-	-	18 - 126	2.0 - 2.6	-	2.6	15	-	1.9 - 6.2	6.3 - 107		
Frecuencia (%)		100	0	0	86	71.4	0	14	14	0	43	71		

*Los estrógenos, desinfectantes, BeP y los compuestos alquifenólicos (OP, PO1EC, OP1EO, NP1EO y OP2EO) no fueron detectados en ninguna de las muestras

5.2.4 Niveles en agua dulce en la región de la Península Antártica norte *(Publicación 8, 2016)*

En este estudio se analizaron los EDCs y compuestos relacionados de esta tesis en distintos tipos de aguas de la región Antártica.

La Antártida es el último continente en ser poblado por humanos. Su distancia de las áreas pobladas y el clima extremo lo ha mantenido relativamente aislado de las fuentes de contaminación. Desde la entrada en vigor del Tratado Antártico (23 de junio de 1961), todo el continente se ha dedicado a la ciencia, con la adopción del Protocolo de Protección Ambiental, también conocido como Protocolo de Madrid (firmado en 1991 y entrada en vigor en 1998), donde todas las actividades que podrían alterar potencialmente su condición original han sido restringidas o prohibidas.

El medio ambiente antártico se encuentra entre los más extremos de la Tierra debido al intenso frío y las especiales condiciones de luz, que restringen el desarrollo de animales y plantas. A pesar de ello, numerosos ecosistemas se activan especialmente durante el breve verano austral. Esta temporada es también el período de máxima actividad científica y de mayor afluencia de turistas. Actualmente hay más de 100 bases científicas antárticas, refugios y otras instalaciones humanas en el continente, y en los últimos años se ha visto de forma rutinaria la llegada de hasta 30.000 turistas al año (IAATO, 2015). La mayor cantidad de instalaciones y visitantes se concentra en la región de la Península Antártica, debido al acceso más fácil y las condiciones climáticas menos extremas. Las condiciones ambientales en esta zona favorecen un mayor desarrollo de la vida, y también ha sufrido la tasa de calentamiento más rápida de todo el hemisferio sur en las últimas décadas (Turner et al., 2005).

El Protocolo de Madrid (1998) reguló la actividad humana en la Antártida y buscó prevenir la entrada de elementos extraños, la dispersión de contaminantes y sus efectos en el medio ambiente. A pesar de ello, la presencia de humanos en la Antártida ha provocado un impacto a nivel local además de otros de carácter global (Bargagli et al., 2005; Bergstrom et al., 2006; UNEP, 2002). De hecho, algunos plaguicidas como el diclorodifeniltricloroetano (DDT) y similares, en combinación con otros contaminantes orgánicos persistentes (POPs) como el hexaclorobenceno (HCB) y el hexaclorociclohexano (HCH), se han detectado en la biota marina antártica y en otras matrices abióticas cuando no se han aplicado jamás en este continente teniendo en cuenta las características del lugar (Sladen et al., 1966; UNEP, 2002).

Una característica particular del área de estudio es que durante el invierno el sistema hidrológico permanece congelado (Turner et al., 2005), por lo que los contaminantes quedan inmovilizados en el suelo o agua sólida (hielo enterrado, nieve, permafrost) (Michel and Van Everdingen, 1994). El aumento de temperatura durante el verano tiene el efecto de activar el ciclo del agua en determinados sectores y provocar la entrada en circulación de grandes cantidades de agua líquida, la movilización de nutrientes y, en el caso de zonas impactadas por la actividad humana, la movilización de contaminantes a través de cursos de agua y acuíferos. La dinámica hidrológica en este entorno está ligada al deshielo y al desarrollo de la capa de permafrost activo, creando una conexión con diversos grados de intensidad entre las aguas subterráneas, arroyos y estanques (French, 2013). Durante el verano, la capa activa

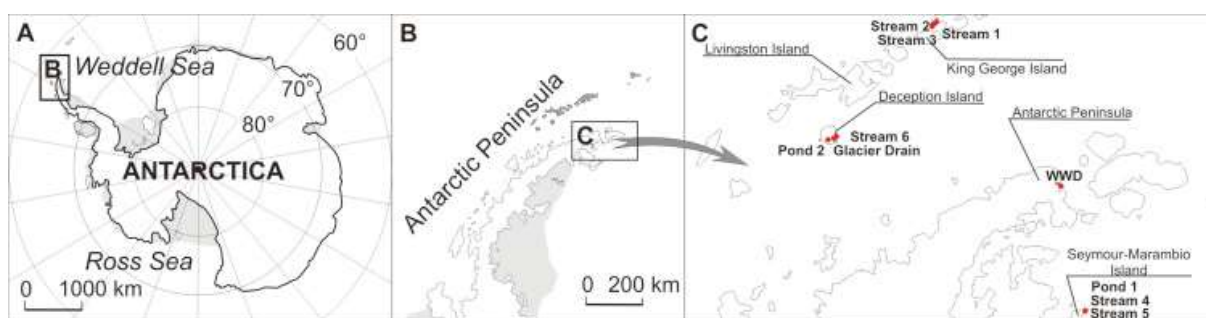
5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

acumula agua líquida que circula sobre el permafrost –que constituye la capa impermeable– y se une al flujo principal (Moreno et al., 2012). Otra característica destacable del caudal de agua de los arroyos de esta zona es su variabilidad diaria, e incluso horaria, condicionada por factores como la temperatura del aire, la tasa de insolación y la ocurrencia de precipitaciones.

Las principales fuentes de contaminación de las actividades antrópicas locales en el suelo, el aire, el agua, la nieve y la biota de la Antártida incluyen la quema de combustibles fósiles, la incineración de desechos, los derrames accidentales y la descarga de aguas residuales (Bargagli, 2008). En 2009, más de un tercio de las aguas residuales de las bases permanentes y más de dos tercios de las estaciones de verano antárticas no tienen sistemas de tratamiento de aguas residuales (Gröndahl et al., 2009). Los sistemas de tratamiento existentes a menudo no pueden hacer frente al aumento de efluentes que se produce en verano (Gröndahl et al., 2009), y se ha informado de la presencia de sustancias biológicamente activas como productos de higiene personal y hormonas esteroides en el entorno costero de los alrededores. las estaciones antárticas (Emnet et al., 2015). Estos compuestos, junto con otras sustancias que pueden encontrarse de forma natural en el medio ambiente antártico (elementos tóxicos), pueden tener efectos adversos sobre los organismos.

Lugares y ubicación de muestreo

El análisis consistió en 10 muestras de agua recolectadas entre el 22 de diciembre de 2012 y el 8 de febrero de 2013 en áreas de la región norte de la Península Antártica, **Figura 5.4**, que se puede suponer que han sufrido impacto antrópico debido a la proximidad de asentamientos humanos, la ocurrencia de derrames o la proximidad de depósitos de almacenamiento. Otro factor que se tuvo en cuenta fue la presencia de una importante actividad turística.



*stream: arroyo, pond: estanque, glacier drain: drenaje de glaciar, WWD: descarga de aguas residuales urbanas

Figura 5.4 Mapa de la ubicación de las áreas muestreadas

Todas las muestras analizadas procedieron de cuerpos de agua libre efímeros que se encuentran congelados y por tanto inactivos durante todo el invierno, y se activan con el deshielo estival. Se tomaron seis muestras de arroyos (Arroyo 1, 2, 3, 4, 5 y 6), una de un drenaje glaciar y dos de estanques (Estanque 1 y Estanque 2). También se tomó una muestra de una descarga de aguas residuales urbanas (WWD) al mar. La **Tabla 5.4** muestra detalles del contexto en el que se tomaron las muestras, con especial atención a su proximidad a focos de contaminación.

5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

Tabla 5.4 Ubicación, tipo, contexto y proximidad a posibles fuentes de contaminación de las muestras estudiadas

Muestra	Altitud (m a.s.l.)	Volumen aprox. (Ls ⁻¹)	Marco geológico/geomorfológico	Presencia de vida	Principales fuentes de contaminación	Observaciones
Arroyo 1	1	15	Estuario con cantos rodados gruesos	Pingüinos aislados	I, III, IV	Entorno antrópico
Arroyo 2	1	20	Estuario con cantos rodados gruesos	No detectada	I	Tanques viejos cercanos de combustible
Arroyo 3	1	50	Estuario con cantos rodados gruesos	Pingüinos y población humana	I, IV	Entorno muy antrópico
Arroyo 4	180	2	Pendiente	Población humana	I, III	Recibe descargas líquidas
Arroyo 5	165	2.5	Pendiente	Población humana	I, III	Recibe descargas líquidas
Arroyo 6	6	25	n.a.	Musgos, lobos marinos	IV	Vida animal y vegetal
Estanque 1	196	n.a.	Meseta	Musgos y líquenes	I, III	Entorno antrópico
Estanque 2	5	n.a.	Cráter	Musgos y líquenes		Estanque 70% cubierto de hielo
Drenaje Glaciar	6	7.5	Depósitos de Lahar	Musgos y pingüinos	I, II, IV	Actividad turística
WWD	0	n.a.	Mar	Población humana	I, III, IV	A unos 5 m de la costa

*msnm: metros sobre el nivel del mar; n.a.: no aplicable;

**I: proximidad a asentamiento humano; II: actividad turística más o menos común durante el verano antártico; III: proximidad a depósitos o residuos antiguos; IV: intensa actividad biológica (roca de pingüinos, lobos marinos, etc.)

Se tomaron muestras del estanque 1, arroyo 4 y arroyo 5 en la isla Seymour-Marambio cerca de la estación de Marambio. La base tiene una población invernal de alrededor de 45, que puede aumentar hasta 150 en tránsitos hacia otros destinos en verano. El sitio alberga una amplia variedad de instalaciones necesarias para el mantenimiento del personal y las aeronaves, incluidos depósitos de combustible y generadores de electricidad. También tiene una pista de aterrizaje, que es la única forma de entrar o salir. No hay ningún tipo de desarrollo turístico en la zona, ni poblaciones significativas de animales o plantas.

Se tomaron muestras de los arroyos 1, 2 y 3 en varias áreas de la península de Fildes, isla King George. En esta zona existen numerosas instalaciones científicas y logísticas, incluidas varias estaciones permanentes de diferentes países. Esta zona también tiene presencia turística. Esta es una de las áreas más densamente pobladas de la Antártida y tiene una gran cantidad de infraestructuras artificiales, incluido un aeródromo, lo que genera una cantidad significativa de desechos.

La isla Decepción, el sitio en el que se tomaron muestras del estanque 2, el arroyo 6 y del drenaje del glaciar, es la más meridional de las islas Shetland del Sur. La actividad humana comenzó en esta isla en la década de 1820 con la industria ballenera, y las primeras bases científicas se establecieron en 1944. Desde 1958 se ha hecho popular entre los turistas, y en particular el área de Whalers Bay, que en 2008-2009 recibió alrededor de 18.000 visitantes.

5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

Además del turismo, en la actualidad hay dos bases activas en la isla –una argentina y otra española– que se utilizan para la actividad científica solo en verano.

Finalmente, la muestra etiquetada como WWD se tomó de una descarga directa de aguas residuales urbanas al mar sin tratamiento previo de la base Esperanza en Hope Bay. Se trata de una estación permanente con 55 personas en invierno y un número variable en verano según la actividad investigadora. Este destino es muy frecuentado por turistas y recibió casi 1700 visitas en 2001. Sin embargo, esta cifra varía notablemente de un año a otro.

Marco hidrológico e hidrogeológico

Los arroyos, estanques y acuíferos que son los principales receptores de los contaminantes de todas las áreas muestreadas funcionan de manera similar. Los cuerpos de agua se ubican sobre materiales no consolidados dando lugar a cuencas de agua suprapermafrost. La amplitud de los acuíferos que alimentan los ríos es muy pequeña, de solo unos pocos decímetros de ancho, y está condicionada por el desarrollo de la capa activa por encima del “permafrost” local, que varía entre “permafrost” continuo, discontinuo o esporádico, según la ubicación. Los cursos fluviales no son muy largos y solo están activos durante los meses de verano. Dependiendo de sus dimensiones, los estanques pueden permanecer descongelados en invierno, pero generalmente tienden a congelarse por completo.

El fondo de la capa activa se encuentra a una distancia variable de un mínimo de alrededor de 1.3 a 3.5 m en las áreas de “talik” bajo la influencia de estanques. La presencia de glaciares o acumulaciones permanentes de nieve varía mucho según la zona de muestreo. No se observan glaciares ni acumulaciones permanentes de nieve en la isla Seymour-Marambio, y en las demás áreas existen glaciares que descargan agua de deshielo durante varios meses del año. La permanencia de la nieve acumulada depende de las temperaturas estivales y varía notablemente de un año a otro.

La evolución del “permafrost” en esta área es un indicador sensible y temprano de los efectos del calentamiento climático, y conduce a un mayor desarrollo de la capa activa y al consiguiente aporte de mayores cantidades de agua líquida en el ciclo del agua superficial y subterránea.

Disruptores endocrinos. Resultados

La **Tabla 5.5** incluye las concentraciones de EDCs encontradas y su mediana para cada una de las muestras de cuerpos de agua estudiadas.

Tabla 5.5 Concentraciones (ng/L) de EDCs para cada una de las muestras analizadas

Compuestos	Arroyos						Mediana (mín. ^a -máx.)	Estanques		Drenaje Glaciar	WWD
	Arroyo 1	Arroyo 2	Arroyo 3	Arroyo 4	Arroyo 5	Arroyo 6		Estanque 1	Estanque 2		
Estradiol (E2)	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	–	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
Estrona (E1)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	–	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Estriol (E3)	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	–	<0.17	<0.17	<0.17	89
Etinilestradiol (EE2)	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14	–	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14
Dietilestilbestrol (DES)	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	–	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
Estrona 3-sulfato (E1-3S)	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	–	<0.00	<0.00	<0.00	<0.00
Estriol 3-sulfato (E3-3S)	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	–	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
Estradiol 17-glucurónido (E2-17G)	<0.46	<0.46	<0.46	<0.46	<0.46	<0.46	–	<0.46	<0.46	<0.46	<0.46
Estrona 3-glucurónido (E1-3G)	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	–	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
Estriol 16-glucurónido(E3-16G)	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	–	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
Triclocarbán (TCC)	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	–	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17
Triclosan (TCS)	<0.03	3.9	<0.03	3.6	13	0.79	3.8 (0.79–13)	1.91	39	<0.03	<0.03
Metilparabeno (MeP)	16	16	18	18	8.9	11	16 (8.9–18)	15	20	27	23
Etilparabeno (EtP)	<0.27	<0.27	<0.27	<0.27	<0.27	<0.27	–	<0.27	<0.27	3.5	<0.27
Propilparabeno (PrP)	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	–	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Bencilparabeno (BeP)	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	–	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
Bisfenol A (BPA)	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	19	<0.12	19	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12
Octilfenol (OP)	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14	–	<0.14	<0.14	<0.14	1.13
Nonilfenol (NP)	261	138	84	99	<0.01	153	138 (84–260)	82	151	92	74
Octilfenol monocarboxilado (OP1EC)	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	–	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
Nonilfenol monocarboxilado (NP1EC)	2.9	2.3	2.4	7.3	<0.03	4.4	2.9 (2.2–7.3)	5.68	2.87	3.82	4318
Octilfenol monoetoxilado (OP1EO)	<17	<17	<17	<17	<17	<17	–	<17	<17	<17	<17
Nonilfenol monoetoxilado (NP1EO)	<62	<62	<62	<62	<62	<62	–	<62	<62	<62	<62
Octilfenol dietoxilado (OP2EO)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	–	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Nonilfenol dietoxilado (NP2EO)	9.2	<0.01	6.9	6.9	1.1	1.1	6.7 (1.1–9.2)	<0.01	<0.01	<0.01	2833
1H-Benzotriazol (BT)	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	11.71	<0.07	12	8.9	<0.07	<0.07	172
Toliltriazol (TT)	<0.01	<0.01	14.68	<0.01	5.37	<0.01	10 (5.4–15)	7.5	<0.01	<0.01	4648
Tris(butoxietil) fosfato (TBEP)	21	22	14	20	31	40	21 (14–40)	23	17	11	9040
Tris(cloroisopropil) fosfato (TCPP)	14	9.0	<0.00	21	188	22	21 (9.0–188)	13	12	26	98
Tris(2-cloroetil) fosfato (TCEP)	1.4	<0.03	5.7	32	93	4.7	5.7 (1.4–93)	118	7.8	0.5	71
Total	325	191	145	207	370	237		274	250	164	21365

^aMínimo-máximo: primer valor por encima del límite de detección

5.2.5 Discusión

Los niveles de contaminantes en los distintos tipos de agua a estudiar varían según el origen y características de esta, además según el tipo de agua a evaluar, los métodos analíticos para el estudio de los compuestos a analizar pueden ser un poco distinto en cada caso. En la primera parte de esta tesis, capítulo 3, se han presentado una serie de métodos analíticos para el análisis de EDCs tanto en distintos tipos de agua como en sedimentos y lodos, todos con el objetivo de tener una variedad más o menos extensa de aproximaciones analíticas para la evaluación de estos contaminantes en distintas matrices medioambientales acuáticas.

La aplicación de las distintas aproximaciones analíticas presentadas en el capítulo 3 permitió una serie de colaboraciones científicas para la evaluación de distintos cuerpos de agua, con problemáticas comunes, como es la de los niveles de EDCs, pero con necesidades específicas según aplicación o área de estudio medioambiental.

Con el fin de resumir/conocer los niveles de EDCs que se pueden encontrar en distintos tipos de agua, utilizando la misma tecnología/metodología, en la **Tabla 5.6** se presentan los niveles encontrados en los diferentes estudios realizados en esta tesis.

Aguas de río

Si comparamos los niveles de estrógenos encontrados en general en la Península Ibérica con los detectados en la Comunidad de Madrid, ambos recopilados en varios muestreos y años, podemos observar que, aunque en la Comunidad de Madrid sólo se detectó E1 a niveles medianos de 10 ng/L, esta concentración fue más alta que las medianas encontradas en los ríos de la Península Ibérica donde se detectaron 1.5 ng/L, 1.3 ng/L y 3.7 ng/L de E2, E1 y E3, respectivamente.

Los estrógenos conjugados más frecuentemente detectados en los 2 estudios, fueron por eso los mismos aunque con medianas de E1-3S y E3-3S de 1.5 ng/L y 9.8 ng/L en la Península Ibérica y de 10 ng/L y 1.7 ng/L en la Comunidad de Madrid, respectivamente

Los niveles de desinfectantes en Madrid fueron en general 10 veces más altos, llegando hasta concentraciones máximas de TCS de 223 ng/L en comparación con la máxima encontrada de 19 ng/L en las cuencas. En cambio, en el caso de los parabenos tanto las medianas como las concentraciones máximas fueron similares para el EtP y PrP y teniendo en cuenta por eso, que en la comunidad de Madrid no se detectó en ningún caso ni MeP ni EtP.

Tanto en el caso del OP y NP como en los otros compuestos alquilfenólicos analizados, los niveles detectados en la Comunidad de Madrid superaron los encontrados en las cuencas estudiadas, llegando a concentraciones máximas de 3374 ng/L para el NPE1C en comparación con los máximos de 1028 ng/L encontrados en los ríos de la Península. Incluso siendo en algunos casos 10 veces más altos, comparando los compuestos de degradación alquilfenólicos NP y OP las medianas encontradas en las

5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

cuencas fueron de 85 ng/L y 391 ng/L frente a 474 ng/L y 1637 ng/L de los ríos de la Comunidad de Madrid, respectivamente.

En el caso del BPA, los niveles no defirieron demasiado, en el caso del plastificante TBEP se siguió la misma tendencia que para los compuestos alquilfenólicos. Fue para los compuestos retardantes de llama y anticorrosivos que los niveles detectados en las cuencas fueron bastante superiores, llegando a 6377 ng/L de TCPP vs los 1260 ng/L, respectivamente.

Aguas de río versus aguas de consumo

En las aguas de consumo analizadas en la Comunidad de Madrid, no fueron detectados ni niveles de estrógenos ni sus conjugados, así como los desinfectantes estudiados. Aunque observando los niveles de parabenos ya se empezó a ver que, aunque los niveles de estos contaminantes en aguas de consumo eran en general ligeramente inferiores a los encontrados en los ríos, sus medianas y máximos no diferían excesivamente.

En general, las concentraciones tanto medianas como máximas para los otros grupos de contaminantes estudiados, compuestos alquilfenólicos, anticorrosivos, plastificantes y retardantes de llama fueron en general una media de 10 veces inferiores. Pero centrándonos en los compuestos más relevantes como el NP, OP y BPA, en el caso de los dos primeros, se detectaron niveles máximos para aguas de consumo más bajos que aguas de río, de 9.7 ng/L y 126 ng/L, respectivamente, siendo por eso estas diferencias ya no tan evidentes comparando medianas, sobre todo en los ríos de las cuencas de la Península.

Esto todavía se puso más en evidencia en el caso del BPA, dónde, por ejemplo, las medianas encontradas en las cuencas de la Península Ibérica, ríos de la Comunidad de Madrid y las aguas de consumo de esta comunidad fueron 28 ng/l, 64 ng/L y 15 ng/L, respectivamente, encontrándose por tanto al mismo nivel, motivo por tanto claro a tener en cuenta para la vigilancia de estos compuestos en todo tipo de matrices de agua.

Niveles determinados en aguas superficiales la Península Antártica norte

Los niveles determinados en los ríos de la Península Ibérica versus los encontrados en los arroyos, estanques y en el drenaje de un glaciar en una región tan remota como la Península Antártica Norte, como era de esperar difieren bastante, siendo claramente más elevados los encontrados en las aguas de río.

Aunque teniendo en cuenta la región tan remota analizada, donde cabría esperar un impacto humano ambiental no apreciable, no se ha detectado en ninguna muestra BPAs, pero sí de otros contaminantes a tener en cuenta, pudiendo detectar concentraciones de TCS de 1.9 ng/L y 39 ng/L en los estanques, niveles de MeP de hasta 27 ng/L en el drenaje del glaciar. Concentraciones detectables de NP y NP1EC en los estanques con máximos de 151 ng/L y 5.7 ng/L, respectivamente.

5. Aplicación de las metodologías desarrolladas a otros estudios

Y aunque solo se detectaron anticorrosivos en el estanque 1. Los niveles de retardantes de llama llegaron a 26 ng/L en el drenaje del glacial y hasta se detectaron niveles del plastificante TCEP de 117 ng/L en el estanque 1.

Aguas residuales Península Ibérica versus las de la Península Antártica norte

Los niveles encontrados en la muestra analizada de descarga de aguas residuales urbanas de la región Antártica, resultó dar resultados bastante dispares.

Se encontraron niveles de 89 ng/L de E3, por tanto, nada despreciables, teniendo en cuenta que en el estudio de las WWTPs de las cuencas de la Península Ibérica esta hormona no fue detectada en ninguna de las muestras. Estos resultados tan dispares por eso, pueden ser debidos al tipo de tratamiento diferente que interconvierte las hormonas en distintos estrógenos según WWTP estudiada, ver apartado 1.3, pág. 29. Pudiendo corroborarse este hecho, ya que si fueron detectadas otras hormonas con un poder disruptor más o menos alto, en las EDARs de las cuencas de la Península estudiadas.

De otros contaminantes analizados como los desinfectantes y parabenos resultaron ser mucho más bajos respecto a lo encontrados durante los estudios realizados en esta tesis. Igualmente cabe recordar que en realidad esta muestra fue recogida puntualmente y por tanto se tendría que hacer un estudio más exhaustivo para poder contrastar la tendencia de los compuestos analizados a lo largo del tiempo.

Por último, las concentraciones más elevadas encontradas detectadas en la región Antártica y comparables con las de la Península, las encontramos para el NP1EC y NPEO2, con 4318 ng/L y 2832 ng/L, respectivamente, y concentraciones del anticorrosivo TT y el plastificante TBEP de 4648 ng/L y 9040 ng/L, respectivamente.

Tabla 5.6 Comparación entre los niveles encontrados entre los distintos tipos de agua estudiados

Unidades Conc. (ng/L)	Proyecto SCARCE (Península Ibérica)						Comunidad Madrid				Antártica					
	Aguas de afluente		Aguas de efluente		Aguas de río		Aguas de río		Aguas de consumo		Arroyos		Estanque 1	Estanque 2	Drenaje Glaciar	WWD
Compuesto	Frec. Det. (%)	Conc.mín.-máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Conc. mín.-máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Conc.mín.-máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Conc. mín.-máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Conc.mín.- máx. (mediana)	Frec. Det. (%)	Conc.mín.- máx. (mediana)	Conc.	Conc.	Conc.	Conc.
E2	10	8.8-24 (23)	45	2.9-11 (7)	42	0.23-7.8 (1.5)	0	-	0	-	0	-	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
E1	65	6.0-136 (21)	84	0.51-35 (11)	62	0.26-7.3 (1.3)	21	4.5-17 (10)	0	-	0	-	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
E3	3	26	0	-	5	1.7-5.7 (3.7)	0	-	0	-	0	-	<0.17	<0.17	<0.17	88.78
EE2	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	<0.14	<0.14	<0.14	<0.14
E1-3S	45	4.9-27 (16)	32	0.76-30 (4)	21	0.25-9.3 (1.5)	21	8.1-10 (10)	0	-	0	-	<0.00	<0.00	<0.00	<0.00
E3-3S	26	7.8-48 (26)	23	6-32 (8)	2	7.4-13 (9.8)	21	1.2-8.9 (1.7)	0	-	0	-	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
E2-17G	0	-	6	82-99 (91)	3	2.3-7.2 (3.0)	0	-	0	-	0	-	<0.46	<0.46	<0.46	<0.46
E1-3G	13	19-93 (50)	19	16-56 (31)	4	1.1-8.3 (3.6)	0	-	0	-	0	-	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
E3-16G	0	-	3	5.8	5	2.0-13 (4.8)	0	-	0	-	0	-	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
2 Estrog. C _{oni}	45	19-126 (36)	32	8.5-131 (41)	30	0.25-13.0 (2.8)	43	1.2-10 (8.5)	0	-	0	-	-	-	-	-
TCC	0	-	0	-	1	1.9-3.4 82.7)	14	10-11 (10)	0	-	0	-	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17
TCS	32	4.5-135 (24)	16	5.9-17 (15)	15	0.04-19 (1.0)	57	46-223 (116)	0	-	67	3.8 (0.79-13)	1.9	39	<0.03	<0.03
MeP	81	8-304 (49)	35	13-53 (25)	79	1.4-142 (6.2)	0	-	85	8.9-86 (21)	100	16 (8.9-18)	15	20	27	22
EtP	81	8.2-814 (55)	42	4.2-31 (6.5)	63	0.59-49 (2.6)	14	11-16 (14)	9	0.97-12 (4.2)	0	-	<0.27	<0.27	3.4	<0.27
PrP	90	10-913 (79)	42	1.3-163 (15)	93	0.07-26 (2.8)	43	4.2-38 (14)	18	7.1-14 (11)	0	-	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
BeP	10	10-11 (11)	42	1.2-61 (9.8)	39	0.02-7.3 (0.66)	0	-	0	-	0	-	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
OP	61	11-407 (54)	39	5.4-64 (24)	68	0.53-85 (4.4)	79	42-474 (101)	18	2.6-9.7 (4.3)	0	-	<0.14	<0.14	<0.14	1.1
NP	100	40-1631 (328)	74	13-785 (62)	63	0.34-391 (23)	100	96-1637 (420)	91	2.5-126 (32)	83	138 (84-261)	82	151	91	74
OP1EC	0	-	0	-	1	1.2	0	-	0	-	0	-	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
NP1EC	100	43-2595 (343)	100	23-3257 (408)	84	2.0-1028 (49)	100	369-3374 (981)	68	2.0-4.8 (2.8)	83	2.9 (2.2-7.3)	5.7	2.9	3.8	4318
OP2EO	97	5.2-581 (59)	81	0.58-72 (36)	85	0.05-33 (3.0)	100	9-234 (42)	15	0.30-3.9 (0.80)	0	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
NP2EO	100	60-2819 (350)	100	11-678 (81)	97	0.17-882 (12)	100	156-721 (279)	21	2.1-188 (3.8)	83	6.8 (1.1-9.2)	<0.01	<0.01	<0.01	2832
BPA	97	64-27558 (623)	97	30-1238 (144)	84	1.7-649 (28)	71	6.5-126 (64)	18	3.7-51 (15)	17	19	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12
BT	97	129-25418 (1763)	97	39-6575 (841)	82	5.4-3185 (171)	100	97-1184 (358)	26	0.40-20 (6.8)	17	12	8.9	<0.07	<0.07	172
TT	100	54-37760 (3233)	100	10-11701 (2105)	91	0.63-7018 (74)	100	272-1052 (658)	68	1.36-55 (4.4)	17	10 (5.4-15)	7.4	<0.01	<0.01	4648
TBEP	100	226-17969 (2395)	94	26-36594 (1483)	100	5.3-659 (52)	100	372-5288 (1958)	24	0.14-34 (5.3)	100	21 (14-40)	23	17	11	9040
TCPP	100	69-20245 (1320)	97	119-36594 (1483)	92	0.85-6377 (73)	100	389-1260 (788)	35	1.5-38 (5.8)	17	21 (9.0-188)	13	13	26	98
TCEP	87	6.4-588 (64)	94	4.6-954 (117)	97	0.43-232 (11)	100	22-64 (38)	74	1.6-266 (17)	17	5.7 (1.4-93)	117	7.8	0.5	71

*Concentración mín.: primer valor por encima del límite de detección

** Los compuestos DES, OP1EC, OP1EO y NP1EO no se detectaron en ninguna de las aguas analizadas

5.3 Eliminación de EDCs en aguas de hospital mediante tratamiento fúngico

(Publicación 9, 2014)

Es demostrado que la fuente principal de la contaminación del medio ambiente por los contaminantes emergentes como los EDCs son los efluentes de las EDARs (Deblonde and Hartemann, 2013; Michael et al., 2013), debido a que estas no están diseñadas para eliminar estos contaminantes y, por lo tanto, muchos de ellos pasan sin cambios y llegan a las aguas superficiales (Verlicchi et al., 2012).

En lo que concierne a los efluentes de hospital, se considera que estos, en general, tienen la misma carga contaminante que las aguas residuales urbanas (en términos de demanda biológica de oxígeno (DBO) y compuestos nitrogenados) y en la mayoría de los países se vierten a las redes de alcantarillado público siendo co-tratadas con aguas residuales urbanas (Le Corre et al., 2012). Sin embargo, la comunidad científica recomienda el pretratamiento de las aguas residuales hospitalarias para mejorar la degradación de contaminantes orgánicos para tratamientos posteriores posteriores y porque el co-tratamiento se basa en la dilución de contaminantes (Altin et al., 2003; Pauwels and Verstraete, 2006). El tratamiento separado de las aguas residuales hospitalarias permite la degradación específica de estos contaminantes ya que podrían ser más accesibles para tratamientos biológicos (Kovalova et al., 2012).

Aunque existen distintos enfoques para la eliminación de contaminantes orgánicos en aguas residuales de hospital, referenciados en esta publicación, este resumen se centra en la aproximación mediante hongos propuesta experimental de este artículo.

Los hongos de la pudrición blanca han demostrado su capacidad para transformar y/o eliminar compuestos farmacéuticos activos (PhACs) (Cruz-Morató et al., 2012) y EDCs (Cabana et al., 2007, Blánquez y Guieysse, 2008). En particular, *Trametes versicolor* ha demostrado ser un hongo atractivo para diseñar estrategias efectivas de biorremediación de contaminantes emergentes debido a su sistema enzimático oxidativo inespecífico, que incluye enzimas extracelulares ligninolíticas como lacasa y peroxidasas, así como enzimas intracelulares como el sistema citocromo P450 (Asgher et al., 2008).

Los primeros estudios de eliminación de PhAC y EDCs con *T. versicolor* se llevaron a cabo en condiciones estériles con medio definido, en una escala de Erlenmeyer y con contaminantes dopando individualmente, degradando por ejemplo químicos disruptores endocrinos (Blánquez and Guieysse, 2008; Cajthaml et al., 2009), entre otros.

El uso en estudios de laboratorio de aguas residuales reales no estériles, donde están presentes muchos contaminantes (en concentraciones que van desde ng/L a mg/L) y microorganismos, proporciona una base para abordar procesos a escala real. Sin embargo, hasta la fecha se han publicado pocos estudios sobre procesos de aguas residuales reales con hongos en un biorreactor y ninguno de ellos ha utilizado aguas residuales hospitalarias (Blánquez et al., 2008; Cruz-Morató et al., 2013; Yang et al., 2013; Zhang and Geißen, 2012).

Aguas residuales hospitalarias y Tratamiento con biorreactor en “batch”

Se recogieron muestras de aguas residuales hospitalarias del alcantarillado principal del Hospital Universitario de Girona Dr. Josep Trueta (Girona, España). Se recolectaron dos muestras de 20 L directamente del colector de alcantarillado del hospital. La muestra 1 se tomó en enero de 2012 y la muestra 2 se tomó en abril de 2012. Se utilizó un biorreactor de lecho fluidizado de aire de vidrio con un volumen útil de 10L (Blánquez et al., 2008). para realizar el tratamiento de aguas residuales hospitalarias en condiciones estériles y no estériles.

Disruptores endocrinos. Resultados

Los resultados del tratamiento de aguas residuales hospitalarias por *T. versicolor* són expuestos en porcentaje de eliminación, ya que no podemos distinguir entre degradación y adsorción en los experimentos del biorreactor. Sin embargo, nuestros resultados anteriores han demostrado la capacidad de este hongo para degradar una amplia gama de productos farmacéuticos y también la identificación de los productos de degradación (ver, por ejemplo, Marco-Urrea et al., 2009).

Tabla 5.7 Concentración inicial y eficiencia de eliminación final después de 8 días de los EDCs en el tratamiento de aguas residuales hospitalaria por *T. versicolor*

Compuesto	Muestra 1 (tratamiento estéril)		Muestra 2 (tratamiento no estéril)	
	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Eliminación (%)	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Eliminación (%)
Benzotriazol	5.57 (± 0.76)	100	56.0 (± 2.86)	68
Toliltriazol	<LOQ	-	<LOQ	-
OP	1.91 (± 0.03)	100	3.44 (± 0.09)	100
OP1EC	<LOD	-	<LOD	-
OP1EO	ND	-	ND	-
OP2EO	1.28 (± 0.34)	Incremento ($2.31 \mu\text{g L}^{-1}$)	7.52 (± 0.29)	75
NP	<LOQ	-	<LOQ	-
NP1EC	<LOD	-	<LOD	-
NP1EO	ND	-	ND	-
NP2EO	ND	-	ND	-
Metilparaben	<LOD	-	<LOD	-
Étilparaben	1.02 (± 0.02)	100	<LOD	-
Propilparaben	1.71 (± 0.02)	100	<LOD	-
Benzilparaben	N.D.	-	<LOD	-
BPA	0.87 (± 0.06)	100	3.44 (± 0.37)	100
Triclorcarabán	ND	-	ND	-
Triclosán	ND	-	ND	-
Cafeína (marcador químico)	75.7 (± 2.7)	7.9	149. (± 3.38)	39

*ND: no determinado

Conclusiones generales

Conclusiones generales

De acuerdo con los objetivos de esta tesis, la investigación realizada y los resultados descritos en los capítulos anteriores, se pueden extraer las siguientes conclusiones

1. El procedimiento LC-LC-MS/MS desarrollado permitió una preconcentración eficiente de los EDCs en muestras de agua de río y residuales, proporcionando en general una alta sensibilidad para la detección de los compuestos de interés debido a la reducción del ruido de fondo MS/MS. Permitiendo de ese modo el análisis simultáneo a nivel traza de EDCs pertenecientes a diferentes familias y con diferentes estructuras y propiedades en menos de 1 h (mediante dos inyecciones, en modo NI y PI, respectivamente), con un mínimo de pretratamiento de la muestra (filtración), mejorando significativamente los métodos reportados anteriormente.

El uso de un sistema LC de columna doble con una válvula de seis puertos redujo las interferencias y mejoró los parámetros de análisis durante la optimización, obteniéndose con la columna EQUAN, Hypersil GOLD™ Aqua los mejores resultados en términos de selectividad y sensibilidad, al estar especialmente indicada para retener analitos inyectados con un alto porcentaje de solución acuosa.

Esta metodología online es rápida y fácil para el análisis de EDC en aguas de ríos superficiales y aguas residuales con bajos LOQs, de pg/L a bajo ng/L para todos los compuestos y matrices, obteniendo recuperaciones aceptables y con una reducción importante en los efectos de matriz con respecto a la metodología de preconcentración SPE convencional. Concretamente los LOQs variaron de 0.008 ng/L a 1.54 ng/L para aguas de río superficial y de 0.18/0.36 ng/L a 12/25 ng/L para aguas residuales efluentes/afuentes (excepto para los monoetoxilados de alquilfenol).

2. El desarrollo y optimización de un nuevo método basado en una extracción PLE seguido de limpieza online utilizando columnas TFC para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en muestras de sedimentos de río y lodos de depuradora, proporcionó una alta sensibilidad para la detección de EDCs debido al reducido ruido de fondo MS/MS. El método de purificación permitió el análisis de trazas simultáneas de EDCs pertenecientes a diferentes familias y con diferentes estructuras y propiedades sin la necesidad de realizar laboriosos pasos de limpieza utilizando SPE offline, lo que resulta en un tiempo de análisis total de aprox. 50 min en lugar de 3 h.

El uso de un sistema LC de doble columna con un sistema de "multiplexing", permitió una efectiva optimización que resultó en una reducción de las interferencias de matriz y un análisis mejorado, obteniendo LOQs que fueron desde 0.008 a 1.60 ng/g para muestras de sedimento y de 0.10 a 125 ng/g para lodos de depuradora (excepto para los monoetoxilados de alquilfenol).

3. A nivel de ecotoxicidad, concretamente basándonos en valores de PNEC, los métodos desarrollados presentaron LODs, tanto para aguas superficiales como para sedimentos, por debajo de las concentraciones precedidas sin efecto, excepto para el EE2 en aguas de río y para el OP1EO en sedimentos. En el caso de los OP1EO, por las dificultades de ionización/fragmentación de los

Conclusiones generales

compuestos APEOs. El EE2 se superó ya que para los estrógenos presentan un gran poder disruptor a concentraciones muy bajas.

Teniendo en cuenta la vinculación de los valores de PNEC con la regulación de ciertos compuestos analizados, en el momento de la realización experimental de esta tesis y según la DMA anterior a 2015, los métodos presentados lograron LODs por debajo de los exigidos legislativamente, concretamente para el OP y NP. No llegando por eso en el caso del EE2, sometido actualmente a vigilancia, Decisión 2015/495/UE, al límite marcado de 0.035 ng/L.

Revisando el estado actual de las nuevas metodologías desarrolladas para alcanzar los cada vez más exigentes límites permitidos para ciertos compuestos, sigue siendo un logro extremadamente difícil que requiere grandes volúmenes de extracción SPE, o enfoques ya sean offline u online específicos, combinados con la espectrometría de masas de alta sensibilidad de última generación.

4. Conocer los niveles determinados y distribución de EDCs en el medio ambiente acuático es un requisito previo para la evaluación del riesgo que estos contaminantes representan para los organismos acuáticos. Los resultados confirman la presencia de mezclas complejas de contaminantes no regulados de diversos orígenes en los ríos ibéricos, lo que genera preocupación por sus posibles efectos interactivos.

Los compuestos utilizados en formulaciones industriales para diversos fines, como los compuestos alquilfenólicos, los benzotriazoles, los retardantes de llama y plastificantes organofosforados son contaminantes importantes que tienen posibles efectos de alteración endocrina en los ríos ibéricos, y fueron todos detectados a concentraciones promedio superiores a 100 ng/L. Concretamente, las más altas concentraciones fueron encontradas en el caso del NP1EC, TT, TCPP, seguido del BT y TBEP.

Se determinaron hormonas naturales y sintéticas en niveles bajos que no excedían los 16 ng/L y 7 ng/g para agua y sedimento, respectivamente (resultado de la concentración total de 8 hormonas y conjugados monitorizados), sin embargo, contribuyeron a más del 80% de la estrogenicidad de las muestras (expresada como EEQ, ng/L o ng/g). La estrogenicidad total fue inferior a 8 ng/L y 2.5 ng/g EEQ en muestras de agua y sedimento, respectivamente, lo que sugiere un bajo riesgo para los organismos acuáticos.

Con respecto a la distribución espacial de estos contaminantes, se descubrió que el río Llobregat era la cuenca fluvial más contaminada, con sitios cerca de la desembocadura del río con la mayor carga contaminante. En la cuenca del río Ebro se identificaron varios puntos calientes y Júcar mostró ser el menos contaminado.

5. El estudio de los niveles determinados, distribución e eliminación de EDCs por parte de las EDARs, es un requisito previo para la evaluación del riesgo que estos contaminantes representan para los organismos acuáticos. Este, confirma la presencia de mezclas complejas de contaminantes regulados, en vigilancia o no regulados de diversos orígenes en las aguas de salida de las EDARs

estudiadas, lo que genera preocupación por sus posibles efectos interactivos y confirmando que las tecnologías aplicadas en las estaciones de depuración de la Península, no són, en la mayoría de los casos eficientes a la eliminación de este tipo de contaminantes.

Los compuestos utilizados en formulaciones industriales para diversos fines, como los compuestos alquilfenólicos, los benzotriazoles, los retardantes de llama y plastificantes organofosforados, son contaminantes importantes que tienen posibles efectos de alteración endocrina, fueron todos detectados a concentraciones de hasta varios $\mu\text{g/L}$ en efluentes.

Sin embargo, si se analiza el aporte estrogénico de estos, teniendo en cuenta sus niveles de concentración, se esperaría un mayor aporte a los niveles de EEQs totales, pero debido a sus bajos valores de EFFis, su contribución al potencial estrogénico en las aguas residuales no fue muy significativa. Siendo la suma de los estrógenos estudiados encontrados en máximos no superiores a unos 250 ng/L , concretamente 233 ng/L , los que aportaron la mayor estrogenicidad detectada tanto en aguas de afluentes como de efluentes.

Además, observando de manera general los resultados obtenidos para los estrógenos, aunque los niveles máximos en los afluentes de depuradora para todas las cuencas fueron superiores que los calculados en los efluentes, las medianas de estrogenicidad mostraron niveles de potencial superior en las salidas de las EDARs estudiadas. Esto fue debido al gran aporte disruptor de las hormonas estudiadas, las cuales no son eliminadas eficientemente en las EDARs, que además fomentan la interconversión entre ellas durante los procesos de tratamiento, llegando incluso, a aumentar el riesgo disruptor una vez tratadas las aguas residuales

6. Resumiendo los datos/niveles determinados de EDCs durante el proyecto SCARCE, así como su comparativa con los niveles encontrados en las referencias bibliográficas actualizadas y reportadas, en las matrices estudiadas más significativas, aguas de río y residuales, así como para los compuestos más relevantes detectados, estrógenos naturales, BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP, se pueden percibir una serie de tendencias, ocurrencia y distribución de estos EDCs tanto a nivel geográfico como a lo largo de las últimas 2 décadas.

- Por ejemplo, la hormona más frecuentemente detectada en nuestro estudio fue la E1, la distribución de ésta en las cuencas analizadas, así como para la hormona de alto poder disruptor E2 fue parecida en todos los ríos, ambas encontrándose además en el rango de concentración de los mínimos detectados publicados en la bibliografía. La hormona E3, fue detectada en muy pocos puntos de los estudiados, siendo además los niveles máximos encontrados no muy elevados según otros datos publicados.

Igualmente, la distribución en los niveles de BPA, OP y NP en las cuatro cuencas fue parecida, con medianas inferiores a las mínimas publicadas excepto para el BPA, no llegando por eso los niveles medianos de este contaminante en ninguna de las cuencas a superar las medianas máximas publicadas.

Conclusiones generales

Fijándonos en la distribución de los máximos publicados para los EDCs anteriormente nombrados, no existen muchas diferencias entre los niveles anteriores a 2010 y los posteriores, seguramente en el caso de los compuestos alquilfenolicos por llevar más de 2 décadas sometidos a restricción, y en el caso de las hormonas y el BPA, por estar en listas de vigilancia.

- Las hormonas E1 y E3 encontradas en las EDARs estudiadas se detectaron a niveles de los mínimos publicados, siendo incluso en el caso de la E3 solamente encontrada en una de las EDARs monitoreadas. Sin embargo, la hormona E2, aunque presentó en gran parte de los afluentes estudiados niveles inferiores al LOD, los valores positivos dieron una mediana parecida a las medianas máximas publicadas. Además, la frecuencia de detección en efluentes de depuradora fue más elevada y los niveles detectados, aunque inferiores a los encontrados en afluentes también se encontraron en el rango de niveles máximos publicados en la bibliografía. Fijándonos en los niveles publicados antes de la realización de nuestro estudio, 2010 y posterior, igual que pasaba en las aguas de río, se pudieron observar cómo los niveles de hormonas en general tanto en afluentes como efluentes de depuradora no han disminuido.

Los niveles medianos encontrados de BPA en las EDARs de nuestro estudio fueron parecidos a los niveles medianos publicados, no llegando por eso a niveles máximos tan altos. En el caso de este contaminante, sí que parece haber disminuido sus concentraciones sobretodo en las entradas de EDARs según los datos publicados antes y después de 2010, sin embargo, los niveles en efluentes siguen siendo parecidos hoy en día, evidenciando la problemática que sigue habiendo sobre la eliminación de este tipo de contaminantes orgánicos en las EDARs en general.

Para los compuestos alquilfenolicos OP y NP representados, parece haber una tendencia más clara en su menor uso fijándonos en los niveles anteriores y posteriores a 2010, además estos, parecen ser bastante eficientemente eliminados de las EDARs, aunque en realidad se bioacumulan en los lodos generados. Por último, se puede observar cómo los niveles encontrados de estos contaminantes regulados en las EDARs estudiadas de la Península Ibérica fueron bastante bajos en comparación a los publicados en la bibliografía.

7. Los niveles de contaminantes en los distintos tipos de agua a estudiar varían según el origen y características de esta. La aplicación de las distintas aproximaciones analíticas presentadas en esta tesis permitió una serie de colaboraciones científicas para la evaluación de distintos cuerpos de agua, con problemáticas comunes, como es la de los niveles de EDCs, pero con necesidades específicas según aplicación o área de estudio medioambiental.

- Comparando los niveles de estrógenos determinados en general en la Península Ibérica con los detectados en la Comunidad de Madrid, ambos recopilados en varios muestreos y años, se pudo observar que, aunque en la Comunidad de Madrid sólo se detectó E1 a niveles medianos de 10 ng/L, esta concentración fue más alta que las medianas encontradas en los ríos de la Península Ibérica. Los estrógenos conjugados más frecuentemente detectados en los 2 estudios fueron por eso los mismos.

Los niveles de desinfectantes en Madrid fueron en general 10 veces más altos, en cambio, en el caso de los parabenos tanto las medianas como las concentraciones máximas fueron similares para el EtP y PrP y teniendo en cuenta por eso, que en la comunidad de Madrid no se detectó en ningún caso ni MeP ni EtP. Tanto en el caso del OP y NP como en los otros compuestos alquilfenólicos analizados, los niveles detectados en la Comunidad de Madrid superaron los encontrados en las cuencas estudiadas. En el caso del BPA, los niveles no difirieron demasiado, en el caso del plastificante TBEP se siguió la misma tendencia que para los compuestos alquilfenólicos. Fue para los compuestos retardantes de llama y anticorrosivos que los niveles detectados en las cuencas fueron bastante superiores.

- En las aguas de consumo analizadas en la Comunidad de Madrid, no fueron detectados ni niveles de estrógenos ni sus conjugados, así como los desinfectantes estudiados. Aunque observando los niveles de parabenos ya se empezó a ver que, aunque los niveles de estos contaminantes en aguas de consumo, eran en general ligeramente inferiores a los encontrados en los ríos, sus medianas y máximos no diferían excesivamente.

En general, las concentraciones tanto medianas como máximas para los otros grupos de contaminantes estudiados, compuestos alquilfenólicos, anticorrosivos, plastificantes y retardantes de llama fueron en general una media de 10 veces inferiores. Pero centrándonos en los compuestos más relevantes como el NP, OP y BPA, en el caso de los dos primeros, se detectaron niveles máximos para aguas de consumo más bajos que aguas de río, siendo por eso estas diferencias ya no tan evidentes comparando medianas, sobretodo en los ríos de las cuencas de la Península. Esto todavía se puso más en evidencia en el caso del BPA, encontrándose en general al mismo nivel, motivo por tanto claro a tener en cuenta para la vigilancia de estos compuestos en todo tipo de matrices de agua.

- Los niveles determinados en los ríos de la Península Ibérica versus los encontrados en los arroyos, estanques y en el drenaje de un glaciar en una región tan remota como la Península Antártica Norte, como era de esperar difirieron bastante, siendo claramente más elevados los encontrados en las aguas de río. Aunque teniendo en cuenta la región tan remota analizada, donde cabría esperar un impacto humano ambiental no apreciable, no se ha detectado en ninguna muestra BPAs, pero sí de otros contaminantes a tener en cuenta, como el TCS, MeP, NP y NP1EC, anticorrosivos el el plastificante TCEP.

Los niveles determinados en la muestra analizada de descarga de aguas residuales urbanas de la región Antártica, resultó dar resultados bastante dispares. Se encontraron niveles de 89 ng/L de E3, por tanto, nada despreciables, teniendo en cuenta que en el estudio de las WWTPs de las cuencas de la Península Ibérica esta hormona no fue detectada en ninguna de las muestras. Pudiéndose por eso ser debidos al tipo de tratamiento diferente que interconvierte las hormonas en distintos estrógenos según WWTP. Por último, las concentraciones más elevadas encontradas detectadas en la región Antártica y comparables con las de la Península, se encontraron para el NP1EC y NPEO2, el anticorrosivo TT y el plastificante TBEP.

Bibliografía

En este capítulo de referencias bibliográficas, se ha diferenciado entre las citas reportadas a lo largo de toda la memoria, de las referencias aportadas en los capítulos 3 y 4, concretamente en los apartados correspondientes que se han basado en los artículos científicos, estas referencias se exponen al final de este capítulo diferenciadas por publicación, concretamente las publicaciones 1, 2, 3 y 4 presentadas.

Bibliografía

- A. Pouillot, Polla, B.S., Polla, A.S., 2006. Conservateurs en cosmetology mise au point sur les parabenes. *J Méd Esthét Chir Dermatol* 33, 187–190.
- Abdul Mumin, M., Farida Akhter, K., Zainal Abedin, M., Zakir Hossain, M., 2006. Determination and Characterization of Caffeine in Tea , Coffee and Soft Drinks by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography (SPE–HPLC). *Malaysian J. Chem.* 8, 045–051.
- Aceña, J., Stampachiachiere, S., Pérez, S., Barceló, D., 2015. Advances in liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry for quantitative and qualitative environmental analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 6289–6299. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8852-6>.
- Acir, I.-H., Guenther, K., 2018. Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. *Sci. Total Environ.* 635, 1530–1546. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.079>.
- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y., 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environ. Int.* 99, 107–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>.
- Adlercreutz, H., Höckerstedt, K., Bannwart, C., Bloigu, S., Hämäläinen, E., Fotsis, T., Ollus, A., 1987. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J. Steroid Biochem.* 27, 1135–1144. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-4731\(87\)90200-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-4731(87)90200-7).
- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J., Sturve, J., 2002. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* 46, 1485–1489. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00255-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00255-7).
- Ahel, M., Giger, W., 1993. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* 26, 1461–1470. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0045-6535\(93\)90213-O](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90213-O)
- Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994a. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28, 1131–1142. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90200-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90200-3).
- Ahel, M., Giger, W., Schaffner, C., 1994b. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res.* 28, 1143–1152. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90201-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90201-1).
- Ahel, M., Scully, F.E., Hoigné, J., Giger, W., 1994c. Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. *Chemosphere* 28, 1361–1368. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90078-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90078-7).
- Alotaibi, M.D., McKinley, A.J., Patterson, B.M., Reeder, A.Y., 2015a. Benzotriazoles in the Aquatic Environment: a Review of Their Occurrence, Toxicity, Degradation and Analysis. *Water, Air, Soil*

- Pollut. 226, 226. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2469-4>.
- Alotaibi, M.D., Patterson, B.M., McKinley, A.J., Reeder, A.Y., Furness, A.J., Donn, M.J., 2015b. Fate of benzotriazole and 5-methylbenzotriazole in recycled water recharged into an anaerobic aquifer: Column studies. *Water Res.* 70, 184–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.040>
- Altin, A., Altin, S., Degirmenci, M., 2003. Characteristics and treatability of hospital (medical) wastewaters. *Fresenius Environ. Bull.* 12, 1098–1108.
- Amin, A., Chauhan, S., Dare, M., Bansal, A.K., 2010. Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75, 206–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.03.001>.
- Andaluri, G., Suri, R.P.S., Kumar, K., 2012. Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost. *Environ. Monit. Assess.* 184, 1197–1205. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2032-8>.
- Andersen, F.A., 2008. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products (Review). *Int. J. Toxicol.* 27, 1–82.
- Andersen, H.R., Hansen, M., Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Ternes, T., Halling-Sørensen, B., 2005. Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere* 61, 139–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.088>
- Andersen, H.R., Lundsbye, M., Wedel, H. V, Eriksson, E., Ledin, A., 2007. Estrogenic personal care products in a greywater reuse system. *Water Sci. Technol.* 56, 45–49. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.821>.
- Andresen, J.A., Et al., Grundmann, A., Bester, K., 2004. Organophosphorus flame retardants and plasticisers in surface waters. *Sci. Total Environ.* 332, 155–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.021>.
- Aparicio, I., Martín, J., Santos, J.L., Malvar, J.L., Alonso, E., 2017. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of polar and non-polar emerging and priority pollutants in environmental waters. *J. Chromatogr. A* 1500, 43–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.007>.
- Aparicio, I., Santos, J.L., Alonso, E., 2007. Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography–mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants. *Anal. Chim. Acta* 584, 455–461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.039>.
- Aranami, K., Readman, J.W., 2007. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere* 66, 1052–1056. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.010>.
- Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M., 2014. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ. Int.* 69, 104–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011>.
- Arnon, S., Dahan, O., Elhanany, S., Cohen, K., Pankratov, I., Gross, A., Ronen, Z., Baram, S., Shore, L.S., 2008. Transport of Testosterone and Estrogen from Dairy-Farm Waste Lagoons to Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5521–5526. <https://doi.org/10.1021/es800784m>.

- Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L., 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19, 771. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9185-3>.
- Asimakopoulos, A.G., Ajibola, A., Kannan, K., Thomaidis, N.S., 2013. Occurrence and removal efficiencies of benzotriazoles and benzothiazoles in a wastewater treatment plant in Greece. *Sci. Total Environ.* 452–453, 163–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.041>.
- Aufartová, J., Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., Nováková, L., Solich, P., 2011. Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. *Anal. Chim. Acta* 704, 33–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.030>.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2006. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochem.* 41, 525–539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.017>.
- Azzouz, A., Ballesteros, E., 2016. Determination of 13 endocrine disrupting chemicals in environmental solid samples using microwave-assisted solvent extraction and continuous solid-phase extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 231–241. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9096-1>.
- Azzouz, A., Ballesteros, E., 2014. Trace analysis of endocrine disrupting compounds in environmental water samples by use of solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* 1360, 248–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.059>.
- Azzouz, A., Ballesteros, E., 2012. Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. *Sci. Total Environ.* 419, 208–215. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.12.058>.
- Bacaloni, A., Cavaliere, C., Foglia, P., Nazzari, M., Samperi, R., Laganà, A., 2007. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of organophosphorus flame retardants and plasticizers in drinking and surface waters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 1123–1130. <https://doi.org/10.1002/rcm.2937>.
- Barber, L.B., Brown, G.K., Zaugg, S.D., 1999. Potential Endocrine Disrupting Organic Chemicals in Treated Municipal Wastewater and River Water, in: *Analysis of Environmental Endocrine Disruptors*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 7–97. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-2000-0747.ch007>.
- Barbosa, M.O., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2016. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Res.* 94, 257–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047>.
- Barceló, D., Petrovic, M., 2007. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 yearson. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 2–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.11.006>
- Bargagli, R., 2008. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 400, 212–226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.062>.
- Bargagli, R., Agnorelli, C., Borghini, F., Monaci, F., 2005. Enhanced Deposition and Bioaccumulation of Mercury in Antarctic Terrestrial Ecosystems Facing a Coastal Polynya. *Environ. Sci. Technol.* 39,

- 8150–8155. <https://doi.org/10.1021/es0507315>.
- Barnabé, S., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Beauchesne, I., Surampalli, R.Y., 2009. Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products—Fate of endocrine disrupting compounds. *Sci.TotalEnviron.*407,1471–1488.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.015>.
- Barreca, S., Busetto, M., Colzani, L., Clerici, L., Daverio, D., Dellavedova, P., Balzamo, S., Calabretta, E., Ubaldi, V., 2019. Determination of estrogenic endocrine disruptors in water at sub-ng L⁻¹ levels in compliance with Decision 2015/495/EU using offline-online solid phase extraction concentration coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchem. J.* 147, 1186–1191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.030>.
- Basheer, C., Parthiban, A., Jayaraman, A., Lee, H.K., Valiyaveetil, S., 2005. Determination of alkylphenols and bisphenol-A: A comparative investigation of functional polymer-coated membrane microextraction and solid-phase microextraction techniques. *J. Chromatogr. A* 1087, 274–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.014>.
- Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V., Le Bot, B., 2012. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1044–1065. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0632-z>
- Bell, K.Y., Wells, M.J.M., Traexler, K.A., Pellegrin, M.-L., Morse, A., Bandy, J., 2011. Emerging Pollutants. *WaterEnviron.Res.*83,1906–1984.
<https://doi.org/10.2175/106143011X13075599870298>.
- Benijts, T., Dams, R., Lambert, W., De Leenheer, A., 2004. Countering matrix effects in environmental liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. *J. Chromatogr. A* 1029, 153–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.022>.
- Bergstrom D.M., Convey P., H.A.H., 2006. Trends in Antarctic terrestrial and limnetic ecosystems. Springer, Dordrecht (2006).
- Bergthaller, P., 2002. Couplers in colour photography—chemistry and function Part 3. *Imaging Sci. J.* 50, 233–276. <https://doi.org/10.1080/13682199.2002.11784405>.
- Berlioz-Barbier, A., Vauchez, A., Wiest, L., Baudot, R., Vulliet, E., Cren-Olivé, C., 2014. Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis. *Anal.Bioanal.Chem.*406,1259–1266. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7450-8>.
- Bester, K., 2003. Triclosan in a sewage treatment process—balances and monitoring data. *Water Res.* 37, 3891–3896. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00335-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00335-X).
- Bevacqua, C.E., Rice, C.P., Torrents, A., Ramirez, M., 2011. Steroid hormones in biosolids and poultry litter: A comparison of potential environmental inputs. *Sci. Total Environ.* 409, 2120–2126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.02.007>.
- Biles, J.E., McNeal, T.P., Begley, T.H., Hollifield, H.C., 1997. Determination of Bisphenol-A in Reusable Polycarbonate Food-Contact Plastics and Migration to Food-Simulating Liquids. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3541–3544. <https://doi.org/10.1021/jf970072i>.
- Blanco, E., Casais, M. del C., Mejuto, M. del C., Cela, R., 2009. Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 647,

- 104–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.024>.
- Blánquez, P., Guieysse, B., 2008. Continuous biodegradation of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by *Trametes versicolor*. *J. Hazard. Mater.* 150, 459–462. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.085>.
- Blánquez, P., Sarrà, M., Vicent, T., 2008. Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions. *Process Biochem.* 43, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.10.002>.
- Błędzka, D., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W., 2014. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ. Int.* 67, 27–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.007>.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239, 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>.
- BPA. Bisfenol A. Available: <https://echa.europa.eu/es/hot-topics/bisphenol-a>, in: ECHA.
- BPA. Bisphenol A. Available: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/bisphenol-bpa>, in: FDA.
- BPA. Bisphenol A. Available: <https://www.foodstandards.gov.au/consumer/chemicals/bpa/Pages/default.aspx>, in: Food Standards Australia New Zealand.
- BPA. Bisphenol A. Available: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/home-garden-safety/bisphenol-bpa.html>, in: Environment Canada and Health Canada.
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82, 1518–1532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.018>.
- Breedveld, G.D., Roseth, R., Sparrevik, M., Hartnik, T., Hem, L.J., 2003. Persistence of the De-Icing Additive Benzotriazole at an Abandoned Airport. *Water, Air Soil Pollut. Focus* 3, 91–101. <https://doi.org/10.1023/A:1023961213839>.
- Briciu, R.D., Kot-Wasik, A., Namiesnik, J., 2009. Analytical Challenges and Recent Advances in the Determination of Estrogens in Water Environments. *J. Chromatogr. Sci.* 47, 127–139. <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.2.127>.
- Brix, R., Postigo, C., González, S., Villagrasa, M., Navarro, A., Kuster, M., de Alda, M.J.L., Barceló, D., 2010. Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1301–1309. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3358-8>.
- Brunelle, D.J., 2005. Advances in Polycarbonates: An Overview, in: *Advances in Polycarbonates*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, p. 1. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-2005-0898.ch001>.
- Bruton, T., Alboloushi, A., de la Garza, B., Kim, B.-O., Halden, R.U., 2010. Fate of Caffeine in the Environment and Ecotoxicological Considerations, in: *Contaminants of Emerging Concern in the Environment: Ecological and Human Health* Cfile:///C:/Users/Marin/Downloads/Es020125z.Risonside rations, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 12–257. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-2010-1048.ch012>.
- Buchberger, W.W., 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Anal. Chim. Acta* 593, 129–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.006>.

Bibliografía

- Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D., Buser, H.-R., 2003. Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 37, 691–700. <https://doi.org/10.1021/es020125z>.
- Buka, I., Osornio-Vargas, A., Walker, R., 2009. Canada declares bisphenol A a “dangerous substance”: Questioning the safety of plastics. *Paediatr. Child Health* 14, 11–13. <https://doi.org/10.1093/pch/14.1.11a>.
- Burridge, E., 2008. Chemical profile: bisphenol A. ICIS Chemical Business on the web. Available: <http://www.icis.com/resources/news/2008/10/13/9162868/chemical-profile-bisphenol-a>.
- Buszewski, B., Szultka, M., 2012. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 42, 198–213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>.
- Buth, J.M., Grandbois, M., Vikesland, P.J., McNeill, K., Arnold, W.A., 2009. Aquatic photochemistry of chlorinated triclosan derivatives: Potential source of polychlorodibenzo-P-dioxins. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2555–2563. <https://doi.org/10.1897/08-490.1>.
- Buth, J.M., Ross, M.R., McNeill, K., Arnold, W.A., 2011. Removal and formation of chlorinated triclosan derivatives in wastewater treatment plants using chlorine and UV disinfection. *Chemosphere* 84, 1238–1243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.017>.
- Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Möder, M., 2009. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75, 745–750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.034>.
- Camilleri, J., Baudot, R., Wiest, L., Vulliet, E., Cren-Olivé, C., Daniele, G., 2015. Multiresidue fully automated online SPE-HPLC-MS/MS method for the quantification of endocrine-disrupting and pharmaceutical compounds at trace level in surface water. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 95, 67–81. <https://doi.org/10.1080/03067319.2014.983494>.
- Campbell, C.G., Borglin, S.E., Green, F.B., Grayson, A., Wozel, E., Stringfellow, W.T., 2006. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere* 65, 1265–1280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.003>.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, 2002. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Nonylphenol and its ethoxylates. *Can. Coun. Minist. Environ.* 1–8.
- Cancilla, D.A., Baird, J.C., Rosa, R., 2003. Detection of Aircraft Deicing Additives in Groundwater and Soil Samples from Fairchild Air Force Base, a Small to Moderate User of Deicing Fluids. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 868–875. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0063-8>.
- Canosa, P., Morales, S., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R., Gómez, M., 2005. Aquatic degradation of triclosan and formation of toxic chlorophenols in presence of low concentrations of free chlorine. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 1119–1126. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0116-4>.
- Carballa, M., Omil, F., Alder, A.C., Lema, J.M., 2006. Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. *Water Sci. Technol.* 53, 109–117. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.241>.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llombart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38, 2918–2926. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.029>.

- Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S., Sezenna, E., 2015. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 5711–5741. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3974-5>.
- Carpinteiro, I., Abuin, B., Ramil, M., Rodríguez, I., Cela, R., 2012. Simultaneous determination of benzotriazole and benzothiazole derivatives in aqueous matrices by mixed-mode solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 2471–2478. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5718-z>.
- Carpinteiro, J., Quintana, J.B., Rodríguez, I., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., Cela, R., 2004. Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1056, 179–185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.111>.
- Cases, V., Alonso, V., Argandoña, V., Rodríguez, M., Prats, D., 2011. Endocrine disrupting compounds: A comparison of removal between conventional activated sludge and membrane bioreactors. *Desalination* 272, 240–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.01.026>.
- Casey, F.X.M., Larsen, G.L., Hakk, H., Šimůnek, J., 2003. Fate and Transport of 17 β -Estradiol in Soil–Water Systems. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2400–2409. <https://doi.org/10.1021/es026153z>.
- Cashman, A.L., Warshaw, E.M., 2005. Parabens: A Review of Epidemiology, Structure, Allergenicity, and Hormonal Properties. *Dermatitis* 16.
- Cavaliere, C., Capriotti, A.L., Ferraris, F., Foglia, P., Samperi, R., Ventura, S., Laganà, A., 2016. Multiresidue analysis of endocrine-disrupting compounds and perfluorinated sulfates and carboxylic acids in sediments by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1438, 133–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.022>.
- Celano, R., Piccinelli, A.L., Campone, L., Rastrelli, L., 2014. Ultra-preconcentration and determination of selected pharmaceutical and personal care products in different water matrices by solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction prior to ultra high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1355, 26–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.009>.
- Čelić, M., Insa, S., Škrbić, B., Petrović, M., 2017. Development of a sensitive and robust online dual column liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of natural and synthetic estrogens and their conjugates in river water and wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 5427–5440. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0408-5>
- Cerqueira, M.B.R., Caldas, S.S., Primel, E.G., 2014. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. *J. Chromatogr. A* 1336, 10–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.002>.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barceló, D., 2008. Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain). *Environ. Pollut.* 153, 384–392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.026>.
- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, Ú., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D., 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and

Bibliografía

- sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 697–708. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2303-5>.
- Chadwick, D., Hashemi, T., 1978. Adsorbed corrosion inhibitors studied by electron spectroscopy: Benzotriazole on copper and copper alloys. *Corros. Sci.* 18, 39–51. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(78\)80074-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0010-938X(78)80074-2).
- Chalew, T.E.A., Halden, R.U., 2009. Environmental Exposure of Aquatic and Terrestrial Biota to Triclosan and Triclocarban¹. *JAWRA J. Am. Water Resour. Assoc.* 45, 4–13. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2008.00284.x>.
- Chang, C.-C., Huang, S.-D., 2010. Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 662, 39–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.003>.
- Chang, C.-M., Chou, C.-C., Lee, M.-R., 2005. Determining leaching of bisphenol A from plastic containers by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 539, 41–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.051>.
- Chang, H.-S., Choo, K.-H., Lee, B., Choi, S.-J., 2009. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *J. Hazard. Mater.* 172, 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.135>.
- Chang, B. V., Yuan, S.Y., Chiou, C.C., 2011. Biodegradation of bisphenol-A in river sediment. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 46, 931–937. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.586246>.
- Chao, Y.-Y., Jian, Z.-X., Tu, Y.-M., Wang, H.-W., Huang, Y.-L., 2013. An on-line push/pull perfusion-based hollow-fiber liquid-phase microextraction system for high-performance liquid chromatographic determination of alkylphenols in water samples. *Analyst* 138, 3271–3279. <https://doi.org/10.1039/C3AN36696K>.
- Charnock, C., Finsrud, T., 2007. Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. *J. Clin. Pharm. Ther.* 32, 567–572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2007.00854.x>.
- Chen, C.-Y., Wen, T.-Y., Wang, G.-S., Cheng, H.-W., Lin, Y.-H., Lien, G.-W., 2007. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 378, 352–365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.038>.
- Chen, Q., Shi, J., Wu, W., Liu, X., Zhang, H., 2012. A new pretreatment and improved method for determination of selected estrogens in high matrix solid sewage samples by liquid chromatography mass spectrometry. *Microchem. J.* 104, 49–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.04.008>.
- Chen, W., Huang, H., Chen, C.-E., Qi, S., Price, O.R., Zhang, H., Jones, K.C., Sweetman, A.J., 2016. Simultaneous determination of 20 trace organic chemicals in waters by solid-phase extraction (SPE) with triple-quadrupole mass spectrometer (QqQ-MS) and hybrid quadrupole Orbitrap high resolution MS(Q-Orbitrap-HRMS). *Chemosphere* 163, 99–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.080>.
- Chiu, T.Y., Koh, Y.K.K., Paterakis, N., Boobis, A.R., Cartmell, E., Richards, K.H., Lester, J.N., Scrimshaw, M.D., 2009. The significance of sample mass in the analysis of steroid estrogens in

- sewage sludges and the derivation of partition coefficients in wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1216, 4923–4926. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.019>.
- Chiu, T.Y., Paterakis, N., Cartmell, E., Scrimshaw, M.D., 2010. A Critical Review of the Formation of Mono- and Dicarboxylated Metabolic Intermediates of Alkylphenol Polyethoxylates during Wastewater Treatment and Their Environmental Significance. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 40, 199–238. <https://doi.org/10.1080/10643380802219517>.
- Chokwe, T.B., Okonkwo, J.O., Sibali, L.L., 2017. Distribution, exposure pathways, sources and toxicity of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in the environment. *Water SA* 43, 529–542. <https://doi.org/10.4314/wsa.v43i4.01>.
- Chokwe, T.B., Okonkwo, J.O., Sibali, L.L., Ncube, E.J., 2015. An integrated method for the simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and brominated flame retardants in sewage sludge samples by ultrasonic-assisted extraction, solid phase clean-up, and GC-MS analysis. *Microchem. J.* 123, 230–236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.07.001>.
- Ciofi, L., Ancillotti, C., Chiuminatto, U., Fibbi, D., Pasquini, B., Bruzzoniti, M.C., Rivoira, L., Del Bubba, M., 2016. Fully automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of alkylphenol polyethoxylates and their carboxylic and phenolic metabolites in wastewater samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 3331–3347. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9403-5>.
- Ciofi, L., Fibbi, D., Chiuminatto, U., Coppini, E., Checchini, L., Del Bubba, M., 2013. Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater. *J. Chromatogr. A* 1283, 53–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.084>.
- Cirelli, A.F., Ojeda, C., Castro, M.J.L., Salgot, M., 2010. Surfactants in Sludge-Amended Agricultural Soils: A Review BT - Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants: Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants, in: Lichtfouse, E. (Ed.), . Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 227–251. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9654-9_12.
- Citulski, J.A., Farahbakhsh, K., 2010. Fate of Endocrine-Active Compounds during Municipal Biosolids Treatment: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8367–8376. <https://doi.org/10.1021/es102403y>.
- Clara, M., Strenn, B., Saracevic, E., Kreuzinger, N., 2004. Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere* 56, 843–851. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.048>.
- Combalt, S., Pype, M.-L., Bernet, N., Hernandez-Raquet, G., 2010. Enhanced methods for conditioning, storage, and extraction of liquid and solid samples of manure for determination of steroid hormones by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 973–984. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3954-7>.
- Coogan, M.A., Edziyie, R.E., La Point, T.W., Venables, B.J., 2007. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere* 67, 1911–1918. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.027>.
- Cornell, J.S., Pillard, D.A., Hernandez, M.T., 2000. Comparative measures of the toxicity of component chemicals in aircraft deicing fluid. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1465–1472. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190601>.
- Corrales, J., Kristofco, L.A., Steele, W.B., Yates, B.S., Breed, C.S., Williams, E.S., Brooks, B.W., 2015.

Bibliografía

- Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose-Response* 13, 1559325815598308.
<https://doi.org/10.1177/1559325815598308>.
- Correa-Reyes, G., Viana, M.T., Marquez-Rocha, F.J., Licea, A.F., Ponce, E., Vazquez-Duhalt, R., 2007. Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain. *Chemosphere* 68, 662–670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.030>.
- Cosmetics Alliance Canada, Cosmetics Alliance Canada. Available: <https://www.cosmeticsalliance.ca/>.
- Cousins, I.T., Staples, C.A., Klečka, G.M., Mackay, D., 2002. A Multimedia Assessment of the Environmental Fate of Bisphenol A. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 8, 1107–1135. <https://doi.org/10.1080/1080-700291905846>.
- Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Guillette, L.J., 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reprod. Toxicol.* 24, 225–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.008>.
- Cristale, J., Lacorte, S., 2013. Development and validation of a multiresidue method for the analysis of polybrominated diphenyl ethers, new brominated and organophosphorus flame retardants in sediment, sludge and dust. *J. Chromatogr. A* 1305, 267–275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.028>.
- Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M., 2013. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water Res.* 47, 5200–5210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.007>.
- Czajka, C.P., Londry, K.L., 2006. Anaerobic biotransformation of estrogens. *Sci. Total Environ.* 367, 932–941. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.021>.
- Czech, T., Bonilla, N.B., Gambus, F., González, R.R., Marín-Sáez, J., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G., 2016. Fast analysis of 4-tert-octylphenol, pentachlorophenol and 4-nonylphenol in river sediments by QuEChERS extraction procedure combined with GC-QqQ-MS/MS. *Sci. Total Environ.* 557–558, 681–687. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.135>.
- D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R., 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Total Environ.* 302, 199–209. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00342-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00342-X).
- Dafouz, R., Cáceres, N., Rodríguez-Gil, J.L., Mastroianni, N., López de Alda, M., Barceló, D., de Miguel, Á.G., Valcárcel, Y., 2018. Does the presence of caffeine in the marine environment represent an environmental risk? A regional and global study. *Sci. Total Environ.* 615, 632–642. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.155>.
- Dann, A.B., Hontela, A., 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 31, 285–311. <https://doi.org/10.1002/jat.1660>.
- Davis, E.F., Gunsch, C.K., Stapleton, H.M., 2015. Fate of flame retardants and the antimicrobial agent triclosan in planted and unplanted biosolid-amended soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 968–976. <https://doi.org/10.1002/etc.2854>.
- De Gussemé, B., Pycke, B., Hennebel, T., Marcoen, A., Vlaeminck, S.E., Noppe, H., Boon, N., Verstraete, W., 2009. Biological removal of 17 α -ethinylestradiol by a nitrifier enrichment culture in a membrane bioreactor. *Water Res.* 43, 2493–2503.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.028>.
- de Sousa, D.N.R., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Carneiro, R.L., Fadini, P.S., 2015. Ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of emerging contaminants in freshwater sediments. *J. Sep. Sci.* 38, 3454–3460. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500644>.
- DeArmond, P.D., DiGoregorio, A.L., 2013. Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry-based method for the analysis of alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates in environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1305, 154–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.017>.
- Deblonde, T., Hartemann, P., 2013. Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals. *Public Health* 127, 312–317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.puhe.2013.01.026>.
- Decisión 2010/169/CE. 2010/169/: Decisión de la Comisión, de 19 de marzo de 2010, relativa a la no inclusión del 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter en la lista de la Unión de los aditivos que pueden utilizarse en la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados.
- Decisión de Ejecución (UE) 2015/495. Decisión de Ejecución (UE) 2015/495 de la Comisión, de 20 de marzo de 2015, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva
- Decisión de Ejecución (UE) 2018/840. Decisión de Ejecución (UE) 2018/840 de la Comisión, de 5 de junio de 2018, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 20.
- Decisión de la Comisión 2002/657/CE, n.d. Decisión de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (Texto pertinente a efectos del EEE).
- Decisión n° 2455/2001/CE. Decisión n° 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2001, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE (Texto pertinente a.
- Dhillon, G.S., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, S.K., Cledón, M., Verma, M., Surampalli, R.Y., 2015. Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 5657–5684. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505657>.
- Dhillon, S.G., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, K.S., Cledón, M., Verma, M., Surampalli, Y.R., 2015. Triclosan: Current Status, Occurrence, Environmental Risks and Bioaccumulation Potential. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* . <https://doi.org/10.3390/ijerph120505657>.
- Dichtl, N., Rogge, S., Bauerfeld, K., 2007. Novel Strategies in Sewage Sludge Treatment. *CLEAN – Soil, Air, Water* 35, 473–479. <https://doi.org/10.1002/clen.200720022>.
- Dimpe, K.M., Nomngongo, P.N., 2016. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *TrAC Trends Anal. Chem.* 82, 199–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.023>.
- Ding, S.-L., Wang, X.-K., Jiang, W.-Q., Meng, X., Zhao, R.-S., Wang, C., Wang, X., 2013. Photodegradation of the antimicrobial triclocarban in aqueous systems under ultraviolet radiation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3195–3201. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1239-8>.
- Directiva 2000/60/CE. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de política de aguas

Bibliografía

- Directiva 2003/53/CE. Directiva 2003/53/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de junio de 2003, por la que se modifica por vigesimosexta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo respecto a la limitación de la comercialización y el uso de determinadas sustancias y prepa.
- Directiva 2008/105/CE. Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE.
- Directiva 2009/90/CE. Directiva 2009/90/CE de la Comisión, de 31 de julio de 2009, por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las.
- Directiva 2013/39/UE. Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.
- Directiva 76/464/CEE. Directiva 76/464/CEE del Consejo, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad.
- Directiva 76/768/CEE. Directiva 76/768/CEE del Consejo, de 27 de julio de 1976, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros en materia de productos cosméticos.
- Directiva 91/271/CEE. Directiva 91/271/CEE: tratamiento de las aguas residuales urbanas.
- Directiva 91/676/CEE. Directiva 91/676/CEE del Consejo, de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura.
- Directiva 96/22/CE. Directiva 96/22/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y.
- Directiva 96/61/CE. Directiva 96/61/CE del Consejo de 24 de septiembre de 1996 relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación.
- Directiva 98/15/CE. Informe de la Comisión - Aplicación de la Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, en su versión modificada por la Directiva 98/15/CE de la Comisión de 27 de febrero de 1998.
- Directiva 98/83/CE. Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Navalón, A., Vílchez, J.L., 2012. Improved sample treatment for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 101, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.045>.
- Dorn, P.B., Chou, C.-S., Gentempo, J.J., 1987. Degradation of bisphenol A in natural waters. *Chemosphere* 16, 1501–1507. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0045-6535\(87\)90090-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0045-6535(87)90090-7).
- Doudrick, K.D., Jones, D.B., Kalinowski, T., Hartmann, E.M., Halden, R.U., 2010. Assessment of the Contribution of Triclosan to Dioxin Emissions from Sludge Incineration in the U.S. Using a Mathematical Model, in: *Contaminants of Emerging Concern in the Environment: Ecological and Human Health Considerations*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 23–469. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-2010-1048.ch023>.
- Du, J., Li, H., Xu, S., Zhou, Q., Jin, M., Tang, J., 2019. A review of organophosphorus flame retardants

- (OPFRs): occurrence, bioaccumulation, toxicity, and organism exposure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 22126–22136. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05669-y>.
- Duncan, L.A., Tyner, J.S., Buchanan, J.R., Hawkins, S.A., Lee, J., 2015. Fate and Transport of 17 β -Estradiol beneath Animal Waste Holding Ponds. *J. Environ. Qual.* 44, 982–988. <https://doi.org/10.2134/jeq2014.08.0353>.
- Duong, C.N., Ra, J.S., Cho, J., Kim, Sang D, Choi, H.K., Park, J.-H., Kim, K.W., Inam, E., Kim, Sang Don, 2010. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere* 78, 286–293. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.048>.
- Durant, A.A., Fente, C.A., Franco, C.M., Vázquez, B.I., Cepeda, A., 2002. Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Determination of 17 α -Ethinylestradiol Residue in the Hair of Cattle. Application to Treated Animals. *J. Agric. Food Chem.* 50, 436–440. <https://doi.org/10.1021/jf010834g>.
- EC/List no.: 202-785-7. European Chemicals Agency. Available: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.002.532>, in: ECHA.
- ECHA, 2009. European Union Risk Assessment Report (EURAR): Tris (2-chloroethyl) phosphate, TCEP. Italy: European Commission. Available: <https://echa.europa.eu/documents/10162/2663989d-1795-44a1-8f50-153a81133258>, in: European Union Risk Assessment Report. p. 213 pp.
- ECHA, 2008. Tris(2-Chloro-1-Methylethyl)Phosphate(TCPP). Available: https://echa.europa.eu/documents/10162/13630/trd_rar_ireland_tccp_en.pdf, in: European Union Risk Assessment Report. pp. 845–854. <https://doi.org/10.1002/9781118834015.ch84>.
- EFRA. Flame Retardants, Frequently Asked Questions. Available: https://www.flameretardants-online.com/images/itempics/2/9/1/item_18192_pdf_1.pdf.
- Emnet, P., Gaw, S., Northcott, G., Storey, B., Graham, L., 2015. Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base. *Environ. Res.* 136, 331–342. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.019>.
- EPA, 2014. Certain Nonylphenols and Nonylphenol Ethoxylates; Significant New Use Rule. Available: <https://www.federalregister.gov/documents/2014/10/01/2014-23253/certain-nonylphenols-and-nonylphenol-ethoxylates-significant-new-use-rule>.
- Epstein, S.S., 1990. The Chemical Jungle: Today's Beef Industry. *Int. J. Heal. Serv.* 20, 277–280. <https://doi.org/10.2190/3MFD-569U-K87C-P8CM>.
- Erger, C., Schmidt, T.C., 2014. Disk-based solid-phase extraction analysis of organic substances in water. *TrAC Trends Anal. Chem.* 61, 74–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.05.006>
- Eriksson, E., Andersen, H.R., Ledin, A., 2008. Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *J. Hazard. Mater.* 156, 240–259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.022>.
- Eriksson, E., Andersen, H.R., Madsen, T.S., Ledin, A., 2009. Greywater pollution variability and loadings. *Ecol. Eng.* 35, 661–669. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.10.015>.
- Fabregat-Cabello, N., Sancho, J. V, Vidal, A., González, F. V, Roig-Navarro, A.F., 2014. Development

- and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution. *J.Chromatogr.A*1328,43–51.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.077>.
- Fan, A.M., Chou, W.-C., Lin, P., 2017. Chapter 41 - Toxicity and Risk Assessment of Bisphenol A, in: Gupta, R.C.B.T.-R. and D.T. (Second E. (Ed.), . Academic Press, pp. 765–795.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00041-X>.
- Fang, T.Y., Praveena, S.M., deBurbure, C., Aris, A.Z., Ismail, S.N.S., Rasdi, I., 2016. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere* 165, 358–368.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.051>.
- Farré, M., Kantiani, L., Petrovic, M., Pérez, S., Barceló, D., 2012. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. *J.Chromatogr.A*1259,86–99.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.024>.
- Farré, M., Pérez, S., Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., Barceló, D., 2010. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* 29, 1347–1362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.016>.
- Farre, M., Petrovic, M., Barcelo, D., 2007. No Title. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1203.
- Fayad, P.B., Prévost, M., Sauvé, S., 2013. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta* 115, 349–360.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.038>.
- Fenichel, P., Chevalier, N., Brucker-Davis, F., 2013. Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 74, 211–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ando.2013.04.002>
- Fent, G., Hein, W.J., Moendel, M.J., Kubiak, R., 2003. Fate of 14C-bisphenol A in soils. *Chemosphere* 51, 735–746. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00100-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00100-0)
- Fernández-Ramos, C., Šatínský, D., Šmídová, B., Solich, P., 2014. Analysis of trace organic compounds in environmental, food and biological matrices using large-volume sample injection in column-switching liquid chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* 62, 69–85.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.008>.
- Fernandez, M.P., Noguerol, T.-N., Lacorte, S., Buchanan, I., Piña, B., 2009. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 957–968. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2516-8>.
- Ferreira, A.P., de Lourdes, C., da Cunha, N., 2005. Anthropic pollution in aquatic environment: Development of a caffeine indicator. *Int. J. Environ. Health Res.* 15, 303–311.
<https://doi.org/10.1080/09603120500155898>.
- Fiss, E.M., Rule, K.L., Vikesland, P.J., 2007. Formation of Chloroform and Other Chlorinated Byproducts by Chlorination of Triclosan-Containing Antibacterial Products. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2387–2394. <https://doi.org/10.1021/es062227l>.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., Wallace, E., 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *J.Environ.Manage.*104,19–34.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.021>.
- French H.M., 2013. *The Periglacial Environment*, John Wiley & Sons, Ottawa (2013).
- Fuerhacker, M., 2003. Bisphenol A emission factors from industrial sources and elimination rates in a sewage treatment plant. *Water Sci. Technol.* 47, 117–122. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0553>.
- Fumes, B.H., Andrade, M.A., Franco, M.S., Lanças, F.M., 2017. On-line approaches for the determination of residues and contaminants in complex samples. *J. Sep. Sci.* 40, 183–202. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600867>.
- Gabet-Giraud, V., Miège, C., Choubert, J.M., Ruel, S.M., Coquery, M., 2010. Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 408, 4257–4269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.05.023>.
- Gadd, J.B., Tremblay, L.A., Northcott, G.L., 2010. Steroid estrogens, conjugated estrogens and estrogenic activity in farm dairy shed effluents. *Environ. Pollut.* 158, 730–736. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.015>.
- García-López, M., Rodríguez, I., Cela, R., 2010. Mixed-mode solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of tri- and di-substituted organophosphorus species in water samples. *J. Chromatogr. A* 1217, 1476–1484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.067>.
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D., 2007. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1138, 32–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.037>.
- Gentili, A., Perret, D., Marchese, S., Mastropasqua, R., Curini, R., Di Corcia, A., 2002. Analysis of free estrogens and their conjugates in sewage and river waters by solid-phase extraction then liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 56, 25–32. <https://doi.org/10.1007/BF02490242>.
- Geyer, H.J., Rimkus, G.G., Scheunert, I., Kaune, A., Schramm, K.-W., Kettrup, A., Zeeman, M., Muir, D.C.G., Hansen, L.G., Mackay, D., 2000. Bioaccumulation and Occurrence of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), Persistent Organic Pollutants (POPs), and Other Organic Compounds in Fish and Other Organisms Including Humans BT - Bioaccumulation – New Aspects and Developments, in: Beek, B. (Ed.), . Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–166. https://doi.org/10.1007/10503050_1.
- Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56, 1021–1032. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.061>
- Giger, W., 2008. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 37. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2481-2>.
- Giger, W., Schaffner, C., Kohler, H.-P.E., 2006a. Benzotriazole and Tolyltriazole as Aquatic Contaminants. 1. Input and Occurrence in Rivers and Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7186–7192. <https://doi.org/10.1021/es061565j>.
- Giger, W., Schaffner, C., Kohler, H.-P.E., 2006b. Benzotriazole and Tolyltriazole as Aquatic Contaminants. 1. Input and Occurrence in Rivers and Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7186–7192. <https://doi.org/10.1021/es061565j>.

Bibliografía

- Giraudou, M., Douville, M., Cottin, G., Houde, M., 2017. Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles: Endocrine-disrupting potential and molting effects. *PLoS One* 12, e0171763–e0171763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171763>
- Giulivo, M., Capri, E., Eljarrat, E., Barceló, D., 2016. Analysis of organophosphorus flame retardants in environmental and biotic matrices using on-line turbulent flow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1474, 71–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.042>.
- Gjelstad, A., Pedersen-Bjergaard, S., 2013. Perspective: Hollow fibre liquid-phase microextraction - principles, performance, applicability, and future directions. *Sci. Chromatogr.* 5, 181–189. <https://doi.org/10.4322/sc.2014.003>.
- Glineur, A., Nott, K., Carbonnelle, P., Ronkart, S., Purcaro, G., 2020. Development And Validation Of A Method For Determining Estrogenic Compounds In Surface Water At The Ultra-Trace Level Required By The EU Water Framework Directive Watch List. *J. Chromatogr. A* 1624, 461242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461242>.
- Golden, R., Gandy, J., Vollmer, G., 2005. A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health. *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 435–458. <https://doi.org/10.1080/10408440490920104>.
- González-Mariño, I., Quintana, J.B., Rodríguez, I., Cela, R., 2011. Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate-mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Water Res.* 45, 6770–6780. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.027>.
- González-Mariño, I., Quintana, J.B., Rodríguez, I., Cela, R., 2009. Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 1756–1766. <https://doi.org/10.1002/rcm.4069>.
- González, M.M., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2010. Occurrence and risk assessment of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge from different conventional treatment processes. *Sci. Total Environ.* 408, 563–570. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.027>.
- González, S., Petrovic, M., Barceló, D., 2007. Removal of a broad range of surfactants from municipal wastewater – Comparison between membrane bioreactor and conventional activated sludge treatment. *Chemosphere* 67, 335–343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.056>.
- Gorga, M., Insa, S., Petrovic, M., Barcelo, D., 2014a. Analysis of Endocrine Disrupters and Related Compounds in Sediments and Sewage Sludge Using On-line Turbulent Flow Chromatography-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of chromatography. A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.028>
- Gorga, M., Insa, S., Petrovic, M., Barcelo, D., 2014b. Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers, *The Science of the total environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.037>.
- Gorga, M., Petrovic, M., Barcelo, D., 2013. Multi-Residue Analytical Method for the Determination of Endocrine Disruptors and Related Compounds in River and Waste Water Using Dual Column

- Liquid Chromatography Switching System Coupled to Mass Spectrometry, *Journal of chromatography. A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.028>.
- Gröndahl, F., Sidenmark, J., Thomsen, A., 2009. Survey of waste water disposal practices at Antarctic research stations. *Polar Res.* 28, 298–306. <https://doi.org/10.1111/j.1751-8369.2008.00056.x>.
- Gruden, C.L., Dow, S.M., Hernandez, M.T., 2001. Fate and Toxicity of Aircraft Deicing Fluid Additives Through Anaerobic Digestion. *Water Environ. Res.* 73, 72–79. <https://doi.org/10.2175/106143001X138714>.
- Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2014. Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends Environ. Anal. Chem.* 3–4, 14–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.10.001>.
- Guedes-Alonso, R., Santana-Viera, S., Montesdeoca-Esponda, S., Afonso-Olivares, C., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2016. Application of microwave-assisted extraction and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of sex hormones and corticosteroids in sewage sludge samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 6833–6844. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9810-7>.
- Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. Simultaneous Determination of Hormonal Residues in Treated Waters Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.* 2013, 210653. <https://doi.org/10.1155/2013/210653>.
- Guo, F., Liu, Q., Qu, G., Song, S., Sun, J., Shi, J., Jiang, G., 2013. Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1281, 9–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.044>.
- Guo, Y., Kannan, K., 2013. A Survey of Phthalates and Parabens in Personal Care Products from the United States and Its Implications for Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14442–14449. <https://doi.org/10.1021/es4042034>.
- Gurr, C.J., Reinhard, M., 2006. Harnessing Natural Attenuation of Pharmaceuticals and Hormones in Rivers. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2872–2876. <https://doi.org/10.1021/es062677d>.
- Haiyan, R., Shulan, J., ud din Ahmad, N., Dao, W., Chengwu, C., 2007. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 α -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. *JCR5. Chemosphere* 66, 340–346. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.064>.
- Halden, R.U., 2014. On the Need and Speed of Regulating Triclosan and Triclocarban in the United States. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3603–3611. <https://doi.org/10.1021/es500495p>.
- Halden, Rolf U, Lindeman, A.E., Aiello, A.E., Andrews, D., Arnold, W.A., Fair, P., Fuoco, R.E., Geer, L.A., Johnson, P.I., Lohmann, R., McNeill, K., Sacks, V.P., Schettler, T., Weber, R., Zoeller, R.T., Blum, A., 2017. The Florence Statement on Triclosan and Triclocarban. *Environ. Health Perspect.* 125, 64501. <https://doi.org/10.1289/EHP1788>.
- Halden, Rolf U., Lindeman, A.E., Aiello, A.E., Andrews, D., Arnold, W.A., Fair, P., Fuoco, R.E., Geer, L.A., Johnson, P.I., Lohmann, R., McNeill, K., Sacks, V.P., Schettler, T., Weber, R., Zoeller, R.T., Blum, A., 2017. The florence statement on triclosan and triclocarban. *Environ. Health Perspect.* 125, 1–13. <https://doi.org/10.1289/EHP1788>.

Bibliografía

- Halden, R.U., Paull, D.H., 2005. Co-Occurrence of Triclocarban and Triclosan in U.S. Water Resources. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1420–1426. <https://doi.org/10.1021/es049071e>.
- Hale, R.C., Smith, C.L., de Fur, P.O., Harvey, E., Bush, E.O., La Guardia, M.J., Vadas, G.G., 2000. Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 946–952. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190423>.
- Haman, C., Dauchy, X., Rosin, C., Munoz, J.-F., 2015. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. *Water Res.* 68, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.030>.
- Hamid, H., Eskicioglu, C., 2012. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Res.* 46, 5813–5833. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.002>.
- Hanselman, T.A., Graetz, D.A., Wilkie, A.C., 2003. Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5471–5478. <https://doi.org/10.1021/es034410+>.
- Hao, C., Helm, P.A., Morse, D., Reiner, E.J., 2018. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry direct injection analysis of organophosphorus flame retardants in Ontario surface water and wastewater effluent. *Chemosphere* 191, 288–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.060>.
- Hart, D.S., Davis, L.C., Erickson, L.E., Callender, T.M., 2004. Sorption and partitioning parameters of benzotriazole compounds. *Microchem. J.* 77, 9–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2003.08.005>.
- Hawthorne, S.B., Grabanski, C.B., Martin, E., Miller, D.J., 2000. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *J. Chromatogr. A* 892, 421–433. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00091-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00091-1).
- Heemken, O.P., Reincke, H., Stachel, B., Theobald, N., 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* 45, 245–259. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00570-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00570-1).
- Heidler, J., Halden, R.U., 2007. Mass balance assessment of triclosan removal during conventional sewage treatment. *Chemosphere* 66, 362–369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.066>.
- Heidler, J., Sapkota, A., Halden, R.U., 2006. Partitioning, Persistence, and Accumulation in Digested Sludge of the Topical Antiseptic Triclocarban during Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3634–3639. <https://doi.org/10.1021/es052245n>.
- Herbst, A.L., Ulfelder, H., Poskanzer, D.C., 1971. Adenocarcinoma of the Vagina. *N. Engl. J. Med.* 284, 878–881. <https://doi.org/10.1056/NEJM197104222841604>.
- Hernandez-Raquet, G., Soef, A., Delgenès, N., Balaguer, P., 2007. Removal of the endocrine disrupter nonylphenol and its estrogenic activity in sludge treatment processes. *Water Res.* 41, 2643–2651. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.039>.
- Hernández Leal, L., Vieno, N., Temmink, H., Zeeman, G., Buisman, C.J.N., 2010. Occurrence of Xenobiotics in Gray Water and Removal in Three Biological Treatment Systems. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6835–6842. <https://doi.org/10.1021/es101509e>.
- Herrero, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2014a. An overview of analytical methods and

- occurrence of benzotriazoles, benzothiazoles and benzenesulfonamides in the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* 62, 46–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.017>.
- Herrero, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2014b. A quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method followed by liquid chromatography-(Orbitrap) high resolution mass spectrometry to determine benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide derivatives in sewage sludge. *J. Chromatogr. A* 1339, 34–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.081>.
- Herzog, B., Lemmer, H., Helmreich, B., Horn, H., Müller, E., 2013. Monitoring benzotriazoles: a 1 year study on concentrations and removal efficiencies in three different wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 69, 710–717. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.766>.
- Higgins, C.P., Paesani, Z.J., Chalew, T.E.A., Halden, R.U., 2009. Bioaccumulation of triclocarban in *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2580–2586. <https://doi.org/10.1897/09-013.1>.
- Hoekstra, E.J., Simoneau, C., 2013. Release of Bisphenol A from Polycarbonate—A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 386–402. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.536919>.
- Hoga, C.A., Almeida, F.L., Reyes, F.G.R., 2018. A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues. *CyTA - J. Food* 16, 679–691. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1475423>.
- Hollingsworth, J., Sierra-Alvarez, R., Zhou, M., Ogden, K.L., Field, J.A., 2005. Anaerobic biodegradability and methanogenic toxicity of key constituents in copper chemical mechanical planarization effluents of the semiconductor industry. *Chemosphere* 59, 1219–1228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.067>.
- Huang, B., Li, Xiaoman, Sun, W., Ren, D., Li, Xiao, Li, Xiaonan, Liu, Y., Li, Q., Pan, X., 2014. Occurrence, removal, and fate of progestogens, androgens, estrogens, and phenols in six sewage treatment plants around Dianchi Lake in China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 12898–12908. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3236-6>.
- Huang, Y.Q., Wong, C.K.C., Zheng, J.S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L., Wong, M.H., 2012. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ. Int.* 42, 91–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.04.010>.
- Hurley, M.A., Matthiessen, P., Pickering, A.D., 2004. A model for environmental sex reversal in fish. *J. Theor. Biol.* 227, 159–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2003.10.010>.
- IAATO, 2015. IAATO (International Association of Antarctica Tour Operators), 2015. Overview of Antarctic Tourism: 2013–14, 2014–15 Season and Preliminary Estimates for 2015–16 Season, 2015.
- Im, J., Löffler, F.E., 2016. Fate of Bisphenol A in Terrestrial and Aquatic Environments. *Environ. Sci. Technol.* 50, 8403–8416. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00877>.
- INE, 2016. Encuesta sobre el Suministro y Saneamiento del Agua. Año 2014. Instituto Nacional de Estadística (2016). Available: <http://www.ine.es/prensa/np992.pdf>.
- Iqbal, M., Syed, J.H., Katsoyiannis, A., Malik, R.N., Farooqi, A., Butt, A., Li, J., Zhang, G., Cincinelli, A., Jones, K.C., 2017. Legacy and emerging flame retardants (FRs) in the freshwater ecosystem: A review. *Environ. Res.* 152, 26–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.024>.
- J. van Donk, S., Biswas, S., L. Kranz, W., D. Snow, D., L. Bartelt-Hunt, S., L. Mader, T., A. Shapiro, C.,

- P. Shelton, D., D. Tarkalson, D., C. Zhang, T., Ensley, S., 2013. Transport of Steroid Hormones in the Vadose Zone after Land Application of Beef Cattle Manure. *Trans. ASABE* 56, 1327–1338. <https://doi.org/https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13031/trans.56.9822>.
- Jakimska, A., Huerta, B., Bargańska, Ż., Kot-Wasik, A., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *J. Chromatogr. A* 1306, 44–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.050>.
- Janna, H., Scrimshaw, M.D., Williams, R.J., Churchley, J., Sumpter, J.P., 2011. From Dishwasher to Tap? Xenobiotic Substances Benzotriazole and Tolytriazole in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3858–3864. <https://doi.org/10.1021/es103267g>.
- Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2001. Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4697–4703. <https://doi.org/10.1021/es010171j>.
- Johnson, A.C., Williams, R.J., Matthiessen, P., 2006. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Sci. Total Environ.* 362, 166–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.014>.
- Jonkers, N., Kohler, H.-P.E., Dammshäuser, A., Giger, W., 2009. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. *Environ. Pollut.* 157, 714–723. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.029>.
- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C.M., Kohler, H.-P.E., Giger, W., 2010. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 834–843. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0275-5>.
- Jover, E., Matamoros, V., Bayona, J.M., 2009. Characterization of benzothiazoles, benzotriazoles and benzosulfonamides in aqueous matrixes by solid-phase extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 4013–4019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.052>.
- Juliano, C., Magrini, A.G., 2017. Cosmetic Ingredients as Emerging Pollutants of Environmental and Health Concern. A Mini-Review. *Cosmet.* <https://doi.org/10.3390/cosmetics4020011>.
- Jürgens, M.D., Holthaus, K.I.E., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Hetheridge, M., Williams, R.J., 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 480–488. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210302>.
- Kang, J.-H., Aasi, D., Katayama, Y., 2007. Bisphenol A in the Aquatic Environment and Its Endocrine-Disruptive Effects on Aquatic Organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 607–625. <https://doi.org/10.1080/10408440701493103>.
- Karthikraj, R., Kannan, K., 2017. Mass loading and removal of benzotriazoles, benzothiazoles, benzophenones, and bisphenols in Indian sewage treatment plants. *Chemosphere* 181, 216–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.075>.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2008. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1293–1308. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1854-x>.
- Kawaguchi, M., Ishii, Y., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Inoue, K., Saito, K., Nakazawa, H., 2004. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–

- mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples. *J. Chromatogr. A* 1049, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.013>.
- Kawaguchi, M., Ito, R., Endo, N., Okanouchi, N., Sakui, N., Saito, K., Nakazawa, H., 2006. Liquid phase microextraction with in situ derivatization for measurement of bisphenol A in river water sample by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1110, 1–5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.061>.
- Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71, 95–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.02.003>
- Khanal, S.K., Xie, B., Thompson, M.L., Sung, S., Ong, S.-K., van Leeuwen, J. (Hans), 2006. Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6537–6546. <https://doi.org/10.1021/es0607739>.
- Kinney, C.A., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Burkhardt, M.R., Zaugg, S.D., Werner, S.L., Bossio, J.P., Benotti, M.J., 2008. Bioaccumulation of Pharmaceuticals and Other Anthropogenic Waste Indicators in Earthworms from Agricultural Soil Amended With Biosolid or Swine Manure. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1863–1870. <https://doi.org/10.1021/es702304c>.
- Kinney, C.A., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Burkhardt, M.R., Werner, S.L., Cahill, J.D., Jorgensen, G.R., 2006. Survey of Organic Wastewater Contaminants in Biosolids Destined for Land Application. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7207–7215. <https://doi.org/10.1021/es0603406>.
- Kirchhof, M.G., Gannes, G.C. de, 2013. The health controversies of parabens. *Ski. Ther. Lett*, 18 5–7.
- Koh, Y.K.K., Chiu, T.Y., Boobis, A., Cartmell, E., Lester, J.N., Scrimshaw, M.D., 2007. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1173, 81–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.074>.
- Koh, Y.K.K., Chiu, T.Y., Boobis, A.R., Cartmell, E., Pollard, S.J.T., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2008. A sensitive and robust method for the determination of alkylphenol polyethoxylates and their carboxylic acids and their transformation in a trickling filter wastewater treatment plant. *Chemosphere* 73, 551–556. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.016>.
- Kolok, A.S., Ali, J.M., Rogan, E.G., Bartelt-Hunt, S.L., 2018. The Fate of Synthetic and Endogenous Hormones Used in the US Beef and Dairy Industries and the Potential for Human Exposure. *Curr. Environ. Heal. Reports* 5, 225–232. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0197-9>.
- Kovalova, L., Siegrist, H., Singer, H., Wittmer, A., McArdell, C.S., 2012. Hospital Wastewater Treatment by Membrane Bioreactor: Performance and Efficiency for Organic Micropollutant Elimination. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1536–1545. <https://doi.org/10.1021/es203495d>.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279–2286. <https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504731>.
- Kumar, V., Johnson, A.C., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H., 2012. De-conjugation behavior of conjugated estrogens in the raw sewage, activated sludge and river water. *J. Hazard. Mater.* 227–228, 49–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.078>.
- Kumar, V., Nakada, N., Yasojima, M., Yamashita, N., Johnson, A.C., Tanaka, H., 2009. Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 77, 1440–1446.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.052>.
- Kunz, P.Y., Simon, E., Creusot, N., Jayasinghe, B.S., Kienle, C., Maletz, S., Schifferli, A., Schönlau, C., Aït-Aïssa, S., Denslow, N.D., Hollert, H., Werner, I., Vermeirssen, E.L.M., 2017. Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five in vitro bioassays. *Water Res.* 110, 378–388. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.062>.
- Kuster, M., Azevedo, D.A., López de Alda, M.J., Aquino Neto, F.R., Barceló, D., 2009. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environ. Int.* 35, 997–1003. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.04.006>.
- Kuster, M., José López de Alda, M., Barceló, D., 2004. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *TrAC Trends Anal. Chem.* 23, 790–798. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.08.007>.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2005. Estrogens and Progestogens in Wastewater, Sludge, Sediments, and Soil BT - Water Pollution: Emerging Organic Pollution in Waste Waters and Sludge, Vol. 2, in: Barceló, D. (Ed.), . Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–24. <https://doi.org/10.1007/b98605>.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2008. 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.* 358, 112–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.05.030>.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., Mainor, T.M., 2001. Alkylphenol Ethoxylate Degradation Products in Land-Applied Sewage Sludge (Biosolids). *Environ. Sci. Technol.* 35, 4798–4804. <https://doi.org/10.1021/es0109040>.
- Labadie, P., Hill, E.M., 2007. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry: Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1141, 174–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.045>.
- LaFleur, A.D., Schug, K.A., 2011. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Anal. Chim. Acta* 696, 6–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.054>.
- Lai, S., Xie, Z., Song, T., Tang, J., Zhang, Y., Mi, W., Peng, J., Zhao, Y., Zou, S., Ebinghaus, R., 2015. Occurrence and dry deposition of organophosphate esters in atmospheric particles over the northern South China Sea. *Chemosphere* 127, 195–200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.015>.
- Langdon, K.A., Warne, M.S.J., Smernik, R.J., Shareef, A., Kookana, R.S., 2012. Field dissipation of 4-nonylphenol, 4-t-octylphenol, triclosan and bisphenol A following land application of biosolids. *Chemosphere* 86, 1050–1058. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.057>.
- Langford, K.H., Scrimshaw, M.D., Birkett, J.W., Lester, J.N., 2005. Degradation of nonylphenolic surfactants in activated sludge batch tests. *Water Res.* 39, 870–876. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.033>.
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* 163, 287–303.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>
- Lara-Martín, P.A., González-Mazo, E., Brownawell, B.J., 2012. Environmental analysis of alcohol ethoxylates and nonylphenol ethoxylate metabolites by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 2359–2368. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5449-6>
- Lardy-Fontan, S., Le Diouron, V., Fallot, C., Vaslin-Reimann, S., Lalere, B., 2018. Toward the determination of estrogenic compounds in the framework of EU watch list: validation and implementation of a two-step solid phase extraction–liquid phase chromatography coupled to tandem mass spectrometry method. *Accredit. Qual. Assur.* 23, 285–295. <https://doi.org/10.1007/s00769-018-1346-4>
- Latch, D.E., Packer, J.L., Arnold, W.A., McNeill, K., 2003. Photochemical conversion of triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 158, 63–66. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(03\)00103-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1010-6030(03)00103-5)
- Le Corre, K.S., Ort, C., Kateley, D., Allen, B., Escher, B.I., Keller, J., 2012. Consumption-based approach for assessing the contribution of hospitals towards the load of pharmaceutical residues in municipal wastewater. *Environ. Int.* 45, 99–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.03.008>
- Leendert, V., Van Langenhove, H., Demeestere, K., 2015. Trends in liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry for multi-residue analysis of organic micropollutants in aquatic environments. *TrAC Trends Anal. Chem.* 67, 192–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.010>
- Legler, J., Dennekamp, M., Vethaak, A.D., Brouwer, A., Koeman, J.H., van der Burg, B., Murk, A.J., 2002. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *Sci. Total Environ.* 293, 69–83. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01146-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01146-9)
- Leisewitz, A., Schwarz, W., 1997. Stoffströme wichtiger endokrin wirksamer Industriechemikalien (Bisphenol A ; Dibutylphthalat / Benzylbutylphthalat ; Nonylphenol / Alkylphenoethoxylate).
- Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., Cai, Y., 2015. Occurrence, fate and risk assessment of parabens and their chlorinated derivatives in an advanced wastewater treatment plant. *J. Hazard. Mater.* 300, 29–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.060>
- Liagkouridis, I., Cousins, A.P., Cousins, I.T., 2015. Physical–chemical properties and evaluative fate modelling of ‘emerging’ and ‘novel’ brominated and organophosphorus flame retardants in the indoor and outdoor environment. *Sci. Total Environ.* 524–525, 416–426. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.106>
- Liang, K., Liu, J., 2016. Understanding the distribution, degradation and fate of organophosphate esters in an advanced municipal sewage treatment plant based on mass flow and mass balance analysis. *Sci. Total Environ.* 544, 262–270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.112>
- Liang, X., Wang, M., Chen, X., Zha, J., Chen, H., Zhu, L., Wang, Z., 2014. Endocrine disrupting effects of benzotriazole in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) in a sex-dependent manner. *Chemosphere* 112, 154–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.106>
- Liao, C., Lee, S., Moon, H.-B., Yamashita, N., Kannan, K., 2013. Parabens in Sediment and Sewage Sludge from the United States, Japan, and Korea: Spatial Distribution and Temporal Trends.

- Environ. Sci. Technol. 47, 10895–10902. <https://doi.org/10.1021/es402574k>.
- Liao, X., Raghavan, G.S. V., Yaylayan, V.A., 2002. A novel way to prepare n-butylparaben under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.* 43, 45–48. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)02065-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)02065-2).
- Lin, A.Y.-C., Lin, C.-A., Tung, H.-H., Chary, N.S., 2010. Potential for biodegradation and sorption of acetaminophen, caffeine, propranolol and acebutolol in lab-scale aqueous environments. *J. Hazard. Mater.* 183, 242–250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.017>.
- Liu, J.-L., Wong, M.-H., 2013. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environ. Int.* 59, 208–224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.012>.
- Liu, S., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L.-J., Lai, H., 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 1367–1378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.014>.
- Liu, X., Ji, K., Choi, K., 2012. Endocrine disruption potentials of organophosphate flame retardants and related mechanisms in H295R and MVLN cell lines and in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 114–115, 173–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.019>.
- Liu, Y.-S., Ying, G.-G., Shareef, A., Kookana, R.S., 2012. Occurrence and removal of benzotriazoles and ultraviolet filters in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Pollut.* 165, 225–232. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.009>.
- Liu, Y.-S., Ying, G.-G., Shareef, A., Kookana, R.S., 2011. Biodegradation of three selected benzotriazoles under aerobic and anaerobic conditions. *Water Res.* 45, 5005–5014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.07.001>.
- Liu, Z., Kanjo, Y., Mizutani, S., 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Sci.Total Environ.* 407, 731–748. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.039>.
- Liu, Z., Lu, G., Yin, H., Dang, Z., Rittmann, B., 2015. Removal of Natural Estrogens and Their Conjugates in Municipal Wastewater Treatment Plants: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5288–5300. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00399>.
- Locatelli, M., Sciascia, F., Cifelli, R., Malatesta, L., Bruni, P., Croce, F., 2016. Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 1434, 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.034>.
- Loi, C.H., Buseti, F., Linge, K.L., Joll, C.A., 2013. Development of a solid-phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for benzotriazoles and benzothiazoles in wastewater and recycled water. *J. Chromatogr. A* 1299, 48–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.073>.
- López-Pacheco, I.Y., Silva-Núñez, A., Salinas-Salazar, C., Arévalo-Gallegos, A., Lizarazo-Holguin, L.A., Barceló, D., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R., 2019. Anthropogenic contaminants of high concern: Existence in water resources and their adverse effects. *Sci. Total Environ.* 690, 1068–1088. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.052>.
- Lorenzo, M., Campo, J., Picó, Y., 2016. Ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass

- spectrometry method for the determination of 9 organophosphate flame retardants in water samples. *MethodsX* 3, 343–349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.04.006>.
- Loyo-Rosales, J.E., Rice, C.P., Torrents, A., 2010. Fate and distribution of the octyl- and nonylphenol ethoxylates and some carboxylated transformation products in the Back River, Maryland. *J. Environ. Monit.* 12, 614–621. <https://doi.org/10.1039/B913229E>.
- Loyo-Rosales, J.E., Rice, C.P., Torrents, A., 2007. Octyl and nonylphenol ethoxylates and carboxylates in wastewater and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 68, 2118–2127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.002>.
- Loyo-Rosales, J.E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C.P., Torrents, A., 2003. Analysis of Octyl- and Nonylphenol and Their Ethoxylates in Water and Sediments by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 4811–4817. <https://doi.org/10.1021/ac0262762>.
- Lozano, N., Rice, C.P., Ramirez, M., Torrents, A., 2013. Fate of Triclocarban, Triclosan and Methyltriclosan during wastewater and biosolids treatment processes. *Water Res.* 47, 4519–4527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.015>.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>.
- Lu, Y.-Z., Yao, L., Wang, L., Liu, W.-R., Zhao, J.-L., He, L.-Y., Ying, G.-G., 2019. Bioaccumulation, metabolism, and risk assessment of phenolic endocrine disrupting chemicals in specific tissues of wild fish. *Chemosphere* 226, 607–615. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.187>
- Macherius, A., Lapen, D.R., Reemtsma, T., Römbke, J., Topp, E., Coors, A., 2014. Triclocarban, triclosan and its transformation product methyl triclosan in native earthworm species four years after a commercial-scale biosolids application. *Sci. Total Environ.* 472, 235–238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.113>
- Mackay, D., Hughes, D.M., Romano, M.L., Bonnell, M., 2014. The role of persistence in chemical evaluations. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10, 588–594. <https://doi.org/10.1002/ieam.1545>.
- Madsen, T., Boyd, H.B., Nylén, D., 2001. Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products.
- Maguire, R.J., 1999. Review of the Persistence of Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Aquatic Environments. *Water Qual. Res. J.* 34, 37–78. <https://doi.org/10.2166/wqrj.1999.003>.
- Mao, Z., Zheng, X.-F., Zhang, Y.-Q., Tao, X.-X., Li, Y., Wang, W., 2012. Occurrence and Biodegradation of Nonylphenol in the Environment. *Int. J. Mol. Sci.* . <https://doi.org/10.3390/ijms13010491>
- Marklund, A., Andersson, B., Haglund, P., 2005. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in air from various indoor environments. *J. Environ. Monit.* 7, 814–819. <https://doi.org/10.1039/B505587C>.
- Marklund, A., Et al., Andersson, B., Haglund, P., 2003. Screening of organophosphorus compounds and their distribution in various indoor environments. *Chemosphere* 53, 1137–1146. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00666-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00666-0).
- Martín-Pozo, L., de Alarcón-Gómez, B., Rodríguez-Gómez, R., García-Córcoles, M.T., Çipa, M., Zafra-Gómez, A., 2019. Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage

- sludgesamples.Areview.Talanta192,508–533.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.056>.
- Martín-Rilo, S., Coimbra, R.N., Escapa, C., Otero, M., 2018. Treatment of dairy wastewater by oxygen injection: Occurrence and removal efficiency of a benzotriazole based anticorrosive. *Water* (Switzerland) 10. <https://doi.org/10.3390/w10020155>.
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2014. Determination of emerging and priority industrial pollutants in surface water and wastewater by liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 3709–3716. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7689-8>.
- Masten, S.A., 2005. Butylparaben review of toxicological literature butylparaben [CAS no. 94-26-8]. *Rev Toxicol Lit* 1–64.
- Matějčíček, D., Houserová, P., Kubáň, V., 2007. Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic–ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. *J. Chromatogr. A* 1171, 80–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.053>.
- Matwiejczuk, N., Galicka, A., Brzóska, M.M., 2020. Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. *J. Appl. Toxicol.* 40, 176–210. <https://doi.org/10.1002/jat.3917>.
- McAvoy, D.C., Schatowitz, B., Jacob, M., Hauk, A., Eckhoff, W.S., 2002. Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1323–1329. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210701>.
- McNeill, K.S., Cancilla, D.A., 2009. Detection of Triazole Deicing Additives in Soil Samples from Airports with Low, Mid, and Large Volume Aircraft Deicing Activities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 265–269. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9626-z>
- Melcer, H., Klečka, G., 2011. Treatment of Wastewaters Containing Bisphenol A: State of the Science Review. *Water Environ. Res.* 83, 650–666. <https://doi.org/doi:10.2175/106143010X12851009156925>
- Metcalf, L., Eddy, H.P., Tchobanoglous, G., 2004. *Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse*.
- Meyer, J., Bester, K., 2004. Organophosphate flame retardants and plasticisers in wastewater treatment plants. *J. Environ. Monit.* 6, 599–605. <https://doi.org/10.1039/B403206C>
- Mezcua, M., Gómez, M.J., Ferrer, I., Aguera, A., Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., 2004. Evidence of 2,7/2,8-dibenzodichloro-p-dioxin as a photodegradation product of triclosan in water and wastewater samples. *Anal. Chim. Acta* 524, 241–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.050>.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Res.* 47, 957–995. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.027>.
- Michałowicz, J., 2014. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 738–758. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>.
- Michel, F.A., Van Everdingen, R.O., 1994. Changes in hydrogeologic regimes in permafrost regions due to climatic change. *Permafr. Periglac. Process.* 5, 191–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ppp.3430050308>.

- Micić, V., Hofmann, T., 2015. Alkylphenolic Compounds in the Danube River BT - The Danube River Basin, in: Liska, I. (Ed.), . Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 197–215. https://doi.org/10.1007/698_2014_308.
- Micić, V., Hofmann, T., 2009. Occurrence and behaviour of selected hydrophobic alkylphenolic compounds in the Danube River. *Environ. Pollut.* 157, 2759–2768. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.028>.
- Miller, T.R., Colquhoun, D.R., Halden, R.U., 2010. Identification of wastewater bacteria involved in the degradation of triclocarban and its non-chlorinated congener. *J. Hazard. Mater.* 183, 766–772. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.092>.
- Miller, T.R., Heidler, J., Chillrud, S.N., DeLaquil, A., Ritchie, J.C., Mihalic, J.N., Bopp, R., Halden, R.U., 2008. Fate of Triclosan and Evidence for Reductive Dechlorination of Triclocarban in Estuarine Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4570–4576. <https://doi.org/10.1021/es702882g>.
- Minamiyama, M., Ochi, S., Suzuki, Y., 2006. Fate of nonylphenol polyethoxylates and nonylphenoxy acetic acids in an anaerobic digestion process for sewage sludge treatment. *Water Sci. Technol.* 53, 221–226. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.356>.
- Mitani, K., Fujioka, M., Kataoka, H., 2005. Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1081, 218–224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.058>.
- Mohapatra, D.P., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge – Fate of bisphenol A. *Chemosphere* 78, 923–941. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.053>.
- Mohapatra, D.P., Cledón, M., Brar, S.K., Surampalli, R.Y., 2016. Application of Wastewater and Biosolids in Soil: Occurrence and Fate of Emerging Contaminants. *Water, Air, Soil Pollut.* 227, 77. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2768-4>.
- Molins-Delgado, D., Silvia Díaz-Cruz, M., Barceló, D., 2015. Removal of polar UV stabilizers in biological wastewater treatments and ecotoxicological implications. *Chemosphere* 119, S51–S57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.084>.
- Molins-Delgado, D., Távora, J., Silvia Díaz-Cruz, M., Barceló, D., 2017. UV filters and benzotriazoles in urban aquatic ecosystems: The footprint of daily use products. *Sci. Total Environ.* 601–602, 975–986. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.176>.
- Möller, A., Sturm, R., Xie, Z., Cai, M., He, J., Ebinghaus, R., 2012. Organophosphorus Flame Retardants and Plasticizers in Airborne Particles over the Northern Pacific and Indian Ocean toward the Polar Regions: Evidence for Global Occurrence. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3127–3134. <https://doi.org/10.1021/es204272v>.
- Möller, A., Xie, Z., Caba, A., Sturm, R., Ebinghaus, R., 2011. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in the atmosphere of the North Sea. *Environ. Pollut.* 159, 3660–3665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.022>.
- Montes-Grajales, D., Fennix-Agudelo, M., Miranda-Castro, W., 2017. Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Sci. Total Environ.* 595, 601–614. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.286>.
- Montgomery-Brown, J., Reinhard, M., 2003. Occurrence and Behavior of Alkylphenol Polyethoxylates

Bibliografía

- in the Environment. *Environ. Eng. Sci.* 20, 471–486. <https://doi.org/10.1089/109287503768335940>.
- Moreno, L., Silva-Busso, A., López-Martínez, J., Durán-Valsero, J.J., Martínez-Navarrete, C., Cuchí, J.A., Ermolin, E., 2012. Hydrogeochemical characteristics at Cape Lamb, Vega Island, Antarctic Peninsula. *Antarct. Sci.* 24, 591–607. <https://doi.org/10.1017/S0954102012000478>.
- Morohoshi, K., Yamamoto, H., Kamata, R., Shiraiishi, F., Koda, T., Morita, M., 2005. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicol. Vitr.* 19, 457–469. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.01.004>.
- Mountfort, K.A., Kelly, J., Jickells, S.M., Castle, L., 1997. Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of bisphenol A. *Food Addit. Contam.* 14, 737–740. <https://doi.org/10.1080/02652039709374584>.
- Muller, M., Combalbert, S., Delgenès, N., Bergheaud, V., Rocher, V., Benoît, P., Delgenès, J.-P., Patureau, D., Hernandez-Raquet, G., 2010. Occurrence of estrogens in sewage sludge and their fate during plant-scale anaerobic digestion. *Chemosphere* 81, 65–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.062>.
- Naldi, A.C., Fayad, P.B., Prévost, M., Sauvé, S., 2016. Analysis of steroid hormones and their conjugated forms in water and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chem. Cent. J.* 10, 30. <https://doi.org/10.1186/s13065-016-0174-z>.
- Nelson, A.M., Long, T.E., 2012. A perspective on emerging polymer technologies for bisphenol-A replacement. *Polym. Int.* 61, 1485–1491. <https://doi.org/10.1002/pi.4323>.
- Nie, Y., Qiang, Z., Zhang, H., Adams, C., 2009. Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 7071–7080. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.064>.
- Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2008. Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1213, 224–230. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.043>.
- Notification No.331 of 2000, 2000. Standards for Cosmetics. Available: <https://www.mhlw.go.jp/english/dl/cosmetics.pdf>, in: Ministry of Health and Welfare.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsh, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2047–2062. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0242>
- Office of Pesticide Programs. Triclosan. Available: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/triclosan_fs.htm, in: EPA.
- Omar, T.F.T., Ahmad, A., Aris, A.Z., Yusoff, F.M., 2016. Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 85, 241–259. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.08.004>.
- Omar, T.F.T., Aris, A.Z., Yusoff, F.M., Mustafa, S., 2017. An improved SPE-LC-MS/MS method for multiclass endocrine disrupting compound determination in tropical estuarine sediments. *Talanta*

- 173, 51–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.064>.
- Ort, C., Lawrence, M.G., Rieckermann, J., Joss, A., 2010. Sampling for Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) and Illicit Drugs in Wastewater Systems: Are Your Conclusions Valid? A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6024–6035. <https://doi.org/10.1021/es100779n>.
- Ort, C., Schaffner, C., Giger, W., Gujer, W., 2005. Modelling stochastic load variations in sewer systems. *Water Sci. Technol.* 52, 113–122. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0122>.
- Pacáková, V., Loukotková, L., Bosáková, Z., Štulík, K., 2009. Analysis for estrogens as environmental pollutants – A review. *J. Sep. Sci.* 32, 867–882. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800673>.
- Padrón, E.M., Afonso-Olivares, C., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2014. Microextraction Techniques Coupled to Liquid Chromatography with Mass Spectrometry for the Determination of Organic Micropollutants in Environmental Water Samples. *Mol.* . <https://doi.org/10.3390/molecules190710320>.
- Pantelaki, I., Et al., Voutsas, D., 2019. Organophosphate flame retardants (OPFRs): A review on analytical methods and occurrence in wastewater and aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 649, 247–263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.286>.
- Pantelaki, I., Voutsas, D., 2019. Organophosphate flame retardants (OPFRs): A review on analytical methods and occurrence in wastewater and aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 649, 247–263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.286>.
- Pauwels, B., Verstraete, W., 2006. The treatment of hospital wastewater: an appraisal. *J. Water Health* 4, 405–416. <https://doi.org/10.2166/wh.2006.0024>.
- Pedrouzo, M., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2009. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem massspectrometry. *Talanta* 78, 1327–1331. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.02.005>.
- Peeler, K.A., Opsahl, S.P., Chanton, J.P., 2006. Tracking Anthropogenic Inputs Using Caffeine, Indicator Bacteria, and Nutrients in Rural Freshwater and Urban Marine Systems. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7616–7622. <https://doi.org/10.1021/es061213c>.
- Pérez, R.A., Albero, B., Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., 2016. Determination of endocrine-disrupting compounds in water samples by magnetic nanoparticle-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 8013–8023. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9899-8>.
- Petersen, G., Rasmussen, D., Gustavson, K., 2007. Study on enhancing the Endocrine Disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals Study on enhancing the Endocrine. *Revis. Rep.toEur.Comm./DGEnviron.c,252*. https://doi.org/http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final_report_2007.pdf.
- Petrie, B., Youdan, J., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2016. Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1431, 64–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.036>.
- Petrović, M., Barceló, D., 2001. Determination of Phenolic Xenoestrogens in Environmental Samples by Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection. *J. AOAC Int.* 84, 1074–1086. <https://doi.org/10.1093/jaoac/84.4.1074>.

Bibliografía

- Petrovic, M., Ginebreda, A., Acuña, V., Batalla, R.J., Elozegi, A., Guasch, H., de Alda, M.L., Marcé, R., Muñoz, I., Navarro-Ortega, A., Navarro, E., Vericat, D., Sabater, S., Barceló, D., 2011. Combined scenarios of chemical and ecological quality under water scarcity in Mediterranean rivers. *TrAC Trends Anal. Chem.* 30, 1269–1278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.012>.
- Peysson, W., Vulliet, E., 2013. Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography–time-of-flight-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1290, 46–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.057>.
- Pintado-Herrera, M.G., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A., 2014. Atmospheric pressure gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry (APGC-ToF-MS) for the determination of regulated and emerging contaminants in aqueous samples after stir bar sorptive extraction (SBSE). *Anal. Chim. Acta* 851, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.030>.
- Pivnenko, K., Laner, D., Astrup, T.F., 2018. Dynamics of bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) in the European paper cycle: Need for concern? *Resour. Conserv. Recycl.* 133, 278–287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.01.02>.
- Priac, A., Morin-Crini, N., Druart, C., Gavaille, S., Bradu, C., Lagarrigue, C., Torri, G., Winterton, P., Crini, G., 2017. Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination. *Arab. J. Chem.* 10, S3749–S3773. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.011>.
- Quednow, K., Püttmann, W., 2009. Temporal concentration changes of DEET, TCEP, terbutryn, and nonylphenols in freshwater streams of Hesse, Germany: possible influence of mandatory regulations and voluntary environmental agreements. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 630–640. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0169-6>.
- Quintana, J.B., Rodil, R., Reemtsma, T., García-López, M., Rodríguez, I., 2008. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in water and air II. Analytical methodology. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 904–915. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.08.004>.
- Racz, L., Goel, R.K., 2010. Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. *J. Environ. Monit.* 12, 58–70. <https://doi.org/10.1039/B917298J>
- Rastogi, S.C., Schouten, A., de Kruijf, N., Weijland, J.W., 1995. Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis* 32, 28–30. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00836.x>.
- Ray, P., Zhao, Z., Knowlton, K., 2013. 17 emerging contaminants in livestock manure: hormones, antibiotics and antibiotic resistance genes. E. Kebreab (Ed.), *Sustain. Anim. Agric.* Cabi Internaional, Bost. MA, U.S.A. 268–283.
- Reddy, S., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2005. Analysis of Steroid Conjugates in Sewage Influent and Effluent by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 7032–7038. <https://doi.org/10.1021/ac050699x>.
- Reemtsma, Et al., García-López, M., Rodríguez, I., Et al., Quintana, J.B., Rodil, R., 2008. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in water and air I. Occurrence and fate. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27, 727–737. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.07.002>.
- Reemtsma, T., Miehe, U., Duennbier, U., Jekel, M., 2010. Polar pollutants in municipal wastewater and the water cycle: Occurrence and removal of benzotriazoles. *Water Res.* 44, 596–604.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.016>.
- Reemtsma, T., Quintana, J.B., Rodil, R., Garcí'a-López, M., Rodríguez, I., 2008. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in water and air I. Occurrence and fate. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 727–737. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.07.002>.
- Reglamento (CE) no1223/2009.Reglamento (CE) no1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos (Texto pertinente a efectos del EEE).
- Reglamento (CE) no 1333/2008.Reglamento (CE) no1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 , sobre aditivos alimentarios (Texto pertinente a efectos del EEE).
- Reglamento (CE) no 1907/2006. Reglamento (CE) no 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de S.
- Regnery, J., Püttmann, W., 2010. Occurrence and fate of organophosphorus flame retardants and plasticizers in urban and remote surface waters in Germany. *Water Res.* 44, 4097–4104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.024>.
- Regnery, J., Püttmann, W., Merz, C., Berthold, G., 2011. Occurrence and distribution of organophosphorus flame retardants and plasticizers in anthropogenically affected groundwater. *J. Environ. Monit.* 13, 347–354. <https://doi.org/10.1039/C0EM00419G>.
- Rejczak, T., Tuzimski, T., 2015. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>.
- Ren, X., Lee, Y.J., Han, H.J., Kim, I.S., 2008. Effect of tris-(2-chloroethyl)-phosphate (TCEP) at environmental concentration on the levels of cell cycle regulatory protein expression in primary cultured rabbit renal proximal tubule cells. *Chemosphere* 74, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.022>.
- Renner, R., 1997. European Bans on Surfactant Trigger Transatlantic Debate. *Environ. Sci. Technol.* 31, 316A-320A. <https://doi.org/10.1021/es972366q>.
- Reyes-Contreras, C., Domínguez, C., Bayona, J.M., 2012. Determination of nitrosamines and caffeine metabolites in wastewaters using gas chromatography mass spectrometry and ionic liquid stationary phases. *J.Chromatogr.A*1261,164–170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.082>.
- Ribeiro, C., Ribeiro, A.R., Maia, A.S., Gonçalves, V.M.F., Tiritan, M.E., 2014. New Trends in Sample Preparation Techniques for Environmental Analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 44, 142–185. <https://doi.org/10.1080/10408347.2013.833850>.
- Rice, S.L., Hale, R.C., 2009. Parameters for Ultra-Performance Liquid Chromatographic/Tandem Mass Spectrometric Analysis of Selected Androgens versus Estrogens in Aqueous Matrices. *Anal. Chem.* 81, 6716–6724. <https://doi.org/10.1021/ac900134m>.
- Richardson, S.D., 2008. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 80, 4373–4402. <https://doi.org/10.1021/ac800660d>.
- Rigol, A., Latorre, A., Lacorte, S., Barceló, D., 2002. Determination of toxic compounds in paper-recycling process waters by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 963, 265–275. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00232-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00232-7).
- Risticvic, S., Niri, V.H., Vuckovic, D., Pawliszyn, J., 2009. Recent developments in solid-phase

Bibliografía

- microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 781–795. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2375-3>.
- Roberts, S., Higgins, C., McCray, J., 2014. Sorption of emerging organic wastewater contaminants to four soils. *Water (Switzerland)* 6, 1028–1042. <https://doi.org/10.3390/w6041028>.
- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., Barceló, D., 2004. Picogram per Liter Level Determination of Estrogens in Natural Waters and Waterworks by a Fully Automated On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Method. *Anal. Chem.* 76, 6998–7006. <https://doi.org/10.1021/ac049051v>.
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 12–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/taap.1998.8544>.
- Rubin, B.S., 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 27–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.002>.
- Rule, K.L., Ebbett, V.R., Vikesland, P.J., 2005. Formation of Chloroform and Chlorinated Organics by Free-Chlorine-Mediated Oxidation of Triclosan. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3176–3185. <https://doi.org/10.1021/es048943+>.
- Rumsey, T.S., Tyrrell, H.F., Dinius, D.A., Moe, P.W., Cross, H.R., 1981. Effect of Diethylbestrol on Tissue Gain and Carcass Merit of Feedlot Beef Steers. *J. Anim. Sci.* 53, 589–600. <https://doi.org/10.2527/jas1981.533589x>.
- Rutishauser, B. V., Pesonen, M., Escher, B.I., Ackermann, G.E., Aerni, H.-R., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 857–864. <https://doi.org/10.1897/03-286>.
- Sabaliunas, D., Webb, S.F., Hauk, A., Jacob, M., Eckhoff, W.S., 2003. Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. *Water Res.* 37, 3145–3154. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00164-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00164-7).
- Salgueiro-González, N., Castiglioni, S., Zuccato, E., Turnes-Carou, I., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., 2018. Recent advances in analytical methods for the determination of 4-alkylphenols and bisphenol A in solid environmental matrices: A critical review. *Anal. Chim. Acta* 1024, 39–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.081>
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2015. Pressurized hot water extraction followed by miniaturized membrane assisted solvent extraction for the green analysis of alkylphenols in sediments. *J. Chromatogr. A* 1383, 8–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.022>.
- Samaras, V.G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D., 2011. An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2549–2561. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4607-6>.
- Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A., 2010. Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* 29, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003>.
- SCCP/1251/09, 2010. Opinion on triclosan - Antimicrobial resistance. Available: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_023.pdf, in: SCCS. <https://doi.org/10.2772/11162>.

- SCCS/1514/13, 2013. Opinion on Parabens. Available:
https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_132.pdf, in: SCCS.
- Schebb, N.H., Flores, I., Kurobe, T., Franze, B., Ranganathan, A., Hammock, B.D., Teh, S.J., 2011. Bioconcentration, metabolism and excretion of triclocarban in larval Qurt medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 105, 448–454. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.020>.
- Schlüsener, M.P., Bester, K., 2008. Behavior of Steroid Hormones and Conjugates During Wastewater Treatment – A Comparison of Three Sewage Treatment Plants. *CLEAN – Soil, Air, Water* 36, 25–33. <https://doi.org/10.1002/clen.200700096>.
- Seeland, A., Oetken, M., Kiss, A., Fries, E., Oehlmann, J., 2012. Acute and chronic toxicity of benzotriazoles to aquatic organisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1781–1790. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0705-z>.
- Servos, M.R., 1999. Review of the Aquatic Toxicity, Estrogenic Responses and Bioaccumulation of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates. *Water Qual. Res. J.* 34, 123–178. <https://doi.org/10.2166/wqrj.1999.005>.
- Sewage Sludge, n.d. Sewage Sludge. Urban Waste Water Treatment. Available:<https://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/>, in: EC.
- Shareef, A., Angove, M.J., Wells, J.D., Johnson, B.B., 2006a. Aqueous Solubilities of Estrone, 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol, and Bisphenol A. *J. Chem. Eng. Data* 51, 879–881. <https://doi.org/10.1021/je050318c>.
- Shareef, A., Angove, M.J., Wells, J.D., Johnson, B.B., 2006b. Sorption of bisphenol A, 17 α -ethinylestradiol and estrone to mineral surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 297, 62–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.10.039>.
- Sheahan, D.A., Brighty, G.C., Daniel, M., Jobling, S., Harries, J.E., Hurst, M.R., Kennedy, J., Kirby, S.J., Morris, S., Routledge, E.J., Sumpter, J.P., Waldock, M.J., 2002. Reduction in the estrogenic activity of a treated sewage effluent discharge to an english river as a result of a decrease in the concentration of industrially derived surfactants. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 515–519. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210307>.
- Shi, Z.-Q., Liu, Y.-S., Xiong, Q., Cai, W.-W., Ying, G.-G., 2019. Occurrence, toxicity and transformation of six typical benzotriazoles in the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 661, 407–421. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.138>.
- Shi, Z.Q., Liu, Y.S., Xiong, Q., Cai, W.W., Ying, G.G., 2019. Occurrence, toxicity and transformation of six typical benzotriazoles in the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 661, 407–421. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.138>.
- Shore, L., Shemesh, M., 2003. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure Appl. Chem.* <https://doi.org/10.1351/pac200375111859>.
- Shore, L.S., Shemesh, M., 2016. Estrogen as an Environmental Pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 447–448. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1873-9>.
- Shrestha, S.L., Casey, F.X.M., Hakk, H., Smith, D.J., Padmanabhan, G., 2012. Fate and Transformation of an Estrogen Conjugate and Its Metabolites in Agricultural Soils. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11047–11053. <https://doi.org/10.1021/es3021765>.
- Silva, C.P., Otero, M., Esteves, V., 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones

- from water: A review. *Environ. Pollut.* 165, 38–58.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.002>.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., Pillonel, L., 2002. Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4998–5004.
<https://doi.org/10.1021/es025750i>.
- Sladen, W.J.L., Menzie, C.M., Reichel, W.L., 1966. DDT residues in Adelie penguins and a crabeater seal from Antarctica. *Nature* 210, 670–673. <https://doi.org/10.1038/210670a0>
- Snow, D.D., Damon-Powell, T., Onanong, S., Cassada, D.A., 2013. Sensitive and simplified analysis of natural and synthetic steroids in water and solids using on-line solid-phase extraction and microwave-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry atmospheric pressure photoioni. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 1759–1771.
<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6572-8>.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* 34, 1033–1049. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.01.004>.
- Sonavane, M., Gassman, N.R., 2019. Bisphenol A co-exposure effects: a key factor in understanding BPA's complex mechanism and health outcomes. *Crit. Rev. Toxicol.* 49, 371–386.
<https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1621263>.
- Song, M., Xu, Y., Jiang, Q., Lam, P.K.S., O'Toole, D.K., Giesy, J.P., Jiang, G., 2006. Measurement of estrogenic activity in sediments from Haihe and Dagu River, China. *Environ. Int.* 32, 676–681.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.03.002>.
- Soni et al., 2005. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* 43, 985–1015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.020>.
- Sosa-Ferrera, Z., Mahugo-Santana, C., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. Analytical Methodologies for the Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Biological and Environmental Samples. *Biomed Res. Int.* 2013, 674838. <https://doi.org/10.1155/2013/674838>.
- Sosa-Ferrera, Z., Mahugo-Santana, C., Santana-Rodríguez, J.J., 2012. New Developments in Liquid Chromatography Mass Spectrometry for the Determination of Micropollutants. *Chromatogr. Res. Int.* 2012, 748989. <https://doi.org/10.1155/2012/748989>.
- Staniszewska, M., Graca, B., Sokółowski, A., Nehring, I., Wasik, A., Jendzul, A., 2017. Factors determining accumulation of bisphenol A and alkylphenols at a low trophic level as exemplified by mussels *Mytilus trossulus*. *Environ. Pollut.* 220, 1147–1159.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.020>
- Staples, C.A., Dome, P.B., Klecka, G.M., Oblock, S.T., Harris, L.R., 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36, 2149–2173.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)10133-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)10133-3).
- Stasinakis, A.S., 2012. Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 121, 432–440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.074>.
- Stasinakis, A.S., Gatidou, G., Mamais, D., Thomaidis, N.S., Lekkas, T.D., 2008. Occurrence and fate of endocrine disrupters in Greek sewage treatment plants. *Water Res.* 42, 1796–1804.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.003>.

- Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., Arvaniti, O.S., Asimakopoulos, A.G., Samaras, V.G., Ajibola, A., Mamais, D., Lekkas, T.D., 2013. Contribution of primary and secondary treatment on the removal of benzothiazoles, benzotriazoles, endocrine disruptors, pharmaceuticals and perfluorinated compounds in a sewage treatment plant. *Sci. Total Environ.* 463–464, 1067–1075. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.087>.
- Stockholm Convention website, n.d. Protecting human health and environment from persistent pollutants. Website:
<http://chm.pops.int/TheConvention/POPsReviewCommittee/Recommendations/tabid/243/Default.aspx>.
- Stüber, M., Reemtsma, T., 2004. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 910–916. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2442-8>.
- Sudhakaran, S., Maeng, S.K., Amy, G., 2013. Hybridization of natural systems with advanced treatment processes for organic micropollutant removals: New concepts in multi-barrier treatment. *Chemosphere* 92, 731–737. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.021>.
- Terasaki, M., Kamata, R., Shiraishi, F., Makino, M., 2009. Evaluation of estrogenic activity of parabens and their chlorinated derivatives by using the yeast two-hybrid assay and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 204–208. <https://doi.org/10.1897/08-225.1>.
- Terasaki, M., Takemura, Y., Makino, M., 2012. Paraben-chlorinated derivatives in river waters. *Environ. Chem. Lett.* 10, 401–406. <https://doi.org/10.1007/s10311-012-0367-1>.
- Thiele, B., Günther, K., Schwuger, M.J., 1997. Alkylphenol Ethoxylates: Trace Analysis and Environmental Behavior. *Chem. Rev.* 97, 3247–3272. <https://doi.org/10.1021/cr970323m>.
- Tijani, J.O., Fatoba, O.O., Babajide, O.O., Petrik, L.F., 2016. Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 14, 27–49. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0537-z>.
- Tijani, J.O., Fatoba, O.O., Petrik, L.F., 2013. A Review of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Compounds: Sources, Effects, Removal, and Detections. *Water, Air, Soil Pollut.* 224, 1770. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1770-3>.
- Ting, Y.F., Praveena, S.M., 2017. Sources, mechanisms, and fate of steroid estrogens in wastewater treatment plants: a mini review. *Environ. Monit. Assess.* 189, 178. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5890-x>.
- Tran, N.H., Chen, H., Reinhard, M., Mao, F., Gin, K.Y.-H., 2016. Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes. *Water Res.* 104, 461–472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.040>.
- Tran, N.H., Reinhard, M., Gin, K.Y.-H., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions—a review. *Water Res.* 133, 182–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>.
- Triclosan Federal Register. 5 Things to Know About Triclosan. Available:
<https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/5-things-know-about-triclosan>.
<https://www.federalregister.gov/documents/2016/09/06/2016-21337/safety-and-effectiveness-of-consumer-antiseptics-topical-antimicrobi>, in: FDA.
- Truong, J.W., Diamond, M.L., Helm, P.A., Jantunen, L.M., 2017. Isomers of tris(chloropropyl) phosphate

Bibliografía

- (TCPP) in technical mixtures and environmental samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 6989–6997. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0572-7>.
- Tsai, W.-T., 2006. Human Health Risk on Environmental Exposure to Bisphenol-A: A Review. *J. Environ. Sci. Heal. Part C* 24, 225–255. <https://doi.org/10.1080/10590500600936482>.
- Turner, J., Colwell, S.R., Marshall, G.J., Lachlan-Cope, T.A., Carleton, A.M., Jones, P.D., Lagun, V., Reid, P.A., Iagovkina, S., 2005. Antarctic climate change during the last 50 years. *Int. J. Climatol.* 25, 279–294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/joc.1130>.
- UNEP, 2002. UNEP (United Nations Environment Programme), 2002. Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances – Antarctica Regional Report. In UNEP Chem.
- Valkova, N., Lépine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Bisailon, J.-G., Beaudet, R., Shareck, F., Villemur, R., 2001. Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant &Enterobacter cloacae& Strain EM. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2404 LP – 2409. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2404-2409.2001>.
- Valsecchi, S., Polesello, S., Mazzoni, M., Rusconi, M., Petrovic, M., 2015. On-line sample extraction and purification for the LC–MS determination of emerging contaminants in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 8, 27–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.teac.2015.08.001>
- Van den Belt, K., Berckmans, P., Vangenechten, C., Verheyen, R., Witters, H., 2004. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* 66, 183–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.004>.
- Van der veen, I., Boer, J., 2012. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere* 88, 1119–1153. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.067>.
- van Leerdam, J.A., Hogenboom, A.C., van der Kooi, M.M.E., de Voogt, P., 2009. Determination of polar 1H-benzotriazoles and benzothiazoles in water by solid-phase extraction and liquid chromatography LTQ FT Orbitrap mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 282, 99–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijms.2009.02.018>.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W. V., 2007. Human exposure to bisphenolA(BPA). *Reprod. Toxicol.* 24, 139–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>.
- Vanderford, B.J., Mawhinney, D.B., Trenholm, R.A., Zeigler-Holady, J.C., Snyder, S.A., 2011. Assessment of sample preservation techniques for pharmaceuticals, personal care products, and steroids in surface and drinking water. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2227–2234. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4608-5>.
- Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. The Use of Microwave Assisted Extraction and On-line Chromatography-Mass Spectrometry for Determining Endocrine-Disrupting Compounds in Sewage Sludges. *Water, Air, Soil Pollut.* 224, 1486. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1486-4>.
- Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2012. Development and optimisation of an on-line solid phase extraction coupled to ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry methodology for the simultaneous determination of endocrine disrupting compounds in wastewater samples. *J. Chromatogr. A* 1230, 66–76.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.077>.
- Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2011. Determination of various estradiol mimicking-compounds in sewage sludge by the combination of microwave-assisted extraction and LC–MS/MS. *Talanta* 85, 1825–1834. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.051>
- Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2010. Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. *J. Hazard. Mater.* 183, 701–711. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.083>.
- Verheyen, V., Cruickshank, A., Wild, K., Heaven, M.W., McGee, R., Watkins, M., Nash, D., 2009. Soluble, semivolatile phenol and nitrogen compounds in milk-processing wastewaters. *J. Dairy Sci.* 92, 3484–3493. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2009-2217>.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci. Total Environ.* 429, 123–155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>
- Verlicchi, P., Zambello, E., 2015. Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil — A critical review. *Sci. Total Environ.* 538, 750–767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.108>.
- Vetter, W., Lorenz, J., 2013. Determination of benzotriazoles in dishwasher tabs from Germany and estimation of the discharge into German waters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 4435–4440. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1386-y>.
- Viglino, L., Aboufadi, K., Prévost, M., Sauvé, S., 2008. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta* 76, 1088–1096. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.008>.
- Vogel, S.A., 2009. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a “safety.” *Am. J. Public Health* 99 Suppl 3, S559–S566. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2008.159228>.
- Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., Davies, P.M., 2010. Erratum: Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 468, 334. <https://doi.org/10.1038/nature09549>.
- Voutsas, D., Hartmann, P., Schaffner, C., Giger, W., 2006. Benzotriazoles, Alkylphenols and Bisphenol A in Municipal Wastewaters and in the Glatt River, Switzerland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 13, 333–341. <https://doi.org/10.1065/espr2006.01.295>.
- Vymazal, J., Březinová, T., Koželuh, M., 2015. Occurrence and removal of estrogens, progesterone and testosterone in three constructed wetlands treating municipal sewage in the Czech Republic. *Sci. Total Environ.* 536, 625–631. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.077>.
- Wade, N., 1972. DES: A Case Study of Regulatory Abdication. *Science* (80-). 177, 335–337.
- Walter V. Reid and et al., 2005. Millennium Ecosystem Assessment, p. 137.
- Wang, H.-X., Zhou, Y., Jiang, Q.-W., 2012. Simultaneous screening of estrogens, progestogens, and phenols and their metabolites in potable water and river water by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microchem. J.* 100, 83–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.09.010>.
- Watch List Development, 2015. Development of the first Watch List under the Environmental Quality

- Standards Directive water policy, in: EU Technical Report. <https://doi.org/10.2788/101376>.
- Weber, R.W., 1993. Food additives and allergy. *Ann. Allergy* 70, 183–190.
- Wei, G.-L., Li, D.-Q., Zhuo, M.-N., Liao, Y.-S., Xie, Z.-Y., Guo, T.-L., Li, J.-J., Zhang, S.-Y., Liang, Z.-Q., 2015. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: Sources, occurrence, toxicity and human exposure. *Environ. Pollut.* 196, 29–46.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.012>
- Weiss, S., Jakobs, J., Reemtsma, T., 2006. Discharge of Three Benzotriazole Corrosion Inhibitors with Municipal Wastewater and Improvements by Membrane Bioreactor Treatment and Ozonation. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7193–7199. <https://doi.org/10.1021/es061434i>
- Weiss, S., Reemtsma, T., 2005. Determination of Benzotriazole Corrosion Inhibitors from Aqueous Environmental Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 7415–7420. <https://doi.org/10.1021/ac051203e>
- Wenhan, C., M, B.J., Zhouqing, X.I.E., Yi, L.I.U., Ming, L.I., Liguang, S.U.N., 2017. Response of polar regions to emerging organic pollutant organophosphorus esters (OPEs), a review 28, 13–22. <https://doi.org/10.13679/j.advps.2017.1.00013>.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G., 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135, 175–182. <https://doi.org/10.1210/endo.135.1.8013351>.
- WHO/UNEP, 2012. State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals. Available: <https://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.020>
- Wintgens, T., Gallenkemper, M., Melin, T., 2003. Occurrence and removal of endocrine disrupters in landfill leachate treatment plants. *Water Sci. Technol.* 48, 127–134. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0180>.
- Wolschke, H., Xie, Z., Möller, A., Sturm, R., Ebinghaus, R., 2011. Occurrence, distribution and fluxes of benzotriazoles along the German large river basins into the North Sea. *Water Res.* 45, 6259–6266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.028>.
- Woudneh, M.B., Benskin, J.P., Wang, G., Grace, R., Hamilton, M.C., Cosgrove, J.R., 2015. Quantitative determination of 13 organophosphorous flame retardants and plasticizers in a wastewater treatment system by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1400, 149–155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.026>
- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., 2009. Adsorption and Degradation of Triclosan and Triclocarban in Soils and Biosolids-Amended Soils. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4900–4905. <https://doi.org/10.1021/jf900376c>.
- Wu, M., Wang, L., Xu, G., Liu, N., Tang, L., Zheng, J., Bu, T., Lei, B., 2013. Seasonal and spatial distribution of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in the Huangpu River and its tributaries, Shanghai, China. *Environ. Monit. Assess.* 185, 3149–3161. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2779-6>.
- Wu, Q., Lam, J.C.W., Kwok, K.Y., Tsui, M.M.P., Lam, P.K.S., 2017. Occurrence and fate of endogenous steroid hormones, alkylphenol ethoxylates, bisphenol A and phthalates in municipal sewage treatment systems. *J. Environ. Sci.* 61, 49–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.02.021>
- Xuan, R., Blassengale, A.A., Wang, Q., 2008. Degradation of Estrogenic Hormones in a Silt Loam Soil.

- J. Agric. Food Chem. 56, 9152–9158. <https://doi.org/10.1021/jf8016942>.
- Yamamoto, H., Watanabe, M., Hirata, Y., Nakamura, Yuki, Nakamura, Yudai, Kitani, C., Sekizawa, J., Uchida, M., Nakamura, H., Kagami, Y., Koshio, M., Hirai, N., Tatarazako, N., 2007a. Preliminary ecological risk assessment of butylparaben and benzylparaben -1. Removal efficiency in wastewater treatment, acute/chronic toxicity for aquatic organisms, and effects on medaka gene expression. *Environ. Sci.* 14, 73–87.
- Yamamoto, H., Watanabe, M., Katsuki, S., Nakamura, Yuki, Moriguchi, S., Nakamura, Yudai, Sekizawa, J., 2007b. Preliminary Ecological Risk Assessment of Butylparaben and Benzylparaben —2. Fate and Partitioning in Aquatic Environments. *Environ. Sci.* 14, 97–105.
- Yang, S., Hai, F.I., Nghiem, L.D., Nguyen, L.N., Roddick, F., Price, W.E., 2013. Removal of bisphenol A and diclofenac by a novel fungal membrane bioreactor operated under non-sterile conditions. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 85, 483–490.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.012>
- Yang, Y., Ok, Y.S., Kim, K.-H., Kwon, E.E., Tsang, Y.F., 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Sci. Total Environ.* 596–597, 303–320.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>.
- Yao, B., Li, R., Yan, S., Chan, S.-A., Song, W., 2018. Occurrence and estrogenic activity of steroid hormones in Chinese streams: A nationwide study based on a combination of chemical and biological tools. *Environ. Int.* 118, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.026>.
- Ying, G.-G., 2006. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ. Int.* 32, 417–431. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.07.004>
- Ying, G.-G., Kookana, R.S., 2005. Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2640–2645. <https://doi.org/10.1897/05-074R.1>
- Ying, G.-G., Kookana, R.S., Dillon, P., 2003. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Res.* 37, 3785–3791.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00261-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00261-6).
- Ying, G.-G., Kookana, R.S., Ru, Y.-J., 2002a. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28, 545–551. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00075-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00075-2).
- Ying, G.-G., Williams, B., Kookana, R., 2002b. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environ. Int.* 28, 215–226. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00017-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00017-X).
- Yost, E.E., Meyer, M.T., Dietze, J.E., Williams, C.M., Worley-Davis, L., Lee, B., Kullman, S.W., 2014. Transport of Steroid Hormones, Phytoestrogens, and Estrogenic Activity across a Swine Lagoon/Sprayfield System. *Environ. Sci. Technol.* 48, 11600–11609.
<https://doi.org/10.1021/es5025806>.
- Yu, W., Du, B., Yang, L., Zhang, Z., Yang, C., Yuan, S., Zhang, M., 2019a. Occurrence, sorption, and transformation of free and conjugated natural steroid estrogens in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 9443–9468. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04402-z>.
- Yu, W., Du, B., Yang, L., Zhang, Z., Yang, C., Yuan, S., Zhang, M., 2019b. Occurrence, sorption, and transformation of free and conjugated natural steroid estrogens in the environment. *Environ. Sci.*

- Pollut. Res. 26, 9443–9468. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04402-z>.
- Yu, Y., Wu, L., 2012. Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 89, 258–263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.023>.
- Zgoła-Grześkowiak, A., Grześkowiak, T., Szymański, A., 2015. Biodegradation of nonylphenol monoproxyethoxylates. *J. Surfactants Deterg.* 18, 355–364. <https://doi.org/10.1007/s11743-014-1652-8>.
- Zhang, C., n.d. *Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis*. WILEY-INTERSCIENCE.
- Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Niu, L., Cai, W., 2016. Occurrence of endocrine disrupting compounds in aqueous environment and their bacterial degradation: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 46, 1–59. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1061881>.
- Zhang, F., Bartels, M.J., Brodeur, J.C., McClymont, E.L., Woodburn, K.B., 2004. Quantitation of 17 α -ethinylestradiol in aquatic samples using liquid-liquid phase extraction, dansyl derivatization, and liquid chromatography/positive electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2739–2742. <https://doi.org/10.1002/rcm.1690>.
- Zhang, L., Xu, C. (Charles), Champagne, P., Mabee, W., 2014. Overview of current biological and thermo-chemical treatment technologies for sustainable sludge management. *Waste Manag. Res.* 32, 586–600. <https://doi.org/10.1177/0734242X14538303>.
- Zhang, Q., Lu, M., Dong, X., Wang, C., Zhang, C., Liu, W., Zhao, M., 2014. Potential Estrogenic Effects of Phosphorus-Containing Flame Retardants. *Environ. Sci. Technol.* 48, 6995–7001. <https://doi.org/10.1021/es5007862>.
- Zhang, Y., Geißen, S.-U., 2012. Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor. *Bioresour. Technol.* 112, 221–227. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.073>
- Zhang, Z., Ren, N., Li, Y.-F., Kunisue, T., Gao, D., Kannan, K., 2011. Determination of Benzotriazole and Benzophenone UV Filters in Sediment and Sewage Sludge. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3909–3916. <https://doi.org/10.1021/es2004057>.
- Zhao, J.-L., Ying, G.-G., Liu, Y.-S., Chen, F., Yang, J.-F., Wang, L., 2010. Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: From source to the receiving environment. *J. Hazard. Mater.* 179, 215–222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.082>
- Zhao, J., Li, Y., Zhang, C., Zeng, Q., Zhou, Q., 2008. Sorption and degradation of bisphenol A by aerobic activated sludge. *J. Hazard. Mater.* 155, 305–311. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.075>.
- Zhou, J.L., Liu, R., Wilding, A., Hibberd, A., 2007. Sorption of Selected Endocrine Disrupting Chemicals to Different Aquatic Colloids. *Environ. Sci. Technol.* 41, 206–213. <https://doi.org/10.1021/es0619298>.
- Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., Prieto, A., 2012. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Anal. Chim. Acta* 736, 7–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.016>.
- Zuo, Y., Zhang, K., Zhou, S., 2013. Determination of estrogenic steroids and microbial and photochemical degradation of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in lake surface water, a case study.

Environ. Sci. Process. Impacts 15, 1529–1535. <https://doi.org/10.1039/C3EM00239J>

Zwir-Ferenc, A., Biziuk, M., 2006. Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. Polish J. Environ. Stud. 15, 677–690.

Referencias de la publicación científica 1

- [1] Colborn, T., S. vom S.F., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378–384.
- [2] Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104, 715–740.
- [3] Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C.M., Kohler, H.-P.E., Giger, W., 2010. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 834–843.
- [4] Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2008. 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.* 358, 112–123.
- [5] Barceló, D., Petrovic, M., 2007. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 2–11.
- [6] Snyder, S.A., Kelly, K.L., Grange, A.H., Sovocool, G.W., Snyder, E.M., Giesy, J.P., 2001. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Waters of Lake Mead, Nevada, in: *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 116-139 SE–7.
- [7] Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107, 907–938.
- [8] Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E., Förlin, L., 1999. Ethinylloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* 45, 91–97.
- [9] Hansen, P.-D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., Blaise, C., 1998. Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. *TrAC Trends Anal. Chem.* 17, 448–451.
- [10] Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2006. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochem.* 41, 525–539.
- [11] S.A. Snyder, E.M. Snyder, D. Villeneuve, K. Kurunthachalam, A. Villalobos, A. Blankenship, J.I. Giesy, in *American Chemical Society*, Washington, DC, 2000, pp.73–95. *Instrumental and Bioanalytical Measures of Endocrine Disruptors in Water. Analysis of Environmental Endocrine Disruptors.*
- [12] Snyder, S.A., Keith, T.L., Verbrugge, D.A., Snyder, E.M., Gross, T.S., Kannan, K., Giesy, J.P., 1999. Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2814–2820.

Bibliografia

- [13] Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498–2506.
- [14] Matthiessen, P., Allen, Y., Bamber, S., Craft, J., Hurst, M., Hutchinson, T., Feist, S., Katsiadaki, I., Kirby, M., Robinson, C., Scott, S., Thain, J., Thomas, K., 2002. The impact of oestrogenic and androgenic contamination on marine organisms in the United Kingdom—summary of the EDMAR programme. *Mar. Environ. Res.* 54, 645–649.
- [15] Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R. V, Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59, 511–524.
- [16] Reddy, S., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2005. Analysis of Steroid Conjugates in Sewage Influent and Effluent by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 7032–7038.
- [17] Lindberg, R.H., Wennberg, P., Johansson, M.I., Tysklind, M., Andersson, B.A. V, 2005. Screening of Human Antibiotic Substances and Determination of Weekly Mass Flows in Five Sewage Treatment Plants in Sweden. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3421–3429.
- [18] Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., Zuccato, E., 2005. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1092, 206–215.
- [19] Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chem. Ecol.* 8, 275–285.
- [20] S.S. Talmage, *The Soap and Detergent Association*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994.
- [21] Corsi, S.R., Zitomer, D.H., Field, J.A., Cancilla, D.A., 2003. Nonylphenol Ethoxylates and Other Additives in Aircraft Deicers, Antiicers, and Waters Receiving Airport Runoff. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4031–4037.
- [22] Montgomery-Brown, J., Reinhard, M., 2003. Occurrence and Behavior of Alkylphenol Polyethoxylates in the Environment. *Environ. Eng. Sci.* 20, 471–486.
- [23] Bennie, D.T., 1999. Review of the Environmental Occurrence of Alkylphenols and Alkylphenol Ethoxylates. *Water Qual. Res. J.* 34, 79–122.
- [24] 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 U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- [25] Servos, M.R., 1999. Review of the Aquatic Toxicity, Estrogenic Responses and Bioaccumulation of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates. *Water Qual. Res. J.* 34, 123–178.
- [26] Rastogi, S.C., Schouten, A., de Kruijf, N., Weijland, J.W., 1995. Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis* 32, 28–30.
- [27] Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 12–19.
- [28] T. Madsen, H. Buchardt, Boyd, D. Nylén, A. Rathmann Pedersen, S.F. Petersen GI, in Danish Environmental Protection Agency Report No.615, Copenhagen 2001. Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products CETOX Environmental Project No. 615.

- [29] Cancilla, D.A., Baird, J.C., Rosa, R., 2003. Detection of Aircraft Deicing Additives in Groundwater and Soil Samples from Fairchild Air Force Base, a Small to Moderate User of Deicing Fluids. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 868–875.
- [30] D.A. Cancilla, J. Martinez, G.C. van Aggelen, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3834. Cancilla, D. A., Martinez, J., & van Aggelen, G. C. (1998). Detection of Aircraft Deicing/Antiicing Fluid Additives in a Perched Water Monitoring Well at an International Airport. *Environmental Science & Technology*, 32(23), 3834–3835.
- [31] Seeland, A., Oetken, M., Kiss, A., Fries, E., Oehlmann, J., 2012. Acute and chronic toxicity of benzotriazoles to aquatic organisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1781–1790. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0705-z>
- [32] Levy, L.S., Jones, K., Cocker, J., Assem, F.L., Capleton, A.C., 2007. Background levels of key biomarkers of chemical exposure within the UK general population - Pilot study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 387–391.
- [33] Peck, A.M., 2006. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 907–939.
- [34] Giokas, D.L., Salvador, A., Chisvert, A., 2007. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 360–374.
- [35] Rodil, R., Quintana, J.B., Reemtsma, T., 2005. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Determination of Nonionic Organophosphorus Flame Retardants and Plasticizers in Wastewater Samples. *Anal. Chem.* 77, 3083–3089.
- [36] Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678–690.
- [37] Rodil, R., Quintana, J.B., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., 2008. Multiclass Determination of Sunscreen Chemicals in Water Samples by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry.
- [38] Majzik, E.S., Tóth, F., Benke, L., Kiss, Z., 2006. SPE-LC-MS-MS Determination of Phenoxy Acid Herbicides in Surface and Ground Water. *Chromatographia* 63, S105–S109.
- [39] Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., Barceló, D., 2004. Picogram per Liter Level Determination of Estrogens in Natural Waters and Waterworks by a Fully Automated On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Method. *Anal. Chem.* 76, 6998–7006.
- [40] Ternes, T., Bonerz, M., Schmidt, T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 938, 175–185.
- [41] Vanderford, B.J., Pearson, R.A., Rexing, D.J., Snyder, S.A., 2003. Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in Water Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 6265–6274.
- [42] Petrovic, M., Solé, M., López De Alda, M.J., Barceló, D., 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2146–2156.

Bibliografía

- [43] Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000. Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environ. Sci. Technol.* 34, 5059–5066.
- [44] Lindsey, M.E., Meyer, M., Thurman, E.M., 2001. Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 4640–4646.
- [45] Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000. Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environ. Sci. Technol.* 34, 5059–5066.
- [46] Croley, T.R., Hughes, R.J., Koenig, B.G., Metcalfe, C.D., March, R.E., 2000. Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1087–1093.
- [47] Laganà, A., Bacaloni, A., Fago, G., Marino, A., 2000. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 401–407.
- [48] Hirsch, R., Ternes, T.A., Lindart, A., Haberer, K., Wilken, R.-D., 2000. A sensitive method for the determination of iodine containing diagnostic agents in aqueous matrices using LC-electrospray-tandem-MS detection. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 366, 835–841.
- [49] Farré, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., Vilanova, M., Barceló, D., 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr. A* 938, 187–197.
- [50] Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Genin, E., 2000. Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters. *J. Chromatogr. A* 879, 51–71.
- [51] Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J. Chromatogr. A* 938, 199–210.
- [52] Ahrer, W., Scherwenk, E., Buchberger, W., 2001. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 910, 69–78.
- [53] Petrovic, M., Diaz, A., Ventura, F., Barceló, D., 2001. Simultaneous Determination of Halogenated Derivatives of Alkylphenol Ethoxylates and Their Metabolites in Sludges, River Sediments, and Surface, Drinking, and Wastewaters by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 5886–5895.
- [54] Trufelli, H., Palma, P., Famigliani, G., Cappiello, A., 2011. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 30, 491–509.

Referencias de la publicación científica 2

- [1] Colborn, T., S., vom S.F., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378–384.

- [2] Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104, 715–740.
- [3] Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C.M., Kohler, H.-P.E., Giger, W., 2010. Occurrence and sources [21] of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 834–843. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0275-5>
- [4] Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2008. 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.* 358, 112–123.
- [5] Barceló, D., Petrovic, M., 2007. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1141–1142. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1012-2>
- [6] Snyder, S.A., Kelly, K.L., Grange, A.H., Sovocool, G.W., Snyder, E.M., Giesy, J.P., 2001. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Waters of Lake Mead, Nevada, in: *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 116-139 SE–7.
- [7] Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107, 907–938.
- [8] Gabet, V., Miège, C., Bados, P., Coquery, M., 2007. Analysis of estrogens in environmental matrices. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 1113–1131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.10.003>
- [9] Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2002a. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *J. Chromatogr. A* 974, 23–51.
- [10] Lopez de Alda, M.J., Díaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barceló, D., 2003. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *J. Chromatogr. A* 1000, 503–526. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00509-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00509-0)
- [11] Buchberger, W.W., 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Anal. Chim. Acta* 593, 129–139.
- [12] Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. The Use of Microwave Assisted Extraction and On-line Chromatography-Mass Spectrometry for Determining Endocrine-Disrupting Compounds in Sewage Sludges. *Water, Air, Soil Pollut.* 224, 1486.
- [13] Sosa-Ferrera, Z., Mahugo-Santana, C., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. Analytical Methodologies for the Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Biological and Environmental Samples. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–23.
- [14] Jakimska, A., Huerta, B., Bargańska, Ż., Kot-Wasik, A., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *J. Chromatogr. A* 1306, 44–58.

Bibliografía

- [15] Petrovic, M., Tavazzi, S., Barcelo, D., 2002b. Column-switching system with restricted access pre-column packing for an integrated sample cleanup and liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediment. *J. Chromatogr. A* 971, 37–45.
- [16] Nanita, S.C., Pentz, A.M., Bramble, F.Q., 2009. High-Throughput Pesticide Residue Quantitative Analysis Achieved by Tandem Mass Spectrometry with Automated Flow Injection. *Anal. Chem.* 81, 3134–3142.
- [17] Llorca, M., Pérez, F., Farré, M., Agramunt, S., Kogevinas, M., Barceló, D., 2012. Analysis of perfluoroalkyl substances in cord blood by turbulent flow chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 433, 151–160.
- [18] Mottier, P., Hammel, Y.-A., Gremaud, E., Guy, P.A., 2008. Quantitative High-Throughput Analysis of 16 (Fluoro)quinolones in Honey Using Automated Extraction by Turbulent Flow Chromatography Coupled to Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 56, 35–43.
- [19] Stolker, A.A.M., Peters, R.J.B., Zuiderent, R., DiBussolo, J.M., Martins, C.P.B., 2010. Fully automated screening of veterinary drugs in milk by turbulent flow chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2841–2849.
- [20] Herman, J.L., 2002. Generic method for on-line extraction of drug substances in the presence of biological matrices using turbulent flow chromatography. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 421–426.
- [21] I.A. Blair, *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, vol. IX, J Wiley & Sons (editors) (2012), p. 1.
- [22] Gorga, M., Petrovic, M., Barcelo, D., 2013. Multi-Residue Analytical Method for the Determination of Endocrine Disruptors and Related Compounds in River and Waste Water Using Dual Column Liquid Chromatography Switching System Coupled to Mass Spectrometry, *Journal of chromatography. A.* 1295, p.57.
- [23] Loyo-Rosales, J.E., Rice, C.P., Torrents, A., 2007. Octyl and nonylphenol ethoxylates and carboxylates in wastewater and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 68, 2118–2127.
- [24] Petrović, M., Barceló, D., 2004. Analysis and fate of surfactants in sludge and sludge-amended soils. *TrAC Trends Anal. Chem.* 23, 762–771.

Referencias de la publicación científica 3

- Bacaloni A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of organophosphorus flame retardants and plasticizers in drinking and surface waters. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:1123–30.
- Barceló D, Petrovic M. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:1141–2.
- Barel-Cohen K, Shore LS, Shemesh M, Wenzel A, Mueller J, Kronfeld-Schor N. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. *J Environ Manage* 2006;78: 16–23.
- Bennie DT. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenols ethoxylates. *Water Qual Res J Can* 1999;34:79–122.

- Brian JV, Harris CA, Scholze M, Backhaus T, Booy P, Lamoree M, et al. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ Health Perspect* 2005;113(6):721–8.
- Brix R, Postigo C, González S, Villagrana M, Navarro A, Kuster M, et al. Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. *Anal Bioanal Chem* 2010;396:1301–9.
- Cargouët M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci. Total Environ.* 2004;324:55-66.
- Céspedes R, Petrovic M, Raldúa D, Saura Ú, Piña B, Lacorte S, et al. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI–MS. *Anal Bioanal Chem* 2004;378:697–708.
- 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.
- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Establishing a framework for community action in the field of water policy as amended by Decision 2455/2001/EC and Directives 2008/32/EC, 2008/105/EC and 2009/31/EC; 2000.
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council. Amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy; 2013.
- Giger W, Schaffner C, Kohler H-PE. Benzotriazole and tolyltriazole as aquatic contaminants. 1. Input and occurrence in rivers and lakes. *Environ Sci Technol* 2006;40:7186–92.
- Gorga M, Petrovic M, Barceló D. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2013;1295:57-66.
- Gorga M, Insa S, Petrovic M, Barceló D. Analysis of endocrine disruptors and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography– liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2014;1352:29–37.
- Jonkers N. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. *Environ Sci Pollut Res Int* 2010;17:834–43.
- Kantiani L, Farré M, Asperger D, Rubio F, González S, López de Alda MJ, et al. Triclosan and methyltriclosan monitoring study in the northeast of Spain using a magnetic particle enzyme immunoassay and confirmatory analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *J Hydrol* 2008;361:1–9.
- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res* 2008;42:3498–518.
- 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.
- Labadie P, Hill EM. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography– electrospray ionisation mass spectrometry: comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007;1141:174–81.

Bibliografía

- Laganà A, Bacaloni A, De Leva I, Faberi A, Fago G, Marino A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal Chim Acta* 2004;501:79–88.
- Lei B, Huang S, Zhou Y, Wang D, Wang Z. Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. *Chemosphere* 2009;76:36–42.
- López de Alda MJ, Gil A, Paz E, Barceló D. Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray–mass spectrometry. *Analyst* 2002;127:1299–304.
- Loyo-Rosales JE, Rice CP, Torrents A. Octyl and nonylphenol ethoxylates and carboxylates in wastewater and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 2007;68:2118–27.
- Nguyen T, Kai-Uwegoss Ball W. Polyparameter linear free energy relationships for estimating the equilibrium partition of organic compounds between water and the natural organic matter in soils and sediments. *Environ Sci Technol* 2005;39(4):913–24.
- Peck M, Gibson RW, Kortenkamp A, Hill EM. Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom rivers. *Environ Toxicol Chem* 2004;23(4):945–52.
- Petrovic M. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. *TrEAC Trends Environ Anal Chem* 2014;1:25–33.
- Petrovic M, Barceló D. Determination of phenolic xenoestrogens in environmental samples by liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J AOAC Int* 2001;84:1074–86.
- Petrovic M, Lacorte S, Viana P, Barceló D. Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *J Chromatogr A* 2002a;959:15–23.
- Petrovic M, Solé M, López De Alda MJ, Barceló D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ Toxicol Chem* 2002b;21:2146–56.
- Petrovic M, Ginebreda A, Acuña V, Batalla RJ, Elosegi A, GuaschH, et al. Combined scenarios of chemical and ecological quality under water scarcity in Mediterranean rivers. *TrAC Trends Anal Chem* 2011;30:1269–78.
- Silva BF, Jelic A, López-Serna R, Mozeto AA, Petrovic M, Barceló D. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 2011;85:1331–9.
- Snyder SA, Kelly KL, Grange AH, Sovocool GW, Snyder EM, Giesy JI. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: scientific and regulatory issues. In: Daughton CG, Jones-Lepp TL, editors. *ACS Symposium Series 791* Washington D.: American Chemical Society; 2001. p. 116–40.
- Sumpter JP, Johnson AC. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol* 2005;39:4321–32.
- Talmage SS. *Environmental and human safety of major surfactants: alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates*. Lewis Publishers; 1994.

- Vanderford B, Mawhinney D, Trenholm R, Zeigler-Holady J, Snyder S. Assessment of sample preservation techniques for pharmaceuticals, personal care products, and steroids in surface and drinking water. *Anal Bioanal Chem* 2011;399:222734.
- Vethaak AD, Lahr J, Schrap SM, AIC Belfroid, Rijs GBJ, Gerritsen A, et al. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 2005;59:511–24.

Referencias de la propuesta de publicación científica 4

- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2006. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochem.* 41, 525–539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.017>
- Barbosa, M.O., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2016. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Res.* 94, 257–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047>.
- Barnabé, S., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Beauchesne, I., Surampalli, R.Y., 2009. Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products—Fate of endocrine disrupting compounds. *Sci. Total Environ.* 407, 1471–1488. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.015>.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239, 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>.
- Carballa, M., Omil, F., Alder, A.C., Lema, J.M., 2006. Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. *Water Sci. Technol.* 53, 109–117. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.241>.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llombart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38, 2918–2926. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.029>.
- Cases, V., Alonso, V., Argandoña, V., Rodríguez, M., Prats, D., 2011. Endocrine disrupting compounds: A comparison of removal between conventional activated sludge and membrane bioreactors. *Desalination* 272, 240–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.01.026>.
- Citulski, J.A., Farahbakhsh, K., 2010. Fate of Endocrine-Active Compounds during Municipal Biosolids Treatment: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8367–8376. <https://doi.org/10.1021/es102403y>
- Dichtl, N., Rogge, S., Bauerfeld, K., 2007. Novel Strategies in Sewage Sludge Treatment. *CLEAN – Soil, Air, Water* 35, 473–479. <https://doi.org/10.1002/clen.200720022>.
- Ferreira, A.P., de Lourdes, C., da Cunha, N., 2005. Anthropogenic pollution in aquatic environment: Development of a caffeine indicator. *Int. J. Environ. Health Res.* 15, 303–311. <https://doi.org/10.1080/09603120500155898>.
- Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2001. Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4697–4703. <https://doi.org/10.1021/es010171j>.

Bibliografía

- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* 163, 287–303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>.
- Liu, Z., Kanjo, Y., Mizutani, S., 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Sci.TotalEnviron.* 407, 731–748. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.039>.
- Mohapatra, D.P., Cledón, M., Brar, S.K., Surampalli, R.Y., 2016. Application of Wastewater and Biosolids in Soil: Occurrence and Fate of Emerging Contaminants. *Water, Air, Soil Pollut.* 227, 77. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2768-4>.
- Sewage Sludge. Sewage Sludge. Urban WasteWater Treatment. Available : <https://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/>, in: EC.
- Stasinakis, A.S., 2012. Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 121, 432–440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.074>.
- Sudhakaran, S., Maeng, S.K., Amy, G., 2013. Hybridization of natural systems with advanced treatment processes for organic micropollutant removals: New concepts in multi-barrier treatment. *Chemosphere* 92, 731–737. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.021>.
- Tijani, J.O., Fatoba, O.O., Petrik, L.F., 2013. A Review of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Compounds: Sources, Effects, Removal, and Detections. *Water, Air, Soil Pollut.* 224, 1770. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1770-3>.
- Verlicchi, P., Zambello, E., 2015. Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil. A critical review. *Sci.TotalEnviron.* 538, 750–767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.108>.
- Yang, Y., Ok, Y.S., Kim, K.-H., Kwon, E.E., Tsang, Y.F., 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Sci. Total Environ.* 596–597, 303–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>
- Zhang, L., Xu, C. (Charles), Champagne, P., Mabee, W., 2014. Overview of current biological and thermo-chemical treatment technologies for sustainable sludge management. *Waste Manag. Res.* 32, 586–600. <https://doi.org/10.1177/0734242X14538303>

Anexo A

Lista de tablas y figuras

Anexo AI: Lista de tablas

Tabla 1.1 Extracto del Anexo I. Normas de la calidad ambiental para sustancias prioritarias y para otros contaminantes, Directiva 2008/105/CE.....	6
Tabla 1.2 Clasificación de los EDCs (WHO/UNEP, 2012)	8
Tabla 1.3.a Compuesto, nº CAS, logKow, pKa, solubilidad a 25°C en agua, estructura química y PM de los estrógenos y sus conjugados estudiados.....	23
Tabla 1.3.b Compuesto, nº CAS, logKow, pKa, solubilidad a 25°C en agua, estructura química y PM de los desinfectantes, parabenos y BPA estudiados	24
Tabla 1.3.c Compuesto, nº CAS, logKow, solubilidad a 20°C en agua, estructura química y PM de los compuestos alquilfenólicos estudiados.....	25
Tabla 1.3.d Compuesto, nº CAS, logKow, pKa, solubilidad a 25°C en agua, estructura química y PM de los benzotriazoles, compuestos organofosforados estudiados y cafeína.....	26
Tabla 1.4 Valores de PNEC de los compuestos estudiados en agua dulce y sedimentos	27
Tabla 1.5 Valores de EFFi encontrados en la literatura para los EDCs estudiados	28
Tabla 1.6.a Metodologías offline para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en matrices de agua.....	54
Tabla 1.6. b Metodologías online para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en matrices de agua.....	57
Tabla 1.7.a Metodologías offline para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en matrices de sedimentos y lodos	59
Tabla 1.7.b Metodologías online para el análisis de EDCs y compuestos relacionados en matrices de sedimentos y lodos	64
Tabla 3.1 Condiciones LC-LC (correspondiente a la Tabla 1 de la publicación científica 1).....	85
Tabla 3.2 Parámetros optimizados MS/MS para el análisis SRM (correspondiente a la Tabla 2 de la publicación científica 1).....	86
Tabla 3.3 Estudio comparativo empleando tres tipos de columnas EQUanTM (correspondiente a la Tabla 3 de la publicación científica 1)	88

Anexo A. Lista de tablas y figuras

Tabla 3.4 Parámetros de validación del método integrado LC-LC-MS/MS usando una columna EQuan™ Hypersil GOLD™ 20×2.1 mm, 12µm (correspondiente a la Tabla 4 de la publicación científica 1)	90
Tabla 3.5 Concentraciones encontradas en ng/L de los compuestos analizados en agua superficial de río (A) y en aguas residuales (B) en la cuenca del Ebro durante la campaña de 2010 (correspondiente a la Tabla 5 de la publicación científica 1).....	93
Tabla 3.6 Condiciones TFC-LC (correspondiente a la Tabla 1 de la publicación científica 2).....	100
Tabla 3.7 Parámetros de validación del método integrado TFC-LC-MS/MS (correspondiente a la Tabla 2 de la publicación científica 2).....	105
Tabla 3.8 Valores de concentración (ng/g) de los compuestos estudiados en sedimentos de ríos y lodos de depuradora en la cuenca del Ebro durante una campaña en 2010 (correspondiente a la Tabla 3 de la publicación científica 2).....	108
Tabla 3.9. Valores de PNEC en agua dulce y sedimentos, LODs en agua de río y sedimentos (EQuan-LC-MS/MS y TurboFlow-LC-MS/MS, respectivamente) y valores legislados por la EC en aguas superficiales.....	111
Tabla 4.1.a Niveles de concentración de estrógenos naturales, sintéticos y conjugados en muestras de agua de río en diferentes lugares del mundo (correspondiente a la Tabla 1 de la publicación científica 3).....	127
Tabla 4.1.b Niveles de concentración de los compuestos alquifenólicos en muestras de agua de río en diferentes lugares del mundo (correspondiente a la Tabla 1 de la publicación científica 3)	129
Tabla 4.1.c Niveles de concentración de compuestos organofosforados, anticorrosivos, BPA, conservantes y desinfectantes en muestras de agua de río en diferentes lugares del mundo (correspondiente a la Tabla 1 de la publicación científica 3).....	131
Tabla 4.2.a Niveles de concentración de estrógenos naturales, sintéticos y conjugados en muestras de sedimentos de río en diferentes lugares del mundo (correspondiente a la Tabla 2 de la publicación científica 3)	133
Tabla 4.2.b Niveles de concentración de compuestos alquifenólicos en muestras de sedimento de río en diferentes lugares del mundo (correspondiente a la Tabla 2 de la publicación científica 3)	135
Tabla 4.2.c Niveles de concentración de compuestos organofosforados, anticorrosivos, BPA, conservantes y desinfectantes en muestras de sedimentos de río en diferentes lugares del mundo (correspondiente a la Tabla 2 de la publicación científica 3).....	137
Tabla 4.3.b Comparación de los niveles encontrados con los datos publicados en la bibliografía para efluentes de depuradora	155

Tabla 4.3.c Comparación de los niveles encontrados con los datos publicados en la bibliografía para lodos de depuradora	156
Tabla 5.1 Concentraciones (ng/L) de EDCs para cada uno de los ríos estudiados en ambas campañas de muestreo (correspondiente a la Tabla 4 de la publicación científica 5)	173
Tabla 5.2 Concentraciones de EDCs para cada una de las muestras de agua de grifo, mediana y rango de concentración (ng/L) (correspondiente a la Tabla 3 de la publicación científica 6)	175
Tabla 5.3 Detección de compuestos disruptores endocrinos (EDC) en cada uno de los puntos de muestreo (correspondiente a la Tabla 2, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 7)	178
Tabla 5.4 Ubicación, tipo, contexto y proximidad a posibles fuentes de contaminación de las muestras estudiadas (correspondiente a la Tabla 1 de la publicación científica 8)	181
Tabla 5.5 Concentraciones (ng/L) de EDCs para cada una de las muestras analizadas (correspondiente a la Tabla 5 de la publicación científica 8)	183
Tabla 5.6 Comparación entre los niveles encontrados entre los distintos tipos de agua estudiados	187
Tabla 5.7 Concentración inicial y eficiencia de eliminación final después de 8 días de los EDCs en el tratamiento de aguas residuales hospitalaria por <i>T. versicolor</i> (correspondiente a la Tabla SM2, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 9, resumen resultados EDCs)	189
Tabla BI.1 Los parámetros optimizados MS/MS para el análisis SRM de estándares internos (correspondiente a la Tabla 2, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 1)	267
Tabla BI.2 Condiciones LC-LC para el análisis offline (correspondiente a la Tabla 1, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 1)	268
Tabla BI.3 Recuperaciones relativas de aguas fortificadas a niveles de concentración de 2.5 y 25 ng/L (correspondiente a la Tabla 3, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 1)	268
Tabla BI.4 Recuperaciones de los compuestos analizados usando el método offline (correspondiente a la Tabla 4, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 1)	269
Tabla BI.5 Condiciones de LC para el análisis offline (correspondiente a la Tabla 3, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 2)	270
Tabla BI.6 Recuperaciones (%) en muestras de sedimentos fortificadas aplicando diferentes metodologías de extracción (correspondiente a la Tabla 4, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 2)	270

Anexo A. Lista de tablas y figuras

Tabla BI.7 Recuperaciones (%) de muestras fortificadas de sedimentos y lodos a niveles de concentración de 1.25 y 125 ng/g para sedimentos and 25 y 2500 ng/g para lodos (correspondiente a la Tabla 5, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 2)	272
Tabla BI.8 Recuperaciones (%), LODs/LOQs (ng/g) de los compuestos usando la metodología offline (correspondiente a la Tabla 6, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 2)	273
Tabla BI.9 Descripción de los sitios de muestreo (correspondiente a la Tabla 7, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 2)	274
Tabla BII.1.a Descripción y características de los sitios de muestreo de la cuenca del Ebro durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 2, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3).....	275
Tabla BII.1.b Descripción y características de los sitios de muestreo de las cuencas del Llobregat y Júcar durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 2, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3)	276
Tabla BII.1.c Descripción y características de los sitios de muestreo de la cuenca del Guadalquivir durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 2, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3)	277
Tabla BII.2 50% de concentración efectiva (EC50), factor de estrogénesis relativo (E2 equiv.) y límites de detección (µg/L) obtenidos para diferentes compuestos por Céspedes et al. (2004) (correspondiente a la Tabla 7, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3).....	277
Tabla BII.3.a Niveles de concentración de los estrógenos y conjugados naturales (E2, E1, E3, E2-17G, E1-3G y E1-16G) en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 8.a-k, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3)	278
Tabla BII.3.b Niveles de concentración de los estrógenos conjugados naturales y sintéticos (E1-3S, E3-3S, EE2 y DES) y de los desinfectantes (TCC y TCS) en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 8.a-k, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3)	279
Tabla BII.3.c Niveles de concentración de los parabenos (MeP, EtP, PrP y BeP) y el BPA en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 8.a-k, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3).....	280
Tabla BII.3.d Niveles de concentración de los compuestos alquifenólicos (OP, NP, OP1EC, NP1EC, OP2EO y NP2EO) en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península	

Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 8.a-k, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3)	281
Tabla BII.3.e Niveles de concentración de los anticorrosivos (BT y TT), compuestos organofosforados (TBEP, TCCP y TCEP) y del marcador Caff en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 8.a-k, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3)	282
Tabla BII.4.a Actividad estrogénica total en las muestras de agua de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/L de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 9.a, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3).....	283
Tabla BII.4.b Actividad estrogénica total en las muestras de agua de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/L de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 9.a, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3).....	284
Tabla BII.4.c Actividad estrogénica total en las muestras de agua de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/L de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 9.a, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3).....	285
Tabla BII.5.a Actividad estrogénica total en las muestras de sedimentos de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/g de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 9_b, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3).....	286
Tabla BII.5.b Actividad estrogénica total en las muestras de sedimentos de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/g de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 9_b, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3).....	287
Tabla BII.5.c Actividad estrogénica total en las muestras de sedimentos de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/g de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2) (correspondiente a la Tabla 9_b, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 3).....	288
Tabla BII.6 Descripción de las EDARs analizadas y niveles de cafeína encontrados en las aguas de afluentes muestreadas	289

Anexo A. Lista de tablas y figuras

Tabla BII.7.a Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuenca del Ebro, año 2010, en ng/L y ng/g, respectivamente	290
Tabla BII.7.b Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuenca del Ebro, año 2011, en ng/L y ng/g, respectivamente	291
Tabla BII.8.a Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuencas del Llobregat y Júcar, año 2010, en ng/L y ng/g, respectivamente	292
Tabla BII.8.b Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuencas del Llobregat y Júcar, año 2011, en ng/L y ng/g, respectivamente	293
Tabla BII.9.a Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuenca del Guadalquivir, año 2010, en ng/L y ng/g, respectivamente	294
Tabla BII.9.b Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuenca del Guadalquivir, año 2011, en ng/L y ng/g, respectivamente	295
Tabla BII.10.a Valores de estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en las cuencas del Ebro y Llobregat durante 2010 y 2011	296
Tabla BII.10.b Valores de estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en las cuencas del Júcar y Guadalquivir durante 2010 y 2011	297

Anexo All: Lista de figuras

Figura 1.1 Estructura molecular general para alquilfenoles (izquierda) y APnEOs (derecha) donde n es el número promedio de moles de óxido de etileno por mol de OP/NP	21
Figura 1.2 Ilustración esquemática de las principales fuentes de liberación de EDCs al medio ambiente. Fuente (Adeel et al., 2017; ver también Ting and Praveena, 2017)	29
Figura 1.3 Diagrama esquemático de los distintos tipos de sistema de tratamiento de aguas residuales en las EDARs. Fuente (Ting and Praveena, 2017).....	30
Figura. 1.4 Vías de interconversión de estrógenos naturales y sintéticos,y los factores que afectan a su degradación. Fuente (Adeel et al., 2017).....	32
Figura 1.5 Vía de degradación esquemática, simplificada y general de los APEOs. Fuente (Acir and Guenther, 2018)	36
Figura 1.6.a Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los estrógenos E2, E1, E3 y EE2 en aguas de río y sedimentos.....	40
Figura 1.6.b Distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas para los estrógenos E2, E1, E3 y EE2 en aguas de río representadas mediante diagrama de caja y bigotes	40
Figura 1.7.a Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas de río y sedimentos	41
Figura 1.7.b Distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas de río representadas mediante diagrama de caja y bigotes	41
Figura 1.8 Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los desinfectantes TCC y TCS, y los parabenos MeP, EtP y PrP en aguas de río y sedimentos	41
Figura 1.9 Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los benzotriazoles y los compuestos organofosforados TBEP, TCPP y TCEP en aguas de río y sedimentos.....	42
Figura 1.10.a Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los estrógenos E2, E1, E3 y EE2 en aguas residuales de afluentes y efluentes, y lodos de EDARs	42
Figura 1.10.b Distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas para los estrógenos E2, E1, E3 y EE2 en aguas residuales de afluentes y efluentes de EDARs, representadas mediante diagrama de caja y bigotes	43

Anexo A. Lista de tablas y figuras

Figura 1.11.a Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas residuales de afluentes y efluentes, y lodos de EDARs	43
Figura 1.11.b Distribución de las concentraciones máximas y mínimas detectadas para el BPA y los compuestos alquilfenólicos OP y NP en aguas residuales de afluentes y efluentes de EDARs, representadas mediante diagrama de caja y bigotes	44
Figura 1.12 Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los desinfectantes TCC y TCS, y los parabenos MeP, EtP y PrP en aguas residuales de afluentes y efluentes, y lodos de EDARs	44
Figura 1.13 Concentraciones medianas máximas y mínimas detectadas para los benzotriazoles y los compuestos organofosforados TBEP, TCPP y TCEP en aguas residuales de afluentes y efluentes, y lodos de EDARs	44
Figura 1.14 Descripción general de las principales estrategias analíticas, para la determinación de EDCs en matrices ambientales estudiadas en esta tesis	46
Figura 3.1 Tecnología EQuan TM acoplada al sistema instrumental de análisis LC-MS/MS. (a) posición de carga, (b) posición de elución y análisis (adaptación de la Fig.1 de la publicación científica 1)	71
Figura 3.2 Tecnología TurboFlow TM acoplada al sistema instrumental de análisis LC-MS/MS. (a) carga y purificación (b) elución y vaciado del “loop”, (c) transferencia, (d) separación analítica y limpieza de columna de purificación, (e) llenado del “loop” y limpieza de columna analítica, (f) equilibrado de la columna de preconcentración (adaptación de la Fig.1 de la publicación científica 2)	74
Figura 3.3 Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS (271>183) correspondientes a [M-H] ⁻ de estradiol obtenido en condiciones de NI de muestras enriquecidas a una concentración de nivel de 250 ng/L. (a) offline SPE-LC-MS/MS; (b) online LC-LC-MS/MS (correspondiente a la Fig.2 de la publicación científica 1)	92
Figura 3.4 Recuperaciones (%) de los EDCs y compuestos relacionados en (a) sedimentos y (b) lodos de depuradora usando la metodología online y offline (correspondiente a la Fig.2 de la publicación científica 2)	106
Figura 3.5.a Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS correspondientes a [M-H] ⁻ de estradiol, estrona y estriol obtenidos en condiciones de NI de muestras de sedimentos fortificados aplicando la metodología online y offline (correspondiente a la Fig.3 de la publicación científica 2)	107
Figura 3.5.b Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS correspondientes a [M-H] ⁻ de estradiol, estrona y estriol obtenidos en condiciones de NI de muestras de lodos fortificados aplicando la metodología online y offline (correspondiente a la Fig.3 de la publicación científica 2)	107

Figura 4.1 Sitios de muestreo. Mapa de los Rios Ibéricos muestreados (correspondiente a la Fig.1 de la publicación científica 3)	122
Figura 4.2.a Niveles de concentración de estrógenos y conjugados naturales y sintéticos en las aguas de río (campañas de muestreo 1 y 2) (correspondiente a la Fig.2a de la publicación científica 3)	126
Figura 4.2.b Niveles de concentración de compuestos alquilfenólicos en las aguas de río (campañas de muestreo 1 y 2) (correspondiente a la Fig.2b de la publicación científica 3)	128
Figura 4.2.c Niveles de concentración de antimicrobianos, conservantes, BPA, anticorrosivos y compuestos organofosforados en las aguas de río (campañas de muestreo 1 y 2) (correspondiente a la Fig.2c de la publicación científica 3).....	130
Figura 4.3.a Niveles de concentración de estrógenos y conjugados naturales y sintéticos en los sedimentos de río (campañas de muestreo 1 y 2) (correspondiente a la Fig.3a de la publicación científica 3)...	132
Figura 4.3.b Niveles de concentración de compuestos alquilfenólicos en los sedimentos de río (campañas de muestreo 1 y 2) (correspondiente a la Fig.3b de la publicación científica 3)	134
Figura 4.3.c Niveles de concentración de antimicrobianos, conservantes, BPA, anticorrosivos y compuestos organofosforados en los sedimentos de río (campañas de muestreo 1 y 2) (correspondiente a la Fig.3c de la publicación científica 3).....	136
Figura 4.4.a Niveles acumulados de EEQ, actividad estrogénica total, en aguas de ríos y sedimentos durante la campaña de muestreo 1 (correspondiente a la Fig.4a de la publicación científica 3)	137
Figura 4.4.b Niveles acumulados de EEQ, actividad estrogénica total, en aguas de ríos y sedimentos durante la campaña de muestreo 2 (correspondiente a la Fig.4b de la publicación científica 3)	138
Figura 4.5 Mapa de las cuencas de los ríos y las EDARs estudiades	143
Figura 4.6.a Niveles de concentración de los estrógenos y conjugados naturales y sintéticos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2010) en ng/L y ng/g, respectivamente.....	147
Figura 4.6.b Niveles de concentración de los estrógenos y conjugados naturales y sintéticos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2011) en ng/L y ng/g, respectivamente.....	147
Figura 4.7.a Niveles de concentración de los desinfectantes (TCC y TCS) y parabenos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2010) en ng/L y ng/g, respectivamente	149
Figura 4.7.b Niveles de concentración de los desinfectantes (TCC y TCS) y parabenos en afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados (2011) en ng/L y ng/g, respectivamente	149

Anexo A. Lista de tablas y figuras

Figura 4.8.a Niveles de concentración de los compuestos alquilfenólicos en afluentes, effluentes y lodos de depuradora estudiados (2010) en ng/L y ng/g, respectivamente.....	151
Figura 4.8.b Niveles de concentración de los compuestos alquilfenólicos en afluentes, effluentes y lodos de depuradora estudiados (2011) en ng/L y ng/g, respectivamente	151
Figura 4.9.a Niveles de concentración del BPA, benzotriazoles y los compuestos organofosforados en afluentes, effluentes y lodos de depuradora estudiados (2010) en ng/L y ng/g, respectivamente.....	153
Figura 4.9.b Niveles de concentración del BPA, benzotriazoles y los compuestos organofosforados en afluentes, effluentes y lodos de depuradora estudiados (2011) en ng/L y ng/g, respectivamente.....	153
Figura 4.10.a Estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en la cuenca del Ebro durante 2010 y 2011	158
Figura 4.10.b Estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en la cuenca del Llobregat durante 2010 y 2011	158
Figura 4.10.c Estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en la cuenca del Júcar durante 2010 y 2011	158
Figura 4.10.d Estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en la cuenca del Guadalquivir durante 2010 y 2011.....	158
Figura 4.11.a Distribución de las concentraciones detectadas para los estrógenos en aguas de río de las cuencas de la Península Ibérica estudiadas, y comparación con los niveles publicados.....	163
Figura 4.11.b Distribución de las concentraciones detectadas para el BPA, OP y NP en aguas de río de las cuencas de la Península Ibérica estudiadas, y comparación con los niveles publicados	163
Figura 4.12.a Distribución de las concentraciones detectadas para los estrógenos en aguas de EDARs de la Península Ibérica, y comparación con los niveles publicados	165
Figura 4.12.b Distribución de las concentraciones detectadas para el BPA, OP y NP en aguas de EDARs de la Península Ibérica, y comparación con los niveles publicados	165
Figura 5.1 Mapa que muestra los puntos de muestreo del río (RSP) utilizados en este estudio (correspondiente a la Fig.1 de la publicación científica 5)	171
Figura 5.2 Mapa del área de estudio y de las ubicaciones de los sitios de muestreo (correspondiente a la Fig.1 de la publicación científica 6)	174
Figura 5.3 Ubicación de los puntos de muestreo de agua potable y las características principales de las DWTPs (correspondiente a la Fig.1 de la publicación científica 7)	177

Figura 5.4 Mapa de la ubicación de las áreas muestreadas (correspondiente a la Fig.1 de la publicación científica 8)	180
Figura BI.1 Mapa de los puntos de muestreo de la cuenca del Ebro (correspondiente a la Fig. 1, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 1 y 2)	267
Figura BI.2 Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS correspondientes a [M-H] ⁻ de E2, E1 y E3 obtenidos en condiciones de NI de muestras enriquecidas redisueltas en diferentes porcentajes de metanol:agua (correspondiente a la Fig. 2, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 2).....	271
Figura BI.3 Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS correspondientes a [M-H] ⁻ de DES en condiciones NI de muestras enriquecidas aplicando diferentes enfoques (A, B, C y D) (correspondiente a la Fig. 3, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 2).....	271
Figura BI.4 Recuperaciones de muestras de lodos de depuradora (%) obtenidas aplicando los métodos A, B, C y D (correspondiente a la Fig. 4, Apéndice A. Datos suplementarios, de la publicación científica 2).....	272

Figura BI.4 Recuperaciones de muestras de lodos de depuradora (%) obtenidas aplicando los métodos A, B, C y D

Anexo B

Información adicional capítulos 3 y 4

Anexo BI: Información adicional capítulo 3

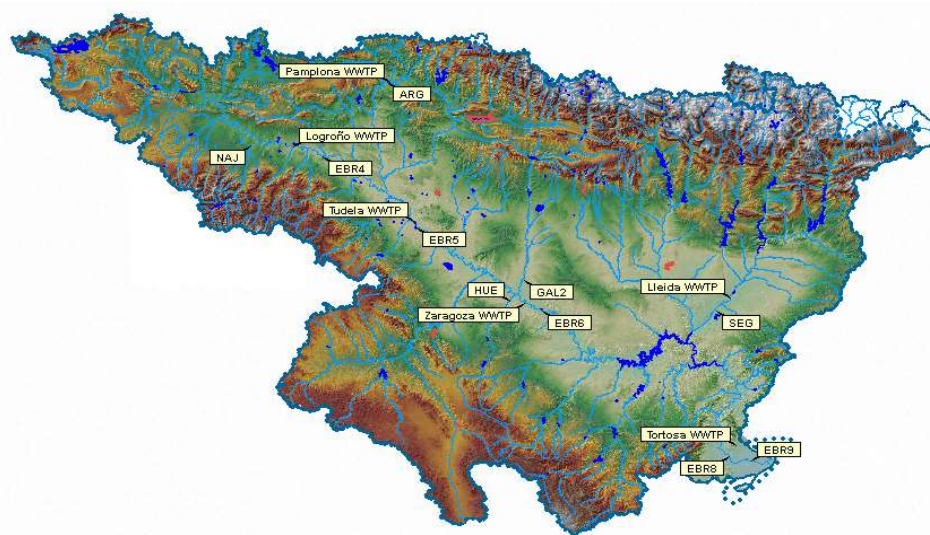


Figura BI.1 Mapa de los puntos de muestreo de la cuenca del Ebro

Tabla BI.1 Los parámetros optimizados MS/MS para el análisis SRM de estándares internos

Nombre	Ion precursor (m/z)	Slens (Hz)	SRM1 (m/z)	Energía colisión (eV)	SRM2 (m/z)	Energía colisión (eV)
Ionización negativa						
<u>Estrógenos naturales y sintéticos y conjugados</u>						
Estradiol d ₅	276	188	147	45	187	44
Estrona d ₄	273	101	147	42	187	39
Etinilestradiol d ₄	299	160	147	41	161	38
Estrona d ₄ sulfato	353	127	273	34	147	57
<u>Desinfectantes/Antimicrobianos/Conservantes</u>						
Etinilhidroxibenzoato C ₁₃	171	86	98	25	143	16
<u>Plastificante</u>						
Bisfenol A d ₁₆	241	116	142	29	223	22
<u>Compuestos alquilfenólicos</u>						
Octilfenol d ₂	207	103	135	26	136	21
Nonilfenol d ₈	227	102	112	23	126	40
Nonilfenol monocarboxilado d ₂	279	95	219	22	133	45
Ionización positiva						
Nonilfenol monoetoxilado d ₂	284	50	127	9	71	7
Octilfenol dietoxilado d ₂	314	71	185	6	123	19
<u>Anticorrosivos</u>						
1H-Benzotriazole d ₄	124	76	69	22	96	17
<u>Compuestos organofosforados</u>						
Triphenyl-d ₁₅ -phosphate	342	127	82	37	160	37
<u>Biomarcador químico</u>						
Cafeína C ₁₃	198	71	140	18	112	20

Anexo B. Información adicional capítulos 3 y 4

Tabla BI.2 Condiciones LC-LC para el análisis offline

Bomba 2:	Bomba de elución
	Volumen de inyección: 10 µL (agua superficial de río, agua de efluente y afluente)
Columna analítica:	Purospher STAR RP-18 (125×2mm, 5µm)
Solvente A:	NI: Agua PI: Agua (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)
Solvente B:	NI: Metanol PI: Metanol (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Gradiente	A%	B%
0:00	0.3	Isocrático	50	50
2:00	0.3	Isocrático	30	70
8:00	0.3	Rampa	-	100
14:00	0.3	Rampa	-	100
19:00	0.3	Rampa	50	50
21:00	0.3	Rampa	50	50

Tabla BI.3 Recuperaciones relativas de aguas fortificadas a niveles de concentración de 2.5 y 25 ng/L

Compuesto	<u>Agua superficial de río</u>		<u>Agua de efluente</u>		<u>Agua de afluente</u>	
	Recuperación relativa (% RSD, n=6)		Recuperación relativa (% RSD, n=6)		Recuperación relativa (% RSD, n=6)	
	2.5 ng/L	25 ng/L	2.5 ng/L	25 ng/L	2.5 ng/L	25 ng/L
E2	103 (2.7)	102 (3.3)	138 (17)	104 (5.5)	-	123 (11)
E1	93 (7.2)	99 (2.8)	76 (5.0)	95 (3.5)	100 (18)	100 (2.6)
E3	83 (11)	67 (4.5)	-	47 (1.8)	-	69 (6.4)
EE2	85 (15)	100 (10)	-	108 (6.6)	-	68 (14)
DES	66 (6.3)	56 (7.5)	-	61 (7.8)	-	58 (7.8)
E1-3S	107 (6.8)	113 (3.5)	111 (14)	98 (13)	98 (12)	72 (8.1)
E3-3S	95 (7.2)	103 (17)	-	75 (10)	-	118 (12)
E2-17G	105 (22)	78.0 (11)	-	94 (12)	-	73 (11)
E1-3G	104 (10)	89 (5.8)	-	86 (13)	-	71 (8.1)
E3-16G	97 (13)	100 (8.9)	-	91 (15)	-	-
TCS	54 (3.6)	56 (3.0)	-	101 (11)	-	122 (4.0)
TCC	111 (7.4)	85 (15)	131 (6.5)	99 (6.7)	85 (11)	81 (10)
BPA	79 (5.2)	72 (10)	-	100 (14)	-	102 (19)
MeP	108 (14)	111 (16)	-	102 (10)	-	84 (8.5)
EtP	83 (9.4)	100 (4.0)	-	94 (2.3)	-	106 (7.3)
PrP	88 (13)	93 (4.1)	96.8 (21)	118 (11)	-	96 (10)
BeP	45 (4.6)	74 (5.6)	57 (7.8)	78 (9.6)	-	137 (5.3)
OP	84 (13)	104 (9.4)	-	103 (19)	-	103 (9.8)
NP	-	77 (11)	-	-	-	81 (9.9)
NP1EC	108 (4.8)	104 (5.3)	105 (1.6)	96 (2.6)	90 (6.3)	103 (11)
OP1EC	94 (3.7)	108 (4.2)	-	59 (8.8)	-	57 (9.9)
OP1EO	-	-	-	-	-	-
NP1EO	-	-	-	-	-	-
OP2EO	93 (13)	115 (11)	106 (17)	92 (13)	97 (9.3)	90 (8.6)
NP2EO	91 (6.9)	108 (18)	128 (2.9)	114 (4.5)	55 (7.6)	86 (6.8)
BT	79 (13)	92 (9.4)	68 (4.8)	57 (8.4)	91.4 (13.9)	82 (19)
TT	59 (5.6)	79 (13)	60 (7.4)	67 (2.4)	93 (8.9)	85 (5.5)
TBEP	97 (7.7)	95 (6.2)	99 (7.3)	84 (4.4)	86 (7.9)	106 (5.3)
TCPP	104 (5.6)	84 (17)	86 (9.5)	105 (3.5)	97 (5.3)	123 (5.4)
TCEP	70 (6.8)	82 (3.3)	78 (10)	83 (6.8)	82 (5.3)	75 (3.5)
Caff	117 (3.9)	112 (3.0)	115 (7.5)	102 (4.7)	142 (19)	123 (9.8)

Tabla BI.4 Recuperaciones de los compuestos analizados usando el método offline

Compuesto	Aqua superficial de río		Aqua de efluente		Aqua de afluyente	
	%Recuperación (% RSD, n=3)	LOD/LOQ (ng/L)	%Recuperación (% RSD, n=3)	LOD/LOQ (ng/L)	%Recuperación (% RSD, n=3)	LOD/LOQ (ng/L)
E2	99 (7.3)	1.4/4.8	47(4.4)	39/132	31 (20)	50/167
E3	75 (10)	7.3/25	59 (7.6)	13/44	29 (4.2)	27/89
E1	100 (11)	0.69/2.3	119 (14)	3.7/12	45 (11)	5.9/20
EE2	99 (18)	0.13/0.45	95 (8.1)	0.57/1.9	60 (12)	1.2/4.1
DES	57 (15)	0.67/2.2	63 (2.7)	Nov-35	23 (11)	15/49
E1-3S	106 (7.1)	0.095/0.32	88 (6.4)	0.94/3.1	50 (6.6)	18/61
E3-3S	75 (3.8)	1.1/3.6	86 (5.4)	1.5/5.2	74 (7.6)	14/47
E2-17G	92 (16)	1.14/3.8	58 (9.4)	3.8/13	49 (15)	10/33
E1-3G	83 (9.5)	0.27/0.91	67 (15)	0.74/2.4	40 (1.0)	1.5/4.9
E3-16G	109 (2.8)	1.1/3.6	85 (3.9)	6.5/22	122 (14)	8.7/29
TCC	89 (4.3)	0.20/0.68	60 (1.9)	0.44/1.5	40 (12)	0.84/2.8
TCS	74 (7.4)	3.9/13	62 (17.3)	7.3/24	34 (18)	7.4/25
MeP	89 (8.9)	0.40/1.3	98 (12)	1.7/5.6	62 (9.4)	2.8/9.3
EtP	95 (4.6)	0.26/0.86	96 (9.7)	1.1/3.6	88 (3.5)	1.6/5.4
PrP	99 (4.0)	1.7/5.5	106 (8.8)	0.91/3.0	104 (16)	1.6/5.2
BeP	75 (8.2)	0.16/0.55	77 (11)	1.0/3.5	113 (11)	0.94/3.1
BPA	111 (9.4)	1.1/3.6	104 (7.5)	8.5/28	91 (5.8)	9.5/32
OP	47 (1.9)	1.1/3.7	24 (8.4)	2.1/7.1	42 (4.6)	12/41
NP	73 (9.0)	2.3/7.5	65 (18)	8.0/27	52 (17)	17/57
NP1EC	86 (7.9)	0.25/0.83	103 (3.5)	0.33/1.1	81 (2.3)	0.35/1.2
OP1EC	67 (5.3)	0.35/1.2	76 (3.1)	1.4/4.5	62 (2.9)	1.5/4.9
OP1EO	32 (17)	8.7/29	31 (80)	58/192	-	250/833
NP1EO	67 (14)	15/51	40 (9.3)	28/93	47 (8.9)	30/100
OP2EO	64 (6.6)	0.11/0.37	70 (3.1)	0.28/0.94	63 (4.7)	0.50/1.7
NP2EO	74 (19)	0.13/0.44	82 (7.2)	0.30/1.0	50 (3.1)	0.57/1.9
TBEP	58 (8.5)	0.037/0.12	45 (12)	0.046/0.15	22 (5.5)	0.13/0.43
TCPP	57 (6.5)	0.074/0.25	56 (4.1)	0.15/0.49	18 (15)	0.49/1.6
TCEP	46 (14)	0.094/0.32	16 (9.5)	0.50/1.7	6.5 (12)	1.6/5.2
BT	65 (5.5)	0.32/1.1	46 (6.6)	0.46/1.5	24 (8.0)	0.56/1.9
TT	75 (11)	0.48/1.6	35 (6.9)	5.8/19	18 (7.5)	10/33
Caff	86(12)	0.22/0.74	81 (9.1)	5.4/18	87 (7.8)	18/61

Anexo B. Información adicional capítulos 3 y 4

Tabla BI.5 Condiciones de LC para el análisis offline

Bomba 2:	Bomba de elución
	Volumen de inyección: 20 µL (muestras de sedimentos y lodos)
Columna analítica:	NI: Hypersil GOLD (75×2.1mm, 3µm), Thermo Scientific PI: Purospher STAR RP-18 (125×2mm, 5µm), Merck
Solvente A:	NI: Agua PI: Agua (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)
Solvente B:	NI: Metanol PI: Metanol (20 mM formiato de amonio, 0.1% ácido acético)

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Gradiente	A%	B%
0:00	0.3	Isocrático	50	50
2:00	0.3	Isocrático	30	70
8:00	0.3	Rampa	-	100
14:00	0.3	Rampa	-	100
19:00	0.3	Rampa	50	50
21:00	0.3	Rampa	50	50

Tabla BI.6 Recuperaciones (%) en muestras de sedimentos fortificadas aplicando diferentes metodologías de extracción

Compuesto	PLE 50°C	PLE 70°C	Sonicación	PLE 50°C (agua/metanol/acetona 1:2:1, v/v)	PLE 50°C (agua/metanol/acetona 1:2:2, v/v)
	Recuperación (% RSD, n=3)	Recuperación (% RSD, n=3)	Recuperación (% RSD, n=3)	Recuperación (% RSD, n=3)	Recuperación (% RSD, n=6)
E2	71 (3.5)	95 (22)	106 (4.2)	88 (2.6)	82 (4.8)
E1	84 (2.4)	80 (15)	88 (6.4)	83 (13)	79 (7.3)
E3	99 (14)	48 (20)	81 (11)	108 (6.1)	105 (7.9)
EE2	89 (9.7)	96 (17)	109 (8.6)	93 (6.8)	98 (5.7)
DES	74 (8.6)	75 (17)	91 (8.5)	114 (12)	77 (11)
E1-3S	112 (4.5)	105 (10)	114 (4.1)	91 (6.0)	115 (5.4)
E3-3S	82 (9.8)	45 (21)	79 (11)	75 (11)	51 (7.4)
E2-17G	-	-	-	92 (1.9)	95 (5.1)
E1-3G	-	-	-	91 (6.8)	85 (7.7)
E3-16G	-	-	-	65 (10)	101 (9.5)
TCC	70 (9.5)	57 (7.2)	57 (6.1)	98 (10)	76 (9.0)
TCS	72 (10)	91 (16)	112 (13)	99 (2.9)	82 (3.5)
MeP	104 (9.9)	74 (4.9)	64 (10)	97 (14)	75.5 (6.1)
EtP	95 (2.5)	98 (4.4)	104 (7.2)	90 (6.1)	112 (8.7)
PrP	103 (3.3)	114 (11)	109 (1.8)	91 (2.2)	95 (2.4)
BeP	71 (3.7)	91 (15)	93 (6.0)	108 (11)	73 (13)
BPA	105 (6.1)	69 (9.3)	58 (12)	87 (3.9)	101 (10)
OP	104 (5.6)	122 (8.5)	71 (7.1)	79 (10)	72 (6.7)
NP	92 (8.1)	87 (13)	89 (7.1)	89 (12)	57 (9.3)
NP1EC	67 (17)	36 (19)	56 (16)	83 (8.6)	78 (18)
OP1EC	69 (6.9)	62 (22)	79 (18)	105 (12)	86 (4.5)
OP1EO	71 (16)	53 (20)	67 (15)	73 (15)	63 (15)
NP1EO	67 (14)	45 (19)	62 (12)	71 (13)	45 (11)
OP2EO	134 (4.1)	125 (11)	101 (5.0)	109 (7.0)	87 (6.5)
NP2EO	131 (6.7)	124 (14)	117 (9.5)	111 (12)	75 (5.4)
BT	51 (5.5)	73 (3.3)	47 (6.8)	79 (7.8)	67 (4.3)
TT	54 (12)	73 (19)	57 (11)	95 (11)	84 (6.6)
TBEP	98 (3.7)	100 (5.6)	86 (6.6)	104 (7.6)	92 (11)
TCPP	87 (1.0)	95 (2.9)	109 (1.6)	91 (5.7)	74 (15)
TCEP	102 (4.1)	91 (8.7)	84 (5.1)	98 (3.2)	88 (5.7)
Caff	106 (5.4)	79 (8.5)	85 (6.3)	104 (9.1)	81 (6.2)
Mediana (%)	84	79	84	91	82

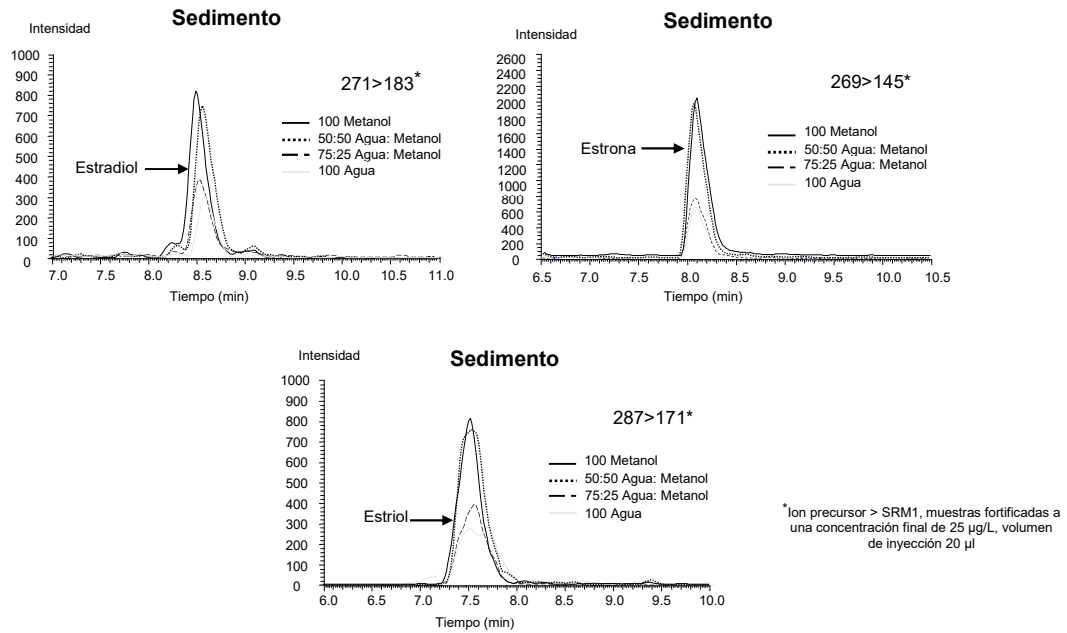


Figura BI.2 Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS correspondientes a $[M-H]^-$ de E2, E1 y E3 obtenidos en condiciones de NI de muestras enriquecidas redisueltas en diferentes porcentajes de metanol:agua

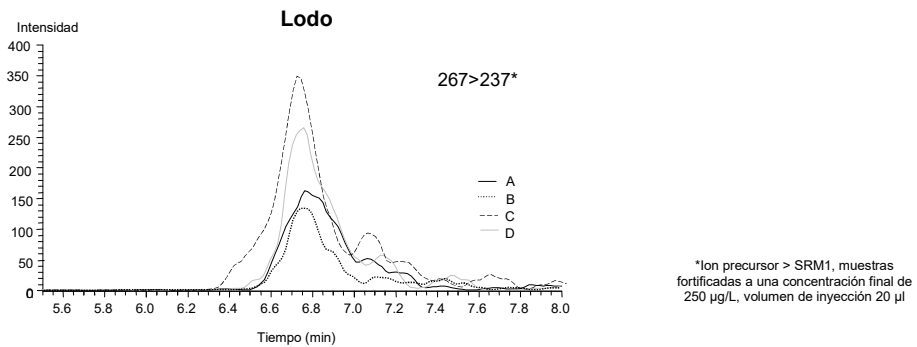


Figura BI.3 Cromatogramas iónicos reconstruidos de MS/MS correspondientes a $[M-H]^-$ de DES en condiciones NI de muestras enriquecidas aplicando diferentes enfoques (A, B, C y D)

Anexo B. Información adicional capítulos 3 y 4

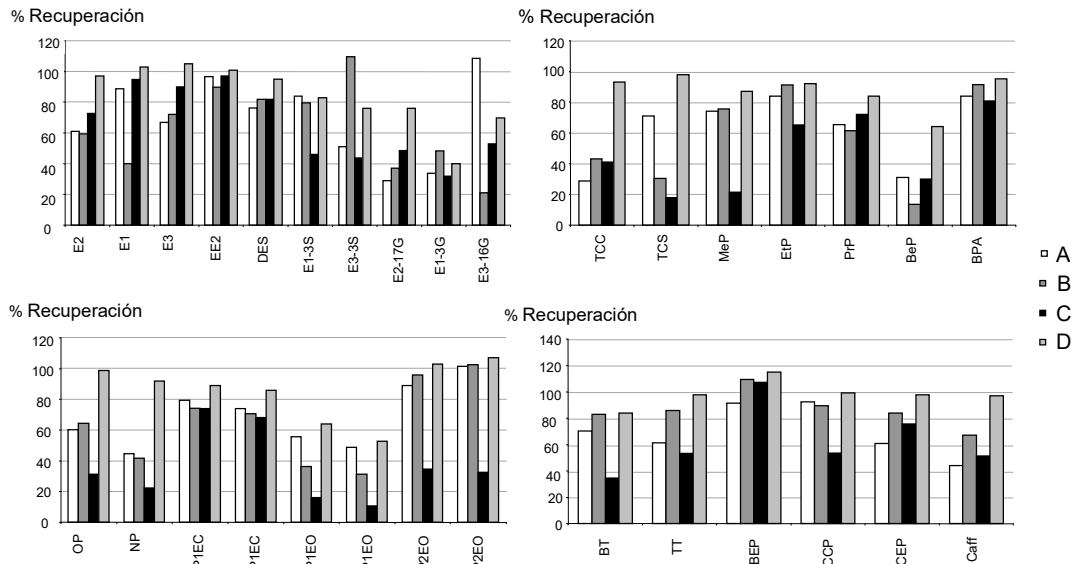


Figura BI.4 Recuperaciones de muestras de lodos de depuradora (%) obtenidas aplicando los métodos A, B, C y D

Tabla BI.7 Recuperaciones (%) de muestras fortificadas de sedimentos y lodos a niveles de concentración de 1.25 y 125 ng/g para sedimentos and 25 y 2500 ng/g para lodos

Compuesto	<u>Sedimento de río</u>		<u>Lodo de depuradora</u>	
	Recuperación (% RSD, n=3)		Recuperación (% RSD, n=3)	
	1.25 ng/g	125 ng/g	25 ng/g	2500 ng/g
E2	112 (7.5)	116 (2.8)	-	97 (6.4)
E1	109 (4.4)	87 (3.0)	95 (11)	94 (8.0)
E3	94 (14)	84 (6.6)	-	105 (9.4)
EE2	105 (9.8)	103 (8.4)	89 (7.5)	101 (8.2)
DES	103 (4.6)	102 (14)	-	106 (12)
E1-3S	80 (8.2)	111 (1.2)	106 (17)	111 (6.3)
E3-3S	68 (8.0)	98 (9.8)	73 (11)	100 (6.0)
E2-17G	90 (3.5)	95 (5.1)	67 (8.1)	87 (6.1)
E1-3G	107 (14)	112 (5.0)	54 (12)	69 (11)
E3-16G	87 (12)	83 (11)	61 (9.8)	97 (7.4)
TCC	87 (6.8)	97 (6.7)	76 (5.8)	101 (9.5)
TCS	82 (4.2)	86 (3.8)	*	89 (3.3)
MeP	*	97 (12)	*	94 (9.4)
EtP	81 (10)	100 (3.7)	103 (12)	104 (6.9)
PrP	108 (18)	79 (1.3)	110 (20)	96 (5.6)
BeP	90 (16)	116 (9.8)	115 (22)	74 (13)
BPA	85 (1.9)	98 (3.5)	104 (16)	114 (13)
OP	91 (3.3)	96 (10)	89 (6.1)	101 (7.9)
NP	80 (16)	95 (7.1)	*	102 (8.3)
NP1EC	94 (7.7)	97(12)	*	93 (3.8)
OP1EC	114 (8.3)	18 (9.1)	99 (5.1)	100 (12)
OP1EO	-	73 (15)	-	64 (16)
NP1EO	-	71 (13)	-	53 (19)
OP2EO	80 (12)	87 (8.9)	102 (8.1)	91 (5.1)
NP2EO	91 (35)	95 (2.5)	*	97 (5.5)
BT	90 (9.1)	84 (4.4)	77 (12)	83 (14)
TT	*	79 (6.1)	*	100 (5.1)
TBEP	*	90 (4.7)	*	89 (11)
TCPP	81 (5.1)	86 (3.1)	*	80 (13)
TCEP	99 (5.3)	113 (3.1)	78 (12)	86 (8.0)
Caff	99 (5.4)	90 (4.2)	*	105 (7.1)

* Estos valores no se calcularon debido a los altos niveles de estos compuestos en el blanco de muestra

Tabla BI.8 Recuperaciones (%), LODs/LOQs (ng/g) de los compuestos usando la metodología

Compuesto	Sedimento de río		Lodo de depuradora	
	% Recuperación (% RSD, n=3)	LOD/LOQ (ng/g)	% Recuperación (% RSD, n=3)	LOD/LOQ (ng/g)
E2	60 (20)	0.36/1.2	54 (12)	39/132
E3	84 (4.0)	0.99/3.3	87 (13)	12/41
E1	98 (22)	0.94/3.2	63 (9.3)	19/64
EE2	114 (21)	0.19/0.62	71 (11)	24/78
DES	119 (13)	0.54/1.8	124 (14)	27/89
E1-3S	81 (12)	0.013/0.044	89 (14)	0.43/1.4
E3-3S	116 (5.4)	0.043/0.14	39 (5.9)	1.3/4.4
E2-17G	86 (15)	0.15/0.50	80 (23)	3.0/10
E1-3G	137 (14)	0.096/0.32	41 (10)	2.0/6.6
E3-16G	101 (16)	0.063/0.21	80 (19)	2.4/7.9
TCC	98 (9.4)	0.27/0.89	92 (15)	150/500
TCS	63 (9.6)	1.7/5.8	85 (14)	5.0/17
MeP	97 (6.7)	0.71/2.4	106 (17)	4.9/16
EtP	81 (10)	0.016/0.054	125 (12)	0.38/1.3
PrP	87 (11)	0.034/0.11	91 (2.9)	1.9/6.3
BeP	119 (16)	0.025/0.084	33 (11)	11/36
BPA	81 (18.1)	0.39/1.3	74 (20)	12/42
OP	100 (19)	0.11/0.38	127 (21)	0.39/1.3
NP	78 (24)	0.67/2.2	87 (15)	3.5/12
NP1EC	85 (10)	0.011/0.037	60 (17)	0.28/0.95
OP1EC	96 (8.4)	0.050/0.17	76 (18)	0.19/0.64
OP1EO	51 (7.5)	6.9/23	-	-
NP1EO	61 (9.0)	16/53	-	-
OP2EO	87 (4.5)	0.023/0.078	89 (7.1)	8.7/29
NP2EO	89 (8.0)	0.018/0.061	90 (6.4)	0.84/2.8
TBEP	90 (6.6)	0.029/0.098	94 (13)	17/56
TCPP	75 (13)	0.0078/0.026	85 (17)	4.2/14
TCEP	114 (23)	0.014/0.046	101 (18)	0.26/0.87
BT	65 (8.9)	0.028/0.094	71 (11)	1.1/3.53
TT	111 (18)	0.064/0.21	118 (11)	2.8/9.3
Caff	78 (6.1)	0.034/0.11	98 (7.2)	3.2/11

Anexo B. Información adicional capítulos 3 y 4

Tabla BI.9 Descripción de los sitios de muestreo

Código	Río	Localización	Descripción del sitio	<u>Características del sedimento</u>	<u>Características del lodo</u>	
				TOC (% C org)	Destino del lodo	TOC (% C org)
NAJ	Nájerilla	San Asensio	Importante zona agrícola vitivinícola	3.1	-	-
Pamplona WWTP	-	-	-	-	-	-
ARG	Arga	Echauri	Río abajo Pamplona WWTP	1.5	-	-
Logroño WWTP	-	-	-	-	-	-
EBR4	Ebro	Mendavia	Río abajo Logroño WWTP	0.51	-	-
Tudela WWTP	-	-	-	-	-	-
GAL2	Gállego	Villanueva de Gállego	Gran influencia de los campos agrícolas	0.89	-	-
HUE	Huerta	Zaragoza	Dentro de la ciudad de Zaragoza. Recibe los efluentes de muchas áreas industriales.	2.4	-	-
Zaragoza WWTP	-	-	-	-	Incineración	76.5
EBR6	Ebro	Presa de Pina	Río abajo Zaragoza WWTP	2.5	-	-
Lleida WWTP	-	-	-	-	Uso agrícola	52.8
SEG	Segre	Torres de Segre	Río abajo Lleida WWTP	0.59	-	-
Tortosa WWTP	-	-	-	-	Uso agrícola	-
EBR9	Ebro	Deltebre	La última antes de que el Ebro llegue al mar. Campos de arroz	2.0	-	-

Anexo BII: Información adicional capítulo 4

Tabla BII.1.a Descripción y características de los sitios de muestreo de la cuenca del Ebro durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

	Código	Río	Ubicación	Descripción del punto	Características del agua		Características del sedimento	
					flujo (m ³ /s)	flujo (m ³ /s)	TOC (%C org)	
					C1	C2	C1	C2
	EBR1	Ebro	Nestares	5 km aguas abajo del nacimiento del Ebro	1.2	0.61	2.1	2.8
	OCA	Oca	Oña	Curso superior del Ebro	1.4	0.75	1.7	2.0
	EBR2	Ebro	Miranda de Ebro	Primera ciudad importante de la cuenca principal. Área Industrial	-	-	1.0	2.6
	ZAD	Zadorra	Villodas	Recibe la influencia de Vitoria	1.9	1.4	6.5	5.2
	EBR3	Ebro	Haro	Recibe la influencia de los campos de vino	-	-	2.4	4.0
	NAJ	Nájerilla	San Asensio	Importante zona agrícola vitivinícola, en el margen derecho	3.7	10	3.1	2.9
	ARG	Arga	Echauri	Aguas abajo de Pamplona WWTP	3.7	1.5	1.5	1.1
	EBR4	Ebro	Mendavia	Aguas abajo de Logroño WWTP	26	31	0.51	1.4
	EBR5	Ebro	El Bocal (Tudela)	Aguas abajo de Tudela WWTP	-	-	*	2.3
Cuenca del Ebro	GAL1	Gállego	Jabarrella	Sitio de referencia de la cuenca del Gállego	10	7.0	2.3	0.42
	GAL2	Gállego	Villanueva de Gállego	Gran influencia de los campos agrícolas	10	10	0.89	2.5
	HUE	Huerva	Zaragoza	Dentro de la ciudad de Zaragoza. Recibe los efluentes de muchas áreas industriales.	1.3	2.1	2.4	1.2
	EBR6	Ebro	Presa de Pina	Aguas abajo Zaragoza WWTP	80	44	2.5	3.8
	MAR	Martín	Alcaine	Sitio de referencia en el margen derecho del Ebro	0.22	0.22	3.0	2.8
	ESE	Ésera	Graus	Sitio típico de muestreos	-	5.6	0.35	0.34
	CIN1	Cinca	Graus	Aguas abajo de la presa de Grado. Sitio típico de muestreos	-	-	2.1	0.84
	CIN2	Cinca	Monzón	Descargue la ciudad de Monzón y una zona industrial que produce compuestos de cloro	-	-	1.5	1.8
	RS	Ribera Salada	Inglabaga	Sitio típico de muestreos	-	-	0.68	3.0
	SEG	Segre	Torres de Segre	Aguas abajo Lleida WWTP	27	31	0.59	4.9
	MAT	Matarranya	Nonaspe	Sitio típico de muestreos	0.030	0.010	0.46	2.4
	ALG	Algars	Batea	Sitio típico de muestreos	0.00	0.000	0.90	0.56
	EBR7	Ebro	Ascó	Aguas abajo del área industrial de cloro de Flix, en medio de un área agrícola	213	155	1.6	3.1
	EBR8	Ebro	Tortosa	Aguas abajo Tortosa WWTP	131	105	*	*
	EBR9	Ebro	Deltebre	Último punto antes de que el Ebro llegue al mar. Campos de arroz	-	-	2.0	0.71

Anexo B. Información adicional capítulos 3 y 4

Tabla BII.1.b Descripción y características de los sitios de muestreo de las cuencas del Llobregat y Júcar durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

	Código	Río	Ubicación	Descripción del punto	Características del agua		Características del sedimento	
					flujo (m ³ /s)	flujo (m ³ /s)	TOC (% C org)	
					C1	C2	C1	C2
Cuenca del Llobregat	LLO1	Llobregat	La Pobla de Lillet. Llobregat	Buena calidad	0.52	-	1.2	1.3
	LLO2	Llobregat	Colònia Rosal. Llobregat	Presa aguas arriba de Guardiola de Berguedà	-	-	2.1	2.2
	LLO3	Llobregat	Vilomara. Llobregat	Tramo medio del río Llobregat	-	-	1.0	1.3
	CAR1	Cardener	Olius. Cardener	Estación de referencia	-	-	1.8	2.1
	CAR2	Cardener	Clariana de Cardener. Cardener	Entre la presa y la WWTP Cardona	3.6	2.6	3.2	2.8
	CAR3	Cardener	Súria. Cardener	Aguas abajo Súria and Cardona	3.6	1.9	3.0	1.3
	CAR4	Cardener	Manresa. Cardener	Aguas abajo Manresa WWTP	3.9**	-	2.3	1.8
	LLO4	Llobregat	Castellbell i el Vilar. Llobregat	Confluencia con el río Cardener	15	7.3	1.5	2.0
	LLO5	Llobregat	Abrera. Llobregat	Aguas arriba Abrera WWTP	15	-	0.91	0.56
	ANO1	Anoia	Jorba. Anoia	Sitio contaminado (pesticidas)	0.12	-	1.5	1.1
	ANO2	Anoia	La Pobla de Claramunt. Anoia	Sitio contaminado (industria)	-	-	3.4	4.8
	ANO3	Anoia	Anoia-Llobregat. Anoia	Aguas abajo de Sant Sadurní. Estiramiento final de Anoia	1.0	0.39	0.29	1.2
	LLO6	Llobregat	Martorell. Llobregat	Aguas abajo Abrera WWTP	27	-	0.27	0.65
	LLO7	Llobregat	Sant Joan Despí. Llobregat	Tramo final del Llobregat	21	4.99	1.4	2.1
Cuenca del Júcar	JUC1	Júcar	Huéllamo	No hay grandes presas. Sitio de referencia	-	-	1.1	1.20
	JUC2	Júcar	Cuenca	En la ciudad de Cuenca	3.7	2.9	1.7	0.65
	JUC3	Júcar	Fresneda de Altarejos	Aguas arriba de la presa de Alcorcón. Influencia mitigada de la ciudad de Cuenca	-	-	2.1	2.0
	JUC4	Júcar	Quasiermas	Llega a la sequía en varias ocasiones	2.9	3.0	3.5	1.0
	JUC5	Júcar	Jalance	Aguas arriba de la presa El Molinar	2.8	3.0	1.8	3.43
	CAB1	Cabriel	Salvacañete	Se convierte en sequía en verano	-	-	1.3	3.83
	CAB2	Cabriel	Pajaroncillo	Usado para varios modelos hidráulicos	3.0	2.4	0.82	1.89
	CAB3	Cabriel	Villar del Humo	Zona aluvial	-	-	1.7	1.41
	CAB4	Cabriel	Venta del Moro	Aguas debajo de la presa Contreras	7.7	0.66	1.2	1.95
	CAB5	Cabriel	Villatoya	Antes de la confluencia con el río Júcar y la presa de Embarcaderos río arriba	-	-	1.7	0.85
	JUC6	Júcar	Cotes	Aguas arriba del canal de irrigación del Júcar	2.5	1.3	2.1	0.51
	JUC7	Júcar	Alzira	Recibe las aguas de Alzira	-	-	2.0	2.4
	MAG1	Magro	Requena	Sitio de referencia. Ciudad sin WWTP	-	-	1.3	2.9
	MAG2	Magro	Carlet	Río arriba la confluencia con el río Júcar. Presencia de la industria	0.00	0.00	3.7	1.92
JUC8	Júcar	Sueca	Próximo a la desembocadura	4.4	4.5	0.84	2.6	

Tabla BII.1.c Descripción y características de los sitios de muestreo de la cuenca del Guadalquivir durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

	Código	Río	Ubicación	Descripción del punto	Características del agua		Características del sedimento	
					flujo (m ³ /s)	flujo (m ³ /s)	TOC (% C org)	
					C1	C2	C1	C2
Cuenca del Guadalquivir	BOR	Borosa	La Iruela	Buena calidad	-	-	1.4	2.19
	GUA1	Guadalquivir	Villacarrilo	Corriente principal	-	-	0.66	0.79
	GUAM	Guadiana Menor	Úbeda	Red SAICA	-	-	0.43	0.63
	GUA2	Guadalquivir	Puente del Obispo (Baeza)	Corriente principal	16	4.6	0.47	0.68
	MAG	Magaña	Santa Elena	Buena calidad	-	-	1.0	0.77
	GUAN	Guadabullón	Mengibar	Red SAICA	-	5.0	0.60	0.63
	GUA3	Guadalquivir	Marmolejo	Corriente principal	45	8.5	0.71	0.69
	YEG	Yeguas	Cardeña	Sitio contaminado (purinos)	-	-	3.5	3.4
	GUAL	Guadalmoral	Baena	Actividad agrícola (olivos). Sitio contaminado	-	-	0.44	0.84
	GUA4	Guadalquivir	Córdoba	Aguas abajo Córdoba WWTP	-	-	0.34	1.2
	PIC	Picachos	Fuente palmera	Actividad agrícola (naranjos). Sitio contaminado	-	-	0.64	0.50
	BEM	Bembézar	Hornachuelos	Buena calidad	-	-	0.82	0.41
	CAC	Cacín	Arenas del rey	Buena calidad	-	-	3.5	1.00
	GEN1	Genil	Loja	Aguas abajo Loja WWTP	0.00	0.0	0.87	0.68
	GEN2	Genil	Écija	Aguas abajo Écija WWTP	22	3.5	0.59	1.5
	GUA5	Guadalquivir	Peñaflor	Corriente principal	40	10.6	1.1	1.0
	COR	Corbones	Carmona	Red SAICA	1.4	2.9	0.78	0.59
	HER	Herreros	Alcalá del Río	Actividad agrícola (cereal). Sitio contaminado	-	-	1.1	1.1
	GUAA	Guadaira	Morón	Campo militar río abajo y Morón	-	-	1.0	1.1
	GUA6	Guadalquivir	Coria del Río	Estuario y aguas abajo Sevilla WWTP	-	-	0.60	0.67
GUA7	Guadalquivir	Brazo del Este	Estuario	-	-	0.53	0.39	
GUA8	Guadalquivir	Rancho de Barzoques	Estuario	-	-	0.69	1.1	
GUAR	Guadamar	Alnalcázar	Red SAICA	5.7	0.055	1.3	1.9	
GUA9	Guadalquivir	Sanlúcar de Barrameda	Estuario	-	-	0.60	0.88	

Tabla BII.2 50% de concentración efectiva (EC50), factor de estrogénesis relativo (E2 equiv.) y límites de detección (µg/L) obtenidos para diferentes compuestos por Céspedes et al. (2004)

Compuesto	EC50 (µg)	E2 equiv ^a	LOD (µg/L) ^b
E2	4 × 10 ⁻² ± 4 × 10 ⁻²	1	0.01
E1	2.12 ± 1.16	0.01886	0.5339
E3	0.116 ± 6.4 × 10 ⁻²	0.3448	0.274
EE2	0.234 ± 0.128	0.1709	0.0538
DES	0.87 ± 0.438	0.04597	0.2207
OP	188 ± 84	2.13 × 10 ⁻⁴	63.92
NP	79.20 ± 19.8	5.05 × 10 ⁻⁴	19.8
NP1EO	2983.2 ± 396	1.336 × 10 ⁻⁵	748.63
NP2EO	bdl	bdl	bdl
NP1EC	bdl	bdl	bdl
BPA	1644 ± 388	2.43 × 10 ⁻⁵	490.32
BT	5490 ± 1322	7.286 × 10 ⁻⁶	2765.3

bdl (Por debajo del límite de detección). ^aExpresado como la relación entre los valores de EC₅₀ para E2 y para el compuesto medido. ^bLímite de detección en el ensayo

Tabla BII.3.a Niveles de concentración de los estrógenos y conjugados naturales (E2, E1, E3, E2-17G, E1-3G y E1-16G) en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Cuenca del río	E2				E1				E3				E2-17G				E1-3G				E1-16G				
	Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		
	C1	C2	C1	C1	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	
Ebro	Conc. Tot.	28	6.6	2.6	2.3	22	23	7.5	21	10	4.3	nd	1.4	nd	8.4	2.09	0.87	nd	nd	1.21	0.24	9.97	nd	0.42	nd
	Frec.	75	4.2	8.3	17	67	50	46	67	13	4.2	0	8.3	0	13	13	8.3	0	0	8.3	4.2	13	0	8.3	0
	Conc. Med.	1.4	nd	nd	nd	0.52	0.46	nd	0.43	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Mín.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	2.5	6.6	1.6	0.65	4.9	3.5	1.6	3.5	4.8	4.3	nd	0.74	nd	3.4	1.5	0.47	nd	nd	0.73	0.24	4.8	nd	0.27	nd
Llobregat	Conc. Tot.	20	1	nd	0.9	10	15	5.3	6.7	nd	5.7	1.5	nd	nd	nd	0.41	nd	nd	nd	1.5	0.093	nd	nd	nd	nd
	Frec.	93	14	0	14	43	50	57	71	0	7.1	7.1	0	0	0	14	0	0	0	21	7.1	0	0	0	0
	Conc. Med.	1.6	nd	nd	nd	nd	0.38	0.26	0.41	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Mín.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	2.2	0.57	nd	0.7	3.8	6.2	1.6	1.5	nd	5.7	1.5	nd	nd	nd	0.27	nd	nd	nd	0.77	0.093	nd	nd	nd	nd
Júcar	Conc. Tot.	3.8	nd	0.33	0.4	16	6.8	5.4	2.2	nd	nd	nd	nd	nd	7.2	3.2	nd	7.2	3.6	0.61	nd	nd	14	nd	nd
	Frec.	53	0	6.7	6.7	87	53	67	27	0	0	0	0	0	6.7	13	0	13	6.7	13	0	0	13	0	0
	Conc. Med.	0.23	nd	nd	nd	0.7	0.6	0.23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Mín.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	0.8	nd	0.33	0.4	3.4	1.2	1.9	1.4	nd	nd	nd	nd	nd	7.2	1.8	nd	6.1	3.6	0.32	nd	nd	12	nd	nd
Guadalquivir	Conc. Tot.	30	23	nd	nd	29	54	3.7	3.5	3	3.7	nd	nd	nd	nd	4.6	0.59	2.6	12	2.6	2.4	nd	21	0.67	3.2
	Frec.	79	13	0	0	75	63	54	29	4.2	4.2	0	0	0	0	21	4.2	4.2	8.3	17	4.2	0	8.3	13	4.2
	Conc. Med.	1.3	nd	nd	nd	0.72	2.2	0.12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Mín.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	4.6	7.8	nd	nd	6.5	7.3	0.8	1	3	3.7	nd	nd	nd	nd	1.6	0.59	2.6	8.3	1.8	2.4	nd	13	0.26	3.2

Conc. Tot. (concentración total). Frec. (Frecuencia). Conc. Med. (concentración mediana). Conc. Mín (concentración mínima). Conc. Máx. (concentración máxima). nd (no detectable)

Tabla BII.3.b Niveles de concentración de los estrógenos conjugados naturales y sintéticos (E1-3S, E3-3S, EE2 y DES) y de los desinfectantes (TCC y TCS) en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Cuenca del río	E1-3S				E3-3S				EE2				DES				TCC				TCS				
	Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		
	C1	C2	C1	C1	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	
Ebro	Conc. Tot.	6.2	6.1	nd	nd	nd	nd	0.61	0.4	nd	nd	nd	2.1	nd	nd	nd	0.32	nd	nd	27	45	16	19	445	782
	Frec.	13	17	0	0	0	0	17	8.3	0	0	0	4.2	0	0	0	4.2	0	0	25	25	17	4.2	54	75
	Conc. Med.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.3	4.2
	Conc. Mín.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	3.1	2.7	nd	nd	nd	nd	0.26	0.35	nd	nd	nd	2.1	nd	nd	nd	0.32	nd	nd	10	29	8.4	19	163	388
Llobregat	Conc. Tot.	nd	nd	nd	nd	nd	13	0.46	0.17	nd	nd	1.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4.7	11	18	11	317	645
	Frec.	0	0	0	0	0	7.1	21	14	0	0	7.1	0	0	0	0	0	0	0	7.1	21	29	14	71	79
	Conc. Med.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.6	5.2
	Conc. Mín.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	nd	nd	nd	nd	nd	13	0.35	0.12	nd	nd	1.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4.7	7.4	14	10	115	343
Júcar	Conc. Tot.	11	6.5	nd	nd	7.4	nd	0.23	1.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.9	1.4	nd	nd	7.2	98	61
	Frec.	60	20	0	0	6.7	0	13	6.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.7	6.7	0	0	6.7	53	33
	Conc. Med.	0.38	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.4	nd
	Conc. Mín.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	3.1	5	nd	nd	7.4	nd	0.13	1.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.9	1.4	nd	nd	7.2	30	39
Guadalquivir	Conc. Tot.	18	21	nd	nd	10	nd	0.19	2.8	nd	2.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.4	1.1	1.6	2.7	nd	65	41
	Frec.	33	21	0	0	4.2	0	13	29	0	4.2	0	0	0	0	0	0	0	4.2	4.2	4.2	8.3	0	71	54
	Conc. Med.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.7	0.68
	Conc. Mín.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	9.3	5.4	nd	nd	10	nd	0.11	2	nd	2.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.4	1.1	1.6	1.7	nd	23	11

Conc. Tot. (concentración total). Frec. (Frecuencia). Conc. Med. (concentración mediana). Conc. Mín (concentración mínima). Conc. Máx. (concentración máxima). nd (no detectable)

Tabla BII.3.c Niveles de concentración de los parabenos (MeP, EtP, PrP y BeP) y el BPA en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Cuenca del río	MeP				EtP				PrP				BeP				BPA				
	Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	
Ebro	Conc. Tot.	313	88	1350	892	170	53	7.2	2.3	88	101	31	32	12	38	nd	0.42	379	919	417	288
	Frec.	100	63	92	96	83	33	46	17	100	88	83	79	21	29	0	25	71	88	79	42
	Conc. Med.	6.8	4	30	26	2.9	nd	nd	nd	1.4	4.5	0.86	0.65	nd	nd	nd	nd	10	29	7.9	nd
	Conc. Mín.	1.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.52	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	142	15	435	130	49	21	2.7	1.6	16	15	6	8.8	7.3	6.5	nd	0.13	61	229	100	93
Llobregat	Conc. Tot.	122	36	365	268	66	51	4.5	2.1	33	67	10	22	nd	27	nd	nd	1251	1333	215	314
	Frec.	100	43	79	100	64	50	71	29	71	86	93	100	0	43	7.1	14	79	100	79	93
	Conc. Med.	5.7	nd	20	20	1.5	0.6	0.21	nd	0.94	4.4	0.59	1.5	nd	nd	nd	nd	29	63	10	16
	Conc. Mín.	1.9	nd	nd	1.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.6	nd	nd	nd	nd	nd	6.8	nd	nd
	Conc. Máx	51	9.5	95	44	41	13	0.91	1.2	20	13	1.6	3.9	nd	6.7	0.066	0.062	530	649	53	117
Júcar	Conc. Tot.	155	143	270	722	46	52	3.9	11	45	66	17	13	0.6	18	0.11	nd	332	499	77	151
	Frec.	87	80	93	60	80	40	33	87	93	100	93	87	6.7	47	13	0	93	93	80	87
	Conc. Med.	4.1	6.6	18	54	1.7	nd	nd	0.54	2.6	2.3	0.71	0.76	nd	nd	nd	nd	24	26	3.1	8.6
	Conc. Mín.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	41	47	62	226	11	17	1.6	2.3	11	16	5.3	2.3	0.56	6.8	0.058	nd	41	84	19	24
Guadalquivir	Conc. Tot.	233	196	326	561	55	79	9.2	17	77	234	22	24	0.87	36	nd	nd	438	986	135	159
	Frec.	100	54	88	71	83	63	79	92	92	92	83	96	4.2	42	0	0	75	79	71	75
	Conc. Med.	6.4	2.5	7.6	27	1.6	1.4	0.29	0.63	1.4	10	0.86	1.1	nd	nd	nd	nd	13	23	3	4.4
	Conc. Mín.	3.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Conc. Máx	59	46	79	63	8.8	14	1.3	1.8	26	24	3.5	2.2	0.87	7.2	nd	nd	81	281	23	31

Conc. Tot. (concentración total). Frec. (Frecuencia). Conc. Med. (concentración mediana). Conc. Mín (concentración mínima). Conc. Máx. (concentración máxima). nd (no detectable)

Tabla BII.3.d Niveles de concentración de los compuestos alquilfenólicos (OP, NP, OP1EC, NP1EC, OP2EO y NP2EO) en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Cuenca del río	OP				NP				OP1EC				NP1EC				OP2EO				NP2EO				
	Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		Agua río		Sedimento		
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	
Ebro	Conc. Tot.	98	46	232	160	226	1165	3825	3205	nd	nd	nd	nd	3160	2064	109	106	65	85	4.9	3.9	660	1173	219	256
	Frec.	100	46	63	33	79	33	92	96	0	0	0	4.2	100	71	38	42	96	58	17	25	100	96	88	92
	Conc. Med.	3.7	nd	7.6	nd	6.5	nd	62	115	nd	nd	nd	nd	32	7.8	nd	nd	2.4	0.73	nd	nd	12	7.9	3.3	2.4
	Conc. Mín.	2.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6.3	nd	nd	nd
	Conc. Máx	9.9	11	45	76	45	391	1693	568	nd	nd	nd	0.23	1028	666	45	45	8.3	16	2.2	1.3	275	882	72	116
Llobregat	Conc. Tot.	100	101	90	52	263	189	2100	1207	nd	1.3	nd	nd	3590	2459	86	206	146	69	1.7	11	921	257	161	190
	Frec.	100	29	43	21	93	29	100	93	0	7.1	0	0	93	86	79	79	100	71	29	64	100	100	86	93
	Conc. Med.	5.1	nd	nd	nd	17	nd	50	76	nd	nd	nd	nd	105	41	3.3	1.5	10	3.9	nd	0.6	16	15	4.2	3.8
	Conc. Mín.	2.4	nd	nd	nd	nd	nd	19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.3	nd	nd	nd	6.5	1.3	nd	nd
	Conc. Máx	16	85	21	39	42	116	470	203	nd	1.3	nd	nd	990	852	26	119	29	33	0.95	5.5	288	63	39	114
Júcar	Conc. Tot.	106	3.1	22	160	851	274	984	2372	nd	nd	nd	nd	1667	306	33	11	39	14	3.6	0.5	314	81	59	35
	Frec.	100	20	13	60	60	27	93	93	0	0	0	0	100	87	27	27	93	47	20	6.7	100	87	80	53
	Conc. Med.	5	nd	nd	7.9	11	nd	50	66	nd	nd	nd	nd	24	8.5	nd	nd	2	nd	nd	nd	17	3.3	1.7	0.64
	Conc. Mín.	2.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8.4	nd	nd	nd
	Conc. Máx	35	1.4	13	37	191	151	175	1035	nd	nd	nd	nd	790	75	12	5.3	6.6	5.6	1.8	0.5	75	20	21	19
Guadalquivir	Conc. Tot.	147	168	137	19	1465	1714	1295	1635	nd	nd	nd	nd	3755	1468	16	19	55	151	3.6	5.5	564	1153	73	61
	Frec.	100	38	46	13	88	71	100	100	0	0	0	0	96	50	29	25	92	83	25	21	100	96	100	83
	Conc. Med.	5.2	nd	nd	nd	45	19	43	36	nd	nd	nd	nd	77	1	nd	nd	1.5	5.3	nd	nd	11	17	1.9	2.3
	Conc. Mín.	2.6	nd	nd	nd	nd	nd	6.1	8.9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.8	nd	nd	nd
	Conc. Máx	17	33	28	9	178	292	190	198	nd	nd	nd	nd	1546	340	8.5	11	8.6	26	1.5	3	196	605	15	7.6

Conc. Tot. (concentración total). Frec. (Frecuencia). Conc. Med. (concentración mediana). Conc. Mín (concentración mínima). Conc. Máx. (concentración máxima). nd (no detectable)

OP1EO y NP1EO no se detectaron en ningún punto de muestreo

Tabla BII.3.e Niveles de concentración de los anticorrosivos (BT y TT), compuestos organofosforados (TBEP, TCCP y TCEP) y del marcador Caff en agua de río (ng/L) y sedimentos (ng/g) de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Cuenca del río	BT				TT				TBEP				TCCP				TCEP				Caff					
	Aqua río		Sedimento		Aqua río		Sedimento		Aqua río		Sedimento		Aqua río		Sedimento		Aqua río		Sedimento		Aqua río		Sedimento			
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2		
Ebro	Conc. Tot.	2303	1218 2	205	121	4596	7147	10 0	94	1407	2531	259	292	1691	9015	1283	1248	405	567	97	91	2517	8101	227	107	
	Frec.	92	100	42	33	100	88	92	92	100	100	92	96	100	83	88	96	100	92	88	92	100	100	83	75	
	Conc. Med.	34	379	nd	nd	54	118	0.9	1.2	51	75	6.8	10	38	106	10	10	10	7.6	1.3	1	61	152	4.9	3.3	
	Conc. Mín.	nd	128	nd	nd	1	nd	nd	nd	7.4	17	nd	nd	12	nd	nd	nd	1.8	nd	nd	nd	14	36	nd	nd	
	Conc. Máx	1148	1539	160	58	1751	1652	26	41	146	659	59	39	255	6377	459	417	79	146	35	54	419	3237	96	21	
Llobregat	Conc. Tot.	3179	5996	855	76	3131	12070	40	143	1497	783	127	185	3106	3024	853	691	722	158	68	40	2547	3518	93	86	
	Frec.	93	100	29	64	100	86	93	100	100	100	100	100	100	71	100	100	100	93	100	100	100	100	100	79	
	Conc. Med.	97	295	nd	1.4	123	163	1.8	2.4	90	39	7.1	9.2	92	63	21	21	18	6.8	2.5	1.8	111	156	5.2	5.1	
	Conc. Mín.	nd	130	nd	nd	1.7	nd	nd	0.58	32	5.3	2.9	3.2	13	nd	3.2	1.6	6	nd	0.1	0.56	15	7	0.86	nd	
	Conc. Máx	1623	1261	842	40	750	7018	17	72	315	216	20	52	964	1117	238	205	232	39	20	7.8	572	1221	17	31	
Júcar	Conc. Tot.	698	2530	15	1.4	753	714	15	51	880	925	129	172	1558	1198	285	243	269	219	18	50	1449	4173	60	400	
	Frec.	67	100	47	6.7	100	53	93	87	100	100	93	100	100	73	93	93	100	100	93	100	100	100	80	93	
	Conc. Med.	11	185	nd	nd	9.3	13	0.6	1.4	49	50	5.1	12	31	30	5.8	8.7	10	6.9	0.54	2.8	97	131	3.3	8.9	
	Conc. Mín.	nd	108	nd	nd	2	nd	nd	nd	18	9.1	nd	3.4	15	nd	nd	nd	3.8	nd	nd	0.74	8.8	53	nd	nd	
	Conc. Máx	424	451	5.6	1.4	391	266	4.3	13	125	285	38	27	893	306	77	83	56	58	6.1	6.3	206	1644	15	273	
Guadalquivir	Conc. Tot.	2161	9745	329	151	2765	3312	59	65	1471	2132	213	219	2931	6324	211	456	603	386	30	103	3072	1019 3	424	811	
	Frec.	63	100	50	21	96	96	10 0	92	100	100	100	100	100	96	100	100	100	96	100	100	100	100	100	88	92
	Conc. Med.	39	276	0.23	nd	43	91	1.0 8	1.72	46	52	5.3	4.6	63	256	5.6	7.4	13	11	0.62	2.4	64	368	4.3	17	
	Conc. Mín.	nd	58	nd	nd	nd	nd	0.2 5	nd	15	7.5	2.8	1.4	13	nd	0.71	3.4	3.3	nd	0.07 3	0.13	12	36	nd	nd	
	Conc. Máx	1238	3185	309	136	875	397	32	24	251	378	66	50	778	618	42	85	147	144	5.6	24	672	1542	286	344	

Conc. Tot. (concentración total). Frec. (Frecuencia). Conc. Med. (concentración mediana). Conc. Mín (concentración mínima). Conc. Máx. (concentración máxima). nd (no detectable)

Tabla BII.4.a Actividad estrogénica total en las muestras de agua de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/L de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Punto de muestreo	E2		E1		E3		EE2		OP		NP		NP1EC		BPA		BT	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
EBR1	1.9	-	0.015	0.022	0.6	-	-	-	0.0008	0.0004	0.00017	-	0.000082	0.00012	0.0002	0.001	-	0.0014
OCA	2	-	0.02	0.022	1.1	-	-	-	0.00077	0.0012	-	-	0.001	0.0044	0.00023	0.00086	0.00027	0.0096
EBR2	-	-	0.0051	0.017	-	-	-	-	0.00087	0.00023	0.0046	-	0.00042	0.00051	0.00069	0.00004	0.00012	0.0012
ZAD	-	-	0.074	0.065	-	-	-	-	0.0021	0.0024	0.0066	-	0.014	0.0089	0.0012	-	0.0084	0.0083
EBR3	1.7	-	0.015	0.021	-	-	-	-	0.0018	0.0014	0.023	0.1	0.0057	0.00085	0.0012	0.000061	0.0007	0.005
NAJ	-	-	0.0068	-	-	-	-	-	0.00062	-	0.0011	0.017	0.0011	0.000088	0.00068	0.00074	0.00013	0.0037
ARG	1.9	-	0.086	0.064	-	-	-	-	0.00093	0.00056	0.0002	-	0.0077	0.0025	0.0015	0.0017	0.002	0.0067
EBR4	1.7	-	0.025	0.039	-	-	-	-	0.0011	-	0.0033	0.2	0.0014	0.0018	0.0003	0.00081	0.00088	0.0025
EBR5	1.1	-	0.011	-	-	-	-	-	0.00087	0.0011	0.0016	-	0.00072	0.00049	0.00025	0.0028	0.00056	0.0029
GAL1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00074	-	-	-	0.00011	0.00012	-	0.00029	0.0002	0.0028
GAL2	1.5	-	-	-	-	-	-	-	0.00093	-	0.011	-	0.00021	-	0.00068	0.00066	0.00028	0.0044
HUE	-	-	0.092	0.063	1.7	-	-	-	0.00073	-	0.0059	-	0.0056	0.0064	0.0007	0.0056	0.00092	0.0044
EBR6	1.4	-	0.013	0.021	-	-	-	-	0.00088	0.00025	-	-	0.00089	0.00098	0.00045	0.0016	0.0004	0.0022
MAR	-	-	0.01	-	-	-	-	-	0.00055	-	0.00079	-	0.00015	-	0.00028	0.0018	0.00018	0.0011
ESE	1.5	-	-	-	-	1.5	-	-	0.001	-	0.0047	-	0.00019	-	-	0.0011	0.00004	0.0034
CIN1	1.4	-	-	-	-	-	-	-	0.00059	-	0.0011	-	0.000074	0.000044	0.00023	-	0.00004	0.0012
CIN2	1.1	-	-	0.027	-	-	-	-	0.00062	-	0.018	0.075	0.00014	-	0.00015	0.00031	0.00016	0.0016
RS	1.2	-	-	-	-	-	-	-	0.0006	-	0.0073	-	0.00011	0.000089	-	0.001	0.000039	0.0013
SEG	1.4	-	0.015	-	-	-	-	-	0.00065	0.00012	0.0076	-	0.00096	-	0.00014	0.00011	0.00046	0.011
MAT	2	-	-	-	-	-	-	-	0.00063	0.00013	0.0044	-	0.0001	0.000075	-	0.001	0.00024	0.0025
ALG	1.6	-	0.017	-	-	-	-	-	0.00089	-	0.0052	0.013	0.00019	0.000054	-	-	-	-
EBR7	2.5	6.6	0.0093	-	-	-	-	-	0.00078	0.0019	0.0033	0.039	0.00074	-	0.00026	0.00021	0.00026	0.0021
EBR8	1.2	-	-	0.03	-	-	-	-	0.00078	-	0.0027	-	0.00042	-	-	0.00062	0.00031	0.0082
EBR9	0.9	-	0.0055	0.034	-	-	-	-	0.00072	-	0.0021	0.13	0.00043	0.00016	-	0.00016	0.00023	0.00093
EEQ t (Ebro)	28	6.6	0.4197	0.425	3.4	1.5	0	0	0.02095	0.00969	0.11466	0.574	0.042436	0.02758	0.00914	0.022471	0.016819	0.08843

Tabla BII.4.b Actividad estrogénica total en las muestras de agua de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/L de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Punto de muestreo	E2		E1		E3		EE2		OP		NP		NP1EC		BPA		BT	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
LLO1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0012	0.0023	0.0097	-	0.00014	0.0001	0.0023	0.0018	0.000052	0.0013
LLO2	0.4	0.42	0.01	0.038	-	-	-	-	0.00085	-	0.0024	-	0.0001	-	0.00011	0.00082	0.0012	0.0014
LLO3	1.4	0.57	-	-	-	2	-	-	0.00061	-	0.0058	-	0.0014	0.00054	-	0.0022	0.00068	0.002
CAR1	1.9	-	-	-	-	-	-	-	0.00051	-	0.0054	-	-	0.000038	0.000081	0.00017	0.000064	0.0012
CAR2	1.7	-	-	-	-	-	-	-	0.001	0.00026	0.011	0.00056	0.000087	0.000034	-	0.00022	-	0.00095
CAR3	1.6	-	-	-	-	-	-	-	0.0029	-	-	-	0.00064	0.00045	0.0001	0.00054	0.000091	0.0014
CAR4	1.6	-	-	0.014	-	-	-	-	0.00063	-	0.016	-	0.0013	0.00056	0.0015	0.0019	0.00073	0.0057
LLO4	2.2	-	-	0.028	-	-	-	-	0.00069	0.00089	0.0082	0.034	0.0015	0.00088	0.00065	0.0013	0.00083	0.0023
LLO5	1.7	-	0.019	0.033	-	-	-	-	0.0018	-	0.0021	0.0024	0.0037	0.0013	0.0012	0.0019	0.00053	0.0018
ANO1	1	-	-	0.037	-	-	-	-	0.00094	-	0.017	-	0.002	-	-	0.00021	0.00047	0.0032
ANO2	1.7	-	0.072	-	-	-	-	-	0.0024	-	0.021	-	0.013	0.0089	0.0018	0.0019	0.0021	0.0058
ANO3	0.9	-	0.037	-	-	-	-	-	0.0011	-	0.0048	-	0.012	0.0065	0.00075	0.016	0.012	0.0042
LLO6	1.7	-	0.03	0.02	-	-	-	-	0.0031	-	0.0091	0.059	0.0042	0.0022	0.013	0.0013	0.0014	0.0033
LLO7	2.2	-	0.028	0.12	-	-	-	-	0.0035	0.018	0.02	-	0.0075	0.011	0.009	0.0025	0.0032	0.0092
EEQ t (Llobregat)	20	0.99	0.196	0.29	0	2	0	0	0.02123	0.02145	0.1325	0.09596	0.047567	0.032502	0.030491	0.03276	0.023347	0.04375
JUC1	0.26	-	0.039	-	-	-	-	-	0.0015	-	0.061	0.023	0.00023	0.000095	0.00017	0.00026	-	0.0013
JUC2	0.37	-	0.014	0.015	-	-	-	-	0.0014	-	0.054	-	0.00023	0.00018	0.00026	0.0014	0.000079	0.0014
JUC3	-	-	0.014	-	-	-	-	-	0.0017	-	0.097	-	0.0016	-	0.001	0.0009	0.00022	-
JUC4	-	-	0.01	0.017	-	-	-	-	0.00073	-	-	-	0.00065	0.00019	0.0003	0.0013	0.000092	0.00079
JUC5	-	-	0.0056	0.012	-	-	-	-	0.0011	-	0.017	0.036	0.00013	0.000084	0.0006	0.0021	0.000059	0.001
CAB1	0.74	-	-	0.02	-	-	-	-	0.0075	-	0.092	0.0027	0.00036	0.00011	0.001	0.00053	-	0.0016
CAB2	0.32	-	-	0.013	-	-	-	-	0.0019	-	0.096	-	0.0003	0.00023	-	0.00056	-	0.00095
CAB3	0.35	-	0.025	-	-	-	-	-	0.00053	0.00011	-	-	0.00017	0.00013	0.00015	0.0005	0.000071	0.0012
CAB4	0.71	-	0.015	-	-	-	-	-	0.00058	0.0003	0.00035	0.076	0.00033	0.00011	0.00028	0.00044	-	0.0023
CAB5	0.23	-	0.035	0.012	-	-	-	-	0.0013	-	-	-	0.00018	0.000088	0.001	-	-	0.0013
JUC6	-	-	0.0049	-	-	-	-	-	0.00079	-	0.0077	-	0.00031	0.000068	0.00084	0.0013	0.0001	-
JUC7	0.8	-	0.013	0.017	-	-	-	-	0.00087	0.00024	-	-	0.0019	0.00093	0.00071	0.00064	0.00022	0.0014
MAG1	-	-	0.063	-	-	-	-	-	0.0011	-	0.0055	-	0.011	-	0.00039	0.00069	0.0031	0.0033
MAG2	-	-	0.042	0.022	-	-	-	-	0.00076	-	-	-	0.0028	0.001	0.00082	0.00054	0.00085	-
JUC8	-	-	0.032	-	-	-	-	-	0.00084	-	-	-	0.0024	0.00087	0.00057	0.001	0.00031	0.0019
EEQ t (Júcar)	3.78	0	0.3125	0.128	0	0	0	0	0.0226	0.00065	0.43055	0.1377	0.02259	0.004085	0.00809	0.01216	0.005101	0.01844

Tabla BII.4.c Actividad estrogénica total en las muestras de agua de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/L de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Punto de muestreo	E2		E1		E3		EE2		OP		NP		NP1EC		BPA		BT	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
BOR	1.2	-	-	-	-	1.3	-	-	0.00072	-	0.00059	-	0.002	-	0.0012	0.0026	-	0.002
GUA1	1.7	-	-	0.052	-	-	-	-	0.00077	-	-	0.0019	0.0001	0.00012	0.00016	0.00076	0.000062	-
GUAM	1.9	-	0.006	0.036	-	-	-	-	0.00091	0.0039	0.0029	0.093	0.00013	-	-	0.00016	-	0.0063
GUA2	1.2	-	-	0.14	-	-	-	-	0.00081	0.007	0.0049	0.15	0.0015	0.0045	0.00038	0.0019	-	-
MAG	-	7.5	0.12	0.044	-	-	-	-	0.0011	-	-	-	0.000095	-	0.00026	-	-	-
GUAN	2	-	0.029	0.061	-	-	-	-	0.0011	-	0.0086	0.008	0.0046	0.002	0.00059	0.00084	0.00027	0.0016
GUA3	4.6	-	0.024	0.082	-	-	-	-	0.00072	-	0.0076	0.13	0.0013	0.0029	0.002	0.0068	-	-
YEG	2.2	-	0.019	0.081	-	-	-	-	0.00077	0.0041	0.0036	-	0.001	0.00045	0.00036	-	0.00017	0.0092
GUAL	1.4	7.3	-	-	-	-	-	-	0.00099	0.004	0.022	0.12	0.00094	-	0.00071	0.00093	-	0.0041
GUA4	1.5	-	0.036	0.083	-	-	-	-	0.00093	0.0026	0.0051	0.03	0.0032	0.0015	0.0015	0.0005	0.00063	0.0017
PIC	2	7.8	0.011	0.048	-	-	-	-	0.00056	-	0.00019	-	0.0012	-	0.00032	-	0.00037	0.00088
BEM	1.4	-	0.024	0.127	-	-	-	-	0.00066	-	0.024	0.02	0.00015	-	0.00023	0.0013	0.00046	0.002
CAC	0.75	-	-	-	-	-	-	-	0.0034	-	0.044	0.05	-	0.000027	0.00049	0.00023	-	0.0053
GEN1	1	-	0.069	0.07	-	-	-	-	0.0037	-	0.045	-	0.0023	0.0026	0.00061	0.0002	0.00085	0.002
GEN2	-	-	0.0094	-	-	-	-	-	0.0012	0.0023	0.054	0.059	0.0011	0.0016	-	0.0026	0.00029	0.0016
GUA5	0.5	-	-	-	-	-	-	-	0.0011	0.0065	0.058	0.012	0.0015	-	-	-	0.00034	0.00042
COR	-	-	0.013	0.039	-	-	-	-	0.0031	-	0.047	-	0.00059	-	0.00068	0.00024	-	0.0044
HER	-	-	0.011	0.057	-	-	-	-	0.0013	-	0.064	0.0017	0.00058	0.00054	0.00029	0.00061	-	-
GUAA	2.2	-	0.014	0.064	-	-	-	-	0.0015	-	0.085	0.02	0.021	0.0016	-	0.0012	0.0013	0.0018
GUA6	-	-	0.033	0.033	1.1	-	-	-	0.0016	0.00077	0.046	0.11	0.0035	0.0017	0.00047	0.0014	0.00069	0.001
GUA7	1.5	-	0.021	-	-	-	-	-	0.00074	0.0046	0.0075	0.0036	0.00038	-	-	-	0.00052	-
GUA8	1.1	-	0.022	-	-	-	-	0.4	0.0012	-	0.059	0.045	0.0017	-	-	0.0011	0.0005	0.0022
GUAR	1.6	-	0.076	-	-	-	-	-	0.0012	-	0.09	0.0055	0.00069	-	0.00026	0.00028	0.009	0.023
GUA9	0.31	-	0.0081	-	-	-	-	-	0.0014	-	0.06	-	0.00098	-	0.00019	0.00027	0.00031	0.0013
EEQ t (Guadalquivir)	30.06	22.6	0.5455	1.017	1.1	1.3	0	0.38	0.03148	0.03577	0.73898	0.8597	0.050535	0.019537	0.0107	0.02392	0.015762	0.0708

Tabla BII.5.a Actividad estrogénica total en las muestras de sedimentos de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/g de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Punto de muestreo	E2		E1		E3		EE2		DES		OP		NP		NP1EC		BPA		BT	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
EBR1	-	-	-	0.0062	-	-	-	-	-	-	0.0005	0.0009	0.019	0.023	-	-	0.0003	-	-	-
OCA	-	-	0.0093	0.014	-	-	-	-	-	-	-	-	0.036	0.075	0.00003	0.0002	0.0003	0.0002	-	0.00006
EBR2	-	-	-	0.013	-	-	-	-	-	-	0.0027	-	0.85	0.052	-	-	0.0004	0.00008	-	-
ZAD	1.6	-	0.028	0.036	-	-	-	-	-	-	0.0084	0.0045	0.044	0.29	0.0005	0.0006	0.0023	0.0023	-	0.0002
EBR3	-	0.63	0.01	0.051	-	-	-	0.36	-	-	0.002	0.0018	0.018	0.11	0.00004	0.00006	0.0004	0.0003	0.00002	-
NAJ	-	-	-	0.0077	-	-	-	-	-	-	0.0022	-	0.21	0.047	-	-	0.0001	-	-	-
ARG	-	-	0.012	0.015	-	-	-	-	-	-	-	-	0.045	0.11	0.0002	0.00005	0.0024	0.0021	0.00009	0.00007
EBR4	-	-	-	0.0038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.034	-	0.00003	0.0001	0.0003	0.0012	-
EBR5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.023	0.056	-	0.00002	-	-	-	-
GAL1	-	-	0.0058	-	-	-	-	-	-	-	0.0015	-	0.045	0.022	-	-	0.0005	-	0.00001	-
GAL2	-	-	-	0.012	-	0.21	-	-	-	-	-	-	0.27	0.06	2E-06	-	0.0001	-	0.00001	6E-06
HUE	-	-	0.0071	0.049	-	-	-	-	-	-	-	-	0.041	0.12	0.0006	0.0004	0.0015	0.0012	0.00008	0.00008
EBR6	-	-	0.0085	-	-	-	-	-	-	-	0.002	-	0.06	0.083	0.00005	-	0.0003	-	-	-
MAR	1.1	-	-	0.031	-	-	-	-	-	-	0.004	-	0.013	0.068	-	-	0.0004	-	-	-
ESE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0024	0.0014	0.072	0.015	-	-	0.0004	0.0004	5E-06	9E-06
CIN1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0022	0.016	0.014	0.032	-	-	0.00007	-	-	-
CIN2	-	0.54	0.0094	0.059	-	-	-	-	-	-	0.0017	0.0067	0.014	0.072	-	0.00001	0.0001	-	-	-
RS	-	-	-	0.0036	-	-	-	-	-	-	-	0.001	0.03	0.038	-	-	0.00007	-	9E-06	-
SEG	-	0.46	-	0.026	-	-	-	-	-	-	0.0096	-	0.014	0.072	-	-	-	0.0002	-	0.00002
MAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.015	0.0013	-	0.01	0.1	-	-	-	-	8E-06	-
ALG	-	-	0.0033	-	-	-	-	-	-	-	0.0028	0.0017	0.033	0.053	-	-	0.00007	-	-	-
EBR7	-	0.65	0.031	0.065	-	0.26	-	-	-	-	0.006	-	0.055	0.064	0.00002	0.00001	0.0002	-	0.00009	-
EBR9	-	-	0.018	0.0084	-	-	-	-	-	-	-	-	0.023	0.015	0.00001	8E-06	-	0.00009	-	0.0004
EEQ t (Ebro)	2.7	2.28	0.1424	0.4007	0	0.47	0	0.36	0	0.015	0.0493	0.034	1.939	1.611	0.00145	0.00139	0.01001	0.00717	0.00152	0.00085

EBR8 no fue colectada en ninguna de las 2 campañas

Tabla BII.5.b Actividad estrogénica total en las muestras de sedimentos de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/g de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Punto de muestreo	E2		E1		E3		EE2		DES		OP		NP		NP1EC		BPA		BT	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
LLO1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.069	0.018	5E-06	4E-06	0.00007	-	-	-
LLO2	-	-	0.03	0.011	-	-	0.25	-	-	-	0.0032	-	0.027	0.067	0.0002	-	-	0.0006	0.00005	0.00008
LLO3	-	-	-	0.0077	-	-	-	-	-	-	-	-	0.023	0.028	0.00006	0.00002	0.0005	0.0005	-	0.00001
CAR1	-	0.25	0.011	0.025	-	-	-	-	-	-	0.0017	-	0.1	0.016	-	7E-06	-	0.0001	-	-
CAR2	-	-	0.014	0.018	-	-	-	-	-	-	0.0045	-	0.022	0.043	-	-	0.0005	0.0001	-	0.00001
CAR3	-	-	0.007	0.0055	-	-	-	-	-	-	-	0.0007	0.24	0.044	0.00001	-	0.0001	0.0001	-	9E-06
CAR4	-	0.69	0.018	0.028	0.5	-	-	-	-	-	-	-	0.074	0.087	0.0001	0.00003	0.0007	0.0004	0.0061	-
LLO4	-	-	0.0068	0.01	-	-	-	-	-	-	0.0044	-	0.019	0.037	0.00006	0.00005	0.0002	0.0006	0.00003	0.00003
LLO5	-	-	0.0028	-	-	-	-	-	-	-	0.0017	-	0.024	0.034	-	0.00002	-	0.0001	-	0.00002
ANO1	-	-	0.0092	0.0092	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22	0.036	0.00003	0.00002	0.0001	0.0004	-	-
ANO2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-	0.0003	0.0008	0.0006	0.0003	-	0.00009
ANO3	-	-	-	0.0035	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.1	0.00003	0.0001	0.0009	0.0029	0.00003	9E-06
LLO6	-	-	-	0.0077	-	-	-	-	-	-	-	0.0021	0.2	0.056	0.00006	0.0001	0.0003	0.0005	-	-
LLO7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0037	0.0082	-	0.04	0.0003	0.0016	0.0013	0.001	-	0.0003
EEQ t (Llobregat)	0	0.94	0.0988	0.1256	0.5	0	0.25	0	0	0	0.0192	0.011	1.038	0.606	0.00116	0.00275	0.00527	0.0076	0.00621	0.00056
JUC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0034	0.088	0.012	-	-	-	0.0001	-	-
JUC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.073	0.023	-	-	0.0003	-	6E-06	-
JUC3	-	-	0.035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.029	0.11	-	-	0.00005	0.0002	-	-
JUC4	-	0.4	0.0039	0.026	-	-	-	-	-	-	-	0.0017	0.014	0.067	-	-	0.0003	0.0006	-	-
JUC5	-	-	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.025	0.52	-	-	0.00003	0.0005	-	-
CAB1	-	-	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0079	0.025	0.033	-	-	-	-	-	-
CAB2	0.33	-	0.011	-	-	-	-	-	-	-	0.0027	0.0011	0.0048	0.017	-	-	0.00006	0.0001	-	-
CAB3	-	-	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0058	0.05	0.14	-	-	0.00008	0.00008	-	-
CAB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0033	0.0056	0.021	-	-	0.0005	0.0003	0.00002	-
CAB5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0019	-	0.01	0.014	-	-	-	0.0003	0.0009	-
JUC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	0.0047	-	-	0.00006	0.00006	0.00001	-
JUC7	-	-	0.0053	0.0032	-	-	-	-	-	-	-	0.0039	0.018	-	0.00008	0.00002	0.0001	0.0005	-	0.00001
MAG1	-	-	0.012	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0041	0.036	0.087	0.0001	0.00007	0.00008	0.0002	0.00004	-
MAG2	-	-	0.0058	0.0052	-	-	-	-	-	-	-	0.0027	0.087	0.041	0.00008	0.00001	0.0001	0.0002	0.00001	-
JUC8	-	-	0.012	0.0062	-	-	-	-	-	-	-	-	0.037	0.1	0.0002	0.00004	0.0002	0.0005	0.00001	-
EEQ t (Júcar)	0.33	0.4	0.101	0.0406	0	0	0	0	0	0	0.0046	0.0339	0.5324	1.1897	0.00046	0.00014	0.00186	0.00364	0.001	0.00001

Tabla BII.5.c Actividad estrogénica total en las muestras de sedimentos de río analizadas expresada como equivalente de estradiol (EEQ) en ng/g de las cuencas de los ríos de la Península Ibérica durante las campañas de muestreo 1 y 2 (C1 y C2)

Punto de muestreo	E2		E1		E3		EE2		DES		OP		NP		NP1EC		BPA		BT	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
BOR	-	-	0.0039	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.049	0.069	-	-	0.00004	-	3E-06	-
GUA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0031	0.016	-	-	0.00004	0.0001	-	-
GUAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0057	-	0.0037	0.064	2E-06	-	0.0001	-	7E-06	-
GUA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.011	0.053	-	0.00002	-	-	-	-
MAG	-	-	-	0.012	-	-	-	-	-	-	0.0009	-	0.028	0.0045	-	-	0.00008	0.0001	0.00001	-
GUAN	-	-	0.0029	-	-	-	-	-	-	-	0.0017	-	0.02	0.0053	0.00002	-	0.0005	0.0001	9E-06	-
GUA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0015	-	0.096	0.011	-	0.00001	0.0005	0.0001	-	0.00005
YEG	-	-	-	0.014	-	-	-	-	-	-	0.006	-	0.066	0.046	-	-	0.0006	0.0002	-	-
GUAL	-	-	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0005	0.013	0.014	9E-06	-	0.00004	0.00009	-	-
GUA4	-	-	0.0047	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.011	0.08	0.00001	0.00003	-	0.0008	0.00001	0.00004
PIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.034	0.049	-	-	-	-	7E-06	4E-06
BEM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	0.0049	-	-	0.00006	0.00005	-	-
CAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0015	0.0019	0.037	0.012	-	-	0.00007	0.00008	-	-
GEN1	-	-	0.015	0.008	-	-	-	-	-	-	0.0016	-	0.035	0.071	0.00004	0.00003	0.00007	0.0002	-	-
GEN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0016	-	0.016	0.057	-	-	0.0005	0.0003	7E-06	-
GUA5	-	-	0.0028	0.019	-	-	-	-	-	-	0.0058	-	0.024	0.1	-	-	-	0.0007	0.00006	-
COR	-	-	0.013	0.0064	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0052	0.048	-	-	-	-	-	-
HER	-	-	0.0026	-	-	-	-	-	-	-	0.0021	-	0.066	0.015	-	-	-	-	-	-
GUAA	-	-	0.0036	0.0022	-	-	-	-	-	-	-	-	0.034	0.038	0.0001	0.0002	0.00008	0.0004	-	0.00002
GUA6	-	-	0.0066	0.0047	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0051	0.011	0.00001	8E-06	0.0001	0.0001	-	-
GUA7	-	-	0.0028	-	-	-	-	-	-	-	0.0008	0.0017	0.0059	0.012	-	-	0.0002	0.0001	6E-06	-
GUA8	-	-	0.0028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.027	0.016	-	-	-	0.0003	0.00001	-
GUAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0088	0.01	-	-	0.0001	0.00006	0.0022	0.001
GUA9	-	-	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-	-	0.0004	0.0002	0.00001	-
EEQ t (Guadalquivir)	0	0	0.0697	0.0663	0	0	0	0	0	0	0.0292	0.0041	0.6188	0.8267	0.00019	0.0003	0.00348	0.00398	0.00234	0.00111

Tabla BII.6 Descripción de las EDARs analizadas y niveles de cafeína encontrados en las aguas de afluentes muestreadas

Cuenca	Abreviación	Río	Localización	Habitantes equivalentes	Observaciones	Conc. Caff (µg/L) 2010	Conc. Caff (µg/L) 2011
Ebro	PAM1	Arga	EDAR Pamplona en Arazuri (Navarra)	695232	Área industrial	48563	86220
	LOG2	Ebro	EDAR Logroño en Logroño-Varea (La Rioja)	196933	Área agrícola/industrial	82559	101274
	TUD3	Ebro	EDAR Tudela (Navarra)	46237	Área agrícola	2100	105273
	ZAR4	Ebro	EDAR Zaragoza en La Cartuja (Zaragoza)	1300000	Área industrial	29424	23192
	LLE5	Segre	EDAR Lleida (Lleida)	140000	Área agrícola	32571	43259
	TOR6	Ebro	EDAR Tortosa (Tarragona)	46847	Área agrícola	29071	78151
Llobregat	MAN7	Cardener	EDAR Manresa (Barcelona)	196167	Área industrial	31755	64568
	ABR8	Llobregat	EDAR Abrera (Barcelona)	65000	Área Industrial	NC	59823
	IGU9	Anoia	EDAR Igualada en Vilanova del Camí (Barcelona)	223000	Área industrial	14029	43981
Júcar	CUE10	Júcar	EDAR de Cuenca (Cuenca)	178080	Área agrícola	37515	74192
	ALZ11	Júcar	EDAR Alzira en Carcaixent (Valencia)	96230	Área industrial	24590	10468
Guadalquivir	COR12	Guadalquivir	EDAR Córdoba en La Golondrina	522000	Área agrícola/industrial	46321	80630
	LOJ13	Genil	EDAR Loja en Loja (Granada)	30480	Área agrícola	24161	1023
	MOR15	Arroyo del Cuerno (Guadaira)	EDAR de Morón de la Frontera (Sevilla)	-	Área agrícola	34979	7073
	SEV16	Guadalquivir	EDAR Sevilla en Copero (Sevilla)	200000	Área industrial	86305	115871
	SEV17	Guadaira	EDAR Sevilla en la Ranilla (Sevilla)	350000	Área industrial	27204	105422

* NC: No Colectada

Tabla BII.7.a Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuenca del Ebro, año 2010, en ng/L y ng/g, respectivamente

Compuesto	PAM1			LOG2			TUD3			ZAR4			LLE5			TOR6		
	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo
E2	23	5.0	<38	<5.4	2.9	<38	<5.4	6.6	<38	<5.4	4.5	<38	<5.4	5.5	<38	24	4.3	NC
E1	24	15	56	8.4	0.5	73	<0.14	20	<2.2	14	1.3	<2.2	11	4.2	<2.2	39	1.2	NC
E3	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	NC
E1-3S	18	2.6	2.6	26	3.5	<0.095	12	8.5	<0.095	8.6	1.5	<0.095	<0.35	1.0	<0.095	15	0.8	NC
E3-3S	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19	7.8	5.8	<0.19	17	8.5	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	6.3	NC
E2-17G	<4.2	<2.9	40	<4.2	<2.9	42	<4.2	<2.9	17	<4.2	<2.9	29	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	NC
E1-3G	<3.1	<0.96	<0.86	19	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	NC
E3-16G	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	NC
TCC	<0.18	<0.14	47	<0.18	<0.14	103	<0.18	<0.14	36	<0.18	<0.14	<0.13	<0.18	<0.14	63	<0.18	<0.14	NC
TCS	22	6	2842	72	15	3374	<2.1	<1.5	2629	26	<1.5	9093	10	16	1612	8.4	10	NC
MeP	25	<0.59	360	157	40	384	34	13	354	93	13	751	9.0	26	<1.9	40	17	NC
EtP	204	6.0	8.9	814	4.5	<0.13	160	<1.2	16	51	6.8	<0.13	14	<1.2	<0.13	70	<1.2	NC
PrP	19	24	77	913	15	39	16	<0.35	57	41	10	173	20	2.7	39	54	5.4	NC
BeP	<1.0	1.4	<0.78	<1.0	1.4	<0.78	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	1.7	<0.78	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	<0.12	NC
OP	60	26	<0.20	35	56	<0.20	178	21	178	28	64	234	351	21	<0.20	24	10	NC
NP	651	<0.30	4183	83	32	29416	755	85	12231	94	<0.30	6452	707	<0.30	17460	56	<0.30	NC
NP1EC	2595	2419	359	1096	1817	740	1513	3257	801	503	2263	457	445	622	655	601	1778	NC
OP2EO	75	55	28	581	36	<0.52	74	44	<0.52	68	38	<0.52	148	54	<0.52	75	<0.092	NC
NP2EO	288	180	662	2819	67	2365	350	182	6085	124	65	3386	1995	168	819	697	130	NC
BPA	13063	608	3590	592	109	262	164	50	386	220	236	<2.0	159	67	<2.0	202	57	NC
BT	1954	1115	<1.4	25418	3303	<1.4	720	695	<1.4	741	644	<1.4	425	446	<1.4	483	877	NC
TT	4901	2388	349	37760	1169	183	8500	7588	2825	1286	3311	286	3242	2105	799	2944	1853	NC
TBEP	4414	367	651	2658	276	1825	2150	2033	1256	2218	2950	2191	853	561	879	308	814	NC
TCPP	1635	4868	429	12308	36594	711	69	356	1155	494	1599	912	941	5021	909	2906	5244	NC
TCEP	588	757	<0.28	146	243	<0.28	21	165	<0.28	45	246	<0.28	275	954	<0.28	581	634	NC
Caff	48563	172	352	82559	108	<0.070	2100	477	922	29424	399	<0.070	32571	176	<0.070	29071	109	NC

* Los compuestos EE2, DES, OP1EC, OP1EO y NP1EO no se detectaron en ninguna de las EDARs analizadas

** NC: No Colectada

Tabla BII.7.b Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuenca del Ebro, año 2011, en ng/L y ng/g, respectivamente

Compuesto	<u>PAM1</u>			<u>LOG2</u>			<u>TUD3</u>			<u>ZAR4</u>			<u>LLE5</u>			<u>TOR6</u>		
	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo
E2	<5.4	<0.59	<38	<5.4	9.0	NC	<5.4	<0.59	<38	<18	11	<38	<5.4	<0.59	<38	8.8	<0.59	<38
E1	34	12	130	<0.14	14	NC	27	<0.14	<2.2	14	23	<2.2	61	25	<2.2	<0.14	9.0	<2.2
E3	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	NC	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6
E1-3S	<0.35	<0.21	<0.095	<0.35	<0.21	NC	<0.35	<0.21	<0.095	<0.35	<0.21	<0.095	<0.35	<0.21	<0.095	20	<0.21	<0.095
E3-3S	<0.99	<0.75	<0.19	31	20	NC	21	<0.75	<0.19	32	<0.75	<0.19	43	19	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19
E2-17G	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	NC	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	27
E1-3G	38	<0.96	<0.86	<3.1	30	NC	62	31	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86
E3-16G	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	NC	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74
TCC	<0.18	<0.14	298	<0.18	<0.14	NC	<0.18	<0.14	<0.13	<0.18	<0.14	<0.13	<0.18	<0.14	1289	<0.18	<0.14	523
TCS	<2.1	<1.5	10677	<2.1	<1.5	NC	<2.1	<1.5	18818	<2.1	<1.5	1526	<2.1	<1.5	2826	<2.1	<1.5	5968
MeP	31	<0.59	610	147	<0.59	NC	26	<0.59	432	<1.5	<0.59	397	144	<0.59	592	36	<0.59	1119
EtP	55	<1.2	<0.13	164	<1.2	NC	27	<1.2	<0.13	<1.4	<1.2	<0.13	257	<1.2	<0.13	46	<1.2	<0.13
PrP	54	<0.35	55	360	<0.35	NC	18	<0.35	15	<0.94	1.3	190	21	<0.35	12	119	15	220
BeP	11	<0.12	<0.78	<1.0	<0.12	NC	<1.0	<0.12	<0.78	10	<0.12	<0.78	11	<0.12	<0.78	<1.0	10	<0.78
OP	<2.9	<1.6	<0.20	<2.9	<1.6	NC	<2.9	<1.6	<0.20	<2.9	<1.6	825	12	5	<0.20	<2.9	<1.6	<0.20
NP	183	28	54575	270	35	NC	111	207	6715	143	48	2724	78	28	6759	278	141	12135
NP1EC	284	281	7881	509	394	NC	119	440	2931	125	538	11909	116	192	722	196	1099	847
OP2EO	75	2.1	<0.52	30	<0.092	NC	23	33	<0.52	67	10	<0.52	17	11	<0.52	60	<0.092	463
NP2EO	704	81	750	1406	34	NC	1400	678	6498	1236	92	1786	340	164	549	585	61	<0.074
BPA	27558	728	5083	878	140	NC	1065	760	<2.0	1561	1238	88	746	143	<2.0	1012	676	153
BT	2681	1765	<1.4	23813	6575	NC	3548	5853	<1.4	2219	2096	<1.4	1031	699	<1.4	22639	4558	239
TT	8752	4260	362	20107	2888	NC	4521	11701	651	2459	6205	254	4218	2537	3757	4073	4914	265
TBEP	5634	496	1103	4808	1235	NC	1789	2578	1534	17969	7803	3006	2431	40	850	1643	846	510
TCPP	2015	1405	1458	20245	686	NC	548	120	4378	2465	1475	1627	1075	1050	804	1507	3799	299
TCEP	65	38	<0.28	8.8	16	NC	9.0	<0.36	20	<0.36	69	<0.28	41	118	<0.28	42	81	<0.28
Caff	86220	96	39	101274	266	NC	105273	3695	<0.070	23192	7479	139	43259	257	<0.070	78151	308	289

* Los compuestos EE2, DES, OP1EC, OP1EO y NP1EO no se detectaron en ninguna de las EDARs analizadas

** NC: No Colectada

Tabla BII.8.a Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuencas del Llobregat y Júcar, año 2010, en ng/L y ng/g, respectivamente

Compuesto	MAN7			ABR8			IGU9			CUE10			ALZ11		
	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo
E2	<5.4	7.6	NC	NC	NC	NC	<5.4	7.9	<38	<5.4	<0.59	NC	<5.4	<0.59	<38
E1	6.0	0.5	NC	NC	NC	NC	17	4.2	<2.2	<0.14	9.0	NC	6.5	<0.14	<2.2
E3	<3.1	<2.3	NC	NC	NC	NC	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	NC	<3.1	<2.3	3.4
E1-3S	19	<0.21	NC	NC	NC	NC	<0.35	<0.21	<0.095	<0.35	<0.21	NC	4.9	<0.21	<0.095
E3-3S	<0.99	<0.75	NC	NC	NC	NC	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	<0.75	NC	19	<0.75	<0.19
E2-17G	<4.2	<2.9	NC	NC	NC	NC	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	NC	<4.2	<2.9	<0.58
E1-3G	<3.1	<0.96	NC	NC	NC	NC	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	24	NC	<3.1	<0.96	<0.86
E3-16G	<7.5	<2.0	NC	NC	NC	NC	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	NC	<7.5	<2.0	<0.74
TCC	<0.18	<0.14	NC	NC	NC	NC	<0.18	<0.14	72	<0.18	<0.14	NC	<0.18	<0.14	809
TCS	12	<5.0	NC	NC	NC	NC	<2.1	<1.5	1983	<2.1	<1.5	NC	<2.1	<1.5	7969
MeP	33	21	NC	NC	NC	NC	28	23	<1.9	<1.5	25	NC	27	26	2201
EtP	8.2	31	NC	NC	NC	NC	12	4.2	<0.13	62	6.5	NC	23	<1.2	<0.13
PrP	10	6.3	NC	NC	NC	NC	<0.95	6.4	48	149	<0.35	NC	20	<0.35	<0.23
BeP	<1.0	1.3	NC	NC	NC	NC	<1.0	1.2	<0.78	<1.0	10	NC	<1.0	12	<0.78
OP	34	10	NC	NC	NC	NC	<2.9	62	318	77	<1.6	NC	13	<1.6	<0.20
NP	588	<0.30	NC	NC	NC	NC	448	79	10609	238	13	NC	1632	785	8990
NP1EC	1150	648	NC	NC	NC	NC	917	2606	<0.051	276	272	NC	1826	297	1380
OP2EO	58	43	NC	NC	NC	NC	50	41	<0.52	64	46	NC	64	46	<0.52
NP2EO	185	28	NC	NC	NC	NC	181	38	861	332	104	NC	204	125	<0.074
BPA	517	146	NC	NC	NC	NC	6520	84	106	122	<0.69	NC	352	358	<2.0
BT	823	805	NC	NC	NC	NC	442	565	<1.4	545	522	NC	454	589	<1.4
TT	2937	1145	NC	NC	NC	NC	3233	1552	122	2051	1141	NC	719	706	411
TBEP	1516	51	NC	NC	NC	NC	3515	182	140	1825	311	NC	584	79	1151
TCPP	1310	<0.063	NC	NC	NC	NC	1217	2798	457	1015	5295	NC	1193	1491	676
TCEP	244	200	NC	NC	NC	NC	199	518	<0.28	137	408	NC	141	139	15
Caff	31755	69	NC	NC	NC	NC	14029	113	410	37515	160	NC	24590	26	843

* Los compuestos EE2, DES, OP1EC, OP1EO y NP1EO no se detectaron en ninguna de las EDARs analizadas

** NC: No Colectada

Tabla BII.8.b Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuencas del Llobregat y Júcar, año 2011, en ng/L y ng/g, respectivamente

Compuesto	MAN7			ABR8			IGU9			CUE10			ALZ11		
	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo
E2	<5.4	<0.59	<38	<5.4	9	<38	<5.4	<0.59	NC	<5.4	<0.59	<38	<5.4	<0.59	<38
E1	21	11	<2.2	<0.14	20	<2.2	68	10	NC	<0.14	15	<2.2	51	17	<2.2
E3	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	NC	<3.1	<2.3	23	<3.1	<2.3	<9.6
E1-3S	<0.35	<0.21	<0.095	<0.35	<0.21	<0.095	<0.35	<0.21	NC	<0.35	18	<0.095	14	<0.21	12
E3-3S	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	<0.75	NC	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19
E2-17G	<4.2	82	41	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	NC	<4.2	100	<0.58	<4.2	<2.9	23
E1-3G	<3.1	38	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	NC	<3.1	16	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86
E3-16G	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	NC	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74
TCC	<0.18	<0.14	172	<0.18	<0.14	425	<0.18	<0.14	NC	<0.18	<0.14	964	<0.18	<0.14	<0.13
TCS	<2.1	<1.5	5173	73	<1.5	6928	102	<1.5	NC	<2.1	<1.5	6273	<2.1	<1.5	8851
MeP	49	<0.59	557	<1.5	<0.59	403	111	<0.59	NC	<1.5	<0.59	702	134	<0.59	457
EtP	41	<1.2	<0.13	<1.4	<1.2	<0.13	46	<1.2	NC	<1.4	<1.2	<0.13	142	7.0	<0.13
PrP	11	<0.35	39	263	<0.35	34	97	<0.35	NC	97	<0.35	38	54	15	13
BeP	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	<0.12	NC	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	10	<0.78
OP	<2.9	<1.6	<0.20	<2.9	<1.6	<0.20	64	<1.6	NC	54	<1.6	<0.20	39	<1.6	<0.20
NP	644	102	43816	328	<0.30	8400	444	<0.30	NC	519	42	5353	293	19	22050
NP1EC	343	519	3833	653	564	1773	682	274	NC	153	124	478	235	326	9808
OP2EO	25	1	<0.52	<0.20	<0.092	<0.52	28	17	NC	63	3.0	<0.52	13	7.9	<0.52
NP2EO	531	82	2040	419	65	795	353	255	NC	803	80	<0.074	536	130	490
BPA	<1.4	658	412	988	60	<2.0	1038	77	NC	670	30	<2.0	348	94	408
BT	5529	3821	280	<0.54	<0.16	<1.4	1572	960	NC	785	768	<1.4	2685	1326	<1.4
TT	4573	2562	205	5728	6098	531	6717	2786	NC	2090	1757	533	2346	1476	74
TBEP	6340	58	714	4494	364	516	4750	<0.053	NC	3754	26	1697	1704	2079	1070
TCPP	2285	1004	686	1053	1145	586	1825	1406	NC	1321	1505	988	2474	1525	1859
TCEP	16	79	<0.28	38	9.4	<0.28	45	59	NC	19	53	<0.28	<0.36	10	<0.28
Caff	64568	37	287	59823	1222	60	43981	2758	NC	74192	569	<0.070	10468	2249	525

* Los compuestos EE2, DES, OP1EC, OP1EO y NP1EO no se detectaron en ninguna de las EDARs analizadas

Tabla BII.9.a Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuenca del Guadalquivir, año 2010, en ng/L y ng/g, respectivamente

Compuesto	COR12			LOJ13			MORP14			SEV15			SEV16		
	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo
E2	<5.4	<0.59	<38	<5.4	8.7	<38	<5.4	5.8	<38	<5.4	<0.59	<38	<5.4	8.4	<38
E1	<0.14	<0.14	<2.2	<0.14	13	<2.2	21	3.1	<2.2	<0.14	<0.14	<2.2	14	7.3	<2.2
E3	26	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	92	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6
E1-3S	<0.35	<0.21	<0.095	<0.35	<0.21	<0.095	14	6	<0.095	<0.35	<0.21	<0.095	6	5	<0.095
E3-3S	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	32	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19
E2-17G	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	<0.58
E1-3G	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86
E3-16G	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	6	<0.74
TCC	<0.18	<0.14	63	<0.18	<0.14	<0.13	<0.18	<0.14	97	<0.18	<0.14	202	<0.18	<0.14	152
TCS	<2.1	<1.5	5513	<2.1	<1.5	4630	5	<1.5	2530	<2.1	<1.5	13268	<2.1	<1.5	<1.1
MeP	54	<0.59	515	<1.5	<0.59	515	139	53	290	<1.5	<0.59	339	33	43	649
EtP	168	<1.2	<0.13	<1.4	7.4	<0.13	45	4.5	<0.13	<1.4	<1.2	<0.13	20	7.9	<0.13
PrP	680	<0.35	91	33	<0.35	30	127	22	68	137	164	39	61	17	<0.23
BeP	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	10	<0.78	<3.5	61	<0.78	<1.0	12	<0.78	<3.5	15	<0.78
OP	91	<1.6	118	<2.9	<1.6	<0.20	16	30	<0.20	407	<1.6	<0.20	33	23	<0.20
NP	622	586	7524	633	62	2283	478	163	8543	999	774	67625	61	<0.30	5990
NP1EC	133	497	445	1540	2159	288	535	203	7221	155	263	20675	1248	408	673
OP2EO	5	49	<0.52	18	31	<0.52	43	42	<0.52	45	72	<0.52	34	45	186
NP2EO	154	49	<0.074	155	26	493	62	34	359	385	103	688	60	104	435
BPA	259	720	<2.0	362	242	<2.0	190	55	32	653	446	433	476	80	<2.0
BT	6405	560	<1.4	146	39	<1.4	321	207	<1.4	5497	1504	<1.4	3149	987	<1.4
TT	2645	1766	137	433	204	332	1280	1273	465	2545	1377	86	1735	1258	167
TBEP	1136	786	1123	508	76	959	332	204	933	2396	1828	2414	715	398	206
T CPP	379	2819	431	159	790	1329	344	1922	433	1077	1355	666	3429	11067	500
TCEP	64	142	<0.28	26	111	<0.28	42	122	<0.28	113	182	<0.28	94	384	<0.28
Caff	46321	1048	132	24161	55	251	34979	75	497	86305	11469	<0.070	27204	47	30

* Los compuestos EE2, DES, OP1EC, OP1EO y NP1EO no se detectaron en ninguna de las EDARs analizadas

Tabla BII.9.b Niveles de concentración de los EDCs y compuestos relacionados estudiados en los afluentes, efluentes y lodos de depuradora estudiados, cuenca del Guadalquivir, año 2011, en ng/L y ng/g, respectivamente

Compuesto	COR12			LOJ13			MOR14			SEV15			SEV16		
	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo	Afluente	Efluente	Lodo
E2	<5.4	<0.59	<38	<5.4	<0.59	<38	<5.4	<0.59	<38	<5.4	<0.59	<38	<5.4	<0.59	<38
E1	137	35	<2.2	12	9.1	7.9	<0.14	<0.14	8	<0.14	26	<2.2	47	27	<2.2
E3	<3.1	<2.3	177	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6	<3.1	<2.3	<9.6
E1-3S	<0.35	<0.21	<0.095	<0.35	<0.21	<0.095	21	<0.21	<0.095	27	30	<0.095	25	<0.21	<0.095
E3-3S	<0.99	<0.75	<0.19	<0.99	8	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19	48	<0.75	<0.19	<0.99	<0.75	<0.19
E2-17G	<4.2	<2.9	64	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	<0.58	<4.2	<2.9	<0.58
E1-3G	94	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86	<3.1	56	<0.86	<3.1	<0.96	<0.86
E3-16G	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74	<7.5	<2.0	<0.74
TCC	<0.18	<0.14	<0.13	<0.18	<0.14	95	<0.18	<0.14	205	<0.18	<0.14	<0.13	<0.18	<0.14	<0.13
TCS	135	17	995	<2.1	<1.5	1713	<2.1	<1.5	3061	<2.1	<1.5	11115	<2.1	<1.5	435
MeP	304	<0.59	410	8.0	<0.59	696	240	<0.59	360	135	<0.59	468	210	<0.59	308
EtP	83	5.7	<0.13	<1.4	6.2	<0.13	292	<1.2	<0.13	93	<1.2	<0.13	40	8.3	<0.13
PrP	209	<0.35	90	<0.94	<0.35	175	147	<0.35	74	232	<0.35	29	104	<0.35	33
BeP	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	<0.12	<0.78	<1.0	<0.12	<0.78
OP	113	<1.6	201	<2.9	<1.6	<0.20	<2.9	<1.6	<0.20	74	51	<0.20	<2.9	<1.6	323
NP	345	45	6185	40	161	3877	528	54	6815	317	58	14255	267	62	9738
NP1EC	108	193	395	43	23	178	94	215	886	69	232	12487	256	379	18707
OP2EO	44	0.6	<0.52	9	<0.092	<0.52	120	<0.092	<0.52	60	3	<0.52	114	8	496
NP2EO	451	25	<0.074	168	11	458	343	28	1336	319	23	460	301	87	871
BPA	1087	108	70	64	43	<2.0	8597	523	56	458	155	285	3139	202	408
BT	1067	313	<1.4	129	133	<1.4	2436	533	178	5008	2598	248	8072	1305	<1.4
TT	3584	2641	874	54	11	60	1683	2292	166	4377	2292	1984	4717	1870	464
TBEP	3050	842	1933	227	<0.053	397	13155	1588	819	5333	4974	1764	3567	618	275
TCPP	2119	1828	857	136	323	426	2554	1287	584	2010	1186	578	3040	447	1140
TCEP	6.4	4.6	<0.28	<0.36	<0.098	<0.28	<0.36	61	<0.28	72	22	<0.28	67	16	3.4
Caff	80630	242	<0.070	1023	185	160	7073	308	<0.070	115871	8499	34	105422	111	<0.070

* Los compuestos EE2, DES, OP1EC, OP1EO y NP1EO no se detectaron en ninguna de las EDARs analizadas

Tabla Bil.10.a Valores de estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en las cuencas del Ebro y Llobregat durante 2010 y 2011

EDAR	E2		E1		E3		Σ Estrog. Conj.		Σ Estrógenos		Otros compuestos		Σ Compuestos			
	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente		
Ebro	2010	PAM1	23	5.0	6.5	4.0	0.00	0.00	0.025	0.00	30	9.0	0.65	0.030	30	9.0
		LOG2	0.00	2.9	2.2	0.14	0.00	0.00	0.042	0.00	2.3	3.0	0.088	0.010	2.4	3.1
		TUD3	0.00	6.6	0.0	5.2	0.00	0.00	0.019	0.014	0.02	12	0.079	0.010	0.10	11.9
		ZAR4	0.00	4.5	3.6	0.36	0.00	0.00	0.017	0.00	3.6	4.9	0.021	0.013	3.6	4.9
		LLE5	0.00	5.5	2.9	1.1	0.00	0.00	0.00	0.00	2.9	6.7	0.079	0.00	3.0	6.7
		TOR6	24	4.3	10	0.32	0.00	0.00	0.021	0.00	35	4.7	0.018	0.00	35	4.7
	2011	PAM1	0.00	0.00	8.9	3.2	0.00	0.00	0.011	0.00	8.9	3.2	1.3	0.035	10	3.3
		LOG2	0.00	9.0	0.00	3.6	0.00	0.00	0.0085	0.014	0.0085	13	0.084	0.0094	0.092	13
		TUD3	0.00	0.00	7.1	0.00	0.00	0.00	0.023	0.0086	7.1	0.0086	0.060	0.053	7.2	0.062
		ZAR4	0.00	11	3.7	6.1	0.00	0.00	0.009	0.00	3.7	17	0.087	0.060	3.8	17
		LLE5	0.00	0.00	16	6.7	0.00	0.00	0.012	0.0053	16	6.7	0.046	0.0091	16	6.7
		TOR6	8.8	0.00	0.00	2.4	0.00	0.00	0.029	0.00	8.8	2.4	0.077	0.046	8.9	2.4
Frec. Det. (%)	Mín.	8.8	2.9	2.2	0.14	0.00	0.00	0.009	0.00	0.0085	0.0086	0.018	0.00	0.092	0.062	
	Máx.	24	11	16	6.7	0.00	0.00	0.042	0.014	35	17	1.3	0.060	35	17	
	Mediana	23	5.3	6.5	3.2	0.00	0.00	0.019	0.00	5.4	5.8	0.079	0.012	5.5	5.8	
Llobregat	2010	MAN7	0.00	7.6	1.6	0.13	0.00	0.00	0.026	0.00	1.6	7.7	0.076	0.0076	1.7	7.8
		ABR8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		IGU9	0.00	7.9	4.4	1.1	0.00	0.00	0.00	0.00	4.4	9.0	0.33	0.013	4.7	9.0
	2011	MAN7	0.00	0.0	5.5	2.8	0.00	0.00	0.00	0.52	5.5	3.3	0.058	0.039	5.5	3.4
		ABR8	0.00	9.3	0.00	5.3	0.00	0.00	0.00	0.031	0.0	15	0.087	0.00	0.087	15
		IGU9	0.00	0.00	18	2.7	0.00	0.00	0.00	0.00	18	2.7	0.054	0.00	18	2.7
	Frec. Det. (%)	Mín.	0	60	80	100	0	0	20	40	80	100	100	100	100	100
		Máx.	0.00	7.6	1.6	0.13	0.00	0.00	0.026	0.031	1.6	2.7	0.054	0.00	0.087	2.7
		Mediana	0.00	7.9	4.9	2.7	0.00	0.00	0.026	0.28	4.9	7.7	0.076	0.0076	4.7	7.8

Tabla Bil.10.b Valores de estrogenicidad expresada en EEQs (ng E2/L) en las distintas EDARs analizadas en las cuencas del Júcar y Guadalquivir durante 2010 y 2011

EDAR	E2		E1		E3		Σ Estrog. Conj.		Σ Estrógenos		Otros compuestos		Σ Compuestos			
	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente	EEQ (ng E2/L) Afluente	EEQ (ng E2/L) Efluente		
Júcar	2011	CUE10	0.00	0.00	0.00	2.4	0.00	0.00	0.0068	0.00	2.4	0.036	0.00	0.036	2.4	
		ALZ11	0.00	0.00	1.7	0.00	0.00	0.00	0.012	0.00	1.7	0.16	0.088	1.9	0.088	
		CUE10	0.00	0.00	0.00	3.9	0.00	0.00	0.00	0.65	0.00	4.5	0.082	0.0051	0.082	4.5
		ALZ11	0.00	0.00	13	4.6	0.00	0.00	0.019	0.00	13	4.6	0.046	0.0093	14	4.6
	Frec. Det. (%)	0	0	50	75	0	0	50	50	50	75	100	100	100	100	
	Mín.	0.00	0.00	1.7	2.4	0.00	0.00	0.012	0.0068	1.7	2.4	0.036	0.00	0.036	0.088	
	Máx.	0.00	0.00	13	4.6	0.00	0.00	0.019	0.65	13	4.6	0.16	0.088	14	4.6	
	Mediana	0.00	0.00	7.6	3.9	0.00	0.00	0.016	0.33	7.6	4.5	0.064	0.0072	0.99	3.5	
Guadalquivir	2010	COR12	0.00	0.00	0.00	0.00	1.5	0.00	0.00	0.00	1.5	0.10	0.084	1.6	0.08	
		LOJ13	0.00	8.7	0.00	3.6	0.00	0.00	0.00	0.0089	0.00	12	0.074	0.019	0.074	12
		MOR14	0.00	5.8	5.6	0.83	0.00	0.00	0.020	0.0083	5.6	6.6	0.058	0.034	5.7	6.7
		SEV15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.10	0.13	0.10
		SEV16	0.00	8.4	3.7	1.9	0.00	0.00	0.009	0.0068	3.7	10	0.031	0.0089	3.7	10
	2011	COR12	0.00	0.00	36	9.2	0.00	0.00	0.026	0.00	36	9.2	0.093	0.0088	36	9.2
		LOJ13	0.00	0.00	3.1	2.4	0.00	0.00	0.00	0.00	3.1	2.4	0.0065	0.016	3.1	2.4
		MOR14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.029	0.00	0.03	0.00	0.44	0.028	0.47	0.028
		SEV15	0.00	0.00	0.00	6.8	0.00	0.00	0.052	0.057	0.05	6.9	0.063	0.013	0.11	6.9
		SEV16	0.00	0.00	13	7.2	0.00	0.00	0.035	0.00	13	7.2	0.17	0.015	13	7.2
		Frec. Det. (%)	0	30	50	70	10	0	60	40	80	70	100	100	100	100
		Mín.	0.00	5.8	3.1	0.83	1.5	0.00	0.0090	0.0068	0.029	2.4	0.0065	0.009	0.074	0.028
		Máx.	0.00	8.7	36	9.15	1.5	0.00	0.052	0.057	36	12	0.44	0.10	36	12
		Mediana	0.00	8.4	5.6	3.6	1.5	0.00	0.028	0.009	3.4	7.2	0.083	0.02	2.3	6.8

Anexo C

Lista de publicaciones y participaciones a congresos

Anexo CI: Publicaciones descritas o resumidas en la tesis

Publicación científica 1: *Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry.* Gorga M., Petrovic M., Barceló D. *Journal of Chromatography A* (2013); 1295: 57-66.

Publicación científica 2: *Analysis of endocrine disruptors and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Gorga M., Insa S., Petrovic M., Barceló D. *Journal of Chromatography A* (2014); 1352: 29-37.

Publicación científica 3: *Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers.* Gorga M., Insa S., Petrovic M., Barceló D. *Science of the Total Environment* (2015); 503-504: 69-86.

Propuesta de publicación científica 4: *Occurrence and fate of EDCs and related compounds in wastewaters and sewage sludge in principals WWTPs of Iberian rivers (No publicada)*

Publicación científica 5: *Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain.* Esteban S., Gorga M., Petrovic M., González-Alonso S., Barceló D., Valcárcel Y. *Science of The Total Environment* (2014); 466–467: 939–951.

Publicación científica 6: *Monitoring endocrine disrupting compounds and estrogenic activity in tap water from Central Spain.* Esteban S., Gorga M., González-Alonso S., Petrovic M., Barceló D., Valcárcel Y. *Environmental Science and Pollution Research* (2014); 21: 9297-9310.

Publicación científica 7: *Determining the presence of chemicals with suspected endocrine activity in drinking water from the Madrid region (Spain) and assessment of their estrogenic, androgenic and thyroidal activities.* Valcárcel Y., Valdehíta A., Becerra E., López de Alda M., Gil A., Gorga M., Petrovic M., Barceló D., Navas JM. *Chemosphere* (2018); 201: 388-398.

Publicación científica 8: *Presence of endocrine disruptors in freshwater in the northern Antarctic Peninsula region.* Esteban S., Moreno-Merino L., Matellanes R., Catalá M., Gorga M., Petrovic M., López de Alda M., Barceló D., Durán J., López-Martínez J., Valcárcel Y. *Environmental Research* (2016); 147: 179–92.

Publicación científica 9: *Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds.* Cruz-Morató C., Lucas D., Llorca M., Rodríguez-Mozaz S., Gorga M., Petrovic M., Barceló D., Vicent T., Sarrà M., Marco-Urrea E. *Science of The Total Environment* (2014); 493: 365-376.

Anexo CII: Otras publicaciones en que se participó durante la tesis

- *Is reproduction of the snail Physella acuta affected by endocrine disrupting compounds? An in situ bioassay in three Iberian basins.* De Castro-Català N.; López-Doval, J.; [Gorga, M.](#); Petrovic, M.; Muñoz, I. Journal of Hazardous Materials (2013); [263, Part 1](#): 248–255.

- *Transcriptomic, biochemical and individual markers in transplanted Daphnia magna to characterize impacts in the field.* Rivetti C.; Campos B.; Faria M.; De Castro Català N.; Malik A.; Muñoz I.; [Tauler R.](#); Soares A.; Osorio V.; Pérez S.; [Gorga M.](#); Petrovic M.; Mastroianni N.; López de Alda M.; Masiá A.; Campo J.; Picó Y.; Guasc H.; [Barceló D.](#); Barata C. Science of The Total Environment (2015); 503-504:200-212.

Anexo CIII: Participaciones a congresos

Presentaciones orales (como oradora):

- *Anàlisi LC-MS/MS de disruptors endocrins en aigües de riu i depuradora mitjançant un sistema d'injecció automatitzat.* [Gorga, M.](#); Petrovic, M.; Barceló, D.

VII Trobada de Joves Investigadors dels Països Catalans. Lugar y fecha de celebración: Palma de Mallorca, España, 16-17 Febrero, 2012.

- *Determination of endocrine disruptors and related compounds in river sediments by Turbulent-Flow Chromatography-LC-MS/MS.* [Gorga, M.](#); Petrovic, M.; Barceló, D.

8th Annual LC-MS/MS workshop on environmental applications and food safety. Lugar y fecha de celebración: Barcelona, España, 2-4 Julio, 2012.

- *Occurrence and fate of EDCs and related compounds in wastewater treatment using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry.* [Gorga, M.](#); Petrovic, M.; Barceló, D.

XIII Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. Lugar y fecha de celebración: Tenerife, España, 8-11 Octubre, 2013.

- *Methodological challenges for the determination of endocrine disruptor compounds in the environment. Comparison of different analytical strategies.* [Gorga, M.](#); Huerta, B.; Rodríguez-Mozaz, S.; Petrovic, M.; Barceló, D.

4th SCARCE International Conference. Lugar y fecha de celebración: Cádiz, España, 25-26 Noviembre, 2013.

Presentaciones orales (como co-autora del orador)

- *Levels and spatial distribution of emerging contaminants in the Iberian rivers.* Petrovic, M.; [Gorga, M.](#); Osório, V.; Pérez, S.; Barceló, D.

SCARCE 2nd Annual Conference. Lugar y fecha de celebración: Madrid, España, 28-29 Noviembre, 2011.

- *Is reproduction of the snail Physella acuta affected by EDCs? An in situ bioassay in SCARCE basins.* De Castro-Català N.; López-Doval J.C.; Petrovic M.; Gorga M.; Muñoz I.
3rd SCARCE International Conference. Lugar y fecha de celebración: Valencia, España, 26-27 Noviembre, 2012.

- *Recent advances in on-line sample preparation methods coupled to LC-tandem MS for the analysis of emerging contaminants in environmental samples.* Petrovic M.; Gorga M.; Lopez-Serna R.; Barceló D.
19th International Symposium on Separation Sciences - New Achievements In Chromatography, Poreč, Croatia. Lugar y fecha de celebración: Poreč, Croatia, 25-28 Septiembre, 2013.

- *Uptake and Bioaccumulation of Endocrine Disruptors and Pharmaceutical compounds in Biofilm, Macroinvertebrates, and Fish in four Mediterranean Rivers.* Huerta B.; Osorio V.; Gorga M.; Jakimska A.; de Castro N.; Ponsati L.; Muñoz I.; Sabater S.; Pérez S.; Petrovic M.; Rodríguez-Mozaz S.; Damià Barceló D.
4th SCARCE International Conference. Lugar y fecha de celebración: Cádiz, España, 25-26 Noviembre, 2013.

Presentaciones póster

- *Multi-residue level determination of endocrine disruptors and related compounds in rivers of the Iberian Peninsula.* Gorga, M.; Petrovic, M.; Barceló, D
SCARCE 2nd Annual Conference. Lugar y fecha de celebración: Madrid, España, 28-29, Septiembre 2011.

- *Endocrine disruptors and related compounds in rivers of Iberian Peninsula.* Gorga, M.; Petrovic, M.; Barceló, D.
3rd SCARCE International Conference. Lugar y fecha de celebración: Valencia, España, 26-27 Noviembre, 2012.

- *Different approaches for the online determination of endocrine disruptors and related compounds in water samples by EQuan™ and Turbulent-Flow™ Chromatography-LC-MS/MS.* Gorga, M.; Petrovic, M.; Barceló, D.
VI Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas. Lugar y fecha de celebración: Úbeda, España, 18-19, Junio 2013.

- *Determination of endocrine disruptor compounds in water samples. Comparison between EQuan™ direct injection technology versus turbulent flow chromatography followed liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Gorga, M.; Petrovic, M.; Barceló, D.
10th Annual LC-MS/MS Workshop on environmental applications and food safety. Lugar y fecha de celebración: Barcelona, España, 1-3, Julio

